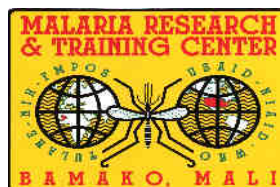


**Ministère des Enseignements
Secondaire, Supérieur et de la
Recherche Scientifique**

**République du Mali
Un Peuple – Un But – Une Foi**



FACULTÉ DE MÉDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTO – STOMATOLOGIE

Année universitaire 2007- 2008

Thèse N °...../M

TITRE

ETUDE DE L'INFECTIVITE DE *PLASMODIUM BERGHEI* ET *PLASMODIUM FALCIPARUM* CHEZ *ANOPHELES GAMBIAE S.S.*

THESE

**Présentée et soutenue publiquement le....21..../....06..../....2008
Devant la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie**

Par

M. Madjou SACKO

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

JURY

Président : Professeur Amagana DOLO

Membre : Docteur Mamadou B. COULIBALY

Co-directeur : Docteur Djibril M. SANGARE

Directeur : Professeur Sékou F. TRAORE



LISTE ACADEMIQUE

FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTO-STOMATOLOGIE

ANNEE UNIVERSITAIRE 2007-2008

ADMINISTRATION

DOYEN: **Anatole TOUNKARA** - Professeur

1^{er} ASSESSEUR: **Drissa DIALLO** - MAITRE DE CONFERENCES

2^{ème} ASSESSEUR: **Sékou SIDIBE** - MAITRE DE CONFERENCES

SECRETAIRE PRINCIPAL: **Yénimégue Albert DEMBELE** - Professeur

AGENT COMPTABLE: **Mme COULIBALY Fatoumata TALL** - CONTROLEUR DES FINANCES

PROFESSEURS HONORAIRES

Mr Alou BA	Ophtalmologie
Mr Bocar SALL	Orthopédie - Traumatologie - Secourisme
Mr Souleymane SANGARE	Pneumo-phtisiologie
Mr Yaya FOFANA	Hématologie
Mr Mamadou L. TRAORE	Chirurgie Générale
Mr Balla COULIBALY	Pédiatrie
Mr Mamadou DEMBELE	Chirurgie Générale
Mr Mamadou KOUMARE	Pharmacognosie
Mr Ali Nouhoum DIALLO	Médecine interne
Mr Aly GUINDO	Gastro-entérologie
Mr Mamadou M. Keita	Pédiatrie
Mr Siné Bayo	Anatomie-Pathologie-Histoembryologie
Mr Sidi Yaya Simaga	Santé Publique
Mr Abdoulaye Ag RHALY	Médecine interne
Mr Boukassoum Haidara	Législation
Mr Boubacar Sidiki CISSE	Toxicologie
Mr Massa SANOGO	Chimie Analytique

LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT PAR D.E.R. & PAR GRADE

▪ **D.E.R. CHIRURGIE ET SPECIALITES CHIRURGICALES**

1. PROFESSEURS

Mr Abdel Karim KOUMARE	Chirurgie Générale
Mr Sambou SOUMARE	Chirurgie Générale
Mr Abdou Alassane TOURE	Orthopédie - Traumatologie
Mr Kalilou OUATTARA	Urologie
Mr Amadou DOLO	Gynéco Obstétrique
Mr Alhousseini Ag MOHAMED	ORL
Mme SY Assitan SOW	Gynéco-Obstétrique
Mr Salif DIAKITE	Gynéco-Obstétrique
Mr Abdoulaye DIALLO	Anesthésie-Réanimation
Mr Djibril SANGARE	Chirurgie Générale, Chef de D.E.R
Mr Abdel Kader TRAORE Dit DIOP	Chirurgie Générale

2. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Abdoulaye DIALLO	Ophtalmologie
Mr Gangaly DIALLO	Chirurgie Viscérale
Mr Mamadou TRAORE	Gynéco-Obstétrique
Mr Filifing SISSOKO	Chirurgie Générale
Mr Sekou SIDIBE	Orthopédie-Traumatologie
Mr Abdoulaye DIALLO	Anesthésie-Réanimation
Mr Tieman COULIBALY	Orthopédie-Traumatologie
Mme TRAORE J. THOMAS	Ophtalmologie
Mr Mamadou L. DIOMBANA	Stomatologie
Mme DIALLO Fatimata S. DIABATE	Gynéco-Obstétrique
Mr Nouhoum ONGOÏBA	Anatomie & Chirurgie Générale
Mr Sadio YENA	Chirurgie Générale
Mr Youssouf COULIBALY	Anesthésie-Réanimation

3. MAÎTRES ASSISTANTS

Mr Issa DIARRA	Gynéco-Obstétrique
Mr Samba Karim TIMBO	ORL
Mme TOGOLA Fanta KONIPO	ORL
Mr Zimogo Zié SANOGO	Chirurgie Générale
Mme Djenèba Doumbia	Anesthésie / Réanimation
Mr Zanafon OUATTARA	Urologie
Mr Adama SANGARE	Orthopédie- Traumatologie
Mr Sanoussi BAMANI	Ophtalmologie
Mr Doulaye SACKO	Ophtalmologie
Mr Ibrahim ALWATA	Orthopédie - Traumatologie
Mr Lamine TRAORE	Ophtalmologie
Mr Mady MAKALOU	Orthopédie/ Traumatologie
Mr Aly TEMBELY	Urologie
Mr Niani MOUNKORO	Gynécologie/ Obstétrique
Mr Tiémoko D. COULIBALY	Odontologie
Mr Souleymane TOGORA	Odontologie
Mr Mohamed KEITA	ORL
Mr Bouraïma MAIGA	Gynéco- Obstétrique
Mr yousouf SOW	Chirurgie Générale
Mr Djibo Mahamane DIANGO	Anesthésie - Réanimation
Mr Moustapha TOURE	Gynécologie
Mr Mamadou DIARRA	Ophtalmologie
Mr Boubacary GUINDO	ORL

▪ D.E.R. DE SCIENCES FONDAMENTALES

1. PROFESSEURS

Mr Daouda DIALLO	Chimie Générale & Minérale
Mr Amadou DIALLO	Biologie
Mr Moussa HARAMA	Chimie Organique
Mr Ogobara DOUMBO	Parasitologie- Mycologie
Mr Yénimégué Albert DEMBELE	Chimie Organique
Mr Anatole TOUNKARA	Immunologie
Mr Bakary M. CISSE	Biochimie
Mr Abdourahmane S. MAÏGA	Parasitologie
Mr Adama DIARRA	Physiologie
Mr Mamadou Koné	Physiologie

2. MAÎTRES DE CONFERENCES

Mr Amadou TOURE	Histoembryologie
Mr Flabou BOUGOUDOGO	Bactériologie- Virologie
Mr Amagana DOLO	Parasitologie Chef de D.E.R
Mr Mahamadou CISSE	Biologie
Mr Sékou F. M. TRAORE	Entomologie médicale
Mr Abdoulaye DABO	Malacologie, Biologie Animale
Mr Ibrahim I. MAÏGA	Bactériologie - Virologie

3. MAÎTRES ASSISTANTS

Mr Lassana DOUMBIA	Chimie Organique
Mr Mounirou Baby	Hématologie
Mr Mahamadou A THERA	Parasitologie - Mycologie
Mr Moussa Issa DIARRA	Biophysique
Mr Kaourou DOUCOURE	Biologie
Mr Bouréma KOURIBA	Immunologie
Mr Souleymane DIALLO	Bactériologie- Virologie
Mr Cheick Bougadari TRAORE	Anatomie- Pathologie
Mr Guimogo DOLO	Entomologie Moléculaire Médicale
Mr Mouctar DIALLO	Biologie/ Parasitologie
Mr Abdoulaye TOURE	Entomologie Moléculaire Médicale
Mr Boubacar TRAORE	Parasitologie- Mycologie
Mr Djibril SANGARE	Entomologie Moléculaire Médicale

4. ASSISTANTS

Mr Mangara M. BAGAYOKO	Entomologie Moléculaire Médicale
Mr Boubacar TRAORE	Immunologie
Mr BoKary Y. Sacko	Biochimie
Mr Mamadou Ba	Biologie, Parasitologie Entomologie médicale
Mr Moussa FANE	Parasitologie Entomologie
Mr Blaise DACKOOU	Chimie Analytique

▪ D.E.R. DE MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES

1. PROFESSEURS

Mr Mamadou K. TOURE	Cardiologie
Mr Mahamane MAÏGA	Néphrologie
Mr Baba KOUMARE	Psychiatrie, Chef de D.E.R.
Mr Moussa TRAORE	Neurologie
Mr Issa TRAORE	Radiologie
Mr Hamar A. TRAORE	Médecine Interne
Mr Dapa Aly DIALLO	Hématologie
Mr Moussa Y. MAIGA	Gastro-entérologie-Hépatologie
Mr Somita KEITA	Dermato-Léprologie
Mr Boubakar DIALLO	Cardiologie
Mr Toumani SiDIBE	Pédiatrie

2. MAÎTRES DE CONFERENCES

Mr Bah KEITA	Pneumo-Phtisiologie
Mr Abdel Kader TRAORE	Médecine Interne
Mr Siaka SIDIBE	Radiologie
Mr Mamadou DEMBELE	Médecine Interne
Mr Mamady KANE	Radiologie
Mr Saharé FONGORO	Néphrologie
Mr Bakoroba COULIBALY	Psychiatrie
Mr Bou DIAKITE	Psychiatrie
Mr Bougouzié SANOGO	Gastro-entérologie
Mme SIDIBE Assa TRAORE	Endocrinologie
Mr Adama D. KEITA	Radiologie
Mr Sounkalo DAO	Maladies Infectieuses

3. MAITRES ASSISTANTS

Mme TRAORE Mariam SYLLA	Pédiatrie
Mme Habibatou DIAWARA	Dermatologie
Mr Daouda K Minta	Maladies Infectieuses
Mr Kassoum SANOGO	Cardiologie
Mr Seydou DIAKITE	Cardiologie
Mr Arouna TOGORA	Psychiatrie
Mme Diarra Assétou SOUCKO	Médecine interne
Mr Boubacar TOGO	Pédiatrie
Mr Mahamadou TOURE	Radiologie
Mr Idrissa A. CISSE	Dermatologie
Mr Mamadou B. DIARRA	Cardiologie
Mr Anselme KONATE	Hépto-Gastro-Entérologie
Mr Moussa T. DIARRA	Hépto-Gastro-Entérologie
Mr Souleymane DIALLO	Pneumologie
Mr Souleymane COULIBALY	Psychologie
Mr Cheick Oumar GUINTO	Neurologie
Mr Mahamadou GUINDO	Radiologie

▪ D.E.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

1. PROFESSEURS

Mr Gaoussou KANOUTE	Chimie Analytique, Chef de D.E.R
Mr Ousmane DOUMBIA	Pharmacie Chimique
Mr Elimane MARIKO	Pharmacologie

2. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Drissa DIALLO	Matières médicales
Mr Alou KEITA	Galénique
Mr Benoît Yaranga KOUMARE	Chimie analytique
Mr Ababacar I. MAIGA	Toxicologie

3. MAÎTRES ASSISTANTS

Mme Rokia SANOGO	Pharmacognosie
Mr Yaya KANE	Galénique
Mr Saibou MAIGA	Législation
Mr Ousmane KOITA	Parasitologie Moléculaire
Mr Yaya COULIBALY	Législation

- **D.E.R. SANTE PUBLIQUE**

1. PROFESSEUR

Mr Sanoussi KONATE Santé Publique, **Chef de D.E.R**

2. MAÎTRE DE CONFERENCES

Mr Moussa A. MAÏGA Santé Publique
Mr Jean TESTA Sante publique
Mr Mamadou Souncalo TRAORE Sante Publique

3. MAÎTRES ASSISTANTS

Mr Adama DIAWARA Santé Publique
Mr Hamadoun SANGHO Santé Publique
Mr Massambou SACKO Santé Publique
Mr Alassane A. DICKO Santé Publique
Mr Mamadou Souncalo TRAORE Santé Publique
Mr Hammadoun Aly SANGO Santé Publique
Mr Seydou DOUMBIA Epidémiologie
Mr Samba DIOP Anthropologie Médicale
Mr Akory AG IKNANE Santé Publique

4. ASSISTANTS

Mr Oumar THIERO Biostatistique
Mr Seydou DIARRA Anthropologie Médicale

- **CHARGES DE COURS & ENSEIGNANTS VACATAIRES**

Mr N'Golo DIARRA Botanique
Mr Bouba DIARRA Bactériologie
Mr Salikou SANOGO Physique
Mr Boubacar KANTE Galénique
Mr Souleymane GUINDO Gestion
Mme DEMBELE Sira DIARRA Mathématiques
Mr Modibo DIARRA Nutrition
Mme MAÏGA Fatoumata SOKONA Hygiène du Milieu
Mr Mahamadou TRAORE Génétique
Mr Yaya COULIBALY Législation
Mr Lassine SIDIBE Chimie-Organique

- **ENSEIGNANTS EN MISSION**

Pr. Doudou BA Bromatologie
Pr. Babacar FAYE Pharmacodynamie
Pr. Lamine GAYE Physiologie
Pr. Mounirou CISSE Hydrologie
Pr. Amadou Papa DIOP Biochimie



DEDICACE

Je dédie ce travail

A ma mère **Feu Bandja Fofana**

Tu nous as quitté très tôt, mais ton souvenir toujours vivace dans mon cœur m'a soutenu tout au long de ce travail. Je te dédie ce modeste travail en témoignage de mon profond respect pour ton âme. Saches maman que je ne t'oublierais jamais. J'aurai souhaité que ce moment te trouves parmi nous mais le tout puissant en a décidé autrement.

Puisse ce travail, te faire plaisir dans ta dernière demeure. Dors en paix, Qu'Allah t'accorde comme tous les bons musulmans sa miséricorde. Amen!

- A mon père **Setigui Sacko**, chef de famille irréprochable, ce travail est le couronnement de tous les sacrifices que tu as consentis.

Ton souci primordial a toujours été la réussite de tes enfants. Que tes sacrifices, tes peines et tes privations trouvent leur récompense dans l'aboutissement de ce travail qui est aussi le fruit de ta persévérance, de ton courage et surtout de ta patience. Je voudrais à travers ce modeste travail, te rendre un hommage mérité et te dire combien je suis fier de l'éducation que tu nous as donnée. Puisse le Tout Puissant te garder longtemps encore parmi nous pour que tu puisses bénéficier de l'ombre de l'arbre que tu as si jalousement protégé et entretenu. Trouve ici l'expression de mon amour filiale et ma profonde reconnaissance.

- A **Awa Diaby**, mère de famille exemplaire, tu as été pour moi plus qu'une mère. Tes conseils ne m'ont jamais fait défaut pour me mettre sur la piste de la réussite. Ce travail n'est que le tien.

Trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

- A la mémoire de **mes grand parents** : Mariam Sacko, Dado Diakite, Idrissa Sacko, Mahamadou Fofana et Mama Camara

Les mots me manquent pour vous exprimer toute ma reconnaissance. Durant votre existence, vous n'avez ménagé aucun effort pour ma réussite. Je n'oublierai jamais vos conseils, vos bénédictions, vos privations et surtout vos sacrifices consentis à mon égard. Vous avez su m'inculquer les vertus du travail bien fait, l'amour du prochain et l'humilité. Ce travail vous est dédié en témoignage de mon profond respect pour vos âmes et en reconnaissance de votre affection. Dormez en paix Grand- parents et que le Tout Puissant vous accepte dans son paradis.

- **A mes frères et sœurs** : Bamoussa, Idrissa, Hamet Bandja, Ladji, Mahamadou (mama), Harouna, Amadou, Mahamadou (Mamadou Thiès), Bakary, Brehima, Almamy, N' youma, Mah Sitan, Mariam, Adam et Fatoumata, que ce travail soit pour nous un moteur de consolidation du lien de sang qui nous unit.



REMERCIEMENTS

A Dieu le tout Puissant, le Miséricordieux, le Maître des destins, pour m'avoir guidé et surtout assisté tout au long de mes études jusqu'à l'aboutissement de ce document. Qu'il affermit d'avantage mes pas pour le reste de mon existence.

Amen !

Je remercie très sincèrement toutes les personnes de bonne volonté qui de loin ou de près ont contribué tant soit peu, à la réalisation de ce travail. Cependant je ne saurai jamais énumérer de façon exhaustive les parents, amis, collaborateurs et maîtres qui m'ont apporté leurs soutiens moraux, matériels, et scientifiques tout au long de cette thèse. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude !

Mes remerciements vont à toute l'équipe du MRTC/ DEAP/ FMPOS et notamment:

A mes maîtres :

- Professeur Yeya T. Touré

Malgré votre éloignement, votre âme d'homme de science incontestable et méticuleux où la rigueur et la qualité vont de paire plane sur nous.

Veillez trouver, cher maître en ce travail, l'expression de ma très profonde admiration.

-Docteur Richard Sakai

-Docteur Touré Abdoulaye

-Docteur Djibril Sangaré

-Docteur Guimogo Dolo

-Docteur Seydou Doumbia

-Monsieur Ibrahim Baber

-Monsieur Alpha Seydou Yaro

-Monsieur Adama Dao

-Monsieur Nafo Sogoba

Chers maîtres les mots me semblent insuffisants pour exprimer l'estime que j'éprouve à votre égard.

Veillez trouver en ce travail l'expression de ma profonde gratitude

- A Mr Souleymane Karambé agent comptable du MRTC, sympathique et sociable. Je ne saurai assez dire combien vos attitudes m'ont marqué tout au long de ce travail. Votre sens du partage et surtout votre souci d'aider les autres font de vous un homme apprécié de tous. Trouvez ici mes sincères remerciements.

- **Au Professeur Kenneth Vernick**, pour votre aide à la réalisation de ce travail et les conseils que vous nous avez prodigués lors de votre séjour au Mali. Veuillez accepter ce travail comme le fruit de votre apport inestimable tout au long de sa réalisation.

- Au docteur **Touré Abdoulaye**, MD et PHD en entomologie et parasitologie médicale. Chef d'unité <<interaction Vecteur Parasite>> de la division entomologique du MRTC, Coordinateur régional de la lutte anti-vectorielle pour le centre O.M.D (Objectif du Millénaire pour le Développement) pour l'Afrique de l'Ouest et du centre.

Votre disponibilité, votre courage et votre clairvoyance forcent l'admiration des autres.

Veuillez accepter cher maître tous mes remerciements.

- A Boubacar Coulibaly et Mme Oumou Niaré, le temps passé à vos côtés m'a permis d'assimiler beaucoup de choses dans le cadre de ma thèse. Votre apport intellectuel et matériel, ainsi que vos conseils ne m'ont jamais fait défaut aux moments cruciaux. Votre simplicité, votre esprit d'équipe et votre disponibilité constante à aider ceux qui en ont besoin, font de vous des scientifiques admirables. Soyez rassurer de ma profonde reconnaissance.

- A mes aînés, mes collègues thésards et techniciens du MRTC : Dr Yaya Coulibaly, Dr Mamadou B. Touré, Dr Alpha Adamou, Dr Benoît Dembélé, Dr Danaya koné, Dr Boubacar Guindo, Dr Sibiri Samaké, Dr Mamoudou Maiga, Dr Brehima Diallo, Dr Sekou Coumaré, Dr Saidou Balam, Dr Housseyni Dolo, Dr Batenin Sacko, Dr Cheick O. Koné, Dr Souleymane Diarra, Dr Brehima Diakité, Dr Yaya Kassogué, Dr Dramane Sanogo, Amadou Guindo, Daouda Diallo, Massiriba Koné, Mariam Maiga, Siaka Y. Coulibaly, Chaka konaté, Assan Dolo, Binta Traoré, Mohamed Traoré, Amadou Sekou Traoré, Abdallah Diallo, Adama Sacko, Abdramane Fofana, Lamine Soumaoro, Michel Coulibaly, Moussa Sissoko, Moussa Diallo, Moussa Keita, Cheick Coulibaly et Boureima.

Ce travail est le fruit de vos efforts conjugués. Vos conseils et surtout votre abnégation ont permis la réalisation de ce document.

Je saisis cette opportunité pour vous faire part de mon estime et de ma reconnaissance.

Trouvez ici mes sincères remerciements.

- Aux informaticiens du laboratoire: Sidy Soumaré, Mady Diarra, Amadou Diallo et Mme Soumaré Salimata Sidibé.

Merci pour votre constante disponibilité.

- Aux chauffeurs du MRTC/DEAP

Mamadou Diallo, Abdoulaye Koné, Mamadou Keita, Moumouni Diallo, Yoro Sidibé, Moro Diakité, Mamadou Diarra, Ousmane Oueleguem et Samba Sidibé. Merci pour votre disponibilité et votre courtoisie.

- Aux manœuvres du laboratoire MRTC

Bemba Diarra, Noumou Mory Coulibaly et Abdoulaye Coulibaly.

- Aux enfants du village de Kenieroba.

- A mes oncles et à mes tantes :

Vous m'avez beaucoup soutenu à travers vos conseils, vos encouragements et vos bénédictions. Trouvez à travers ce modeste travail, l'expression de ma profonde reconnaissance et le témoignage de mon profond respect.

Que ce travail soit pour vous un motif de réconfort.

- A mon oncle **Lassana Sacko** et sa famille à Ségou

Vous avez été plus qu'un père pour moi, grâce à vous et au bon Dieu, j'ai pu franchir le cap du baccalauréat sans grande difficulté. J'ai admiré en vous un chef de famille responsable, soucieux de l'avenir de ses enfants. J'ai beaucoup bénéficié de vos conseils sans lesquels je n'aurai atteint ce niveau.

Que ce travail soit pour vous, l'expression de ma profonde gratitude et de ma sincère reconnaissance.

- A mon oncle **Kaba Oumar Sacko** et sa famille à Sabalibougou

J'ai apprécié votre sens d'aider les autres et surtout votre souci de partage. Vous m'avez beaucoup soutenu à travers vos conseils, vos encouragements et vos bénédictions.

Trouvez à travers ce modeste travail, l'expression de ma profonde reconnaissance et le témoignage de mon profond respect.

Que le Miséricordieux vous récompense, car lui seul en est capable.

- A mes **cousins et cousines**, que ce travail soit une source de renforcement de nos liens fraternels et familiaux.

- Aux **familles Sacko** à Nioro du sahel, Banamba, Mahina, Ségou, Kayes, Diéma, Kasséla, Banconi, Hippodrome, Lafiabougou, Sabalibougou et Quartier Mali.

- A mon oncle **Bandjougou Fofana** et sa famille à Mopti.

- A mon tonton **Ibrahima Sall** et famille à Kalaban Coura.

- A mon tonton **Cheicknè Diagouraga** et famille à Magnambougou.

- A mon tonton **Kanda Keita** et famille à Pelengana (Ségou).

- A mon tonton **Tidiane Bathily** et famille à Badalabougou.

- A **El Hadj Gakou** et famille à Nioro du sahel.

Sachez que ma réussite n'est que le résultat de vos bénédictions incessantes. Trouvez en ce travail un motif de consolation et ma profonde gratitude. Que le tout puissant vous gratifie de sa bonté inestimable dans le monde ici bas et à l'au delà. Amen !

- **A mes belles sœurs**

- **A mes neveux et nièces**

- **A l'association Sacko Wakané** notamment aux membres du bureau : Saloum, Abdoulaye (Choui), Abdrahmane, Harouna, Idrissa N° 2, Housseyni, Moussa, Cheick Oumar, Mahamadou (Mama), Mahamadou (labbe), faites en sorte que nous restions unis. Je prie le bon Dieu de consolider d'avantage nos relations et qu'ensemble, nous soyons un jour, source de bonheur et de fierté de nos parents.

- **Aux Présidents d'honneur** de l'association **Sacko Wakané**.

- **A Mamadou Boundy** et famille à Pelengana (Ségou)

- **A Habia Cissé** et famille à Pelengana (Ségou)

- **A mes amis d'enfance** : Je garderai toujours en souvenir les moments que nous avons passés ensemble. Que Le Tout Puissant nous garde aussi longtemps ensemble et qu'il guide nos pas sur le droit chemin !

-A mes amis Feu Antoine A. M. D. Sidibé et Feu Abdoul Fatah Traoré

Si j'étais maître des temps, j'allais prolonger vos jours parmi nous, mais devant la volonté et la puissance du bon Dieu je ne suis rien. Vous étiez comme des frères pour moi, sachez que je ne vous oublierai jamais. Ce travail est le votre. Dormez en paix.

- A mes Promotionnaires et amis (es) Moussa Togola, Bah Berthé, Seydou T. Traore, Seydou A. Maiga, Cheick A. K. A. Waigalo, Macky Traore, Boureima kodjo, N'faly Sacko, Adama Camara, Layes Touré, Alou Touré, Mamadou Cissouma Bakary Cissouma, Gada Coulibaly, Yacouba Kassambara, Lassina Coulibaly, Alpha Diakité, Abdrahamane Touré, Mahamadou Ouane, Adama Dembélé, Abdrahamane Mariko, Ousmane Diarra, Mana Simaga, Bougou Goita, Aly kodjo, Abdias Dougnon, Sadou Ongoïba, Sekou Oueleguem, Souleymane Dembélé, Mohamed Baby, Mahamadou Touré, Seriba Sidibé, Sékou Mallé, Ibrahim Diarra, Drissa Sidibé, René Diarra, Madou T. Koné, Hawa Traoré, Adam Traoré, Tenin Sanogo, Bintou Cissé, Tenin Oueleguem, Leyla, Gogo Diallo et Nana.

Vous avez toujours répondu à mes attentes. Je ne saurai vous remercier assez et j'implore le tout puissant qu'il exauce nos vœux de bonheurs et renforce d'avantage nos liens d'amitié.

- A mes cadets Luc Sidibé, Souhel Moulaye, Lassana Diallo, kafougo, Sidiki Traoré, Isaac Antibé, Adjaratou Dacko, Aicha Diallo, Binta Togola et Awa Sidibé.

- A mon locateur **Dounantié Coulibaly** et famille au point G, merci pour votre hospitalité.

- Aux travailleurs de la Cabine BBC, notamment à Mamoudou Dramé.

- Au Sphinx Club.

- A tous les joueurs de l'équipe de football de l'AS. Ko bèdon

- A tous les joueurs de l'équipe de football de la FMPOS.

- A tous les joueurs de l'équipe BENKADY FC.

- A tous les joueurs de l'équipe FC. Tabalon.

- A tous mes supporters et fans.

Merci à toutes et à tous.



HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

A notre maître et Président du jury

Professeur Amagana DOLO

Maître de conférences agrégé en parasitologie-mycologie à la FMPOS.

Chef de l'unité d'Immunologie au MRTC.

Cher maître c'est un grand honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury malgré vos multiples occupations.

Votre rigueur scientifique, votre amour pour le travail bien fait font de vous un maître exemplaire et témoigne aussi de l'importance que vous attachez à notre formation médicale.

Vos nombreuses tâches ne vous ont pas empêché d'apporter votre contribution à ce modeste travail.

Nous en sommes honorés et c'est l'occasion ici de vous dire infiniment merci et croyez en notre reconnaissance et notre grande admiration.

A notre maître et juge

Docteur Mamadou B. COULIBALY

Docteur en Pharmacie, PhD en entomologie médicale, chef de la section génomique et proteomique du MRTC.

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail malgré vos multiples occupations.

Nous avons apprécié vos qualités humaines et scientifiques tout au long de cette thèse.

Votre rigueur et votre amour pour le travail bien accompli ainsi que votre sens critique ont fait de vous un homme apprécié de tous.

Soyez rassuré de notre profond attachement et de notre entière confiance.

A notre maître et co-directeur de thèse

Dr Djibril M. SANGARE

PhD en parasitologie entomologie médicale, PhD en entomologie moléculaire

Chef de l'unité bioinformatique des vecteurs au MRTC.

Cher maître, vos critiques et suggestions ont été d'un apport inestimable pour la réalisation de ce document.

Nous avons apprécié 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.

A notre maître et directeur de thèse

Professeur Sékou Fantamady TRAORE

PhD en entomologie médicale,

Maître de conférences en entomologie médicale à la FMPOS.

Chef de la section entomologie du MRTC

Co-directeur du MRTC

Cher maître, nous vous remercions de la confiance que vous nous avez placée en nous proposant ce travail.

Vos 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 fiers d'être parmi vos élèves. Soyez rassuré, cher maître de notre profonde gratitude et de nos sincères remerciements.



LISTE DES ABREVIATIONS

Abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique

AG : (*gambiae*)

An.: *Anopheles*

AR: *arabiensis*

Bp: Base paire

Bti: *Bacillus thurigiensis israelensis*

cm: Centimètre

°C: Degré Celsius

ddl: Degré de liberté

DNTP: Dinotrotriphosphate

& : Et

FMPOS: Faculté de Médecine, Pharmacie et d'Odontostomatologie

GIS: Geographical information system

IDC : intervalle de confiance

X² : Khi carré

Km: kilomètre

M: Forme Mopti

Mgcl₂ : chlorure de magnésium

µl: microlitre

ml: Millimètre

µm: micromètre

mM: millimole

mn: minute

MRTC: Malaria Research and Training Center

ng/ml: nano gramme par millilitre

N : Nombre

N° : Numéro

OMS: Organisation mondiale de la Santé

P. : *Plasmodium*

PCR: Polymérase chaîne réaction

PNEP: Programme national d'éradication du paludisme

PNLP: Programme nationale de lutte contre le paludisme

% : Pourcentage

R.A.C.E: Recensement administratif à caractère électoral

S: Forme Savane

s.l : Sens large

s.s: Sens strict

Taq: Tacus aquaticus

T: temps

UN: Universel

UV: Ultraviolet

WHO: World Health Organisation



SOMMAIRE

Sommaire

1- INTRODUCTION	1
2- OBJECTIFS	4
3- GENERALITES	5
3-1- Parasites	5
3-1-1- Cycle biologique de <i>Plasmodium falciparum</i>	5
3-1-2- Cycle chez l'homme	5
3-1-2-1- Cycle exo érythrocytaire	6
3-1-2-2- Cycle érythrocytaire	7
3-1-3- Cycle chez l'anophèle	8
3-1-4- Cycle biologique de <i>Plasmodium berghei</i>	9
3-2- Le vecteur	11
3-2-1- L'œuf	11
3-2-2- La larve	12
3-2-3- La nymphe	13
3-2-4- L'adulte	14
3-3- Mécanismes de défense du moustique contre le parasite	17
3-4- Les méthodes de lutte contre le paludisme	20
3-4-1- La lutte contre le parasite	20
3-4-2- La lutte anti-vectorielle	20
3-4-2-1- La lutte anti-larvaire	20
3-4-2-1-1- La lutte biologique	21
3-4-2-1-2- La lutte physique	21
3-4-2-2- La lutte anti-adulte	23
3-4-2-3- Lutte génétique	24
4 - MATERIEL ET METHODES	25
4-1- Lieux d'étude : Kenieroba	25
4-1-1- Kenieroba	26
4-2- Justification du choix du lieu d'étude (Kenieroba)	28
4-3- Type d'étude	28

4-4- Période d'étude	28
4-5- Echantillonnage	29
4-6- Sélection des porteurs de gamétocytes	29
4-6-1- Sélection des porteurs de gamétocytes humains	29
4-6-1-1- Sensibilisation de la population	29
4-6-1-2- Sélection des familles	30
4-6-1-3- Organisation	30
4-6-1-4- L'équipe parasito- clinique	30
4-6-1-5- L'équipe entomologique	30
4-6-1-6- Le dépistage	30
4-6-2- Sélection des porteurs de gamétocytes animaux	32
4-6-3- Protocole d'infection des souris avec la souche PbGFR-CON de <i>Plasmodium berghei</i> (voire annexes).....	32
4-7- Elevage des moustiques	32
4-8- Infestations expérimentales	33
4-8-1- Infestation sur membrane	34
4-8-2- Détermination des charges oocystiques	35
4-9- Saisie et analyse des données	37
5- RESULTATS	38
5-1- Caractérisation des porteurs de gamétocytes humains et animaux	38
5-1-1- Caractérisation des porteurs de gamétocytes chez les enfants de 4 à 18 ans	38
5-1-2- Caractérisation des porteurs de gamétocytes chez les souris	39
5-2- Détermination des taux d'infections d' <i>Anopheles gambiae</i> s.s. en fonction de l'espèce plasmodiale	40
5-3- Détermination des charges oocystiques chez <i>An. gambiae</i> s.s. en fonction de l'espèce plasmodiale	42
5-4- Détermination de la prévalence des phénotypes d'oocystes chez <i>An. gambiae</i> s.s. en fonction de l'espèce plasmodiale	44

5-5- Comparaison des charges oocystiques d' <i>An. gambiae</i> s.s. en fonction de l'espèce plasmodiale et des phénotypes observés	48
5-6- Prévalence des charges oocystiques chez <i>An. gambiae</i> s.s. dans le cas des infections à phénotypes mixte	51
5-6-1- <i>Anopheles gambiae</i> s.s. infectés avec <i>P. berghei</i>	51
5-6-2- <i>Anopheles gambiae</i> s.s. infectés avec <i>P. falciparum</i>	51
6- COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS.....	52
- Caractérisation des porteurs de gamétocytes	52
- Comparaison des taux d'infection et des charges oocystiques chez les moustiques en fonction de l'espèce plasmodiale	52
- Comparaison des différents phénotypes oocystiques observés.....	53
7- CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	55
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	59
ANNEXES	

LISTE DES FIGURES ET PHOTOS

Figure 1: Cycle biologique du *Plasmodium*.

Figure 2: Cycle biologique d'un *Anophelinae*.

Figure 3: Carte du Mali indiquant le site d'étude (Kenieroba).

Figure 4: Comparaison des taux d'infection d'*An. gambiae* s.s. en fonction de l'espèce plasmodiale après infestation expérimentale sur membrane.

Figure 5: Fréquence des oocystes chez *An. gambiae* s.s. Infectés avec *P. berghei* et *Plasmodium falciparum*.

Figure 6: Prévalence des phénotypes d'oocystes chez *An. gambiae* s.s. infectés avec *Plasmodium berghei*.

Figure 7: Prévalence des phénotypes d'oocystes chez *An. gambiae* s.s. infectés avec *Plasmodium falciparum*.

Figure 8: Comparaison des phénotypes d'oocystes chez *An. gambiae* s.s. en fonction de l'espèce plasmodiale après infestation expérimentale sur membrane.

Photo1: Appareillage de l'infection sur membrane.

Photo2: Feeder contenant du Sang.

Photo 3: Estomac d'anophèle montrant des centaines d'oocystes. (WHO/TDR image collection)

Photo 4: Identification des espèces et formes moléculaires sur un gel d'agarose



INTRODUCTION

1- INTRODUCTION

Le paludisme ou malaria est une érythrocytopathie fébrile et hémolysante, dû à la présence et à la multiplication dans l'organisme humain d'une des espèces plasmodiales inféodées à l'homme. Sa transmission est assurée par un moustique hématophage du genre *Anopheles* (Gentilini, 1993).

Selon l'OMS (2003), près de 90 pays à travers le monde sont concernés par cette affection avec environ 2,2 milliards de personnes dans les zones à risque (soit près de 2/3 de la population mondiale). Chaque année 300 millions de cas, dont 90% en Afrique, sont à l'origine de plus d'un million de décès. Les enfants en dessous de 5 ans et les femmes enceintes sont les couches les plus vulnérables.

Au Mali, le paludisme constitue un problème majeur de santé publique et de développement, car il représente la première cause de morbidité et de mortalité avec des taux respectifs de 26,13% et 27,16 % (PNLP Mali rapport 2004).

Les principaux vecteurs de cette maladie au Mali sont *Anopheles gambiae s.l.* et *Anopheles funestus* (Touré et al, 1979). Les études de Touré et al, 1994 et 1998 ont montré qu'au Mali, *An. gambiae s.l.* est constitué par *An. arabiensis* et trois formes chromosomiques d'*An. gambiae s.s.* dénommées : Bamako, Mopti et Savane. (Favia et al en 2001, Fanello et al en 2002) ont reparti ces trois formes chromosomiques en deux formes moléculaires M (Mopti) et S (Bamako et Savane) par l'amplification de l'ADN ribosomal.

Les trois espèces plasmodiales du paludisme humain couramment rencontrées au Mali sont *P. falciparum*, *P. malariae* et *P. ovale*. Un seul cas de *P. vivax* a été décrit par Koïta en 1988 dans le nord du pays chez les populations leucodermes. *P. falciparum* au Mali représente 85-95% de la

formule parasitaire et provoque les formes graves et compliquées du paludisme [Koïta, 1988].

Face au fléau meurtrier et persistant du paludisme dans les pays tropicaux, et à l'échec des stratégies de lutttes antipaludiques (Resistance des parasites aux antipaludiques, des moustiques aux insecticides couramment utilisés), l'OMS encourage de plus en plus les efforts pour une meilleure compréhension de la biologie du moustique et de ses interactions avec le parasite dans la quête de nouvelles stratégies et outils de lutte. Les mécanismes de réponses anti-pathogène chez les moustiques constituent des cibles importants pour la mise au point de nouveaux moyens de lutte antipaludiques. L'infestation expérimentale est l'une des approches permettant d'évaluer cette réponse.

En 1992 au Cameroun, l'infestation expérimentale a permis de comparer l'infectivité d'*An. gambiae* par un plasma naturellement infecté dans une zone endémique et un plasma non immun (plasma d'européen) [Bert Mulder et *al*, 1992]. Le premier infectait moins que le dernier et ceci s'expliquerait par le fait que le sang du porteur naturellement infecté contiendrait des facteurs de blocage de la formation des oocystes.

En 1999, une autre étude réalisée au Mali sur la comparaison des deux méthodes d'infection (infestation sur membrane et sur humain) a permis, de démontrer que l'infestation sur membrane, bien qu'ayant une infectivité moindre (faible pourcentage oocystiques) est utilisable comme technique de substitution à la méthode directe (Coulibaly, 1999).

Dans les laboratoires d'Europe du Nord et aux Etats-Unis (zones non endémiques), l'indisponibilité permanente de la triade naturelle (*P. falciparum*, porteur de gamétocytes et d'*Anopheles gambiae*) pour les expériences répétitives (reproductibilité des résultats) fait que ces laboratoires utilisent d'autres types de plasmodies : *Plasmodiums* des rongeurs ou des oiseaux (modèle purement expérimental) pour générer des informations précieuses sur les interactions hôtes-parasites. La plupart de

nos connaissances actuelles sur les réponses des moustiques à l'infection plasmodiale a été obtenue à partir d'études de laboratoires, en utilisant *P. berghei* et différentes colonies d'*An. gambiae* s.s. (Aguilar et al, 2005). Actuellement il est nécessaire de savoir si les résultats générés par ces études sont comparables et transposables entièrement chez le modèle humain ou s'il ya un besoin d'ajustement. C'est dans ce cadre que nous avons mené la présente étude dont l'objectif est d'étudier la réponse anti-pathogène d'*An. gambiae* s.s. à l'infection avec *P. falciparum* et *P. berghei*.



OBJECTIFS

2- OBJECTIFS

2-1- Objectif général

Etudier sur le plan phénotypique la réponse anti-pathogénique d'*An. gambiae* s.s. à l'infection avec *P. berghei* et *P. falciparum*.

2-2- Objectifs spécifiques

- Déterminer les taux d'infection et les charges oocystiques d'*An. gambiae* s.s. en fonction de l'espèce plasmodiale.
- Déterminer les prévalences des phénotypes d'oocystes (normal et mélanisé) chez *Anopheles gambiae* s.s. en fonction de l'espèce plasmodiale.
- Comparer les taux d'infection d'*An. gambiae* s.s. en fonction de l'espèce plasmodiale.
- Comparer les phénotypes d'oocystes chez *An. gambiae* s.s. en fonction de l'espèce plasmodiale.



GENERALITES

3- GENERALITES

3-1- Parasites

Le *Plasmodium* est un parasite unicellulaire (protozoaire). Il existe des espèces qui ont été retrouvées chez l'homme et d'autres chez divers animaux. Ils sont transmis aux différents hôtes par la piqûre d'anophèle. *Plasmodium falciparum* est l'une des 4 espèces plasmodiales inféodées à l'homme.

Au Mali les vecteurs qui assurent sa transmission sont: *Anopheles gambiae s.l.* et *Anopheles funestus* (Gillies et De Meillon, 1968).

Plasmodium berghei est l'une des multiples espèces de parasite du paludisme qui infecte les mammifères autres que les humains (rongeurs). Le parasite *P. berghei* a été découvert en 1948 au Katanga (Congo) (Vincke *et al*, 1948). Ce parasite est transmis par *Anopheles durenii* à des rongeurs (*Thammomys surdaster*) (Mouchet *et al*, 2004). C'est un parasite qui est bien adapté aux souris de laboratoire, et présente de nombreux avantages. L'intérêt de ce parasite est qu'il est un bon modèle d'organisme pratique pour des études expérimentales du paludisme humain au laboratoire.

Le cycle biologique du *Plasmodium* se divise en trois phases. Une se déroule chez le moustique (cycle sporogonique) et deux chez l'hôte humain ou animal: cycle érythrocytaire (dans les cellules sanguines) et cycle exo-érythrocytaire (hors des cellules sanguines)

3-1-1- Cycle biologique de *Plasmodium falciparum*

3-1-2- Cycle chez l'homme

La multiplication du parasite est asexuée. Au cours du repas sanguin, l'anophèle femelle infectée inocule à l'homme des centaines voire des milliers de sporozoïtes. Ces sporozoïtes fusiformes sont des formes parasitaires de 15µm de long sur 1 à 2µm de large. Ils ne restent dans la

circulation sanguine qu'une demi-heure et gagnent rapidement le foie où va commencer le cycle exo érythrocytaire ou (intra hépatique).

3-1-2-1- Cycle exo érythrocytaire

Les sporozoïtes pénètrent dans les hépatocytes où ils se « cachent » sous le nom de cryptozoïtes. Après 40 à 50 heures, ces cryptozoïtes subissent une multiplication asexuée (schizogonie intra hépatique) aboutissant à la formation du « corps bleu » schizonte de 30 à 70µm de diamètre. Les schizontes murs peuvent contenir 10.000 à 30.000 noyaux autour desquels s'individualisent des fragments de cytoplasme aboutissant à la formation des mérozoïtes qui sont libérés dans la circulation sanguine par éclatement des hépatocytes infectés.

Certains cryptozoïtes peuvent rester quiescents pendant un temps variable (quelques mois à plusieurs années). Il y aurait ainsi deux populations de sporozoïtes, les uns évoluant immédiatement jusqu'au stade schizonte intrahépatique et les autres appelés hypnozoïtes restants « endormis » dans les hépatocytes. *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium malariae* sans doute ne comportent ni hypnozoïtes ni schizogonie tissulaire secondaire.

Ces hypnozoïtes sont responsables de reviviscence schizogoniques dans le cas de *Plasmodium ovale* et *Plasmodium vivax*.

La durée du cycle pré érythrocytaire est en moyenne de 8 jours pour *Plasmodium vivax*, 6 jours pour *Plasmodium falciparum*, 13 jours pour *Plasmodium malariae* et 9 jours pour *Plasmodium ovale* (<http://lozere.org/perso/malaria/parasit.htm>).

3-1-2-2- Cycle érythrocytaire

Après leur libération dans la circulation sanguine, les mérozoïtes hépatiques vont rapidement envahir les érythrocytes et initier le stade sanguin. Une fois entré, le mérozoïte va se transformer en anneau, caractérisé par un cytoplasme très fin entourant la vacuole parasitophore. Ensuite le cytoplasme s'épaissit et le parasite augmente de taille. A ce stade, appelé trophozoïte, apparaissent des grains de pigment dans le cytoplasme, qui résultent de la dégradation de l'hémoglobine en hémozoïne. Ce trophozoïte entame une série de mitoses jusqu'à la formation d'un schizonte mature (rosace) qui éclate en rompant la membrane du globule rouge pour libérer, selon l'espèce, de 8 à 32 mérozoïtes. Ces derniers peuvent ensuite envahir d'autres érythrocytes. La durée de maturation au cours du cycle endoérythrocytaire est une caractéristique de chaque espèce plasmodiale. Chaque cycle érythrocytaire dure 48 heures pour *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* ou *Plasmodium falciparum* et 72 heures pour *Plasmodium malariae*, rythmant ainsi les accès thermiques (fièvres tierces pour les premiers cas, quarte dans le second) (<http://lozere.org/perso/malaria/parasit.htm#HOM>).

Dans le sang s'amorce enfin le cycle sexué ou sporogonique. Après plusieurs cycles schizogoniques, certains trophozoïtes vont être détournés du cycle érythrocytaire pour former des éléments à potentiel sexué (mâle et femelle), les gamétocytes, première étape d'une phase sexuée chez l'hématozoaire. A maturité, les gamétocytes restent dans le sang périphérique de l'homme ; c'est un stade bloqué (<http://lozere.org/perso/malaria/parasit.htm#HOM>).

Les gamétocytes ne vont continuer leur cycle de développement que s'ils sont ingérés par un anophèle femelle lors d'un repas sanguin sur un paludéen.

3-1-3- Cycle chez l'anophèle

- Cycle sporogonique

L'infection d'un anophèle femelle commence lors d'un repas sanguin pris sur un homme impaludé porteur de gamétocytes. Si d'autres stades parasites sont ingérés par l'anophèle, ils sont tués et digérés. Seuls les gamétocytes assurent la poursuite du cycle.

Dans l'estomac du moustique, les gamétocytes mâles se transforment en gamètes mâles par exflagellation, processus de bourgeonnement de flagelles (jusqu'à huit, mais ordinairement de quatre à six), qui se détachent du corps du gamétocyte mâle activé et qui constituent autant de microgamètes. Les gamétocytes femelles se transforment en gamètes femelles ou macrogamètes par expulsion de corpuscules chromatinien. Toutes ces transformations interviennent une dizaine de minutes après la prise du repas sanguin. Le gamète mâle se déplace par ses propres mouvements, rencontre un gamète femelle puis pénètre dans ce dernier. La rencontre va aboutir à la formation d'un zygote dans la demi-heure suivant la piqûre. Le zygote se transforme en ookinètes allongé et mobile puis en oocyste.

A l'intérieur de cet oocyste se formera plusieurs sporoblastes, dans lesquels se formeront des sporozoïtes. Au bout d'environ 10 jours, ces sporozoïtes perforeront la coque de l'oocyste avant de passer dans l'hémolymphe pour aboutir au niveau des glandes salivaires, l'anophèle femelle devient ainsi infectante.

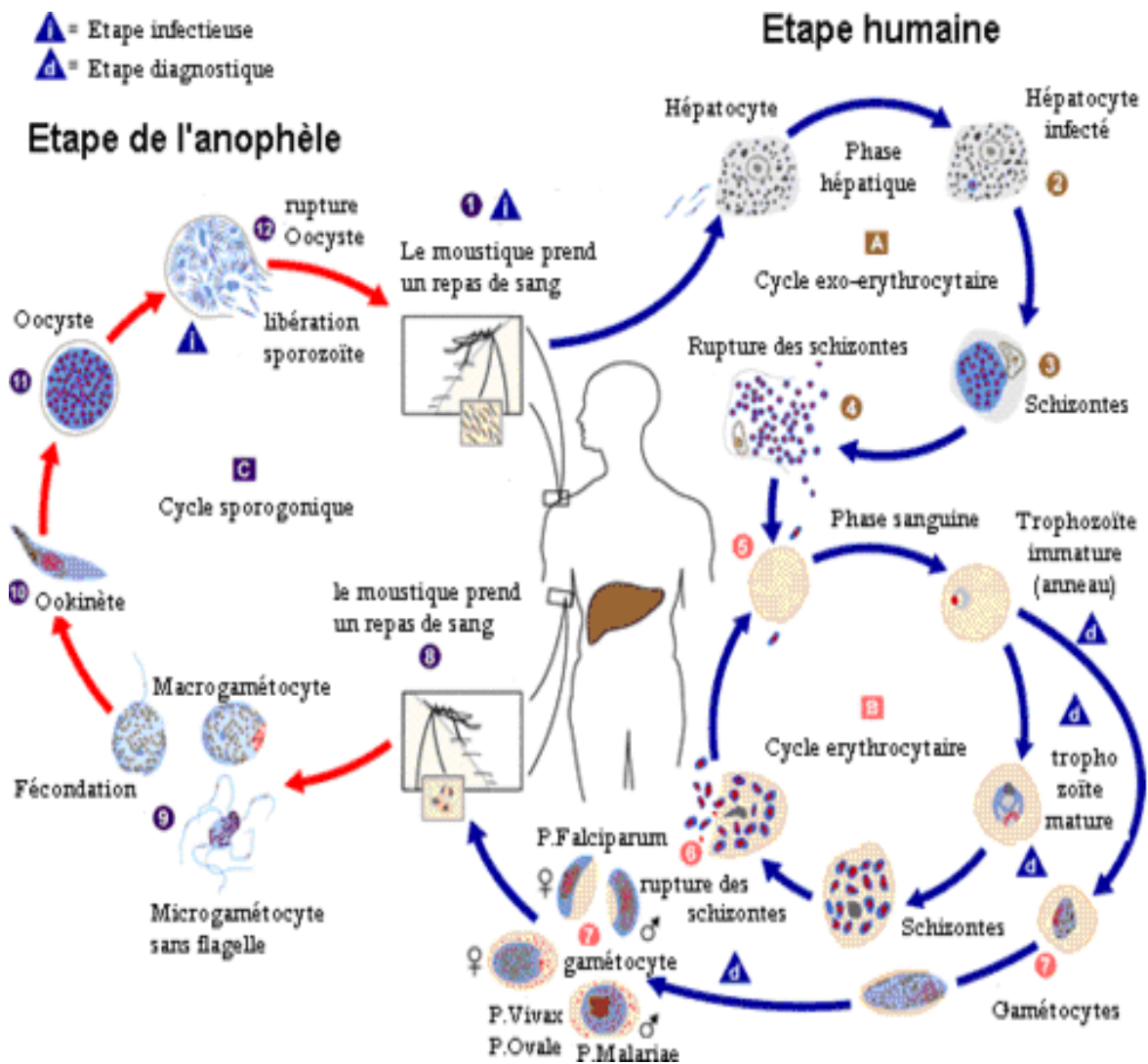


Figure 1 : Cycle biologique du *Plasmodium*

Source: http://www.uni-tuebingen.de/modeling/Mod_Malaria_Cycle_fr.html

3-1-4-Cycle biologique de *Plasmodium berghei*

Comme tous les parasites du paludisme humain, incluant les quatre parasites du paludisme humain, *P. berghei* est transmis par les anophèles et il infecte le foie après avoir été injecté dans la circulation sanguine par suite d'une piqûre. Après une courte période (quelques jours) de développement et de multiplication, ces parasites quittent le foie et envahissent les érythrocytes (globules rouges).

La multiplication de ces parasites dans le sang cause des pathologies telles que l'anémie et la destruction des organes essentiels de l'hôte tels que les poumons, le foie, la rate. Les infections de *P. berghei* peuvent aussi affecter le cerveau et peuvent causer des complications cérébrales chez les souris de laboratoire. Ces symptômes sont à un certain degré comparable aux symptômes du paludisme cérébral des personnes infectés par *Plasmodium falciparum*.

Cependant il existe quelques petites différences par exemple le fait que *P. berghei* a une préférence pour les réticulocytes pour son développement.

3-2- Le vecteur

Le vecteur du paludisme est un moustique du genre *Anopheles*. Son développement est caractérisé par la succession de deux phases : la première est aquatique et recouvre la vie pré imaginaire, c'est-à-dire l'œuf, les stades larvaires et la nymphe. La seconde est aérienne et concerne l'adulte, ou imago.

Les anophèles appartiennent à : l'embranchement des arthropodes, à la classe des insectes, à l'ordre des diptères, à la famille des culicidés ou moustiques vrais, à la sous famille des *Anophelinae* et au genre *Anopheles* (Hamon et al, 1961). Les mâles et les femelles se nourrissent de jus sucrés, nectars et autres exsudats végétaux. Le mâle est incapable de perforer la peau d'un vertébré. Seule la femelle est hématophage.

Les mâles fécondent les femelles qui prennent un ou plusieurs repas de sang (selon les espèces) et vont pondre dans les gîtes les plus proches. Après l'éclosion des œufs, il faut environ 7 à 12 jours pour *An. gambiae* et 3 semaines pour *An. funestus*, à la température de 27°C pour effectuer la totalité du cycle : œuf à imago.

3-2-1- L'œuf

Un moustique femelle ne copule qu'une fois en général dans sa vie. Habituellement, après la copulation, elle a besoin d'un repas de sang pour la maturation de ses œufs. Ce repas sanguin est généralement renouvelé tous les deux ou trois jours. A chaque ponte, 100 à 150 œufs sont déposés à la surface de l'eau par la femelle (OMS, 2003), (YARO et al, 2006). Les sites d'oviposition sont très variables: petites quantités d'eau dans des empreintes de pas, des flaques d'eau de pluie ou collections plus grandes comme des rivières, canaux, marécages, lacs, rizières. Chaque espèce de moustique préfère une variété bien déterminée de surface aquatique pour déposer ses œufs. (OMS, 2003).

Chaque œuf mesure environ 0,5 mm de long et est muni de deux flotteurs latéraux remplis d'air. L'œuf est protégé par plusieurs enveloppes

particulières qui, contrairement à d'autres espèces de moustiques, ne lui permettent toutefois pas de résister à la sécheresse (Vincent Robert, 2001). Le moustique femelle continue à pondre pendant toute son existence. La plupart des femelles pondent 1 à 3 fois, mais certaines peuvent pondre jusqu'à 5 à 7 fois. Dans les meilleures conditions tropicales, la durée de vie des moustiques est de 3 à 4 semaines dans la nature.

3-2-2- La larve

Une larve sort de l'œuf au bout de deux jours en général (Holstein, 1949 ; YARO et *al*, 2006) et flotte parallèlement à la surface de l'eau pour respirer. Elle se nourrit de particules présentes dans l'eau. Mesurant à peine 1mm, les larves jeunes sont noires et présentent une colorette claire très nette qui persiste jusqu'au 3ème stade (Holstein, 1949). Les larves subissent trois mues consécutives qui, par des modifications morphologiques qu'elles engendrent, les conduisent au 4ème stade ou stade de larve adulte ou encore exovue larvo-lymphatique. La morphologie externe des larves diffère selon que l'on s'adresse aux Anophelinae, Culicidae et Aedinae.

Le corps de la larve est divisé en trois parties : la tête, le thorax et l'abdomen. Chez *Anopheles gambiae*, la larve mesure 1 mm de long au premier stade et 5 mm au quatrième stade.

- **La tête** comprend notamment les yeux, les antennes et les pièces buccales qui entourent la bouche ventrale. Un cou membraneux sépare la tête du thorax. Pour se nourrir, la larve effectue une rotation de la tête de 180°, si bien que la bouche se retrouve juste sous la surface de l'eau. Elle filtre et ingère les particules alimentaires amenées vers la bouche par le courant de surface engendré par le battement des brosses buccales.

- **Le thorax** est formé de trois segments non individualisés.

- **L'abdomen**, cylindrique, se compose de neuf segments. Les sept premiers portent notamment des plaques dorsales sclérifiées et des soies palmées caractéristiques des anophèles. Ces soies contribuent au maintien de la larve juste sous la surface de l'eau, dans la position typique des anophèles, parallèle à la surface de l'eau, face dorsale vers le haut. Le huitième segment abdominal porte dorsalement deux orifices respiratoires, les stigmates, s'ouvrant directement au niveau d'une plaque spiraculaire. L'absence de siphon respiratoire différencie les anophèles des autres moustiques. Les stigmates respiratoires sont ouverts en surface pour autoriser le renouvellement d'air du système trachéen et fermés par des valves lors de la plongée. La respiration est aérienne. Le dernier segment abdominal porte l'anus (Holstein, 1949).

3-2-3- La nymphe

En fin de quatrième stade larvaire, la cuticule se fend dorsalement et libère une nymphe, bien différente de la larve. Elle est composée de deux parties: le céphalothorax, résultant de la coalescence d'une tête non individualisée, d'un thorax globuleux et l'abdomen.

- **Le céphalothorax** porte deux trompettes respiratoires, qui correspondent aux stigmates antérieurs du thorax de l'adulte. Ces trompettes à extrémités hydrophobes traversent la surface de l'eau et assurent la respiration aérienne de la nymphe.

- **L'abdomen** comprend huit segments bien visibles, dont le huitième porte une paire de palettes natatoires. Lorsque l'abdomen se contracte brutalement, la nymphe effectue des mouvements saccadés. De la nymphe émerge un adulte, mâle ou femelle au bout de 24h en général (Holstein, 1949).

3-2-4- L'adulte

Après quelques jours de vie nymphale, la cuticule du céphalothorax de la nymphe âgée se fracture dorsalement selon un plan sagittal. Les plans hydrophobes de la fracture écartent la surface de l'eau et libèrent successivement les différentes parties de l'adulte : thorax, tête, antennes, ailes, trompe, pattes, abdomen. L'adulte se retrouve à l'air libre, posé sur son exuvie nymphale. Il reste immobile, le temps que ses ailes se déploient et que la cuticule durcisse : après une heure, il est capable de s'envoler. L'émergence dure quelques minutes et représente une phase délicate dans la vie de l'insecte en raison d'une forte mortalité par noyade.

L'adulte comprend trois parties bien distinctes : la tête, le thorax et l'abdomen.

- **La tête** porte deux gros yeux composés, une paire d'antennes de quinze articles à soies nombreuses et longues chez le mâle, rares et courtes chez la femelle. La trompe, ou proboscis, est formée d'une pièce buccale particulière, le labium, formant une gouttière souple entourant les autres pièces buccales vulnérantes chez la femelle: l'hypopharynx, les deux mandibules et les deux maxilles. Certaines de ces pièces buccales forment deux canaux indépendants dans lesquels la circulation des fluides se fait dans des sens bien définis et inverses l'un par rapport à l'autre. Le plus gros est le canal alimentaire, délimité par le labre replié en gouttière. Le moustique y aspire le sang de l'hôte. Le plus fin est le canal salivaire, placé à l'intérieur de l'hypopharynx : la salive est injectée dans ce canal et circule depuis les glandes salivaires du moustique jusqu'à la partie distale de l'hypopharynx, à l'extrémité la plus avancée du point de piqûre dans l'hôte. Ces caractéristiques morphologiques permettent à l'anophèle femelle d'ingérer un volumineux repas sanguin et d'injecter avec sa salive le stade infectant (sporozoïte) du *Plasmodium*. Deux palpes maxillaires sont situés de part et d'autre de la trompe. Chez la femelle, ils

sont de la même taille que la trompe. Chez le mâle, ils sont plus longs et la partie distale est renflée en massue.

- **Le thorax** est formé de trois segments portant chacun une paire de pattes. Le premier est réduit. C'est sur le second, très développé et renfermant de puissants muscles alaires, que s'insère une paire d'ailes. Sur le troisième est placée une paire d'haltères, ou balanciers, qui est l'homologue d'une paire d'ailes postérieures atrophiées, et qui joue un rôle dans l'équilibration du vol. Les six pattes, longues et graciles, sont formées de neuf articles. Les ailes présentent de nombreuses écailles claires et sombres: leur arrangement sur le rebord costal est caractéristique des anophèles.

- **L'abdomen** est constitué de dix segments, dont sept sont bien visibles. Chaque segment est constitué d'une plaque chitineuse dorsale et d'une plaque ventrale reliées par une membrane qui autorise la dilatation de l'abdomen lors de la prise d'un repas de sang et lors de l'élaboration de la ponte dans les ovaires. Les trois derniers segments portent l'anus et les appendices génitaux, ou génitalias. L'ensemble trompe-tête-thorax-abdomen est dans le même alignement. Au repos cet alignement détermine par rapport au support un angle aigu caractéristique des anophèles (Holstein, 1949).

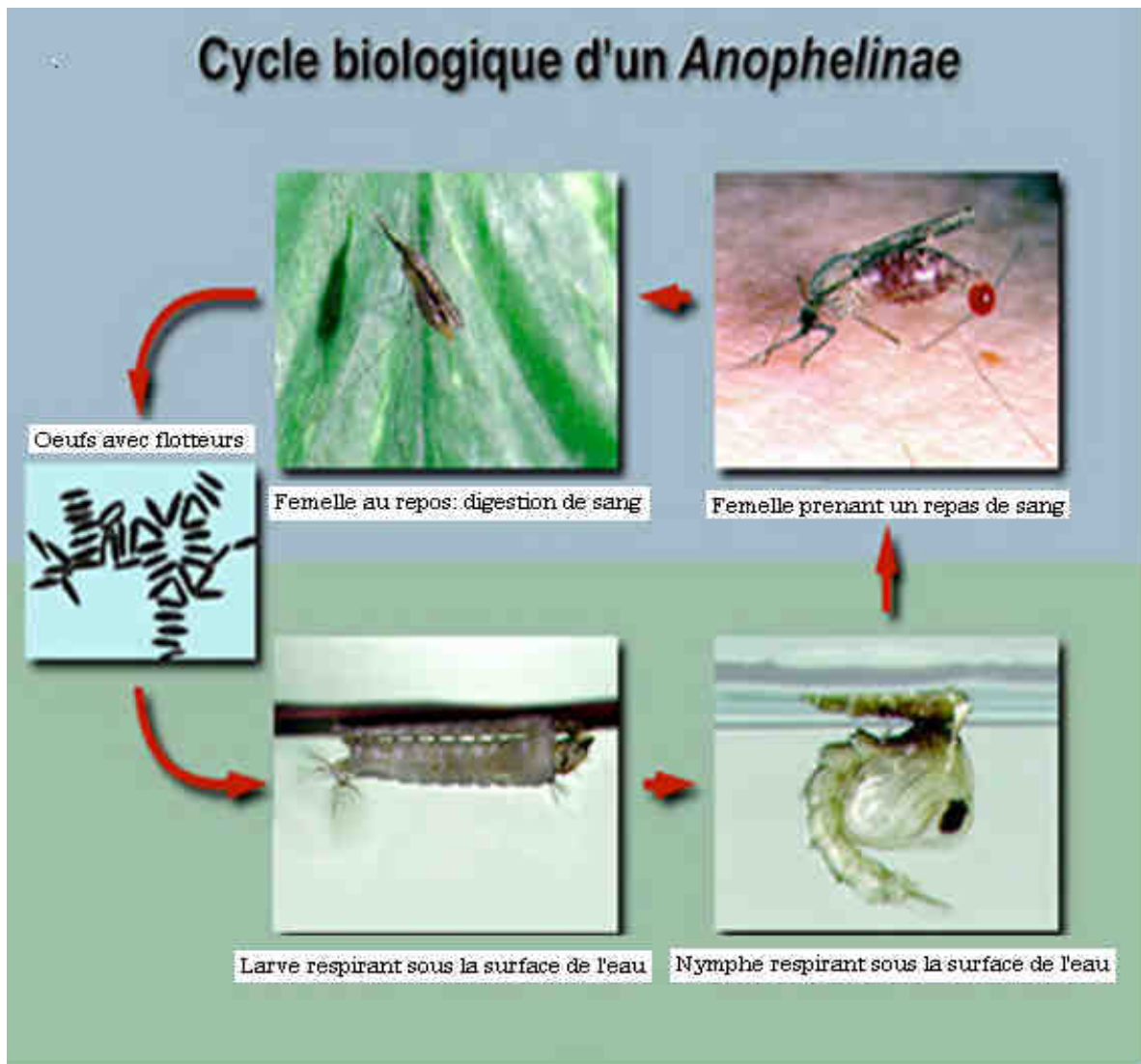


Figure 2 : Cycle biologique d'un *Anophelinae* (Brunhes et al, 1998)

3-3 Mécanismes de défense du moustique contre le parasite

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.

Ces mécanismes de résistances peuvent limiter le développement du parasite et donc la transmission de la maladie. Parmi ces mécanismes nous avons :

- **La réduction du nombre de parasite** : au cours de son développement sporogonique chez le moustique, le parasite franchit successivement deux barrières : la matrice péritrophique et l'épithélium intestinal.

La matrice péritrophique (MP)

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 (Billingsley, PF. & al, 1992, Richards, AG. & al, 1977). 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.

De plus, dans la lumière intestinale se produit une forte réduction parasitaire de telle sorte que, dans les conditions naturelles de transmission, seule une dizaine d'oocystes arrive à maturité. Les réactions

de défense du moustique pourraient contribuer à cette réduction parasitaire.

- **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 (Collins et al. 1986). Les hémocytes du moustique ne sont pas impliqués dans le processus d'encapsulation, indiquant que le mécanisme est de type humoral (Paskewitz et al 1988)

- **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 (Vernick et al. 1995) tandis que les parasites déjà encapsulés gardent une apparence ultra-structurale normale jusqu'au moment où ils commencent à dégénérer (Collins et al. 1986).

- **Les enzymes de la digestion**

L'ingestion d'un repas sanguin déclenche chez le moustique une sécrétion enzymatique protéolytique abondante (Billingsley, PF. & al, 1991). 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 (Gass, RF. 1977., Gass, RF. & al, 1979., Kumar, N. & al, 1985., Yeates,

RA. & al, 1981). Il doit probablement mettre en jeu des mécanismes de protection qui sont encore inconnus. Le développement de l'ookinète, contemporain du pic de sécrétion enzymatique ou de la formation d'une matrice péritrophique 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 secrétés et selon le rôle concomitant de la matrice péritrophique. Un autre rôle serait dévolu aux enzymes digestives.

Elles activeraient la prochitinase secrétée par l'ookinète sous forme inactive, au moins chez *Plasmodium. gallinaceum* (Huber, M. & al, 1991., Shahabuddin M. & al, 1996., Shahabuddin M. & al, 1993), favorisant ainsi la traversée de la matrice péritrophique. Mais un tel mécanisme a été récemment mis en question (Langer RC. & al, 2001). Enfin, les enzymes digestives du moustique détruiraient les facteurs du complément, pouvant ainsi empêcher la destruction des zygotes (Grotendorst, CA. & al, 1987).

3-4- Les méthodes de lutte contre le paludisme

Deux méthodes peuvent être mises en œuvre pour lutter contre le paludisme, l'une visant à détruire l'agent pathogène, l'autre orientée contre le vecteur.

3-4-1 La lutte contre le parasite

Elle repose sur l'utilisation des substances antipaludiques (schizonticides et gamétocides) qui sont actives contre les différents stades sanguins du parasite. Elle vise soit à éliminer les parasites déjà présents chez un hôte (chimiothérapie), ou bien à prévenir l'installation et le développement du parasite chez l'homme (chimioprophylaxie).

Les parasites résistent de plus en plus aux médicaments antipaludiques les plus usuels comme la chloroquine ou l'association sulfadoxine-pyriméthamine (Kouriba B., 1993).

Un consensus s'est dégagé récemment pour privilégier des associations à base d'artémisinine. L'association de deux médicaments est l'un des moyens pour limiter l'apparition des pharmaco résistances car le risque d'apparition simultanée d'une résistance à deux produits différents est très faible. De plus, les nouvelles combinaisons médicamenteuses parviennent à éliminer le parasite et permettent aux paludéens de récupérer beaucoup plus rapidement.

3-4-2 La lutte anti-vectorielle

Cette lutte repose sur la rupture ou la réduction du contact homme vecteur. Différentes méthodes de lutte sont applicables contre les larves, et ou contre les adultes.

3-4-2-1 La lutte anti-larvaire

La lutte anti-larvaire s'effectue au niveau des gîtes, elle consiste à la destruction des larves avant qu'elles ne deviennent adultes. Cette lutte peut être: biologique, physique et chimique.

3-4-2-1-1 La lutte biologique

Cette lutte s'effectue au niveau des gîtes et consiste à détruire les larves 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 moustiques. Parmi les principales espèces à avoir été introduites avec 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 (OMS, 2003).

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 les eaux d'irrigation des cultures vivrières et dans les eaux de boisson.

Le Bti a le désavantage de n'être active que par ingestion, puis sa densité l'entraîne au fond alors que les larves d'anophèle se nourrissent en surface. Elle se détruit très rapidement dans le milieu naturel et doit donc être ré appliquée périodiquement [OMS 2003]

3-4-2-1-2 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 [PNEP Tunisie 1968]. 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 terrain perméable etc...). Il a l'avantage d'évacuer rapidement les eaux et d'entraîner œufs et larves vers des milieux défavorables à leur développement où leur 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 boîte consiste à concentrer les eaux dans les tranchées, et par conséquent réduire la superficie du gîte à empoissonner.

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 :

- Le pompage à l'aide d'une pompe à moteur ;
- L'installation d'une pompe éolienne ;
- L'aménagement en puits ;
- 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 boisement

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. (<http://lozere.org/perso/malaria/LUTTE-ANTILARVAIRE.htm>)

C- 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 ainsi les larves à des substances naturelles ou de synthèse qui provoquent 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 [OMS 2003]. 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 [OMS 2003].

3-4-2-2 La lutte anti-adulte

Différentes méthodes sont utilisées pour lutter contre les moustiques adultes et ou limiter le contact Homme-vecteur [www.guyane-guide.com]. 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 periodique 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 chimiquement 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 une pièce, ou avant d'aller dormir pour tuer tout insecte ayant pu pénétrer.

3-4-2-3- Lutte génétique

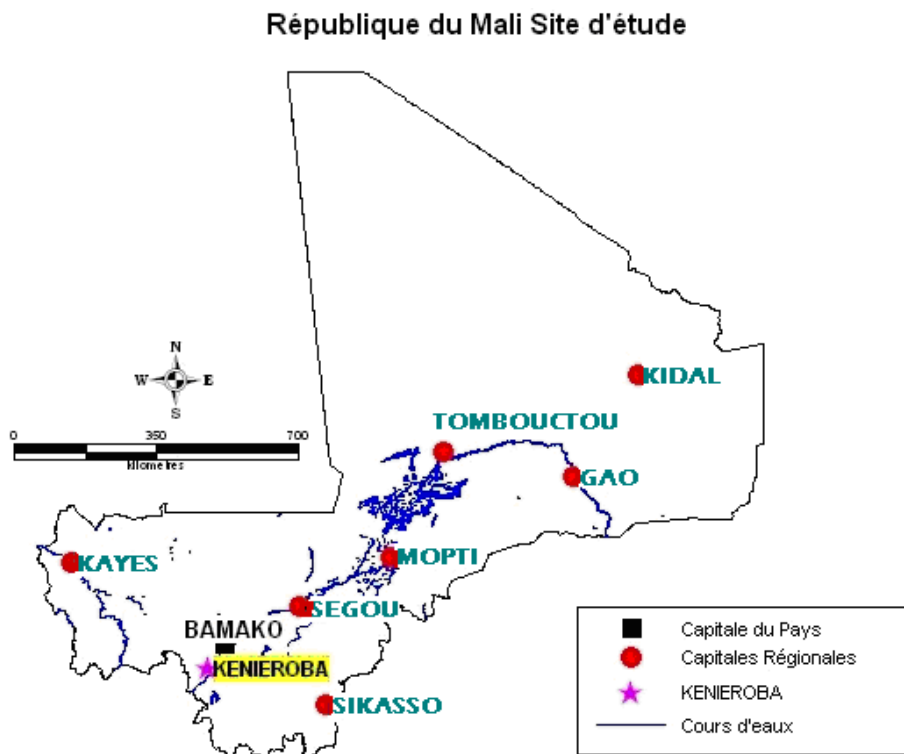
Elle est basée sur la manipulation du patrimoine génétique des moustiques afin d'obtenir des individus transgéniques qui peuvent être soit stériles, soit réfractaires aux parasites qu'ils transmettent habituellement (Tabachnick, 2003) et (Fontenille, 2005).



METHODOLOGIE

4 - MATERIEL ET METHODES

4-1 Lieu d'étude : Kenieroba



Source: GIS (MRTC) Bamako

Figure 3 : Carte du Mali indiquant le site d'étude (Kenieroba)

4.1.1. Kenieroba

Localisation géographique

Kenieroba est un village de la commune rurale de Bancoumana situé à 71kms au Sud-est de Bamako à 8° 33 longitude ouest 12° 11 latitude Nord. Il est limité au Nord par le village de Tico, à l'est par le village de Sambada, au Sud par le village de Gueleba, à l'ouest par le village de Madina.

Climat et végétation

Kenieroba est situé dans la zone soudano-guinéenne. Le climat est de type soudanien, avec des températures très variables au cours de l'année dont les plus basses (18°C) sont observées au mois de janvier et les plus élevées au mois de mai (38°C).

La mousson, vent maritime, et l'harmattan, vent continental, se succèdent le long de l'année.

On y observe une saison pluvieuse (mai à octobre), et une saison sèche divisée en saison sèche fraîche (novembre à janvier) et en saison sèche chaude (février à mai).

La végétation est du type de savane herbeuse avec quelques galeries forestières le long du fleuve Niger. On y rencontre des grands arbres comme le karité (*Vitellaria paradoxa*) le Néré (*Parkia biglobosa*), le manguier, l'oranger, et des arbustes recouvrant une strate herbacée.

La faune est constituée surtout par de petits mammifères notamment les lièvres, les hérissons et quelques phacochères. Les reptiles sont représentés par les margouillats, les scorpions et quelques espèces venimeuses.

Relief et hydrographie

Il est marqué par la présence d'une vaste plaine rizicole qui s'étale entre le village et le fleuve Niger situé à 5 km et à l'Est.

La moyenne pluviométrique annuelle est de 961,9 mm.

Population

Selon le recensement administratif à caractère électoral de 2001 (R.A.C.E, 2001), le village de Kenieroba, compte environ 4730 habitants.

Cette population est composée en majorité de Malinkés cultivateurs (85%) ; de Peuhls éleveurs (10%), de Bambara, de Sarakolé de Somono et de quelques Bozo pêcheurs.

L'islam est la religion dominante à côté du christianisme et des vieilles coutumes animistes.

Economie

Les ressources naturelles du village sont représentées par les produits de cueillette (noix de karité, fruits de Néré, et le tamarin), le sable, le gravier, et des traces de métal jaune (non encore prospectées).

L'agriculture est basée sur les cultures vivrières (mil, sorgho, riz, maïs et haricot) ; les cultures maraîchères (tomates, oignons, goyaves, tabac, arachides et pastèque) ; ainsi que les cultures de plantation (manguier, bananier, oranger, citronnier, manioc et papayer).

Les populations pratiquent l'élevage de bovins, d'ovins (moutons), de caprins (chèvres), d'équins (ânes et chevaux), et de volaille (poules et pintades).

La pêche pratiquée dans le fleuve est appréciée par la présence de poissons de diverses variétés.

La forge et la poterie sont les principales activités de l'artisanat.

Organisation sociale et administrative

A Kenieroba la chefferie est le monopole de la famille Keita fondatrice du village. De façon coutumière la succession du chef au sein de cette famille se fait selon le patriarcat.

Infrastructures

Le village de Kenieroba dispose d'un centre de santé dirigé par un infirmier, une école fondamentale (1er et 2^e cycle), une caisse villageoise et un centre d'alphabétisation.

Le village est accessible en toutes saisons grâce à une route reliant Bamako à Kangaba. Cette route est entretenue régulièrement après chaque saison des pluies.

4.2. Justification du choix du lieu d'étude (Kenieroba)

Ce village a été choisi parce que non seulement il est d'accès facile en toute saison de l'année, mais aussi à cause des travaux de recherches du MRTC dont les résultats antérieurs ont indiqué que:

- la prévalence de l'infection parmi les enfants de 0 à 10 ans est supérieure ou égale à 85 % pendant les six mois de la saison pluvieuse de juin à octobre ;
- les vecteurs responsables de la transmission sont *Anopheles gambiae s.s.* et *Anopheles arabiensis* ;

4.3. Type d'étude

C'est une étude expérimentale, longitudinale avec des passages répétés. Ces passages étaient organisés deux fois par mois c'est-à-dire tous les quinze jours pour toutes les deux équipes entomologique et parasito-clinique.

4-4 Période d'étude

L'étude s'est déroulée de juillet 2007 à décembre 2007 et 10 passages ont été effectués.

4-5- Echantillonnage

- Porteurs de gamétocytes humains :

L'étude a porté sur des enfants de 4 à 18 ans car c'est la tranche d'âge la plus touchée et qui infeste mieux les moustiques [Touré. et *al*, 1998.] Au cours de cette étude, la sélection des porteurs de gamétocytes a été faite par sélection rotative au hasard des enfants de 30 familles dans différents secteurs du village. Le dépistage de ces enfants pour le portage de gamétocytes s'effectuait jusqu'à l'obtention de 7 porteurs. En nous référant toujours sur ces études antérieures [Touré. et *al*, 1998), un groupe de quatre vingt à cent enfants étaient consultés par passage et parmi eux les deux ou trois meilleurs porteurs de gamétocytes étaient retenus pour l'étude.

- Porteurs de gamétocytes animaux :

Les souris ayant des charges gamétocytiques élevées suite à une infection provoquée avec une souche de *P. berghei*. étaient également retenues pour l'étude.

- Pour la population anophélienne, *Anopheles gambiae* s.s. a été utilisé pour les séances d'infestation et environ 100 anophèles étaient utilisés par séance. Notre méthodologie d'échantillonnage était basée sur celle des études similaires au cours desquelles 3 pots contenant 30 anophèles chacun, étaient gorgés directement sur les porteurs. La taille de l'échantillon était environ une centaine d'anophèles pour toute l'expérimentation.

4-6- Sélection des porteurs de gamétocytes

4-6-1 Sélection des porteurs de gamétocytes humains

4-6-1-1 Sensibilisation de la population

Le protocole d'étude est soumis au comité d'éthique de la faculté de médecine de pharmacie et d'Odontostomatologie.

Après l'acceptation du protocole, une rencontre est organisée entre les investigateurs du laboratoire, les autorités locales du village afin d'avoir leur consentement.

4-6-1-2- Sélection des familles

Trente familles sont choisies par passage de façon aléatoire parmi les différentes familles de Kenieroba.

4-6-1-3 Organisation :

4-6-1-4 L'équipe parasito- clinique

Composée d'un ou de deux biologistes, d'un médecin, d'un pharmacien et d'un guide chargé d'informer les familles des enfants la veille du screening.

4-6-1-5 L'équipe entomologique

Composée d'un biologiste, d'un thésard en médecine et d'un technicien.

4-6-1-6 Le dépistage

Il consiste à identifier les porteurs de gamétocytes de *Plasmodium falciparum* dans la population d'enfants sélectionnés de 4 à 18 ans par la technique des gouttes épaisses.

A chaque passage, un ticket comportant le nom, le prénom, l'âge le sexe et le N° d'identification est remis aux enfants identifiés par famille en fonction d'un numéro d'ordre. L'identité des parents ou tuteurs de chaque enfant est d'office connue. Le clinicien fait la palpation de la rate, relève la température et le poids corporel de chaque sujet.

- Matériel de prélèvement et confection de gouttes épaisses

- . Lames porte-objet
- . Vaccinostyles stériles
- . Coton
- . Alcool 90%
- . Boîte 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 et la date. Les lames sont colorées et séchées dans la boîte de collection à l'abri des mouches et de la poussière.

Coloration des lames

Matériel et réactifs

- . Eau tamponnée (un comprimé tampon à pH 7.2 pour un litre d'eau désionisée).
- . Bac de coloration
- . Râtelier
- . Eprouvette graduée

Technique

Placer les lames dos contre ventre dans le bac de coloration. Ajouter le Giemsa dilué à l'eau tamponnée à 5%. Attendre 45mn. Rincer avec l'eau et sécher sur le râtelier.

Lecture

Lire toute la lame au microscope à l'objectif100 pour la détection des gamétocytes. Les porteurs sont classés en fonction des charges gamétocytiques (1+, 2+, 3+).

Convocation des porteurs

Après lecture des lames, les guides vont chercher tous les porteurs de gamétocytes. Un confetti, est confectionné sur chacun. Les deux porteurs les plus chargés sont acheminés au laboratoire, accompagnés d'un adulte avec le consentement des parents.

Au laboratoire

Le parent qui accompagne les enfants est tenu informé de toute l'expérimentation. Ici se tiennent les séances d'infestation : une séance d'infestation sur membrane pour chaque porteur.

4-6-2 Sélection des porteurs de gamétocytes animaux

La même technique décrite chez les humains a été utilisée pour le dépistage des souris porteuses de gamétocytes. Mais bien avant nous avons provoqué une infection chez les souris avec la souche PbGFR-CON de *Plasmodium berghei*.

4-6-3 Protocole d'infection des souris avec la souche PbGFR-CON de *Plasmodium berghei* (voire annexes)

4-7- Elevage des moustiques

Une capture de moustiques a été organisée trois semaines avant l'infestation à Kenieroba.

Les femelles d'*Anopheles gambiae* ont été capturées vivantes à l'aide d'aspirateur à bouche type (Coluzzi / Petrarca, 1973). Après la capture les moustiques étaient conditionnés afin de les acheminer au laboratoire MRTC à la faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie, elles étaient gardées dans l'insectarium: chambre dans laquelle sont réunis certaines conditions nécessaires pour le développement optimal des moustiques. Ils y sont maintenus à une température variant entre 26 - 28°C avec une humidité comprise entre 70 et 80 %. Pour simuler l'alternance jour et nuit, l'insectarium est illuminé 12 heures sur 24.

Les moustiques étaient gardés dans une cage en carton de forme cylindrique de 15 cm de diamètre, 30 cm de hauteur et recouverte par une tulle moustiquaire. Ils ont été maintenus pendant deux jours afin qu'ils soient gravides.

Ensuite nous procédions à une ponte individuelle, chaque moustique gravis était mis dans un tube Falcon de 50 ml à l'aide d'un aspirateur à bouche contenant un papier buvard qui sera imbibé d'un peu d'eau.

Après la ponte les œufs étaient transférés dans un plateau en plastique dans de l'eau distillée avec un papier flotteur pour maintenir les œufs en surface. Chaque plateau contenait les œufs d'un moustique et portait un numéro indiquant la famille. Les corps des moustiques ayant pondu étaient récupérés et fixés individuellement dans des tubes secs avec les numéros correspondants et gardés à -70 degrés. Une patte de chaque moustique a été prélevée pour son identification en formes moléculaires et/ ou espèce par la technique de Fanello.

Au bout de 24 heures à 48 heures les œufs donnaient des larves après éclosion. Ces larves étaient nourries de poudre d'aliments à base de lait, calcium et des sels minéraux (Friskies®). La quantité de cette poudre d'aliments augmentait avec le stade d'évolution des larves. La poudre était donnée une fois par jour.

Les imagos étaient nourris sur du coton imbibé de jus sucré déposé sur la cage les contenant. Le jus était renouvelé tous les jours.

Après cette émergence l'équipe parasito-clinique était informée de la date de l'infestation 72 heures en avance.

Celle ci se déplaçait sur le terrain pour faire le dépistage afin d'envoyer les deux ou trois porteurs les plus chargés au laboratoire.

Pour les porteurs animaux, on s'assurait également si les souris avaient un taux de gamétocytes élevé permettant l'infection des moustiques. Dès la veille de l'infestation, les moustiques étaient mis à jeun 16 heures avant l'expérience.

4-8- Infestations expérimentales

Une seule souche de moustique a été utilisée pour les différentes infestations, c'est à dire la progéniture d'une seule femelle. Après la ponte, la femelle ayant pondu plus d'œufs était retenue. Ses œufs ont été divisés en deux parties, une partie a été envoyée à Minnesota pour l'infestation avec *P. berghei* et l'autre partie est restée au Mali pour l'infestation avec *P. falciparum*.

Les nouvelles émergences âgées de 2 à 5 jours nourries uniquement du jus sucré (eau sucrée à 5%) étaient mises dans des cages et utilisées pour les différentes infestations expérimentales.

Les cages, en papier, étaient fermées par des morceaux de tulle à l'aide de bracelets. Des inscriptions étaient portées sur les cages pour indiquer le jour où l'infestation s'était effectuée, le numéro de famille des

moustiques, le nom et prénom du porteur (pour les humains). Les infestations se passaient dans l'insectarium.

4-8-3- Infestation sur membrane

Cette méthode d'infestation a été utilisée pour l'infection des moustiques avec les différents parasites (*P. falciparum* et *P. berghei*).

Matériel

-Un feeder-machine contenant de l'eau et muni d'un thermorégulateur ajusté à 37 °C pour maintenir le sang dans les conditions corporelles (voire photo).

-Un feeder de grand calibre (voire photo).

-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 leur repas de sang à travers cette membrane d'où le nom d'infestation sur membrane ou membrane-feeding en anglais.

Mode opératoire

Quatre ml de sang veineux sont recueillis sur chaque porteur (humain et animal y compris) et seront utilisés pour l'infestation.

Ce sang est, ensuite, mis dans les feeders, connectés les uns aux autres, par leur petite ouverture. Les feeders à leur tour sont connectés par les deux 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 cages étaient appliqués à chaque feeder pendant 10-15 mn en moyenne.

Deux heures après l'infestation, les anophèles qui n'avaient pas suffisamment pris du sang et celles n'ayant pas du tout pris le repas de sang étaient retirés des cages et un jus sucré à 5% était déposé sur les cages.

Deux jours après l'infestation un pondeur était introduit dans chaque cage afin d'obtenir la progéniture de ces moustiques avant qu'ils ne soient soumis à une dissection.



▲ **Photo 1:** Appareillage de l'infection sur membrane.

▲ **Photo 2:** Feeder contenant du sang.

4-8-2- Détermination des charges oocystiques

Elle a été faite de la même manière pour tous les moustiques qu'ils soient infectés par *P. falciparum* ou *P. berghei*. La procédure était la suivante : au huitième jour après l'infestation les moustiques étaient disséqués. Cette dissection se faisait individuellement et nous donnions des identifiants (numéro et origine du repas sanguin) à chaque moustique disséqué.

Matériel

- 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

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.

Une goutte de mercurochrome est déposée sur la lame porte-objet. Le moustique est déposé dans la goutte sur le dos. A l'aide de la loupe appuyer avec l'aiguille au niveau du deuxième segment partant du thorax et maintenir la pression. Par la pince tirer sur les deux derniers segments d'un mouvement continu 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. (Voire photo)

Sur une fiche indiquer la présence ou l'absence d'oocystes. Dénombrer les différents phénotypes d'oocystes par estomac et porter sur la fiche de dissection.

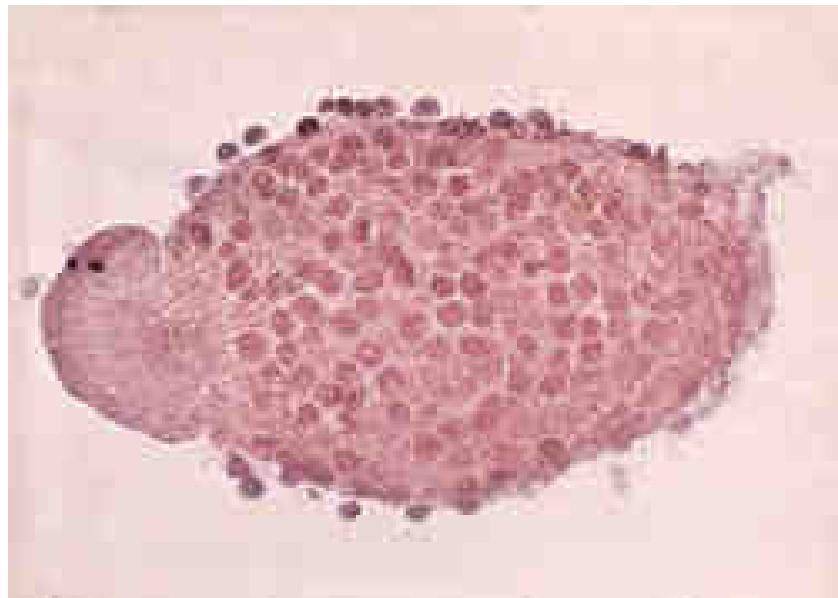


Photo 3 : Estomac d'anophèle montrant des centaines d'oocystes.

(WHO/TDR image collection)

4-9- Saisie et analyse des données

Les données ont été enregistrées sur des fiches de dissection, saisies sur SPSS et le texte sur Microsoft® Word 2003. Les analyses ont été effectuées sur SPSS 11.0 et EPI6 au laboratoire MRTC.



RESULTATS

5- RESULTATS

5-1- Caractérisation des porteurs de gamétocytes humains et animaux.

5-1-1 Caractérisation des porteurs de gamétocytes chez les enfants de 4 à 18 ans.

Notre étude a porté sur un total de 687 enfants d'âge compris entre 4 et 18 ans. Ces enfants avaient été examinés et subis des gouttes épaisses de juillet 2007 à décembre 2007.

L'indice gamétocytaire moyen mensuel était de 10,6% (IC: 95%) comprise entre 8,4% (décembre 2007) et 13,6% (juillet 2007).

Cette moyenne n'avait pas subi de variations significatives ($X^2 = 1,95$, ddl = 5, $P = 0,85$).

Parmi ces enfants 16 avaient été retenus pour l'étude. Ces porteurs avaient un âge moyen de 7ans.

Tableau I: Indice gamétocytaire des enfants de 4 à 18 ans de Kenieroba de juillet 2007 à décembre 2007

Période	Effectif	Positifs	%
Juillet	110	15	13,6
Août	115	12	10,4
Septembre	120	13	10,8
Octobre	105	12	11,4
Novembre	119	11	9,2
Décembre	118	10	8,4
Total	687	73	10,6

5-1-2 Caractérisation des porteurs de gamétocytes chez les souris.

En effet nous n'avons utilisé que dix souris Suisses de Webster qui avaient été infectés au préalable par la souche PbGFR-CON de *P. berghei*. Avant d'effectuer l'infestation expérimentale, il était nécessaire de s'assurer que le sang des souris contenait un nombre élevé de parasites. Pour cela nous leur faisons des prélèvements de sang et les trois meilleurs porteurs étaient retenus pour l'infestation. C'est-à-dire celles qui avaient approximativement une parasitémie de 10% et un taux de gamétocytes de 2%.

5-2 Détermination des taux d'infections d'*Anopheles gambiae* s.s. en fonction de l'espèce plasmodiale.

Tableau II: Proportion d'*An. gambiae* s.s. infectés avec *P. berghei*.

Etat d'infection	<i>Anopheles gambiae</i> s.s.	
	Effectif	Pourcentage
Négatifs	16	15,4
Positifs	88	84,6
Total	104	100

Le taux d'infection d'*Anopheles gambiae* s.s. était de 84,6% (88/104)

Tableau III: Proportion d'*An. gambiae* s.s. infectés avec *P. falciparum*.

Etat d'infection	<i>Anopheles gambiae</i> s.s.	
	Effectif	Pourcentage
Négatifs	668	73,6
Positifs	239	26,4
Total	907	100

Le taux d'infection d'*Anopheles gambiae* s.s. était de 26,4% (239/907)

Tableau IV : Comparaison des taux d'infection d'*An. gambiae* s.s. en fonction de l'espèce plasmodiale après infestation expérimentale sur membrane.

Etat d'infection	<i>An. gambiae</i> s.s. infectés avec <i>P. berghei</i>		<i>An. gambiae</i> s.s. infectés avec <i>P. falciparum</i>	
	Effectif	%	Effectif	%
Négatifs	16	15,4	668	73,6
positifs	88	84,6	239	26,4
Total	104	100	907	100

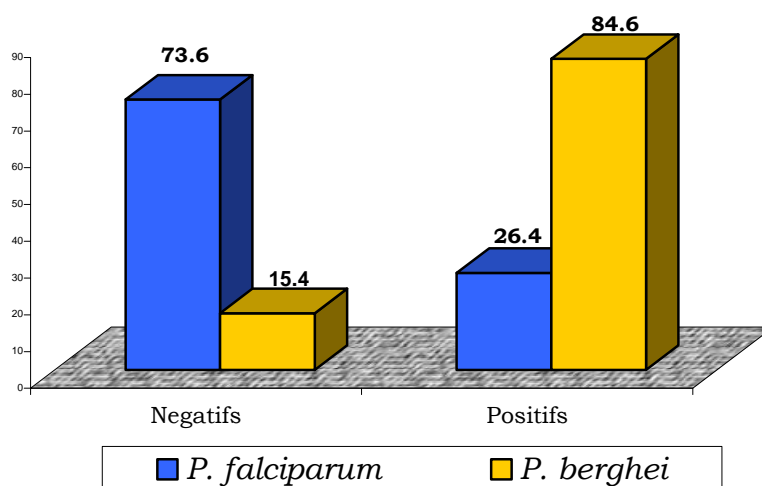


Figure 4 : Comparaison des taux d'infection d'*An. gambiae* s.s. en fonction de l'espèce plasmodiale après infestation expérimentale sur membrane.

Les taux d'infection d'*Anopheles gambiae* s.s. en fonction de l'espèce plasmodiale avaient variés significativement ($X^2 = 144,7$; ddl = 1 ; $p = 10^{-7}$). Le taux d'infection d'*An. gambiae* s.s. infectés avec *P. berghei* (84,6%) était significativement plus élevé que celui d'avec *P. falciparum* (26,4 %).

5-3 Détermination des charges oocystiques chez *An. gambiae* s.s. en fonction de l'espèce plasmodiale.

Tableau V : Fréquence des oocystes chez *An. gambiae* s.s. infectés avec *P. berghei* et *P. falciparum*.

Nombre d'oocystes	<i>An. gambiae</i> s.s. infectés avec <i>P. berghei</i>		<i>An. gambiae</i> s.s. infectés avec <i>P. falciparum</i>	
	Effectif	Pourcentage	Effectif	Pourcentage
0	16	15,4	668	73,6
1-20	35	33,7	198	21,8
21-40	22	21,1	15	1,7
41-60	8	7,7	9	1,0
61-80	8	7,7	4	0,4
81-100	3	2,9	4	0,4
> 100	12	11,5	9	1,0
Total	104	100	907	100

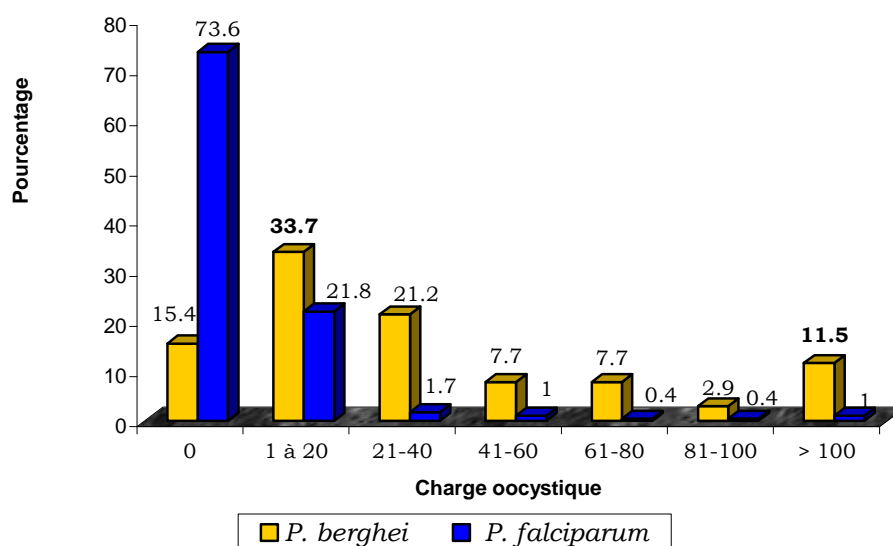


Figure 5 : Fréquence des oocystes chez *An. gambiae* s.s. infectés avec *P. berghei* et *P. falciparum*.

L'analyse du tableau V et de la *figure 5* montre que la distribution du nombre d'oocystes par espèces plasmodiales classé de façon empirique par intervalles différait également. En effet 33,7 % (35/104) des moustiques infectés avec *P. berghei* avaient un nombre d'oocystes compris entre un et 20 contre 21,8% (198/907) chez ceux infectés avec *P. falciparum*.

Il a été également observé chez les moustiques infectés avec *P. berghei* que 11,5 % (12/104) avaient plus de 100 oocystes contre seulement 1 % (9/907) des moustiques infectés avec *P. falciparum*.

5-4 Détermination de la prévalence des phénotypes d’ocystes chez *Anopheles gambiae* s.s. en fonction de l’espèce plasmodiale.

Tableau VI : Prévalence des phénotypes d’ocystes chez *An. gambiae* s.s. infectés avec *Plasmodium berghei*

Phénotypes d’ocystes	<i>An. gambiae</i> s.s infectés avec <i>P. berghei</i>	
	Effectif	%
Oocystes normaux	26	29,6
Oocystes mélanisés	20	22,7
Oocystes normaux & mélanisés	42	47,7
Total	88	100

Nous avons observé une différence statistiquement significative des prévalences phénotypiques oocystiques présents ($X^2 = 13,23$; ddl = 2 ; p = 0,001). Les phénotypes normaux et mélanisés associés prédominaient (47,7%) suivis des phénotypes normaux (29,2%) et des phénotypes mélanisés (22,7).

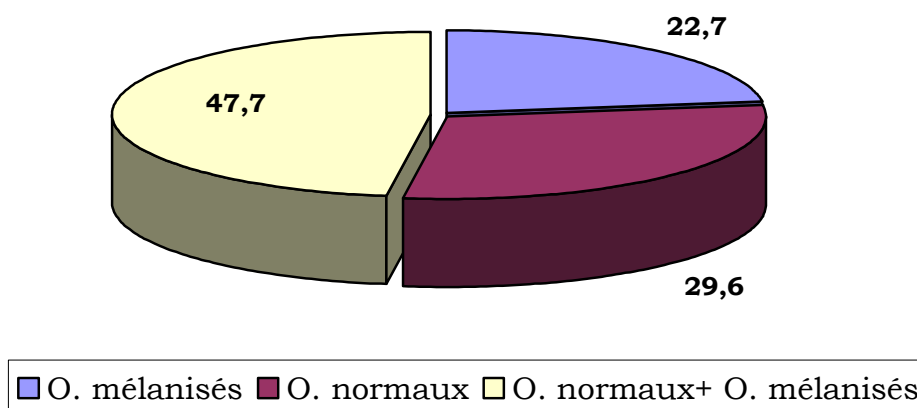


Figure 6 : Prévalence des phénotypes d’ocystes chez *An. gambiae* s.s. infectés avec *Plasmodium berghei*.

Tableau VII : Prévalence des phénotypes d’ocystes chez *An. gambiae* s.s. infectés avec *Plasmodium falciparum*.

Phénotypes d’ocystes	<i>An.gambiae</i> s.s infectés avec <i>P. falciparum</i>	
	Effectif	%
Oocystes normaux	231	96,7
Oocystes mélanisés	7	2,9
Oocystes normaux & mélanisés	1	0,4
Total	239	100

Nous avons observé une différence statistiquement significative des prévalences phénotypiques oocystiques présents ($X^2 = 647,1$; ddl = 2 ; $p = 10^{-3}$). Les phénotypes normaux prédominaient (96,7%) suivis des phénotypes mélanisés (2,9%) et des phénotypes normaux et mélanisés associés (0,4%).

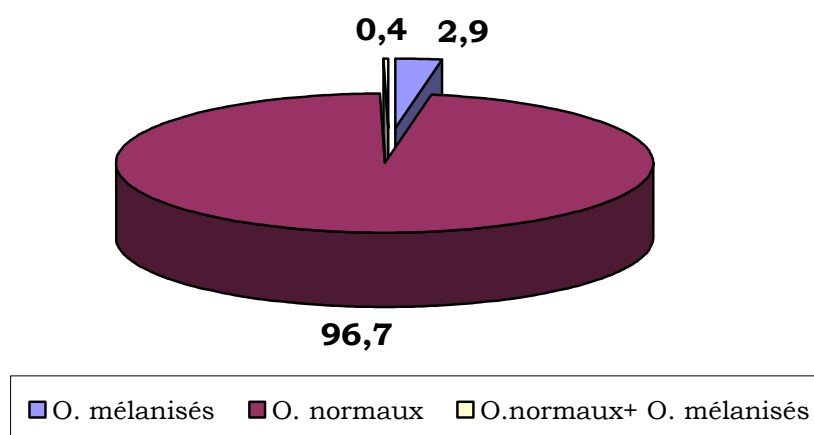


Figure 7 : Prévalence des phénotypes d’ocystes chez *An. gambiae* s.s. infectés avec *Plasmodium falciparum*.

Tableau VIII : Comparaison des phénotypes d’ocystes chez *An. gambiae* s.s. en fonction de l’espèce plasmodiale après infestation expérimentale sur membrane.

Phénotypes d’ocystes	<i>An. gambiae</i> s.s. infectés avec <i>P. berghei</i>		<i>An. gambiae</i> s.s. infectés avec <i>P. falciparum</i>	
	Nombre	%	Nombre	%
Normaux	26	29,6	231	96,7
Mélanisés	20	22,7	7	2,9
Normaux + mélanisés	42	47,7	1	0,4
Total	88	100	239	100

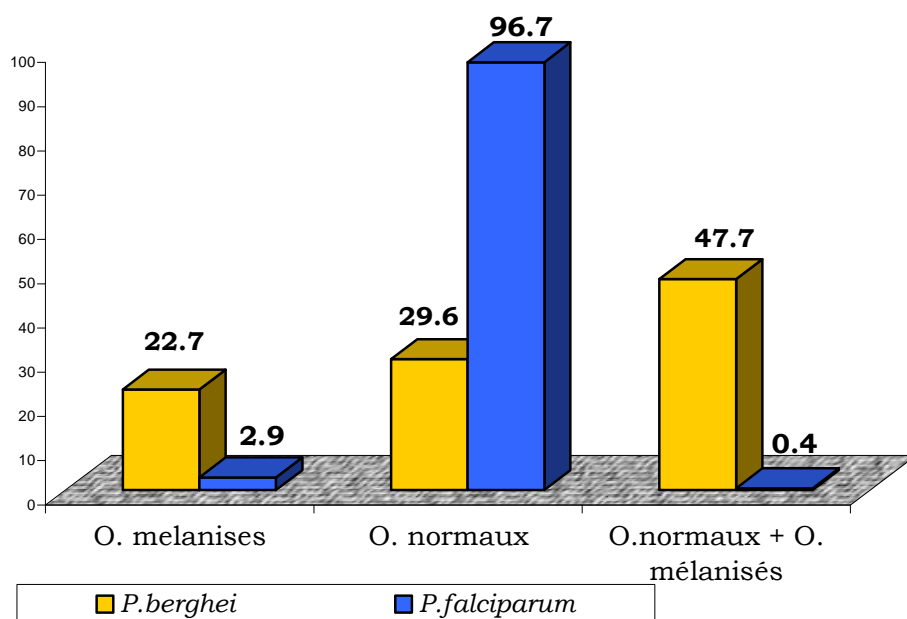


Figure 8: Comparaison des phénotypes d’ocystes chez *An. gambiae* s.s. en fonction de l’espèce plasmodiale après infestation expérimentale sur membrane.

Selon les résultats observés au niveau du tableau VIII et de la figure 8, les phénotypes d'oocystes chez *Anopheles gambiae* s.s. montraient des variations de fréquences différentes selon l'espèce plasmodiale : chez *An. gambiae* s.s. infectés avec *Plasmodium berghei* nous avons observé une prédominance des oocystes avec phénotypes normaux plus mélanisés (47,7%), tandis que chez *An. gambiae* s.s. infectés avec *P. falciparum*, les oocystes avec phénotypes normaux prédominaient (96,7%).

Par ailleurs il a été observé plus de cas de mélanisation des oocystes chez *An. gambiae* s.s. infectés avec *Plasmodium berghei* (20%) que chez *An. gambiae* s.s. infectés avec *Plasmodium falciparum* (2,9%).

5-5 Comparaison des charges oocystiques d'*An. gambiae* s.s. en fonction de l'espèce plasmodiale et des phénotypes observés.

Cette comparaison a été faite à partir des moyennes géométriques des nombres d'oocystes observés chez les anophèles retrouvés positifs.

Tableau IX: Moyenne géométrique des charges oocystiques chez *An. gambiae* s.s. infectés avec *Plasmodium berghei*.

Phénotypes des oocystes	Effectif	Moyenne Géométrique	Variance
Oocystes normaux	26	12,18	3994,72
Oocystes mélanisés	20	32,30	1881,36
Oocystes normaux & mélanisés	42	31,54	1599,13
Total	88	23,94	2362,01

La moyenne géométrique globale des charges oocystiques pour tous les phénotypes confondus était de 23,94 oocystes par moustique infecté. Cette moyenne a variée de 12,18 oocystes (n = 26) pour le phénotype normal, à 32,30 oocystes pour le phénotype mélanisé. Cependant, nous n'avons pas observé de différence statistiquement significative entre les moyennes géométriques des charges oocystiques pour les différents phénotypes d'oocystes (F = 0,912 ; ddl = 2 ; P = 0,406) selon le test d'ANOVA.

Tableau X: Moyenne géométrique des charges oocystiques chez *An. gambiae* s.s. infectés avec *Plasmodium falciparum*.

Phénotypes des oocystes	Effectif	Moyenne Géométrique	Variance
Oocystes normaux	231	5,22	782,96
Oocystes mélanisés	7	4,14	20,905
Oocystes normaux & mélanisés	1	2,00	0,0
Total	239	5,16	760,46

La moyenne géométrique globale des charges oocystiques était de 5,16 oocystes par moustique infectés. Pour faire le test d'ANOVA on n'a pas tenu compte du seul cas d'infection avec les deux phénotypes présents (un oocyste normal et un oocyste mélanisé). Nous n'avions pas observé de différence statistiquement significative entre les moyennes géométriques des charges oocystiques pour les différents phénotypes ($F = 0,809$; ddl = 1 ; $P = 0,369$).

Tableau XI: Comparaison de la moyenne géométrique des charges oocystiques chez *An. gambiae* s.s. infectés avec *P. berghei* et avec *P. falciparum*.

Phénotypes d'oocystes	<i>An. gambiae</i> s.s. infectés avec <i>P. berghei</i>			<i>An. gambiae</i> s.s. infectés avec <i>P. falciparum</i>		
	Nbre*	MGO**	Variance	Nbre*	MGO**	Variance
Oocyste normaux	26	12,18	3994,72	231	5,22	782,96
Oocystes mélanisés	20	32,30	1881,36	7	4,14	20,905
Oocystes normaux & mélanisés	42	31,54	1599,13	1	2,00	0,0
Total	88	23,94	2362,01	239	5,16	760,46

*Nbre = Nombre de moustiques positifs

**MGO = Moyenne géométrique oocystiques

La moyenne géométrique des charges oocystiques d'*An. gambiae* s.s. infectés avec *P. berghei* 23,94 (n = 88) était significativement plus élevée que celle d'*An. gambiae* s.s. infectés avec *P. falciparum* 5,16 (n = 239) (ANOVA F = 19,08 ; ddl = 1 ; p = 0,001).

5-6- Prévalence des charges oocystiques chez *An. gambiae* s.s. dans le cas des infections à phénotypes mixte.

5-6-1- *Anopheles gambiae* s.s. infecté avec *P. berghei*

Tableau XII : Charge moyenne d'oocystes normaux et mélanisés chez *An. gambiae* s.s. hébergeant les deux phénotypes d'oocystes après infestation sur membrane avec *P. berghei*.

Phénotypes	Minimum*	Maximum**	Moyenne géométrique
Oocystes normaux	1	104	7,96 ± 23,52
Oocystes mélanisés	1	165	14,31 ± 35,13

*Minimum : nombre minimum d'oocyste

**Maximum : nombre maximum d'oocyste

Pour ce qui est de l'infection avec *P. berghei* 42 *An. gambiae* s.s. des 88 positifs hébergeaient les deux phénotypes d'oocystes (mélanisé et normal). Les moyennes géométriques des charges oocystiques pour ceux-ci étaient de 14,31 pour le phénotype mélanisé et 7,96 pour le phénotype normal. Le Test ANOVA avait montré qu'il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre ces deux moyennes (F = 0,95 et P = 0,33).

5-6-2- *Anopheles gambiae* s.s. infectés avec *P. falciparum*.

Pour l'infection avec *P. falciparum*, nous n'avons observé qu'un seul cas d'infection à phénotypes d'oocystes mixtes (un oocyste normal et un oocyste mélanisé) sur 239 *An. gambiae* s.s retrouvés positifs.



COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS

6- COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS

Ce protocole a reçu l'approbation des comités d'éthique de la Faculté de Médecine, Pharmacie et d'Odontostomatologie et de l'Université de Minnesota (USA). Les résultats des études antérieures menées à Kenieroba, les étroites relations du laboratoire avec les notabilités du village et sa situation par rapport à Bamako font de ce village un bon choix pour cette étude. Grâce à cette proximité du village avec Bamako où s'effectuent les séances d'infestation, les captures de moustiques femelles sauvages étaient organisées bien avant le jour des infestations et l'insectarium du laboratoire a permis la mise en ponte individuelle des moustiques et le suivi de l'évolution des œufs jusqu'aux imagos. L'élevage des moustiques à l'insectarium a permis d'éviter le manque d'anopheles pour les infestations expérimentales.

- Caractérisation des porteurs de gamétocytes

Le choix de la tranche d'âge de 4 à 18 ans est basé sur les résultats des études antérieures menées à Bancoumana en 1994 qui ont montré que les porteurs de gamétocytes de cette tranche infectaient mieux les moustiques que ceux d'âge supérieur à 18 ans.

La moyenne d'âge des porteurs de notre étude était de 7ans se trouvant dans la tranche indiquée comme mieux infectant.

L'indice gamétocytaire mensuel moyen était de 10,6%.

- Comparaison des taux d'infection et des charges oocystiques chez les moustiques en fonction de l'espèce plasmodiale

Un total de 1011 moustiques ont été utilisés pour les séances d'infestations expérimentales sur membrane dont 907 moustiques qui ont été mis en contact avec *P. falciparum* et 104 moustiques en contact avec *P. berghei*.

Nous avons observé un taux d'infection plus élevé chez les moustiques qui ont été mis en contact avec *P. berghei* (84,6%) que ceux qui ont été mis en

contact avec *P. falciparum* (26,4%), les charges oocystiques étaient également plus élevées avec *P. berghei* qu'avec *P. falciparum* au cours de cette étude.

Les faibles niveaux d'infections et des charges oocystique observés au cours de l'infection à *Plasmodium falciparum* seraient liés d'une part à la longue coévolution de *P. falciparum* et d'*An. gambiae* s.s. aboutissant à l'établissement d'un équilibre entre le parasite et son hôte (*An. gambiae*), équilibre qui est bénéfique pour leur survie, (TAYLOR et al, 1997) avaient signalé qu'une forte charge parasitaire pouvait être néfaste à la survie du vecteur, la transmission vectorielle nécessiterait donc une faible gamétocytemie.

D'autre part, les porteurs de gamétocytes (humains), aussi comme les moustiques ont une longue histoire évolutive avec le parasite. Donc ces Porteurs ont pu développer une certaine immunité suite à une forte exposition au parasite. De ce fait leurs sangs contiendraient des anticorps qui peuvent avoir des effets réducteurs sur les taux d'infections en opposition aux souris qui ne sont pas non seulement des hôtes naturelles pour *P. berghei*, mais aussi sont à leur premier contact avec ce dernier et constituent des sujets neufs démunies de toutes mémoires immunologiques. Bert Mulder et al, (1992) avaient démontré que le sang d'un porteur naturellement infecté contiendrait des facteurs de blocage de la transmission ou serait déficient en substances nécessaires à la formation des oocystes.

- Comparaison des différents phénotypes oocystiques observés

Nous avons observé que la mélanisation des d'oocystes était plus fréquente chez les moustiques qui étaient parvenus à développer l'infection à *Plasmodium berghei* que chez les moustiques qui étaient parvenus à

développer l'infection à *Plasmodium falciparum*. Chez ces derniers l'évolution des oocystes était normale dans la majorité des cas (96,7%). (Gouagna et al, 1998 ; Touré et al, 1998 et Coulibaly, 1999) avaient trouvé très peu ou presque pas de cas de mélanisation au cours de leur infestation expérimentale.

L'augmentation et la diminution des taux de mélanisation des oocystes dans l'infestation expérimentale sur membrane, respectivement à *P. berghei* et à *P. falciparum* seraient probablement liées :

- d'une part à la longue coévolution de *Plasmodium falciparum* et *An. gambiae*, ce qui favoriserait la reconnaissance très précoce de la présence du parasite (Mémoire immunologique) et de déclencher très vite les mécanismes de défenses pour empêcher et ou réguler son développement. Il faudrait signaler que déjà au stade ookinète des parasites, le moustique enclenche la lyse parasitaire pour réduire le nombre de parasite;

- d'autre part le fait qu'*An. gambiae* n'étant pas le vecteur naturel de *Plasmodium berghei* entrainerait chez ce vecteur une durée de période plus longue avant de reconnaître le parasite afin de donner une réponse adéquate à l'invasion par ce dernier, d'où le processus de mélanisation des oocystes qui survient aux derniers stades de développement du parasite, (Carolina et al, 2005) avaient signalé que la lyse parasitaire était le premier niveau de régulation de la trop forte densité des parasites. C'est à dire qu'elle précédait la mélanisation.



CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

7- CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Au terme de cette étude et de nos résultats, nous avons observé qu'*An. gambiae* même n'étant pas le vecteur naturel de *P. berghei* parvenait à développer le parasite. Bien vrais que nous avons eu à observer dans certains cas une réponse tardive du moustique pour entraver le développement du parasite.

Par ailleurs nous avons observé un taux de mélanisation des oocystes plus élevé avec *P. berghei* qu'avec *P. falciparum*. Ce qui nous amène à la conclusion suivante : qu'*An. gambiae* se comporte de manière différente avec *P. berghei* et *P. falciparum*.

Néanmoins, nous devrions garder à l'esprit que ce parasite n'est pas l'agent du paludisme humain et que les avancées qui pourront être faites dans la compréhension des interactions entre *Anopheles* et *Plasmodium* devront toujours être généralisées avec précaution puisque le couple *An. gambiae*-*P. berghei* n'a pas coévolué, *P. berghei* n'étant pas transmis par *An. gambiae* s.s. dans les conditions naturelles.

Les travaux que nous avons réalisés sont donc des investigations préliminaires sur la compréhension de la biologie des interactions entre un parasite donné (*P. berghei*) et un moustique (*An. gambiae*) qui n'est pas son vecteur naturel. Ainsi les connaissances obtenues à partir du modèle animal ne pourront pas être utilisées de façon systématique dans les études de terrain (conditions naturelles) mais pourraient éclairer d'autres champs de recherche plus avancé sur le paludisme.

De ce fait il serait souhaitable que la présente étude puisse se poursuivre sur le plan génétique pour :

- caractériser d'avantage les causes explicatives de telles différences
- rechercher et caractériser le ou les gènes impliqués dans le blocage du développement des Plasmodiums chez *An. gambiae* s.s. en vue de

l'élaboration d'une stratégie de lutte basée sur les moustiques réfractaires au développement du parasite.

Au vu de ces résultats, nous recommandons :

- Au ministère de la recherche, de financer et d'encourager de telles études qui pourront avoir une contribution dans la compréhension de la biologie du moustique et de ses interactions avec les parasites.
- Aux chercheurs de continuer ces études sur le plan génétique afin de rechercher et caractériser le ou les gènes impliqués dans le blocage du développement des *Plasmodiums* chez *An. gambiae* s.s. en vue de l'élaboration d'une stratégie de lutte basée sur les moustiques réfractaires au développement du parasite.

Fiche Signalétique

Nom: Sacko

Prénom: Madjou

Titre: Etude de l'infectivité de *Plasmodium berghei* et de *Plasmodium falciparum* chez *Anopheles gambiae s.s.*

Année de soutenance: 2008

Ville de soutenance: Bamako

Pays d'origine: Mali

Lieu de dépôt: Bibliothèque de la FMPOS

Secteur d'intérêt : Entomologie et Parasitologie médicales

Résumé

De juillet à décembre 2007, une étude comparative de l'infectivité de *Plasmodium berghei* et de *Plasmodium falciparum* chez *An. gambiae s.s.* fut menée à Kenieroba, un village de savane sud soudanienne du Mali, situé à 70 kms de Bamako. Les porteurs humains et animaux se sont révélés très infectieux pour les moustiques.

Par contre les taux d'infection en oocystes chez les moustiques étaient plus élevés dans l'infection avec *P. berghei* qu'avec *P. falciparum*. La charge oocystique des moustiques infectés avec *P. berghei* était plus élevée que celle d'avec *P. falciparum*.

Par ailleurs il ya eu nettement plus de cas de mélanisation des oocystes chez les moustiques infectés avec *P. berghei* que chez ceux infectés avec *P. falciparum*.

Il serait souhaitable que la présente étude puisse se poursuivre sur le plan génétique pour rechercher le ou les gènes qui seraient associés dans le blocage du développement des parasites chez *An. gambiae*.

Personal details card

Last name: Sacko

First name: Madjou

Title: Study on infection by *Plasmodium berghei* and *Plasmodium falciparum* with *Anopheles gambiae s.s.*

Year of Viva Voce: 2008

City of Viva Voce: Bamako

Country of origin: Mali

Registration of Copy: FMPOS library

Area of Interest: Entomology and medical parasitology

Summary: From July to December 2007, a comparative study on infection by *Plasmodium berghei* and by *Plasmodium falciparum* with *An. gambiae s.s.* was undertaken in Kenieroba, a Malian sub-sudanian savanna village 70 km from Bamako. Human and animal carriers revealed very infectious to the mosquito.

Level of oocyst infection in mosquitoes was on the contrary much higher with *P. berghei* than *P. falciparum*. Oocyst charge of infected *P. berghei* mosquitoes was higher than that of *P. falciparum* infected mosquitoes.

Elsewhere, there was distinctly more case of melanization of oocysts in mosquitoes infected with *P. berghei* than with *P. falciparum*.

It is our wish that the current study be conducted genetically in order to search for the gene or the genes associated with the blockage of the parasite development in *An. gambiae*.



BIBLIOGRAPHIE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- Aguilar, Ruth, Yuemei Dong, Emma Warr, George Dimopoulos. *Anopheles* infection responses; laboratory models versus field malaria transmission systems. *Acta Tropica* 2005, **95**, 285-291
- 2- Billingsley PF & Hecker H - Blood digestion in the mosquito, *Anopheles stephensi*: activity and distribution of trypsin, aminopeptidase and alpha-glucosidase in the midgut. *J Med Entomol* 1991, **28**, 865-871.
- 3- Billingsley PF & Rudin W - The role of the mosquito peritrophic membrane in bloodmeal digestion and infectivity of *Plasmodium* species. *J Parasitol*, 1992, **78**, 430-40.
- 4- Brunhes, J., and *al.* Les anophèles de la région afro-tropicale. *ORSTOM Ed.*1998.
- 5- Carolina Barillas-Mury* and Sanjeev Kumar. *Plasmodium* –mosquito interactions: a tale of dangerous liaisons *Cellular Microbiology* (2005) **7** (11), 1539–1545. Microreview
- 6- Collins, F. H., R. K. Sakai, K. D. Vernick, S. Paskewitz, D. C. Seeley, L. H. Miller, W. E. Collins, C. C. Campbell, and R. W. Gwadz. Genetic selection of a *Plasmodium*-refractory strain of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Science*, 1986, **234**: 607-10.
- 7- Coluzzi, M., and V. Petrarca. Aspirator with paper cup for collecting mosquitoes and others insects. *News*, 1973, **33**, 249-250.

8- Coulibaly, M. B. Comparaison de deux méthodes d'infection expérimentale des moustiques comme moyen d'évaluation des vaccins de blocage de la transmission du paludisme à Bancoumana, Mali.

Thèse de pharmacie FMPOS, 1999.

9- Doumbia, S. Contribution à l'étude épidémiologique du paludisme, des bilharzioses et des parasitoses intestinales dans un quartier périurbain de Bamako : Banconi., Médecine. ENMP, Bamako, 1989.

10- Fanello, C., F. Santolamazza, and A. Della Torre. Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex by PCR-RFLP. *Med. Vet. Entomol.* 2002, **16**: 461-4.

11- Favia G, Lanfrancotti A, Spanos L, Siden-Kiamos I, Louis C. Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol*, 2001. **10**(1):

12- Fontenille, D., and *al.* Vecteurs du paludisme: du terrain à la génétique moléculaire, recherches en Afrique. *Rev epidemiol santé publique*, 2005, **53**: 283-290.

13- Gass RF - Influences of blood digestion on the development of *Plasmodium gallinaceum* in the midgut of *Aedes aegypti*. *Acta Trop*, 1977, **34**, 127-140.

14- Gass RF & Yeates RA - *In vitro* damage of cultured ookinete of *Plasmodium gallinaceum* by digestive proteinases from susceptible *Aedes aegypti*. *Acta Trop*, 1979, **36**, 243-252.

- 15- Gentilini, M. Médecine tropicale, 5ème édition. Flammarion, France. 1993.
- 16- Gilles, M. T., and B. De Meillon. The Anophelinae of Africa south of the Sahara. *Pub. Sth. Afr. Inst. Med. Res.* 1968, **54**: 343.
- 17- Gouagna LC, Mulder B, Noubissi E, Tchuinkam T, Verhave JP, Boudin C. The early sporogonic cycle of *Plasmodium falciparum* in laboratory-infected *Anopheles gambiae*: An estimation of parasite efficacy. *Trop Med Int Health* (1998). **3**: 21–28.
- 18- Grotendorst CA & Carter R - 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*, 1987, **73**, 980-984.
- 19- Hamon, J., M. Eyraud, B. Diallo, A. Dyenkouma, H. B. Choumara, and O. Sylla. Les moustiques de la république du Mali (Dipt. Culidae). 1961
- 20- Holstein, M. Guide pratique de l'anophélisme en Afrique de l'ouest Française (AOF). 1949.
- 21- Huber M, Cabib E & Miller LH- Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**, 2807-2810.
- 22- Koenraadt, C. J., K. P. Paaijmans, A. K. Githeko, B. G. Knols, and W. Takken. Egg hatching, larval movement and larval survival of the malaria vector *Anopheles gambiae* in desiccating habitats. *Malar J.*2003. **2**: 20.

- 23- Koïta, O. Epidémiologie du paludisme le long de la route Trans-saharienne du Mali. *Thèse de pharmacie* (Aout- Sept. 1988), 88p-26.
- 24- Kouriba, B. Ecologie de la chloroquino-résistance au Mali: intérêt d'un test de détection des souches chloroquino-résistantes de *Plasmodium falciparum* par l'utilisation de l'hydrogène trituré de verapamil. Thèse de pharmacie de l'ENMP. 1993.
- 25- Kumar, N. & Carter R - Biosynthesis of 2 stage specific membrane proteins during transformation of *Plasmodium gallinaceum* zygotes in to Ookinetes. *Mol Biochem Parasitol*, 1985, **14**,127-139.
- 26- Langer RC & Vinetz JM - *Plasmodium* ookinete-secreted chitinase and parasite penetration of the mosquito peritrophic matrix. *Trends Parasitol*, 2001, **17**, 269-272.
- 27- Mulder, B., T. Tchuinkam, J. P. Verhave, and V. Robert. Malaria transmission-blocking activity in the plasma of *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers in Cameroon. *Parasitologia*, 1993. **35** Suppl: 65-7.
- 28- Mouchet J., Carnevale P., Coosemans M., Julvez J., Manguin S., Richard-Lenoble D., Sircoulon J., *Biodiversité du paludisme dans le monde*, Paris : Editions John Libbey Eurotext, 2004, 428p
- 29- OMS. Stratégies de lutte contre le paludisme dans la région africaine et étapes pour leur mise en œuvre. *Cahiers Techniques AFRO*, 2003. **25** 1-20.
- 30- OMS. Guide du stagiaire: Entomologie du paludisme et contrôle des vecteurs. 2003.

31- Paskewitz, S. M., M. R. Brown, A. O. Lea, and F. H. Collins. Ultrastructure of the encapsulation of *Plasmodium cynomologi* (B strain) on the midgut of a refractory strain of *Anopheles gambiae*. *J Parasitol*, 1988. **74**: 432-9.

32- PNLP-Mali. Rapport de la collecte des données de base pour le suivi et l'évaluation des interventions de lutte contre le paludisme. Mars 2004.

33- Richards AG & Richards PA - The peritrophic membrane of insect. *Annu Rev Entomol* 1977, **22**, 219-240.

34- Shahabuddin M., Lemos FJA, Kaslow DC & Jacobs Lorena M - Antibody mediated inhibition of *Aedes aegypti* midgut trypsin blocks sporogonic development of *Plasmodium gallinaceum*. *Infect Immunol*, 1996, **64**, 739-743.

35- Shahabuddin M., Toyoshima T, Aikawa M & Kaslow DC- Transmission-blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitinase by mosquito protease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**, 4266-4270.

36- Sites internet:

- a. Site1: http://www.unituebingen.de/modeling/Mod_Malaria_Cycle_fr.html .
- b. Site2: <http://lozere.org/perso/malaria/lutte-antilarvaire.htm> .
- c. Site3: <http://lozere.org/perso/malaria/parasit.htm#HOM> .
- d. Site4: www.malaria.tun ; Lutte antivectorielle.
- e. Site5: www.guyane-guide.com . 2005.

- 37- Tabachnick, W. J. Reflections on the *Anopheles gambiae* genome sequence, transgenic mosquitoes and the prospect for controlling malaria and other vector borne diseases. *J Med Entomol*, 2003. **40**: 597-606.
- 38- Taylor LH & Read AF - Why so few transmission stages? Reproductive restraint by malaria parasites. *Parasitol Today*, 1997, **13**, 135-140.
- 39- Touré, Y. T. Bioécologie des anopheles (Diptera, Culidae) dans une zone rurale de savane soudanienne au Mali, Banambani et incidence sur la transmission du paludisme et de la filariose de Bancroft. *Thèse 3ème cycle en biologie animale, option entomologie, Centre Pédagogique Supérieur, Bamako, Mali*. 1979.
- 40- Touré, Y. T., O. Doumbo, A. Touré, M. Bagayoko, M. Diallo, A. Dolo, K. D. Vernick, D. B. Keister, O. Muratova, and D. C. Kaslow. Gametocyte infectivity by direct mosquito feeds in an area of seasonal malaria transmission: implications for Bancoumana, Mali as a transmission-blocking vaccine site. *Am J Trop Med Hyg*. 1998. **59**: 481- 6.
- 41- Touré, Y. T., Petrarca V. and Coluzzi M. Répartition géographique et polymorphisme chromosomique des membres du complexe *anopheles gambiae* au Mali. In Communication orale 2ème conf. intern. Paludisme et Babésioses. *Annecy, France Edition M6-1983*.
- 42- Vernick, K. D., H. Fujioka, D. C. Seeley, B. Tandler, M. Aikawa, and L. H. Miller. *Plasmodium gallinaceum*: a refractory mechanism of ookinete killing in the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Exp Parasitol* 1995. **80**: 583-95.

43- Vincke IH, Lips M. Un nouveau *Plasmodium* d'un rongeur sauvage du Congo, *Plasmodium berghei* n.sp. *Ann Soc Belg Med Trop* 1948 ; **28** : 97-104

44- Yaro, A. S., Dao A., Adamou A., J. E. Crawford, J. M. Ribeiro, R. Gwadz, Traoré S. F., and Lehmann, T. The distribution of hatching time in *Anopheles gambiae*. *Malar J.* 2006a, **5**: 19.

45- Yaro, A. S., Dao A., Adamou A., J. E. Crawford, Traoré S. F., Touré A. M., R. Gwadz, and Lehmann, T. Reproductive output of female *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae): comparison of molecular forms. *J Med Entomol* 2006b, **43**: 833-9.

46- Yeates, RA & Steiger, S - Ultrastructural damage of *in vitro* cultured Ookinetes of *Plasmodium gallinaceum* (Brumpt) by purified proteinases of susceptible *Aedes aegypti*. *Z Parasitenkd*, 1981, **66**, 93-97.



ANNEXES

ANNEXES

1- Identification des espèces et des formes moléculaires par PCR

La technique de Fanello C. et *al* en 2002

- **Numéroter les tubes PCR (0.2ml) correspondant au nombre de moustiques à traiter.**
- Mettre dans chaque tube une patte de moustique tout en prenant soin de relever dans un registre les références (étiquette) du moustique devant le numéro qui lui correspond.
- Mettre dans chaque tube 24µl de mixture et s'assurer que la patte est complètement submergée dans la mixture.
- Utiliser un contrôle positif pour M, A, S et un contrôle négatif.
- Placer les tubes à -20° et attendre à ce que la solution se congèle.
- **Programmer la machine (programmable thermal Controller) au cycle d'amplification et attendre 94°C. Introduire les micros tubes (0.2) contenant les réactifs nécessaires aux différentes réactions, puis lancer la machine.**
- Attendre à ce que la machine affiche sur l'écran FOR EVER ou 4°.
- Reprogrammer la machine à 37°C et ajouter 0,65µl de l'enzyme de digestion Hha I et attendre 6 heures avant de les faire migrer à l'électrophorèse ou bien de les garder à 4°C pour une migration prochaine.

Tableau : Composition des réactifs nécessaires pour la mixture à l'identification des espèces et des formes moléculaires d'*An. gambiae s.l.*

Réactifs	Concentrations initiales	Concentrations finales
PCR buffer(tampon)	10 X	1 X
dNTPs	10 mM	0.2 mM
Mgcl2	50 mM	2.5 mM
GA	20 ng/μl	6.25 ng
AR	20 ng/μl	18.75 ng
UN	20 ng/μl	12.5 ng
Taq polymerase	5U /μl	0.9 U

Cycle d'amplification

1. 94 °C pendant 7mn
2. 94 °C pendant 30 s
3. 50 °C pendant 30 s
4. 72°C pendant 30 s
5. 72°C pendant 7mn
6. 4°C température de conservation des amplifiants

Ce cycle est répété 29 fois à partir de l'étape 2.

Séquence nucléotidique des différentes amorces pour l'identification des espèces et formes moléculaires

AG (<i>gambiae</i>)	5'-CTGGTTTGGTTCGGCACGTTT - 3'
AR (<i>arabiensis</i>)	5'-AATTGTCCTTCTCCATCCTA - 3'
UN (universel)	5' -GTGTGCCCTTCCTCGATGT- 3'

Electrophorèse de L'ADN

Préparation du Gel et Interprétation des bandes

Nous avons préparé un gel d'agarose à 2% sur lequel 10µl d'ADN mélangés à 2µl de Dye (100ml d'H₂O stérile + 46g de sucrose + 0.25g de bleu de bromophenol) ont été logés par puits.

La migration a été conduite dans un bac électrophorétique à l'aide d'un générateur (Electrophoresis power supply-EP301) sous un courant de 150 volts pendant 1 heure.

Après migration, les bandes ont été visualisées sous une lampe UV et photographiées à l'aide d'une caméra quick shooter (IBI, model QSP/Hood # 14, catalog N° 46420).

L'interprétation a consisté à identifier les espèces et leurs formes moléculaires par comparaison de leur taille en base paire (bp) à celle du marqueur moléculaire (100 bp DNA Ladder, Invitrogen Ready load). Ainsi on a : 367 bp (*An. gambiae* forme M), 257 bp (*An. gambiae* forme S), 292 bp (*An. arabiensis*).



Photo 4: identification des espèces et formes moléculaires sur un gel d'agarose.

Légende

- 1** : Marqueur moléculaire 100bp
- 2** : Contrôle positif forme M (espèce A)
- 3** : Contrôle positif d'*An. arabiensis* (espèce B)
- 4** : Contrôle positif forme S (espèce A)
- 5, 10** : *An. Arabiensis* (espèce B)
- 6, 11** : forme M (espèce A)
- 7, 8, 9, 12** : forme S (espèce A)
- 13** : Contrôle négatif.

2- Fiche de dissection des moustiques

DISSECTION DES MOUSTIQUES D'INFESTATION EXPERIMENTALE

Localité:	Date dissection:
Date d'emergence:	Identification de porteur:
Date du repas de sang:	Charge gametocyt que:
Identification de moustique	Charge parasitaire:
No. de groupe:	Nombre de femelles non-gorgées:
No. de famille:	Especes/formes chromosomiques:

No	OOCYST +/-	CHARGE	ABD. STAGE	OBSERV.	DNA

3- Protocole d'infection des souris de laboratoire avec *P. berghei*

Chris Janse, Jai Ramesar, Andy Waters

Leiden University Medical Center (LUMC)

A - Isolement de la souche de *P. berghei*

Le sang des thammomys sauvages est étudié sur goutte épaisse, puis sur frottis. Lorsqu'il est infecté, l'animal l'est le plus souvent par deux espèces appartenant l'une au groupe *berghei* et l'autre au groupe *vinckei-chabaudi*.

Le problème posé est tout d'abord de séparer ces deux espèces, puis d'entretenir chaque souche sur des rongeurs de laboratoire.

La séparation des souches est assez aisée car *P. berghei* infecte les rats et hamsters au premier passage et non les souris ; tandis que *P. vinckei* infecte les souris et non les rats et hamsters.

On peut aussi installer une souche sur souris à partir d'*Anopheles* sauvages infectées. Pour cela les glandes salivaires positives sont écrasées entre lame et lamelle ; puis la lamelle est retirée, les sporozoïtes sont prélevés dans une goutte de ringer et inoculés en injection intraveineuse.

Après l'isolement, ces souches étaient conservées par la méthode suivante.

B- Méthode de conservation des stades sanguins de *P. berghei*.

Les stades sanguins des clones de parasite étaient stockés dans l'azote liquide. Ces stades sanguins étaient obtenus à partir des souris infectées.

- 1.** Prélever 0,8 - 1ml de sang infecté par ponction au niveau du cœur d'une souris ayant une parasitémie de 1-10%.
- 2.** Mélanger le sang avec 1ml d'une solution de glycérol/PBS (glycérol de 30% ; v/v), contenant 0,05ml de solution stock à base d'héparine.
- 3.** Transférez la suspension à 4 cryotubes (Nunc), 0,5ml par tube.
- 4.** Laissez les tubes durant 5 - 15mn à 4°C et transférez les fioles doucement dans le réservoir d'azote liquide. La suspension de sang d'un tube (0,5ml) peut être employée pour infecter 2 - 10 souris. Par l'injection intra péritonéale de 0,1ml de cette suspension à une souris, la parasitémie augmente et atteint habituellement 1 - 10% dans les 3 - 5 jours.

C- Procédure expérimentale de l'infection des souris avec les stades sanguins de *P. berghei*.

Nous procédions à l'infection des souris par l'injection intra-péritonéale des érythrocytes infectés. L'injection des stades sanguins de *Plasmodium berghei* (*P. berghei*) en intraveineuse dans la veine au niveau de la queue avait lieu uniquement lors du clonage d'une lignée de parasite ou pour établir des infections synchronisées. Ces stades sanguins étaient obtenus soit à partir des stocks congelés dans l'azote liquide ou directement à partir d'autres souris infectées. Pour la plupart des cas durant l'infection de ces souris, le nombre exact de parasite injecté n'était pas nécessairement établi. Le but essentiel de ces séances d'infection était d'entretenir et de faire multiplier les parasites, pour cela nous employions les souris suisses (20 - 25g). Les souris suisses étaient plus grandes, plus faciles à manipuler et de meilleur marché que la plupart des autres souris. Pour l'entretien et la propagation des parasites *in vivo* les caractéristiques suivantes étaient prises en compte: 1µl de sang contenant approximativement 6×10^6 érythrocytes; *P. berghei* à un taux moyen de multiplication de 10 par 24 heures chez les souris pendant la période de la parasitémie croissante de 0 à 5 - 10% ; à une parasitémie de plus de 5 - 10% les souris pouvaient mourir des complications cérébrales.

Pour réduire la perte de production de gamétocytes nous maintenions les souris à une séance d'injection hebdomadaire de parasites obtenus à partir des stocks congelés. Ces séances hebdomadaires se poursuivaient durant huit (8) semaines maximum au bout desquelles l'infection était renouvelée avec de nouvelles souches du parent clone en stock congelés.

- L'infection des souris avec des stades sanguins de *P. berghei* conservés congelés.

1. Dégelez un "cryotube" contenant la suspension du sang 0,5ml (voire B) à la température ambiante.
2. Injectez 0,02 - 0,5 ml de la suspension intra-péritonéale à une souris.

- L'infection de souris avec des stades sanguins obtenues à partir d'une souris infectée (voie mécanique).

1. Prélever une gouttelette de sang de la queue (5 μ l) d'un animal infecté ayant une parasitémie de 5 - 10% dans 10ml PBS.

2. Injecter 0,1ml de la suspension intra-péritonéale à une souris.

3. 4 à 7 jours après l'injection la parasitémie augmentera de 0,1 à 5 -20%.

Cette méthode est employée pour infecter mécaniquement les souris de façon hebdomadaire. L'infection est exécutée pendant 1 - 2jours avant que les caractéristiques de la maladie, telles que les complications cérébrales ne deviennent évidentes.

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette faculté, de mes Condisciples, devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'Être Suprême d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et je n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail,

Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine dès la conception.

Même sous la menace, je n'admettrai de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois humaines.

Respectueux et reconnaissant envers mes maîtres, je donnerai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leur père.

Que 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