

UNIVERSITE DU MALI

REPUBLIQUE DU MALI
Un Peuple - Un But - Une Foi

Institut Supérieur de Formation
Et de Recherche Appliquée ISFRA

THESE DE DOCTORAT DE SPECIALITE DE L'ISFRA

Spécialité: Parasitologie Médicale:

Sujet:

Paramètres Epidémiologiques de la transmission de *Plasmodium falciparum* dans le village de Bancoumana; pouvoir infectieux des porteurs de gamétocytes pour la préparation de sites d'essais vaccinaux bloquant la transmission.

Présenté par: **Mouctar DIALLO**

Sous la direction de: **Professeur Ogobara K. DOUMBO**

Soutenu le/2001.

Jury:

M^{me}SANGARE Constance Soucko, Professeur, Université du Mali, Présidente.
M^r Dominique CHABASSE, Professeur, Université d'Angers (France), Rapporteur
M^r Dapa A. Diallo, Professeur, Université du Mali. Rapporteur
M^r Anatole Tounkara, Professeur, Université du Mali, Examineur
M^r Ogobara K. Doumbo, Professeur, Université du Mali, Directeur de thèse

Ce travail réalisé au Centre de Recherche et de Formation sur le Paludisme (MRTC) du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires (DEAP) de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie (FMPOS) de l'Université du Mali a bénéficié de l'appui du Projet TMRC Mali-Tulane, du Programme TDR/OMS et LPD/NIH (USA).

Dédicaces

Je dédie humblement ce travail à:

Mon grand-père: Feu Mouctar TANGARA, je sais qu'au jour où tu m'inscrivais à l'école, ton intention était de faire de moi un "Homme", comme tu l'as été aux côtés de la France colonisatrice de ton pays, en 1914-1918 et 1939-1945. Alors cher grand-père, malgré le fait que je t'ai connu très peu, j'avoue sincèrement que j'ai encore en mémoire tes qualités d'homme de foi, de générosité, de patience et de pardon. Tu as tout simplement été pour moi, un homme social.

Dors en paix.

Amen

Ma grand-mère: Feue Oumou COULIBALY, je n'oublie jamais et je ne me lasserai de le dire et si nécessaire de l'écrire l'adage dont tu ne cessais de me répéter: "La Kola du pauvre se croque dans la toilette". Je te remercie pour tout ce que tu as fait pour que je sois là aujourd'hui. Je reconnais maintenant le sens de l'éducation que tu m'as donnée. Je te suis très reconnaissant chère grand-mère.

Répose en paix.

Amen

Mon père Dramane Diallo, je te remercie pour tout ce que tu as fait pour moi.

Ma mère Fatoumata SOUCKO (TANGARA), mère de famille exemplaire, mère de famille infatigable et mère de tout, je te dis aujourd'hui merci pour tout le sacrifice consenti. Tu as cultivé en moi, l'acceptation et l'amour des autres avec leurs différences, les vertus de la tolérance, du pardon, de la patience et de l'amour du prochain. Trouves ici l'expression de ma profonde reconnaissance et de mon amour filial.

Tous mes frères et soeurs, pour le dévouement et l'affection qu'ils m'ont témoignés trouvez tous ici, le fruit des sacrifices consentis pour moi.

Ma femme Mariam Doumbia et à mes filles Fatoumata dite Goundé et Oumou Mouctar pour toutes les souffrances endurées pendant les longues périodes d'absence causées par la réalisation de cette thèse. Je vous remercie de votre soutien psychologique qui était indispensable à la réussite de ce travail. Je vous prie de retrouver ici ma profonde reconnaissance, mon amour (d'époux et de père) profond et toute mon affection.

REMERCIEMENTS

Un remerciement très sincère est adressé à toutes les personnes de bonne volonté qui de loin ou de près ont contribué tant soit peu à la réalisation de ce travail.

Dans ce cas, je me réserve d'énumérer nommément de façon exhaustive les parents, collaborateurs et maîtres qui m'ont apporté leurs soutiens moraux, matériels et scientifiques tout au long de cette thèse. Trouvez ici, l'expression de ma profonde gratitude.

Mes remerciements s'adressent à toute l'équipe du Centre de Recherche et de Formation sur le Paludisme (MRTC) du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires (DEAP) de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie (FMPOS) et notamment à mes maîtres:

Au **Professeur Ogobara Doumbo**, médecin chef de DEAP/FMPOS, directeur du Cours d'Epidémiologie pour Cadres Supérieurs de la Santé, Lésion d'Honneur de la République Française, Chevalier de l'Ordre National de la République du Mali, directeur de cette thèse. Cher maître, votre amour du travail bien fait, votre passion pour la science et la technologie font de vous un chercheur admirable. Vous n'avez ménagé aucun effort pour suivre cette thèse depuis sa conception jusqu'à la rédaction. Scientifique infatigable, rigoureux et méticuleux vous avez lu et relu cette thèse afin qu'elle en soit aujourd'hui ce qu'elle est. Cette oeuvre est le fruit d'un effort conjugué de toute une équipe de recherche en laquelle vous avez su inculquer l'esprit de compétitivité dans l'honnêteté scientifique. Car votre grande ambition scientifique ajoutée à votre esprit d'ouverture font de vous un scientifique et un pédagogue admirable. Puisse ce travail exprimer toute ma profonde reconnaissance et mon admiration.

Au **Professeur Yéya Tiémoko Touré**. Cher maître, votre apport intellectuel et matériel ainsi que vos conseils de grand frère et de "confident" ne m'ont jamais fait défaut aux moments cruciaux de ce travail. Cher grand "frère confident", cher maître, votre sympathie, votre ouverture d'esprit, votre grande ambition scientifique font de vous un scientifique admirable. Votre sens élevé du bonheur de tous et votre tact ont permis de faire de ce département (DEAP) un cadre idéal de travail et d'épanouissement. Je vous prie de trouver ici ma profonde gratitude.

Au **Professeur Amadou Diallo**. Professeur de biologie animale, de Zoologie et de Génétique à la FMPOS, Chef de DER des Sciences Fondamentales à la FMPOS: Vos qualités de scientifique et pédagogue et votre humeur constamment joviale font de vous un maître admirable. J'ai bénéficié de vos précieux conseils et de votre disponibilité en des moments difficiles de la réalisation de ce travail. Je vous dis simplement merci pour tout ce que vous avez fait pour moi.

Au **Docteur Richard K. Sakai**, modeste, discret et efficace scientifique, de par vos qualités je vous prie d'accepter mon appellation: "Ambassadeur scientifique" des Etats

Unis d'Amérique auprès du DEAP au Mali. Nous avons bénéficié votre soutien tant sur le plan technique que matériel tout au long de la réalisation de ce travail. Je vous prie d'accepter toute ma reconnaissance.

Aux membres du jury qui, en dépit de leurs multiples occupations, ont bien voulu accepter de siéger dans ce jury. J'ai nommé:

- **Professeur SANGARE Constance SOUCKO**, Présidente du Jury, vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider le jury de cette thèse. Votre qualité d'Enseignante de chercheur, votre calme, votre sérénité, votre rigueur et votre amour du travail bien fait, font de vous un exemple à imiter. Trouvez ici Madame toute ma reconnaissance et ma profonde gratitude.

-**Professeur Dominique CHABASSE**, Professeur de Parasitologie-Mycologie Médicale, chef du Service de Parasitologie-Mycologie Médicale au Centre Hospitalier Universitaire (CHU) d'Angers (France), Chargé du cours de Mycologie Médicale à Angers à Nantes et à l'Institut Pasteur, Membre de la Société Française de Mycologie Médicale, Membre du Comité Scientifique de l'Institut Pasteur, Membre du Comité chargé de la sélection des articles paraissant dans le journal "Mycologie Médicale", Membre du Comité de Partenariat de Jumelage et de la Mutualité Angers-Bamako, cher professeur malgré vos multiples fonctions, vous avez accepté de siéger dans ce jury. Nous vous disons merci et nous vous témoignons toute notre reconnaissance.

-**Professeur Anatole TOUNKARA**, Immunologiste, Maître de conférences agrégé d'Immunologie, Chargé du cours d'Immunologie à la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie (FMPOS), Directeur du Centre National de Transfusion Sanguine, c'est un grand plaisir pour nous de vous compter parmi les membres de Jury de cette thèse. Cela témoigne de votre spontanéité, de votre constante disponibilité, de votre qualité d'homme de science et de votre rigueur pour le travail bien fait. Veuillez accepter monsieur le Professeur notre profonde gratitude et notre profonde reconnaissance.

-**Professeur Dapa A. DIALLO**, Professeur agrégé d'Hématologie à la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie (FMPOS) du Mali, Chef du Laboratoire d'Hématologie de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie (FMPOS) du Mali, Chargé du cours d'Hématologie à la FMPOS, Votre présence dans ce jury témoigne de votre constante disponibilité, de votre simplicité et de l'intérêt que vous portez à la formation. Nos quelques années de contact nous ont permis de mesurer l'étendue de votre savoir, de votre sagesse de votre délicatesse et de l'amour de travail bien fait qui resteront un exemple pour nous. Permettez nous, monsieur de vous exprimer notre considération et notre attachement. C'est un grand plaisir pour nous de vous voir siéger dans ce jury de thèse. Merci!

- A tous mes collègues et maîtres du Centre de Recherche et de Formation sur le Paludisme (MRTC) du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires (DEAP) de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie (FMPOS), ce travail

est le fruit des efforts consentis de tous. Vous avez fait preuve d'une équipe solidaire, homogène, compétitive et de renommée internationale. Je ne me lasserai jamais de remercier ceux qui ont guidé mes premiers pas dans ce laboratoire. Il s'agit de: Abdoulaye Dabo, Ousmane Koita, Amagana Dolo, Sékou F. Traoré, Madama Bouaré et Madame Traoré Yaye Sow. Je vous réitère toute ma reconnaissance et vous dis: "Alla ka aw saara". Amen.

- J'adresse sincèrement mes remerciements à mes camarades de thèse: Magaran Bagayoko, Guimogo Dolo et Djibril Sangaré pour avoir trimé ensemble des années durant pour leur collaboration franche et constructive. Je leur dis bon courage, bonne chance et succès dans les activités de recherche qui nous attendent. Je leur dis: "Il n'est jamais trop tard pour bien faire".

- Mes remerciements sincères vont à l'ensemble du staff technique impliqué dans l'élaboration du projet TMRC Mali-Tulane et particulièrement à mes collègues: Abdoulaye Touré, Seydou Doumbia, Mahamadou Diakité, Samba Diop, Amed Ouattara, Lalla Kassambara, Awa Dembélé, Haoua Konaré, Belco Poudiougou, Sory Diawara, Oumou Niaré, Nafomon Sogoba, Adama Daou.

- Aux gestionnaires et secrétaire du MRTC/DEAP, Danzélé Coulibaly, Madame Sissoko Araba Maradou et Madame Coulibaly Assa Demba.

- Au Directeur et à tout le personnel de l'ISFRA ainsi qu'à la direction de la FMPOS, pour les services administratifs rendus indispensables à la réalisation de cette thèse.

- A la population de Bancoumana et aux guides collaborateurs, Modibo Diabaté, Djéliyman Diabaté, Seydou Camara et Mamady Camara.

Je salue très cordialement mes collaborateurs et formateurs extérieurs et particulièrement:

- Les scientifiques des Instituts Nationaux de la Santé (NIH) des USA et notamment à David Kaslow, Andréa Egan, David Kester, Olga M, Bob Gwadz et Louis Miller pour leur franche Collaboration et leur appui scientifique et matériel.

- Je remercie le personnel de l'Université de Tulane en Nouvelle Orléan (New Orleans-USA): Donald Krogstad, John C. Beier, Madame Krogstad Fran, John Gerone et Moukaila Abdou pour leur collaboration fructueuse.

C'est aussi le lieu pour moi de remercier les parents et connaissances pour leurs apports quelque soit la nature. J'exprime ainsi toute ma reconnaissance:

- A ma tante Feuc Fatoumata dite Goundé Diarra et son mari Abel Dioni pour m'avoir logé durant les cycles secondaire et supérieur de mes études. Je vous dis encore merci.

- Mes remerciements s'adressent à Paul Cissé, Mamadou Bassirou Camara, Farouk Camara, Amadou Diarra, Nahouma Sylla, Abdoulaye Diarra, Drissa Diop, Seydou

Diarra et Abdoulaye Tapo pour le soutien moral qu'ils m'ont offert. Trouvez ici l'expression de toute ma profonde gratitude.

RESUME :

Le paludisme reste encore un problème majeur de santé publique. L'approche vaccinale est une des meilleures armes du futur. Dans le but de préparer un site d'essais vaccinaux bloquant la transmission au Mali, nous avons déterminé les paramètres épidémiologiques de la transmission du paludisme et étudié le pouvoir infectieux des porteurs de gamétocytes dans le village de Bancoumana, une zone d'endémie palustre et à transmission saisonnière. Le village est situé à 60 km au sud-ouest de Bamako.

Pour atteindre nos objectifs, nous avons procédé à une caractérisation socio-démographique du village de Bancoumana. Nous avons choisi les enfants âgés de 6 mois à 9 ans pour étudier l'épidémiologie du paludisme. Les essais biologiques (Infection directe et Infection à travers une membrane) ont été testés chez les sujets d'âge compris entre 4-18 ans pour l'étude du pouvoir infectieux des porteurs de gamétocytes. Les moustiques ont été dissequés 8 jour après le repas de sang. Nous avons cherché chez les porteurs de gamétocytes les facteurs pouvant influencer l'infectivité. L'étude du polymorphisme de *P. falciparum* a été réalisée par la technique de la biologie moléculaire.

L'indice plasmodique (IP) était significativement plus élevé en octobre ($P < 10^{-6}$). Il a baissé progressivement entre 1996 et 1998. L'indice splénique (IS) était également plus élevé en octobre 1996 (53,0%), 1997 (44,1%). En 1998 l'indice splénique était plus élevé en février (40%) ($P < 10^{-6}$). Les indices gamétocytiques (IG) étaient comparables d'une année à l'autre. Ils variaient de façon significative selon les passages transversaux d'une même année ($P < 10^{-6}$). La résistance parasitologique a touché avec une plus grande fréquence les enfants de 1-2 ans en 1996 et 1997 respectivement 31,6% et 28,5%. Par contre cette résistance parasitologique est plus marquée chez les enfants de 3-4 ans en 1998 (15%). Les enfants âgés de 1 à 2 ans ont fait plus d'accès grave que les autres enfants des autres tranches d'âge pendant les trois années d'étude ($P < 10^{-6}$). Une variation significative de la fréquence des accès fébriles en fonction des associations d'allotypes a été observée. La fréquence de fièvre la plus élevée était rencontrée chez les sujets porteurs de l'association d'allotypes MAD20-RO33 (13,3%). Les taux d'infection des moustiques en oocystes dans les classes d'âge 4-9 ans et 10-18 ans étaient respectivement de 64,5% et 52,3% en 1997, 70,9% et 59,3% en 1998. Les charges oocystiques moyennes (moyenne géométrique) des moustiques infectés étaient plus élevées chez les enfants de 4-9 ans en 1997 ($P = 0,05$), et en 1998 ($P = 0,07$). En 1997, le taux de prévalence globale en oocystes était de 62%, 62,2% et 61,2% respectivement en saison chaude, froide et pluvieuse. Il était comparable d'une saison à l'autre. Mais pendant la saison des pluies, les enfants de 4-9 ans avaient infecté plus de moustiques (68,4%) que les adolescents de 10-18 ans (43,5%) ($X^2 = 4,30$; ddl = 2; $P = 0,0,03$); (OR = 0,36; IC = 0,11-1,08). En 1998, le taux de portage global en oocystes était de 52,5%, 58,2% et 79,1% respectivement pendant la saison chaude, froide et pluvieuse. L'infectivité des porteurs de gamétocytes était plus élevée dans les deux groupes d'âge pendant la saison des pluies que pendant la saison sèche (OR = 2,53; IC = 1,21-5,29).

A la lumière de nos résultats sur les paramètres paludologiques, les variations saisonnières de l'infectivité chez les porteurs de gamétocytes, les essais de vaccins bloquant la transmission du paludisme seraient focalisés sur les sujets d'âge compris entre 6 mois et 18 ans, pendant la saison des pluies reconnue comme saison de transmission intense du paludisme dans le village de Bancoumana.

SUMMARY:

Malaria remains again a public health problem. In futur for vaccine approach will be a better of weappons. To prepare sites trial in Mali, we study the epidemiological parameters of malaria transmission and the infectivity of gametocytes carriers in the village of Bancoumana, a malaria endemic area.

To reach our objectives we proceeded to a socio-demographic characterization of the village of Bancoumana. Children aged from 6 months to 9 years old were selected for the epidemiology study and those from 4 to 18 years old were selected for the infectivity study. Mosquitoes were dissected 8 days after blood meal. We check within gametocytes carriers factors which can determine infectivity. PCR technique was performed to amplify the polymorphic bloc of MSP1.

The peak prevalence of infection (smear positivity) was in October ($P < 10^{-6}$) and decrease from 1996 to 1998. The splenic rate was also high in Ocober, except in 1998 where the peak was in February .

Gamotocytes rate were comparable within years but differ at each cross sectional survey. Parasitological resistance was most found within children aged from 1 to 2 years old (31.6% and 28.5%) in 1996 and 1997. In 1998 this frequence was high in 3 to 4 years old children (15%).

During the 3 years survey, malaria was common in 1 to 2 years children ($P < 10^{-6}$). Fever was associated with the combination of allotypes MAD20-RO33 (13.3%).

Rates of mosquito infection in oocysts in 4-9 years old and 10-18 years old were respectively 64.5% and 52.3% in 1997, 70.9% and 59.3% in 1998.

The geometric means of oocyst loads between was higher among children of 4- 9 years of age categories in 1997 ($P = 0.05$) and 1998 ($P = 0.07$).

In 1997, the rate of global prevalence in oocysts was respectively 62%, 62.2% and 61.2% in hot, cold and rainy season. It was also comparable during the 3 years survey. During the rainy season, children from 4-9 years old infected more mosquitoes (68.4%) than those of 10-18 years old (43.5%) ($P = 0.0,03$); In 1998, the global portage rate in oocysts was 52.5%, 58.2% and 79.1% respectively during the hot, cold and rainy season.

The infectivity of gametocytes carriers was more than two time higher in the rainy season compared to the dry season (OR =2.53;.95% IC 1.21 to 5.29).

In discovery of malaria transmission blocking vaccine, interventions will be focalized on subjects aged from 6 months to 18 years old according our results for paludometric parameters and the seasonal infectivity of gametocyte carriers during the raining season which is malaria transmission period in Bancoumana.

Liste des abréviations :

OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
TBV :	Transmission Blocking Vaccine
TBV25H :	Human Transmission Blocking Vaccine "contre la Protéine de poids moléculaire 25 kD"
kD :	kilo-Dalton
DEAP :	Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires
MRTC :	Malaria Research and Training Center
MSP-1 :	Protéine-1 de la Surface du Mérozoïte
CSCOM :	Centre de Santé Communautaire
PEV :	Programme Elargi de Vaccination
ONG :	Organisation Non Gouvernementale
FMPOS :	Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie
NIH :	National Institute of Health
PPP :	Probabilité Proportionnelle à la taille de la Population
GE :	Goutte épaisse
mg :	milligramme
J0 :	Jour zéro
RI :	Résistance de type I
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
PCR :	Polymerase Chain Reaction
µl :	microlitre
UV :	Ultra-violet
DO :	Densité Optique
Pb :	paire de base
°C :	dégré celsius
mn :	minute
TMRC :	Tropical Medicine and Research Center
CDC :	Centre de Diagnostic et de Contrôle
USA :	United States of America
DS :	Déviation Standard.
IP:	Indice plasmodique
IG:	Indice gamétocytaire
IS :	Indice splénique
ddl :	dégré de liberté
OR :	Ode Ratio
IC :	Intervalle de confiance
ICAM-1 :	Intercellular adhesion molecule-1
KAHRP :	Knob Associated Histidine Rich Protein
RESA :	Ring Erythrocyte Surface Antigen
HRP1-2 :	Histidine Rich Protein 1-2
PMMSA:	Precursor to Major Merozoite Surface Antigen

Table de matières

	Pages:
I Introduction :	1
II Généralités:	4
1- Les vecteurs de la transmission	4
2- Biologie des Plasmodies	4
2-1 Les <i>Plasmodium</i> humains et leur répartition	4
a) <i>Plasmodium falciparum</i>	5
b) <i>Plasmodium malariae</i>	5
c) <i>Plasmodium ovale</i>	5
d) <i>Plasmodium vivax</i>	5
3- Cycle biologique	5
a) chez l'homme	6
b) chez le moustique	12
4- Généralité sur la diversité génétique de <i>Plasmodium falciparum</i>	15
4-1 Cycle biologique et source de la diversité de <i>Plasmodium ... falciparum</i>	15
4-2 Généralité sur l'antigène de surface du mérozoite.	15
5- La lutte antipaludique	16
5-1 La lutte et la protection antivectorielle	17
5-2 Diagnostic biologique du paludisme	18
III Matériels et méthodes :	33
A. Caractères socio-démographiques	33
1- Lieu d'étude	33
2- Historique	34
3- Climat et végétation	34
4- Relief et hydrographie	35
5- Démographie	35
6- Infrastructure socio-sanitaire	36
7- Activités économiques	36
B. Epidémiologie du paludisme, dynamique de la diversité allotypique à Bancoumana	36
1- Echantillonnage	36

2- Période d'étude	37
3- Techniques d'étude	37
3-1- Suivi longitudinal	38
3-2-test <i>in-vivo</i> standard de l'OMS de 14 jours	38
4- Résistance parasitologique	39
5- Mesure de l'hématocrite	39
6-Extraction de l'ADN plasmodial et amplification par PCR	39
6-1- Amplification <i>in vitro</i> de l'ADN ou 'Polymerase Chain Reaction'	40
6-2 Choix des amorces	41
6-3 Préparation des mélanges réactionnels	41
6-4 Mode opératoire	41
6-5 Préparation du gel à 2%	42
6-6 Révélation des produits amplifiés	42
4- Paludisme grave, définition du TMRC	42
5- Considérations éthiques	42
6- Analyse des données	43
C. Etude du pouvoir infectieux des porteurs de gamétocytes à Bancoumana.	43
Ca- Indentification des porteurs de gamétocytes- gorgement des moustiques par contact direct.	43
1- Recrutement	43
2- Techniques de gorgement	44
3- Dissection des moustiques	44
3-1- Récupération des oocystes	44
3-2- Extraction de l'ADN des oocystes	45
3-3- Amplification des oocystes	45
Cb- Facteurs hématologiques et infectivité des gamétocytes	45
1- Principe de l'électrophorèse	45
2- Procédure	45
3- Préparation de la cuve à électrophorèse	46
4- Electrophorèse	46
5- Coloration	47
6- Clairance des plaques	47
Cc- Facteurs de sérum sur l'infectivité des gamétocytes.	47

IV RESULTATS ET DISCUSSION :

A- Caractères socio-démographiques	49
1- Données socio-climatiques	50
2- Infrastructures socio-sanitaires	54
B- Indicateurs paludométriques	56
I-Indices paludométriques	56
II-Morbidité et mortalité palustres	61
1- Accès palustre simple	61
2-Accès palustre grave et compliqué	62
3-Taux de léthalité/paludisme	62
4-Niveau de résistance de <i>Plasmodium falciparum</i> à la chloroquine	63
5-Répartition des allotypes de la MSP-1 à Bancoumana de 1996-1997.	64
6-Relation entre allotypes de la MSP-1/morbidité palustre	65
III-Discussion	67
IV-Conclusion	69
C- Infestation expérimentale.	72
I Variations saisonnières de l'infectivité des porteurs de gamétocytes chez <i>Anopheles gambiae</i> à Bancoumana.	72
1- Prévalence des indices plasmodiques et gamétocytiques au cours du "screening bimensuel"	72
2- Infectivité des porteurs de gamétocytes selon l'âge et les saisons	72
3- Discussion	77
4- Conclusion	78
II Comparaison de deux techniques de l'infection expérimentale dans l'évaluation du blocage de la transmission du paludisme à Bancoumana	78
1- Discussion	82
2- Conclusion	
III Rôle des facteurs hématologiques sur l'infectivité des gamétocytes de <i>Plasmodium falciparum</i> chez les moustiques à Bancoumana.	83
1- Discussion	87

2- Conclusion	88
IV Etude des facteurs de plasma sur l'infectivité des gamétocytes chez <i>Anopheles gambiae</i> à Bancoumana	88
1- Les porteurs de gamétocytes	88
2- Infection expérimentale	88
3- Discussion	94
4 –Conclusion	95
V Etude du polymorphisme de <i>Plasmodium falciparum</i> de l'homme au moustique au cours de l'infection expérimentale à Bancoumana.	95
1- Discussion	99
2 –Conclusion	100
Eléments d'identification de site d'essai vaccinal du "Transmission Blocking Vaccine"	101
Conclusion Générale	107
Références bibliographiques	109

INTRODUCTION

INTRODUCTION:

Le paludisme demeure un grand problème de santé publique dans la zone sub-saharienne. Il affecte l'état de santé des populations et constitue l'un des principaux obstacles au développement socio-économique des zones concernées. Le paludisme à *Plasmodium falciparum* est responsable de 10 à 25% des décès dans le groupe d'âge de moins de 5 ans dans les régions de forte endémicité avec une transmission saisonnière (OMS,1992). Selon l'OMS (1994), le paludisme tue 1 à 2 millions de personnes par an dans le monde. Quatre vingt dix (90%) pour cent de cette mortalité surviennent en Afrique au sud du sahara. La population infanto-juvénile, les femmes enceintes, les personnes âgées et les sujets "neufs" lui payent un lourd tribut.

Avec l'avènement de la résistance du parasite aux antipaludiques et la résistance des vecteurs aux insecticides, le paludisme pose de nouveaux problèmes et défis en matière de prise en charge et de contrôle. En Afrique, la lutte contre le paludisme est rendue difficile par la complexité et la variabilité des aspects que présente son épidémiologie (OMS, 1992).

Au Mali l'épidémiologie du paludisme diffère selon les régions éco-climatiques naturelles. Elle est saisonnière et stable dans les savanes du sud et instable dans les zones saharo-sahéliennes. En 1989, Doumbo et *al.* ont décrit cinq faciès épidémiologiques de transmission du paludisme allant de la zone sud-soudanienne à la zone sub-saharienne. Les variations micro-épidémiologiques sont donc extrêmement importantes. Les mêmes auteurs ont décrit en 1994 au Mali une saisonnalité des formes graves et compliquées du paludisme. Ils ont trouvé que 50% des cas de neuro-paludisme surviennent en fin de saison des pluies. Ils ont émis l'hypothèse de mutants virulents en fin de saison des pluies où le taux d'inoculation entomologique est le plus élevé. En 1995 Doumbo et *al.* ont trouvé au cours de leur étude que le paludisme est endémique dans toutes les localités étudiées au Mali avec des indices plasmodiques variant de 12,75% à 70,21% et les indices gamétocytiques variant de 1,30% à 14,36% suivant les localités. Au cours de cette étude ils ont constaté le phénomène suivant: avec un indice gamétocytique de 0,97%, la population était infectée avec un indice plasmodique de 61,64%; avec un indice gamétocytique de 12%, la population était infectée avec un indice plasmodique de 36,14%; avec un indice gamétocytique de 1,73%, la population était infectée avec un indice plasmodique de 52%. A partir de cette observation nous constatons qu'il existe au Mali un besoin d'étude sur la dynamique de l'infectivité de la population porteuse des formes sexuées de *plasmodium falciparum* en fonction de l'âge et des saisons de l'année. Il serait alors nécessaire de chercher à comprendre les facteurs qui déterminent cette infectivité.

Le phénomène de clonalité a été mis en évidence par Doumbo et *al.* en 1994; Koita (1994) et Diallo (1996) chez les formes asexuées qui peuvent se différencier en formes sexuées, les gamétocytes. Ainsi les gamétocytes issus de cette différenciation peuvent-ils suivre le même profil génétique? La diversité génétique de *Plasmodium falciparum* est telle que dans une communauté de parasites donnés l'apparition de nouvelles populations suit un répertoire antigénique différent.

Plusieurs stratégies ont été développées pour mettre au point le vaccin antipaludique: le vaccin anti-infection était destiné à prévenir tout développement du sporozoite au niveau du foie en empêchant l'attaque des globules rouges. Le vaccin anti-maladie autorisait l'infection, mais empêcherait tout développement de la maladie. Le **vaccin bloquant la transmission (TBV)** est un vaccin altruiste qui ne protège pas l'individu mais empêcherait le moustique d'assurer la phase sporogonique. Ainsi les protéines et ou les antigènes sont actuellement en étude et pourraient être utilisés comme candidats vaccinaux.

Au Cameroun Lensen et *al.* en 1998, ont montré la relative contribution des facteurs de sérum et des globules blancs sur la réduction de la transmission du paludisme chez les porteurs de gamétocytes en zone d'endémie . Le sang des porteurs de gamétocytes a servi à gorger les moustiques par la technique de "Membrane feeding" après remplacement du serum ou la déplétion des globules blancs ou les deux la fois. En cas de paludisme, les facteurs liés au serum, aux globules blancs ou les deux à la fois ont montré un impact significatif sur la réduction de la transmission alors que l'infectivité des porteurs de gamétocytes a été réduite par les facteurs humoraux seulement. En plus l'infectivité des gamétocytes des porteurs semiimmuns étaient significativement moindre, comparativement aux porteurs non immuns, et l'infectivité était indépendante de la densité gamétocytaire et des facteurs du plasma ou des leucocytes (ou les deux à la fois) après le repas sangain. Autrement dit le sang d'un porteur naturellement infecté contiendrait des facteurs de blocage de la transmission.

Drakeley et *al.* en 1998, ont constaté avec du sang lavé et resuspendu dans du serum, en gorgeant les moustiques par la technique de "Membrane feeding", que la transmission est bloquée chez les volontaires camerounais et gambiens qui avaient des réponses anticorps positives. En 1994 Kaslow et *al.*, ont présenté le TBV25H (un antigène synthétique) comme le meilleur antigène parce que bien structuré pour bloquer la transmission par la production des anticorps (testé par immunoblot). Ils ont trouvé que la protéine Pfs25 (une cystine-riche protéine) présente sur la surface des zygotes de *P. falciparum* est capable de bloquer complètement la transmission des parasites du paludisme par la technique de "Membrane feeding". Aussi c'est le vaccin candidat potentiel induisant l'immunité pouvant bloquer la transmission par la méthode de "Membrane feeding".

Ainsi avant l'essai de ces candidats vaccinaux sur le terrain il serait souhaitable que leur degré de conservation des souches plasmodiales soit testé par la méthode de la biologie moléculaire et de trouver un test d'essai biologique pour évaluer le "Transmission Blocking Vaccine". Ce test s'intéressera à suivre le parasite de l'homme au moustique (gamétocyte) et du moustique à l'homme (oocyste-"sporozoite"). Au Mali, une telle étude est rendue possible grâce à l'existence au Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires (DEAP) d'équipes d'entomologie et de parasitologie de l'unité de Malaria Research and Training Center: Centre de Recherche et de Formation sur le Paludisme (MRTC). Nous avons aussi pris en compte la nécessité de faire des études de

biologie moléculaire sur l'infectivité des gamétocytes en fonction de la complexité génotypique de *P. falciparum*.

Nous avons émis l'hypothèse:

Qu'il existerait une variation saisonnière et inter-annuelle du pouvoir infectieux des gamétocytes de *Plasmodium falciparum* dans la population de Bancoumana. Cette variabilité serait déterminée par des facteurs d'âge, sérologiques, socio-environnementaux, humains et génétiques de la population parasitaire.

Le but de notre travail était d'étudier l'épidémiologie du paludisme dans le village de Bancoumana en vue de préparer un site d'essais vaccinaux bloquant la transmission. Pour cela nous nous sommes fixés les objectifs suivants:

Objectif Général:

Etudier les paramètres épidémiologiques de la transmission de *Plasmodium falciparum* dans le village de Bancoumana et le pouvoir infectieux des porteurs de gamétocytes.

Objectifs spécifiques:

- Caractériser les paramètres socio- démographiques de la population de Bancoumana par un recensement démographique actualisé annuel.
- Décrire les paramètres humains de la transmission du paludisme dans le village de Bancoumana de 1996 à 1998;
- Déterminer l'infectivité différentielle des porteurs de gamétocytes dans la population de 4-18 ans par la technique du "Direct feeding" et décrire la dynamique de la charge gamétocytaire en fonction de l'âge.
- Comparer l'infectivité des gamétocytes par la technique "direct feeding" et "Membrane feeding" et identifier le meilleur essai biologique du "Transmission Blocking Vaccine" et les facteurs impliqués.
- Identifier les facteurs hématologiques pouvant expliquer la différence d'infectivité chez les porteurs de gamétocytes dans le village de Bancoumana.
- Analyser le potentiel de recombinaison génétique entre différents allotypes de la MSP-1 chez le moustique d'élevage.

GENERALITES

GENERALITES SUR LE PALUDISME:

Le paludisme est à l'heure actuelle la plus grave des maladies parasitaires endémiques. Il sévit dans les régions intertropicales où il est l'une des principales causes de morbidité et de mortalité infanto-juvénile.

I - LES VECTEURS DE LA TRANSMISSION:

Au Mali la transmission de cette parasitose est assurée essentiellement selon Touré et *al.*, (1979) par deux importants vecteurs: *Anopheles gambiae* s.l et *Anopheles. funestus* .

Ces vecteurs majeurs font partie de la famille des *Culicidae* communément appelés moustiques, qui sont des Diptères nématocères. Cette famille est subdivisée en 3 sous-familles: les *Toxorhynchitinae*, les *Anophelinae* et les *Culicinae*. Il a été identifié 3200 espèces de moustiques, réparties entre 37 genres. Les genres *Anopheles*, *Culex*, *Aedes*, *Mansonia* et *Sabethes* constituent les genres de moustique d'importance médicale.

Les vecteurs du paludisme humain appartiennent tous au genre *Anopheles*. Sur les 400 espèces d'Anophèles répandues à travers le monde, 60 sont vectrices du paludisme. Dans ce groupe, *Anopheles gambiae* occupe une place de choix. C'est en effet le vecteur majeur de *Plasmodium falciparum* en Afrique sub-saharienne. Pour qu'une espèce soit vectrice, elle doit remplir un certain nombre de critères. Il faut donc une compatibilité entre le vecteur et le parasite.

Les *Aedes* et les *Culex* sont vecteurs des plasmodies aviaires, mais sont réfractaires au développement des hématozoaires humains. *Anopheles artroparvus* d'Europe est vecteur de *Plasmodium vivax* et est réfractaire au développement de *Plasmodium falciparum* d'Afrique tropicale. Cette incompatibilité est un facteur limitant pour l'expansion des espèces de plasmodies hors de leur aire de distribution. Ensuite, la longévité du vecteur au stade imago doit être supérieure à la durée du cycle extrinsèque du parasite (gamogonie et sporogonie). Même en admettant que l'anophèle s'infecte au cours de son premier repas de sang, il devra par la suite vivre pendant une durée au moins égale à celle de l'incubation extrinsèque du parasite pour atteindre un âge épidémiologiquement dangereux. Enfin, l'anthropophilie est la condition *sine qua non* de la transmission naturelle du paludisme. L'endophilie stricte, soit par suite de préférence trophique, soit à cause de l'absence d'hôte alternatif est une condition favorisante. Lorsque toutes ces conditions sont réunies, l'anophèle au cours de son repas de sang inocule dans les vaisseaux sanguins de l'hôte, des sporozoïtes contenus dans ses glandes salivaires. Ces derniers sont issus d'un repas de sang infectant antérieur.

II - BIOLOGIE DES PLASMODIES:

1 - Les *Plasmodium* humains et leur répartition:

Il existe quatre espèces plasmodiales humaines : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* et *Plasmodium vivax*, sont rencontrées toutes au Mali, Koïta (1988), Doumbo et *al.*, (1992).

Plasmodium falciparum:

C'est le plus redoutable agent de la fièvre maligne (accès pernicieux, anémie sévère). Il envahit les érythrocytes qu'ils soient jeunes (réticulocytes) ou âgés. *P. falciparum* n'est donc pas du point de vue parasitologique un "parasite parfait" puisqu'il peut tuer son hôte.

Plasmodium falciparum est l'espèce la plus répandue autour de l'équateur où le paludisme sévit de façon endémique à cause de la température élevée et de l'humidité qui entretiennent de façon permanente des conditions favorables au développement du cycle chez les moustiques.

Plasmodium malariae:

Il est l'agent de la fièvre quarte. Ses mérozoïtes parasitent de préférence les hématies âgées. Cette prédilection joue à l'avantage du parasite puisque dans une certaine mesure elle empêche la mort de l'hôte. Il peut être responsable de syndromes néphrotiques graves. Il est essentiellement présent en Afrique et en Asie, beaucoup plus rare en Amérique tropicale.

c) *Plasmodium ovale:*

C'est l'agent de la fièvre tierce bénigne. Ses mérozoïtes parasitent de préférence les hématies jeunes (réticulocytes). Il est présent presque exclusivement en Afrique entre les tropiques du Cancer et du Capricorne, c'est à dire là où *P. vivax* est rare ou absent.

d) *Plasmodium vivax:*

Il est aussi responsable d'une fièvre tierce bénigne. Ses mérozoïtes ont comme *P. ovale* une préférence pour les globules rouges immatures. Miller et al (1975, 1977) ont démontré que l'antigène du groupe sanguin Duffy intervient dans la pénétration des mérozoïtes de *P. vivax* dans les hématies. En effet, *P. vivax* n'envahit que les érythrocytes qui possèdent l'antigène de groupe sanguin Duffy (Duffy +). Cet antigène est très rare dans la race noire (Duffy -). C'est ce qui explique sa localisation géographique actuelle. Il est exceptionnellement rencontré en Afrique du nord mais très répandu en Asie et en Amérique, entre le 16^{ème} et le 21^{ème} degrés de latitude.

CYCLE BIOLOGIQUE:

Les plasmodies sont des sporozoaires hémococcidies (ou hémospodides) appartenant au phylum des Apicomplexa. Ce sont des parasites dixènes puisque leur cycle comporte un hôte vecteur invertébré (l'anophèle) et un hôte vertébré homéotherme (Fig: 1).

a) Cycle chez l'homme:

L'anophèle femelle infectante au cours de son repas de sang injecte dans un vaisseau avec sa salive, les sporozoïtes localisés dans ses glandes salivaires.

Ces sporozoïtes transportés par le courant sanguin circulent dans tout l'organisme pendant un temps relativement court, sans subir de transformations.

Seuls survivent ceux ayant gagné le foie et ayant probablement franchi le barrage des cellules phagocytaires du foie (c'est à dire les cellules de Kupffer).

Phase hépatique:

Appelée phase pré-érythrocytaire ou phase exo-érythrocytaire, c'est une phase silencieuse et fut découverte par Shortt et Garnham en 1948. Les sporozoïtes traversent le revêtement endothélial des capillaires sinusoides avant de pénétrer dans l'hépatocyte. D'après Meis *et al.*, 1983, ce mécanisme fait intervenir probablement les expansions dendritiques des cellules phagocytaires de Kupffer qui traversent l'endothélium et un récepteur (Hollindale, 1983) dont la nature n'est pas encore connue. Chez les plasmodium selon Kretti *et al.*, (2000), il existe 3 stades d'invasion du parasite: l'invasion par les ookinètes de l'hépatocytome stomacal, l'invasion des glandes salivaires et les hépatocytes par les sporozoïtes et l'invasion des globules rouges par les mérozoïtes. Le mécanisme par lequel les sporozoïtes traversent la peau est inconnu. Mota *et al.*, en 2001 ont démontré par des études *in vitro* que les sporozoïtes traversent la lumière épithéliale, un mécanisme qui pourrait permettre le passage des sporozoïtes à travers les vaisseaux cutanés. Après ce passage, les sporozoïtes entrent dans la circulation et se localisent dans le foie, puis envahissent les hépatocytes. Cette infection, chez l'hôte naturel peut être importante. Le sporozoïte rencontre, selon Cerami (1992) et Frevert (1993) dans les cellules du foie, des récepteurs spécifiques. Il existe d'autre part des co-récepteurs pendant la progression des sporozoïtes qui sont d'après Dame (1984) et Robson (1995), des domaines de la thrombospondine (TSP) sur la Circomsporozoïte protéine (CSP) et sur la TRAP. Ce passage des sporozoïtes selon Shin (1982), des vaisseaux cutanés à la circulation intraveineuse est très rapide. Ceux-ci dans les cellules de Kupffer apparaissent en désintégration dans les phagolysosomes. Au contraire, Meis *et al.*, en 1983 ont observé *in vitro* les sporozoïtes passer à travers les cellules de Kupffer dans une vacuole ensuite dans l'espace de Disse. Récemment, Pradel et Frevert (2001) ont trouvé que les sporozoïtes utilisent les cellules de Kupffer comme voie d'accès au foie.

Une fois dans l'hépatocyte, le parasite s'arrondit et se transforme en une grosse cellule uninucléée, le trophozoïte. L'évolution du trophozoïte hépatique dépend de l'espèce plasmodiale.

** Evolution immédiate:

Chez les espèces *P. falciparum* et *P. malariae*, le noyau du trophozoïte âgé se divise en un grand nombre de fois, puis chaque noyau s'entoure d'un peu de cytoplasme pour former un syncytium qui à son tour s'entoure d'une membrane. Il se forme ainsi en 6

jours chez *P. falciparum* et en 15 jours chez *P. malariae*, un schizonte hépatique mûr appelé "corps bleu" qui contient quelques milliers de noyaux. C'est la schizogonie hépatique. Ce schizonte à maturité, éclate avec l'hépatocyte et libère des mérozoïtes hépatiques dans le courant sanguin qui vont pénétrer dans les globules rouges et initier ainsi la phase érythrocytaire.

** Evolution retardée:

La schizogonie exo-érythrocytaire chez *P. ovale* et *P. vivax* dure respectivement 9 et 8 jours. Il faut noter que certains schizontes peuvent rester en dormance sous forme uninucléée dans les hépatocytes. Ils sont appelés des hypnozoïtes. Ces hypnozoïtes peuvent donner naissance à des schizogonies hépatiques. Elles sont à l'origine de rechutes et de réviviscence schizogoniques (Danis et Mouchet, 1991).

La phase sanguine

Cycle érythrocytaire asexué:

Le mérozoïte:

La pénétration dans l'érythrocyte se fait en trois temps:

- La phase de fixation initiale ou de contact entre le manteau du mérozoïte et la surface de l'hématie qui peut se faire en n'importe quel point de la surface de l'un ou l'autre.
- La phase de réorientation pendant laquelle la région apicale du mérozoïte (perforatorium) se dirige vers la membrane érythrocytaire. Cette région apicale qui contient des rhoptries et des micronèmes est caractéristique des formes invasives du parasite d'où le nom d'*Apicomplexa*.
- La phase d'endocytose durant laquelle la membrane de l'hématie s'invagine, puis les micronèmes et les rhoptries se déchargent dans la vacuole parasitophore.

Au cours de cette pénétration active, la membrane érythrocytaire se déplace progressivement sous forme d'un anneau vers l'arrière du parasite. Le manteau glycoprotéique du parasite se détache et le mérozoïte se retrouve isolé dans la vacuole parasitophore, tandis que le manteau reste exposé à la surface du globule rouge.

Les études réalisées *in vivo* par Roberts et al., (1992) avec les clones de *Plasmodium falciparum* indiquent que des échanges antigéniques de l'ordre de 2% sont observés par génération. Par ailleurs, Howard (1984) et Leech (1984), au cours de leur étude réalisée sur des variants antigéniques de différentes espèces plasmodiales, ont décrit ces variants comme une famille polymorphique ayant un poids moléculaire élevé. Selon Su (1995) et Baruch (1995), le 'var gene' chez *Plasmodium falciparum* serait codé à la protéine-1 de la membrane érythrocytaire (PfEMP-1). Ces 'var genes' auraient une structure caractéristique avec une taille de 6-13 Kb. L'extrémité 5' coderait pour un large domaine extracellulaire polymorphique, et l'extrémité 3', courte coderait pour la portion cytoplasmique conservée et acide. L'extrémité 5' contiendrait une des 4 copies du motif original identifié dans d'autres protéines développées sur des ligands. Du point de vue organisation génomique des 'var genes', il a été identifié 50 copies de 'var' chez *P. falciparum* avec la présence d'un gène sur chaque télomère. En plus, selon Rubio et al.,

(1996) et Fischer et al.,(1997), il y a une aggrégation de ‘var genes’ sur les chromosomes 4, 7, 8 et 12. Pour structure, dans un globule rouge parasité, la PfEMP-1, est associée à un parasite sous la forme de Knobs formés par l’interaction du parasite qui code avec les protéines érythrocytaires. Dans ce cas, la PfEMP-1 pourrait médier l’adhésion de globules rouges parasités avec une variété de cellules endothéliales ou de protéines telles que CD36, ICAM-1, thrombospondine.

Le trophozoïte:

Le mérozoïte se transforme et prend une forme plus ou moins sphérique qui caractérise le trophozoïte, après sa pénétration dans l’hématie. Le trophozoïte est le siège d’importantes activités métaboliques et a une volumineuse vacuole nutritive qui refoule le noyau à la périphérie du cytoplasme. Cette vacuole nutritive parasitaire se remplit progressivement du produit de dégradation de l’hémoglobine, le pigment malarique ou hémozoïne (Danis et Mouchet, 1991). Des sacules se détachent de cette vacuole et migrent vers la membrane érythrocytaire avec laquelle ils fusionnent. Ces organites (granulations de Schüffner chez *P. ovale* et *P. vivax* ou tâches Mäurer chez *P. falciparum*) assurent le transport du matériel parasitaire dans le cytoplasme des hématies. Dans le cas de *P. falciparum*, ce matériel parasitaire semble entrer dans la composition des ‘Knobs’, qui sont des protubérances observées sur la membrane plasmique des globules rouges parasités et qui pourraient déterminer l’adhérence aux cellules endothéliales des vaisseaux du cerveau et la genèse de l’accès pernicieux (Danis et Mouchet, 1991).

Le schizonte:

Il provient de la multiplication successive du noyau du trophozoïte en plusieurs petits noyaux dont chacun s’entoure de cytoplasme, c’est la schizogonie endo-érythrocytaire. Le schizonte mûr est appelé ‘corps en rosace’. A maturité le schizonte éclate. Les hématies parasitées éclatent aussi. Les mérozoïtes ainsi libérés dans le plasma envahissent de nouvelles hématies. De nombreux cycles érythrocytaires sont ainsi initiés.

Lors de l’éclatement, l’hémozoïne et les débris membranaires sont libérés dans la circulation et sont phagocytés par les polynucléaires neutrophiles, les monocytes ainsi que les macrophages du foie, de la rate et de la moelle hématopoétique.

La lyse des hématies parasitées par les schizontes mûrs est synchronisée et contemporaine des accès fébriles.

La phase érythrocytaire a une durée de 7 à 15 jours pour *P. falciparum* et de 3 semaines pour *P. malariae*. Cette durée est difficile à déterminer chez les deux autres espèces (*P. ovale* et *P. vivax*) à cause des reviviscences schizogoniques. La schizogonie endo-érythrocytaire suit un cycle relativement régulier, caractéristique de chacune des espèces plasmodiales avec un nombre déterminé de mérozoïtes par schizonte. La durée d’un cycle est en général un multiple de 12 heures. Elle est de 36-48 heures pour *P. falciparum*, 48 heures pour *P. ovale* et *P. vivax* et 72 heures chez *P. malariae*. Un schizonte mûr de *P. falciparum* a 16 à 32 mérozoïtes, 6 à 24 pour *P. malariae*, 8 à 16 pour *P. ovale* et 16 à 20 pour *P. vivax*.

La gamétocytogénèse:

La gamétocytogénèse correspond à l'amorce du cycle sexué ou gamogonie. Après plusieurs cycles schizogoniques asexués, certains parasites endo-érythrocytaires se différencient en éléments uninucléés potentiellement sexués qui vont permettre la poursuite du cycle chez le moustique, ce sont les gamétocytes.

Le mécanisme d'induction ou le déclenchement ainsi que le processus de la gamétocytogénèse ne sont pas encore bien élucidés, de même la nature du stimulus demeure inconnue (Vanderberg, 1988).

Néanmoins on retient le fait que l'induction de la gamétocytogénèse est liée à une modulation environnementale ou à la souffrance du parasite. Par exemple la production des gamétocytes *in vitro* est accrue lorsqu'on ne renouvelle pas les érythrocytes dans les cultures continues (Carter et Miller, 1979). Quant à la modulation environnementale, on fait allusion à l'état immunitaire de l'hôte. En 1981, Smalley et Brown ont constaté que les sérums d'enfants gambiens n'exerçaient aucun effet de stimulation à eux seuls, mais pouvaient indirectement stimuler les lymphocytes qui à leur tour induisaient la production de gamétocytes. En 1981 Ade-Serrano et *al.* ont mis en cause une fraction C_{3b} du complément dans cette induction.

La pression médicamenteuse exercée surtout par des doses inférieures aux doses curatives serait à l'origine d'une augmentation de la gamétocytémie. Il a été constaté que la production des gamétocytes augmentait après administration de la pyriméthamine chez des sujets atteints de paludisme à *P. falciparum* (OMS, 1973; Schute et Maryon, 1954).

Aussi avec l'administration de la chloroquine, certaines contraintes métaboliques sont parmi les meilleurs facteurs de modifications environnementales et contribuent à induire la production des gamétocytes (Mons, 1985).

+ Développement des gamétocytes:

Selon L'OMS (1987), lors des premières manifestations cliniques du paludisme à *P. malariae*, à *P. ovale* et à *P. vivax*, il existe déjà dans le sang, des gamétocytes fonctionnels; tel n'est pas le cas au cours du paludisme à *P. falciparum*.

La gamétocytogénèse dure plus longtemps chez *P. falciparum* que chez les autres espèces. Selon Smalley, (1976) *in vivo*, les gamétocytes apparaissent dans le sang périphérique environ 10 jours après la sortie des premiers mérozoïtes hépatiques et un peu plus *in vitro* (12 à 14 jours).

En 1971, Hawking et *al.* distinguaient 5 stades au cours de la différenciation morphologique du jeune trophozoïte en gamétocyte mature. L'ultrastructure de ces stades (I à V) a été étudiée par Sinden en 1982. Les modifications de la forme du parasite sont surtout le fait d'un cytosquelette de sacs membranaires ainsi que des microtubules qui les sous-tendent. Entre le stade I et le stade III, on n'observe ces éléments qu'à un pôle de la cellule, mais finalement ils envahissent le gamétocyte tout entier au stade IV. Le stade V ou stade mature est caractérisé par la forme en banane du parasite. Selon donc le sexe du gamétocyte, les autres modifications structurales observées sont différentes. Le développement du gamétocyte mâle (microgamétocyte) peut s'accompagner d'une

prolifération du génome, de l'apparition du stade IV d'un corpuscule intranucléaire au voisinage de l'enveloppe nucléaire, de la réduction de la densité des ribosomes, des réticulums endoplasmiques, des mitochondries et des granules osmiophiles. Le développement des gamétocytes femelles (macrogamétocytes) n'implique au contraire aucune extension du noyau. mais il y a une prolifération des ribosomes cytoplasmiques, de réticulum endoplasmiques de mitochondries et de granules osmiophiles.

A l'observation microscopique d'un frottis sanguin coloré au May-Grunwald Giemsa, les microgamétocytes de *P. falciparum* sont légèrement arcqués, ils ont un noyau presque diffus, un cytoplasme rouge violacé contenant des pigments dispersés. Par contre, les macrogamètes sont plus arcqués en forme de banane, ils ont un noyau sphérique rouge bien différencié, un cytoplasme bleuté contenant des pigments concentrés autour du noyau.

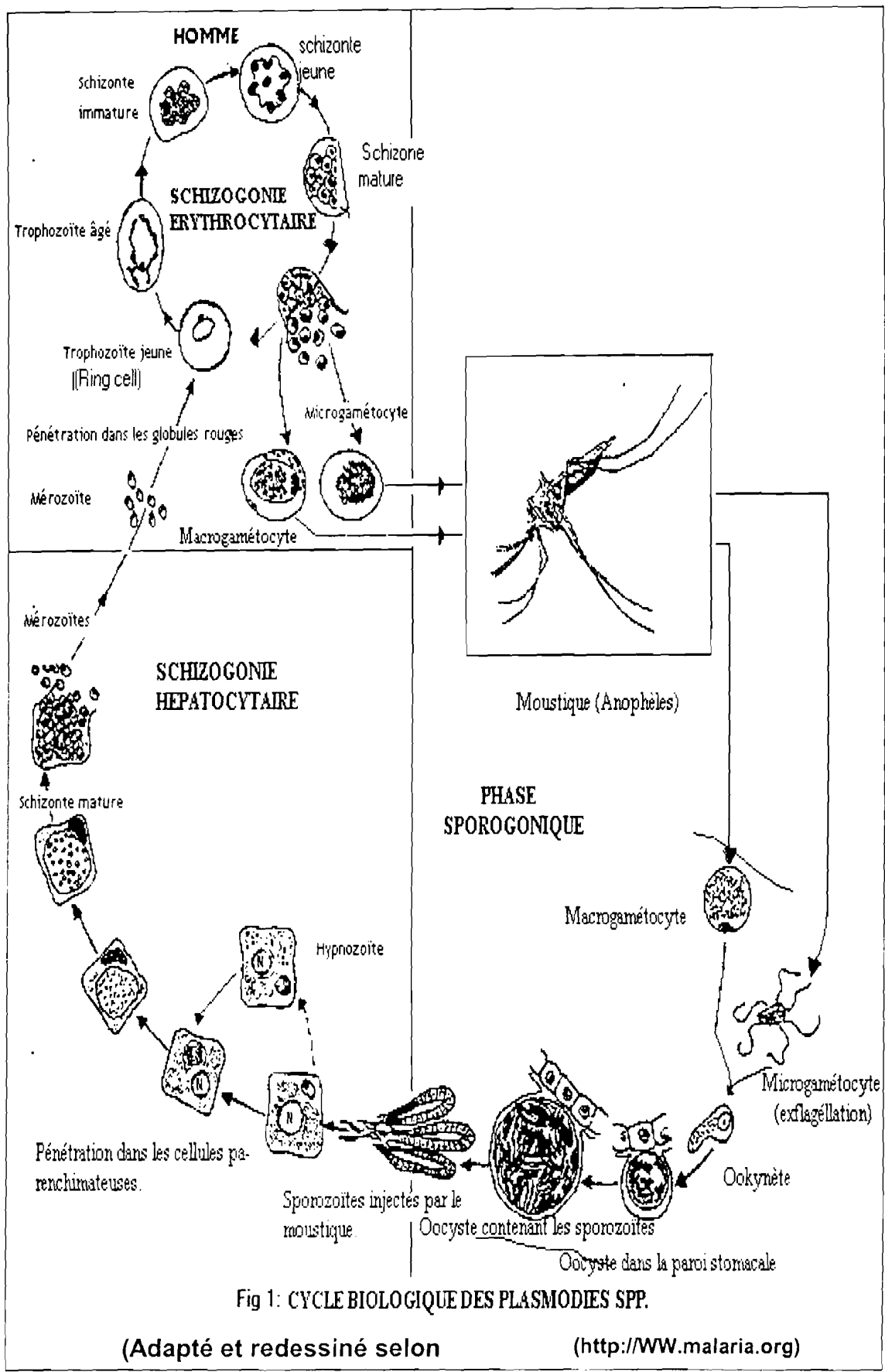


Fig 1: CYCLE BIOLOGIQUE DES PLASMODIES SPP.

(Adapté et redessiné selon

(<http://WWW.malaria.org>)

Chez le moustique:

La gamogonie:

Conditions de développement:

La transformation des gamétocytes en gamètes dans les conditions naturelles est subordonnée à leur ingestion par le moustique lors d'un repas sanguin. Le microgamétocyte donne naissance à 8 gamètes mobiles ayant chacun une longévité de quelques minutes. Le macrogamétocyte se transforme en un macrogamète unique. Les gamétocytes présents dans le sang infectant ne sont pas tous capables de **gamétogénèse**. L'aptitude du gamétocyte à se développer en gamète n'est acquise qu'au terme d'un phénomène de "**capacitation**". Plusieurs facteurs jouent un rôle important dans l'induction de la gamétogénèse: abaissement de la température (température optimale entre 28^o et 36^o C), l'augmentation du pH (entre 7,7 et 8,4) due à l'action du CO₂ sur les réactions faisant intervenir le bicarbonate, les produits pharmacologiques en particuliers les inhibiteurs de phosphodiesterase comme la caféine (Carter et Graves, 1988) et probablement d'autre élément non encore identifié que Nijhout (1979) a appelé "**facteur moustique**".

Gamétogénèse et fécondation:

Sur un sujet infesté, le moustique absorbe avec les cellules sanguines, les différents stades du parasites, pendant son repas de sang. Les formes asexuées (mérozoïtes, trophozoïtes et schizontes) sont digérées. Seuls les gamétocytes sont capables de poursuivre leur développement. Quelques minutes après le repas sanguin, les membranes des cellules sanguines parasitées ainsi que celles des vacuoles parasitophores se rompent. Pendant ce temps, les gamétocytes perdent leur forme allongée et arcquée en banane pour devenir plus ou moins sphériques, c'est l'**activation**. Les gamétocytes femelles ne subissent pas de modification profonde lors de leur transformation en macrogamète. Ils font simplement une modification de forme et l'expulsion des corpuscules chromatiniens. La transformation du microgamète en macrogamète est par contre lente et fait intervenir 3 mitoses sur une durée d'environ 10 - 12 minutes, la première étant réductionnelle. Les 8 microgamètes formés sont ensuite expulsés du microgamétocyte sous forme de fins filaments, c'est l'exflagellation. La division qui précède l'exflagellation entraîne simultanément la ségrégation du génome et des axonèmes, de sorte que des 8 microgamètes qui apparaissent reçoivent un axonème unique, un seul noyau condensé et contenant un génome haploïde (n chromosomes) et un corpuscule basal avec son granule à l'extrémité distale. Le gamète mâle mesure environ 20-25µ et est flagellé, très mobile et va à la rencontre du gamète femelle.

Lors de la fécondation des macrogamètes par les microgamètes qui a lieu 20 minutes à 2 heures de temps après le repas sanguin, les membranes cellulaires des gamètes mâles et femelles fusionnent, puis l'axonème et le noyau du microgamète sont refoulés dans le cytoplasme du gamète femelle. Le noyau mâle extrêmement condensé auparavant, devient moins dense et fusionne avec le noyau femelle, d'où la formation d'un zygote à 2n chromosomes

Evolution du zygote:

Les stades pré-oocystes:

Le zygote est avant tout une simple cellule globulaire immobile d'environ 8µm de diamètre appelée forme ronde ou forme circulaire "round form". Son cytoplasme contient de nombreux pigments animés de mouvements de Brown bien visibles en lumière ultra-violette 3 à 15 heures après le repas de sang 10 à 24 heures plus tard apparaissent des structures nouvelles (rhoptries, micronèmes et pellicules). Le zygote émet alors un pseudopode et prend la forme cornue "retort form". L'évolution continue par l'allongement du pseudopode et le zygote désormais mobile prend un aspect fusiforme de 18 à 24 µm, c'est l'ookinète qui s'observe 18 à 24 heures après l'infection. Ce dernier migre vers l'épithélium du mésentéron qu'il traverse pour se loger et s'enkyster sous l'assise basale dans une dépression de la paroi stomacale. On ignore si l'ookinète passe à travers ou entre les cellules épithéliales du mésentéron.

De même, on se demande si l'ookinète lèse les cellules épithéliales de l'hôte vecteur ou s'il peut être lui même détruit lors de son passage. La première hypothèse expliquerait l'augmentation du taux des anophèles morts après le repas de sang infectant (Buxton, 1935; Gad *et al.* 1979; Klein *et al.* 1986). Par contre d'autres auteurs tels que De Duck et Swellengrebel, 1935; Boyd, 1940; Wilkinson *et al.* 1972; Maier *et al.* 1987; Robert *et al.* 1990; Gamage-Mendis *et al.* 1993 n'ont pas observé ce phénomène d'accroissement de la mortalité post-infection des anophèles. Il est donc probable que cela dépende de la charge oocystique.

L'oocyste:

Le développement se poursuit entre la paroi épithéliale du mésentéron et son assise basale. L'ookinète s'enkyste en s'entourant d'une capsule amorphe et devient l'oocyste. Ce dernier est d'abord dans une dépression de la paroi cellulaire, par la suite la capsule s'amincit au fur et à mesure que l'oocyste se développe et augmente de volume. Simultanément, l'assise basale se déforme et finit par se rompre. Dès lors, l'oocyste de forme sphérique fait saillie à la face externe de l'estomac du moustique. Il grossit jusqu'à atteindre un diamètre de 50 à 80 µm. Il est immergé dans l'hémolymphe et n'a plus qu'un contact très limité avec les cellules de l'hôte. En 1960, Weatersby a constaté que le contact entre l'oocyste et l'épithélium du mésentéron n'est pas indispensable au développement du parasite puisque certains oocystes se développent dans l'hémocèle. Cependant on ignore l'origine immédiate et le mécanisme de captage des nutriments utilisés par l'oocyste pour se développer. Selon Beaudoin *et al.* 1974, il est probable que la principale source soit l'hémolymphe, bien qu'un développement ectopique des oocystes soit possible, avec expulsion des sporozoïtes dans la lumière intestinale. Et Marck *et al.*, 1978, 1979 ont prouvé que les oocystes extraient leurs nutriments de l'hémolymphe.

La sporogonie:

Formation des sporoblastes:

Au cours du développement de l'oocyste, on voit apparaître des vacuoles dans le cytoplasme sous la capsule. Ces vacuoles grandissent et fusionnent par coalescence, formant de grandes fissures qui subdivisent le cytoplasme de l'oocyste en plusieurs sporoblastes de structure fine. Les zones recouvertes par des segments de membrane interne font saillie vers l'extérieur et l'on voit les sporozoïtes sortir des sporoblastes par un processus de bourgeonnement. Le nombre de sporoblastes par oocyste selon Rosenberg et Rungsiwongse en 1991, dépend de la fécondité de la souche de *Plasmodium*. On peut avoir jusqu'à 10 000 sporoblastes par oocyste (Pringle, 1965). Les repas de sang sains supplémentaires après le repas infectant n'augmentent pas le nombre d'oocystes, mais accroissent la densité de sporozoïtes dans les glandes salivaires, c'est à dire le nombre d'oocystes qui arrivent à maturité.

Evolution des sporoblastes:

L'oocyste à maturité, éclate et libère les sporozoïtes encore immatures qui s'échappent dans l'hémocèle d'où ils migrent et pénètrent à l'intérieur de différents tissus. Mais leur concentration dans les glandes salivaires ne fait aucun doute bien qu'on ait pour le moment aucune explication biologique à ce phénomène. Plus de 20% des sporozoïtes libérés par les oocystes, selon Rosenberg et Rungsiwongse (1991), se retrouvent finalement dans les glandes salivaires. Le destin des autres sporozoïtes est inconnu. Il est probable d'après Robert et al en 1988, qu'ils migrent dans les différents tissus où ils dégèrent ou sont détruits par les phagocytes du moustique. La mobilité des sporozoïtes leur permet d'envahir les cellules sécrétoires des glandes salivaires. Cette mobilité facilite leur sortie de ces cellules à travers le canal excréteur pour gagner les hépatocytes chez l'hôte vertébré.

Structure des sporozoïtes:

De forme filiforme, le sporozoïte mesure environ 12 à 15 μm de long sur 1 μm de diamètre. Il a un noyau unique avec antérieurement les micronèmes et postérieurement la majeure partie des réticulums endoplasmiques et des mitochondries. Les sporozoïtes se trouvant dans le canal excréteur de la glande salivaire sont matures et possèdent une pellicule complexe dont la couche externe est formée par la protéine circumsporozoïtaire (CSP). Cette épaisse enveloppe s'est révélée très antigénique. En effet d'après Zavala et al. (1983), la CSP possède une région immunodominante contenant des épitopes répétitifs constitués d'un peptide à 4 acides aminés (Asp-Ala-Asp-Pro ou NANP). La plupart des anticorps monoclonaux et polyclonaux reconnaissent cette région antigénique, d'où l'attention particulière qui lui est accordée dans les tentatives d'élaboration d'un vaccin ant sporozoïtaire. A la partie antérieure de la cellule, le cytosquelette est organisé en un complexe apical (perforatorium) contenant des anneaux apicaux au travers desquels s'étendent des micronèmes. Ces micronèmes comme les rhoptries des mérozoïtes semblent libérer selon Aikawa (1980), une substance qui agit sur la membrane des cellules de l'hôte pendant la pénétration.

III - GENERALITES SUR LA DIVERSITE GENETIQUE DE *PLASMODIUM FALCIPARUM*:

1- Cycle biologique et source de la diversité de *P. falciparum*:

Plasmodium falciparum est un protozoaire intra-cellulaire obligatoire. Son cycle biologique nécessite un hôte invertébré poïkilotherme (Anophèle) et un hôte vertébré homéotherme (Homme).

Chez l'hôte humain le parasite est haploïde et se multiplie de façon asexuée dans l'hépatocyte et le globule rouge. Pendant la sporogonie qui a lieu chez le moustique, le parasite est diploïde. La multiplication sexuée chez l'hôte invertébré résulte de la fusion des microgamètes et des macrogamètes et aboutit à la formation d'un zygote. Durant la phase érythrocytaire chez l'homme et la sporogonie chez le moustique le parasite subit une variation intense de son génome.

L'étude des chromosomes de plusieurs espèces de *P. falciparum* a montré selon Corcoran et al. 1988 l'existence d'un polymorphisme. Cette différence entre la taille des chromosomes résulterait de la délétion et de l'insertion des séquences nucléotidiques aux brins d'ADN. Plusieurs mécanismes seraient à l'origine de ce polymorphisme. La cassure et le réarrangement des chromosomes durant la mitose d'après Appai et al. en 1989, la duplication des régions répétitives, la recombinaison des chromosomes homologues et non homologues durant la méiose chez l'anophèle (Corcoran et al., 1988). De même l'instabilité de la partie télomérique du chromosome pendant la mitose pourrait d'après Cappai et al. 1989, Day et al. 1993, entrainer une perte des gènes situés à la partie subtélomérique. C'est ainsi que les gènes codant pour la KAHRP (Knob associated Histidin Rich Protein), la RESA (Ring Erythrocyte Surface Antigen), et la HRP1-2 (Histidin Rich Protein 1-2) situés dans la région subtélomérique pourraient être perdus.

2-Généralités sur l'antigène de surface du mérozoïte.

Le mérozoïte est la forme invasive de la phase asexuée des espèces de *Plasmodium*. Actuellement deux glycoprotéines ont été identifiées à la surface de l'espèce *Plasmodium falciparum*. La plus décrite est la protéine majeure de surface du mérozoïte (MSP1) qui a un poids moléculaire de 195 kDa. La deuxième MSA2 a un poids moléculaire variant de 35 à 48 kDa. Elle est différente de MSA1 mais présente un polymorphisme similaire. Ces protéines joueraient un rôle dans l'invasion de l'érythrocyte par le parasite. En effet elles se fixeraient aux résidus d'acide sialique situés à la surface du globule rouge.

La première protéine de la famille de MSA1 décrite est pf230. L'immunisation des rats avec cette protéine, les a protégés d'une infection létale à *Plasmodium yoelii*. La protéine MSA1 a été largement décrite sous différents noms tels que p190, gp195 et PMMSA (Precursor to the Major Merozoite Surface Antigen). Des protéines similaires ont été identifiées chez *P. vivax* (pv200) et *P. chabaudi* (p199). L'immunisation des singes à l'aide des préparations stérilisées de MSA1 a montré la potentialité de cette protéine dans le développement du vaccin. Le gène codant pour cette protéine a été séquencé. La comparaison des séquences du gène de quatre souches différentes a permis d'observer la subdivision du gène en 17 blocs de séquences variables, semi-conservés ou conservés

(Tanabe et al, 1987). La séquence du bloc 2 du gène présente un polymorphisme marqué. Ce polymorphisme a permis de décrire 3 allotypes qui sont K1, MAD20 et RO33. Il existe une homologie de structure entre les séquences du bloc 2 de *P. falciparum* et du bloc 4 de *P. yoelii*.

L'existence de deux groupes d'allèles révélée par des versions différentes de MSA1 suggère un dimorphisme de la protéine. Ce dimorphisme se traduit au niveau génique par une variation de deux bases seulement. Des variations ont été révélées au niveau des blocs 4, 8 et 11 de RO33. L'étude phylogénique a montré selon Tanabe et al., (1987) que les souches K1 et MAD20 proviendraient de RO33.

L'une des particularités du dimorphisme de MSA1 est la possibilité de crossing-over entre allèles. Ce crossing-over concerne généralement les blocs 2 à 5 chez *P. falciparum* et se traduit en général par une déletion ou une insertion de bases. Selon Tanabe et al.1987, les allèles de la MSA1 proviennent de l'évolution de 2 populations biologiquement distinctes. Les variations au sein des blocs 2, 4, 14, 16 sont le produit de recombinaison. Deux autres mécanismes peuvent être responsables des modifications géniques: le "reassortement" entre les parasites d'hôtes différents et la pression immunologique. Les fragments de la MSA1, p83, p36, gp41 et gp19 selon Cooper JA, en 1993 sont issus de la protéolyse enzymatique de la protéine précurseure gp90 avant l'expression de celles-ci à la surface du mérozoïte mature. Les fragments p83, p36 et gp42 se trouvent à la surface du mérozoïte dès la rupture du schizonte. Les fragments p33 et gp19 sont issus du clivage de la gp42. Le fragment gp19 est exprimé à la surface de l'érythrocyte durant la phase d'invasion du parasite. Ce fragment est la cible des anticorps anti-MSA1 et serait un potentiel candidat vaccin.

La synthèse de la MSA1 se fait du côté de N-terminal. Le côté C-terminal joue le rôle de molécule d'ancrage.

IV- LA LUTTE ANTIPALUDIQUE:

Nous définissons la lutte antipaludique comme l'ensemble des mesures destinées non pas à supprimer, mais à réduire la morbidité et la mortalité causées par le paludisme. Selon l'OMS (1985), environ 2 milliards de personnes (soit 34% de la population mondiale) vivent dans les zones impaludées et sont exposées au paludisme. La mortalité et la morbidité du paludisme sont mal connues. On sait seulement qu'elle a beaucoup évolué avec le temps et suivant les régions. Le nombre de cas symptomatique annuel est estimé à 100 millions dans le monde avec une mortalité évaluée à 2 millions par an.

Plusieurs stratégies ont été utilisées pour lutter contre le paludisme et suivant des axes variés. Cette lutte comporte des actions curatives basées sur la chimiothérapie des malades ainsi que des actions préventives basées sur la chimioprophylaxie et la lutte antivectorielle. Quant aux vaccins antipaludiques, des recherches sont en cours.

Ces différents actes stratégiques sont complémentaires et doivent être exécutés conjointement pour être efficaces. L'OMS en 1992 a proposé une nouvelle approche de lutte antipaludique dont la démarche est la suivante:

- Contrôler la transmission en faisant recours à la lutte antivectorielle au niveau communautaire et au niveau de la famille.
- Assurer le diagnostic et permettre au Programme Elargi de Vaccination (PEV) la prise en charge systématique des cas de paludisme dans toutes les régions.
- Restreindre la chimioprophylaxie aux groupes à risque notamment les femmes enceintes en zone d'endémie.
- Prévention et gestion des épidémies
- Développer les capacités d'intervention locale en incluant la recherche opérationnelle.
- Intensifier les recherches pour un vaccin antipaludique.

1 - La lutte et la protection antivectorielle:

Ce sont des moyens permettant de diminuer ou de supprimer la transmission du parasite dans une population donnée, donc de prévenir l'infection des membres de la communauté. Elles constituent la meilleure méthode de prévention collective.

- Aménager l'environnement:

Cette activité permet d'éliminer les gîtes potentiels d'anophèles. Elle entraîne une rareté des points d'eau propices au développement des larves et de la rétention de la ponte chez les femelles gravides.

- Agents de la lutte biologique:

L'introduction des poissons larvivores a été une réussite avec *Gambusia* contre *An. sergenti* en Algérie et en Amérique, *Oreochromis spilurus* en Somalie. Il en a été de même pour *Lebistes reticulatus* (guppies) en Asie du Sud-est contre *An. arabiensis*. Cependant les poissons ne peuvent pas être utilisés partout.

Dans les mares temporaires où se développent certaines souches d'*Anopheles gambiae*, la solution alternative est l'utilisation des bactéries. *Bacillus thuringiensis* sérotype H14 est un bon agent de lutte biologique. Lorsqu'il est épendu dans les gîtes, (selon Robert et al. 1987; OMS, 1982), il est ingéré par les larves d'anophèles et l'endotoxine libérée dans l'estomac de ces insectes provoque des lésions létales du tube digestif.

Les répulsifs:

De nombreux produits (repellents) sont utilisés localement pour éloigner les moustiques ou de les dissuader de piquer: Essence de citronnelle en Europe, l'huile de palme en Guinée, la fumée de diverses essences et certains produits de synthèse dont on imbibe les tortillons et les plaquettes fumigènes. C'est le cas du Diméthylephtalate (DMP) et du Diéthyloluamide (DEET).

Les insecticides:

Ils sont utilisés contre les stades larvaires et contre les stades adultes. La destruction des anophèles par épandage de larvicide est très efficace dans les régions où les anophèles pondent dans les mares temporaires. Les produits larvicides sont utilisés à l'extérieur,

tandis que les produits aldulticides sont beaucoup plus utilisés à l'intérieur des habitations. La pulvérisation intradomociliaire par les bombes insecticides est très pratiquée en milieu urbain à cause des nuisances culicidiennes.

La protection contre les piqûres:

Elle comprend l'ensemble des moyens mécaniques d'isolement. Elle se fait par des grillages protecteurs placés sur les ouvertures des habitations ou mieux par des moustiquaires de lit, si possible imprégnées d'insecticides.

Cette méthode a montré son efficacité par la réduction de la transmission et des fortes charges parasitaires dans beaucoup d'études effectuées sur le terrain (Carnevale et al. 1988, 1992 ; Robert et al. 1989, 1991).

Les supports (moustiquaires et rideaux) imprégnés d'insecticides ont montré également leur efficacité dans la réduction de la transmission et des fortes charges parasitaires (Touré et al., 1989).

2 – Diagnostic biologique du paludisme:

En cas de fièvre, de céphalées ou de courbatures, les malades et même les agents de santé commencent un traitement antipaludique sans recourir à l'examen de laboratoire pour ne pas risquer de mettre en danger le patient (le paludisme à *P. falciparum* pouvant s'aggraver subitement).

Cette pratique bien adaptée au contexte africain n'est pas à condamner puisqu'elle permet de sauver des vies. Cependant un diagnostic fiable ne peut provenir que d'un laboratoire d'analyse dans les structures de références. Les techniques de diagnostic classique actuellement en usage consistent en la mise en évidence des parasites ou de leurs antigènes dans les prélèvements sanguins. On peut en zone non endémique s'aider de la titration des anticorps spécifiques et de la détection d'antigènes parasitaires.

- Recherche des parasites dans le sang:

Elle se fait par l'examen microscopique des gouttes épaisses ou des frottis minces colorés.

* La goutte épaisse:

Le troisième doigt le moins kératinisé de la main, préalablement aseptisé à l'alcool est ponctionné à l'aide d'un vaccinostyle stérile. Avec du coton sec, la première goutte est nettoyée, une seconde plus volumineuse (20µl) est déposée au milieu de la lame porte-objet. Avec le bord anguleux d'une seconde lame, la goutte de sang est uniformément étalée en une zone circulaire de 1,5 cm de diamètre jusqu'à défibrination mécanique totale. Après séchage à la température ambiante, il est coloré au Giemsa dilué à 3-5% pendant 15-30 mn. La goutte épaisse permet la concentration des éléments parasitaires du sang sur une surface plus petite que dans le frottis, ce qui accélère l'examen. Elle permet de faire une quantification de la parasitémie qui est exprimée par rapport au nombre de leucocytes. On estime en général qu'un microlitre de sang contient environ 7500 leucocytes.

* Le frottis mince:

Une petite goutte de sang prélevée au doigt est placée à une extrémité d'une lame porte-objet, une deuxième lame qu'on incline d'environ 45° est amenée au contact de cette goutte de sang, puis dans un mouvement régulier et ininterrompu, la lame inclinée entraîne derrière elle ce sang qui s'étale en une couche unistratifiée. La préparation est d'abord fixée au méthanol absolu (quelques secondes) avant d'être colorée au Giemsa. L'examen du frottis permet l'identification de l'espèce.

* Le test du QBC®:

Le principe est basé sur la coloration à l'acridine orange d'un échantillon de sang prélevé dans un tube capillaire et centrifugé. La lecture se fait directement à la lumière ultraviolette. C'est une méthode qualitative.

* ParaSightF® :

Le principe consiste en la recherche dans le sang total de l'antigène protéique de type II riche en Histidine: Histidine Rich Protein II (HPRII) de *Plasmodium falciparum*.

Du point de vue opérationnel, le test peut se faire à partir du sang veineux recueilli sur anti-coagulant, ou à partir du sang capillaire.

Ce test a l'avantage d'être manuel et rapide pour le diagnostic du paludisme à *Plasmodium falciparum*. Le kit est transportable partout, manipulable par un non spécialiste et est conservable à la température ambiante.

Par contre les réactifs composant le kit contiennent de l'azide de sodium. Ce produit est très toxique par inhalation, par ingestion et par contact. En présence d'acide, des gaz très toxiques sont libérés. En cas de contact donc avec la peau, laver immédiatement avec beaucoup d'eau. Porter un système de protection des yeux et du visage.

*Technique de l'OptiMAL® :

Le principe est basé sur la mise en évidence de l'activité enzymatique de la Lactate Déshydrogénase (LDH) plasmodiale dans le sang humain.

Le mode opératoire consiste d'abord à déposer 2 gouttes du réactif 1 (anticorps monoclonal) dans un puits de la plaque d'ELISA. Il s'agit:

Recueillir 10 µl de sang dans le tube plastique, ajouter le sang au puits et mélanger, tremper la bandelette dans le puits, déposer 4 gouttes du réactif 2 (détergent) dans un autre puits.

Après absorption complète du sang par la bandelette, tremper la dans le réactif 2. Dès que la bandelette devient claire, procéder à la lecture.

Les résultats sont interprétés de la manière suivante:

Le test est négatif lorsqu'il n'apparaît qu'une seule bande rose témoin sur la bandelette. Il est positif lorsqu'il apparaît sur la bandelette en plus de la bande rose témoin une ou deux autres bandes.

Dans le cas d'une seule bande supplémentaire, il s'agit de *Plasmodium vivax*. Mais quand il y a 3 bandes le test est positif à *Plasmodium falciparum*. Lorsqu'il n'apparaît aucune bande sur la bandelette le test n'est pas interprétable. Il faudrait dans ce cas le reprendre avec une autre bandelette.

C'est un test rapide, la réponse est obtenue en 20 mn. Il est simple, et nécessite seulement une goutte de sang (10 µl) capillaire prélevé directement au bout du doigt, ou du sang total anticoagulé. Il est sensible car permet de détecter une parasitémie de 100-200 parasites par µl de sang. Cette sensibilité est comparée à une observation microscopique d'au moins 30 mn d'un frottis sanguin. Il est aussi spécifique car permet de détecter la présence de lactate déshydrogénase de *Plasmodium* (pL-DH), une enzyme produite par les formes sexuées et asexuées du parasite.

- Recherche et titration des anticorps anti-*plasmodium* (Sérologie)

Quand un sujet est infecté par un *Plasmodium* cela entraîne la synthèse d'anticorps dirigés contre les antigènes du parasite en question. Le nombre et la diversité des antigènes dans les différents stades schizogoniques érythrocytaires compliquent bien entendu la réponse immunitaire. Quoiqu'il en soit, la quantité et la qualité d'anticorps dosés par les méthodes sérologiques est proportionnelle à l'intensité et à la durée de l'infection.

Les différentes techniques utilisées sont variées, mais elles sont toutes basées sur le même principe. Les réactions immunologiques consistent à provoquer *in vitro* la formation de complexes antigènes-anticorps et à les rendre détectables. On distingue: le test immuno-radiométrique ou Radio-Immuno-Assay (RIA), l'Immuno-Fluorescence Indirecte (IFI) ou ImmunoFluorescence-Assay (IFA), l'Hémagglutination passive ou Indirecte (HAI) et le test Immuno-enzymatique ou Enzyme-Linked- Immunosorbent-Assay (ELISA).

- Détection d'antigènes de *plasmodium*:

On peut déceler la présence des *Plasmodium* dans le sang de l'homme par des méthodes autres que l'examen parasitologique direct au microscope. Il s'agit de détecter les antigènes du parasite ou son génôme.

Les sondes nucléiques (PCR):

On désigne sous le nom de "sonde nucléique", un brin monocaténaire de fragment d'ADN dénaturé et marqué au phosphore radio-actif (P₃₂) ou par des enzymes. Elle est complémentaire d'une séquence répétitive d'ADN spécifique du *plasmodium* recherché. Dans un prélèvement de sang contenant des parasites dont l'ADN a été auparavant dénaturé, la sonde reconnaît son brin complémentaire composé de nucléotides disposés dans le même ordre. La rénaturation a lieu par appariement des bases. Selon Barker, 1986 et Franzen, 1984; cette hybridation moléculaire est dosée par autoradiographie.

Les vaccins potentiels contre le paludisme:

L'expansion des souches chimiorésistantes de *P. falciparum* aux antimalariques (OMS, 1973), avec l'apparition et la diffusion de la résistance des moustiques vecteurs aux insecticides (WHO, 1980), sont à la base de l'inefficacité des moyens de lutte contre le paludisme. Ce qui rend impératif la mise au point de vaccins antipaludiques.

Au cours de son cycle chez l'homme, le *Plasmodium* subit des modifications structurales; morphologiques correspondant à des modifications antigéniques, responsables de réponses immunitaires différentes. Alors 4 cibles potentiels de vaccin sont à considérer:

- Le sporozoïte:

Les recherches les plus avancées pour la mise au point d'un vaccin contre le paludisme concernent le vaccin ant sporozoïte. Puis qu'il s'agit du stade qui est injecté dans le sang de l'homme par le moustique et qui est exposé aux anticorps du plasma pendant un temps relativement court avant d'envahir les hépatocytes. Les investigations sont menées à trois niveaux différents:

Immunisation avec des sporozoïtes atténués:

En immunisant les souris au moyen de sporozoïtes de *Plasmodium berghei* irradiés au rayon X, selon Nussenweig et al, 1967, des études ont été entreprises en vue de déterminer si cette forme de protection était possible chez les humains avec les sporozoïtes de *P. falciparum*.

Pour ces études, les anophèles sont infestées expérimentalement avec les gamétocytes de *P. falciparum*. Les moustiques devenus infectants sont irradiés au rayon X pour atténuer les sporozoïtes dans leurs glandes salivaires, tout en conservant leur antigénicité. Ensuite des volontaires humains sont exposés aux piqûres des anophèles infectants et irradiés.

Ces sujets ont d'abord développé une bonne tolérance à l'inoculation des sporozoïtes atténués. En 1974, Rieckmann et al., ont infecté des anophèles sur des volontaires immunisés. Pendant 8 à 15 semaines après leur expérience, ils n'ont pas observé de parasitémie.

En 1991, Herrington et al. ont repris avec succès ces travaux et ont montré qu'en fonction de l'intensité et de la radiation des sporozoïtes, de la fréquence et du nombre des piqûres immunisantes, on pouvait soit retarder l'apparition des stades érythrocytaires, soit protéger complètement les sujets. Ils ont donc prouvé que l'immunité ainsi induite par les sporozoïtes irradiés était multifactorielle. Elle comporte des réponses à médiation humorale, à médiation cellulaire.

En 1979, Rickmann et al. ont montré une autre importance de cette méthode qui réside au fait que l'immunisation par les piqûres d'un nombre suffisant de moustiques irradiés porteurs de sporozoïtes de *P. falciparum* d'une souche donnée par exemple sensible à la chloroquine, peut protéger contre une autre souche de parasites de même espèce, mais géographiquement différente et en l'occurrence résistante à la chloroquine et vice versa.

Elle est par ailleurs très spécifique de l'espèce. L'immunisation par les sporozoïtes atténués de *P. falciparum* ne protège pas encore selon Clyde et al. 1973, 1975; Rickmann et al. 1979, contre les piqûres d'anophèles infestés par *P. vivax*. Ceci pose un problème pour l'application de cette méthode sur le terrain dans les zones où ces espèces cohabitent.

Immunsation avec des protéines récombinantes:

Cette méthode a soulevé un espoir manifeste chez les chercheurs à cause de la structure des antigènes circumsporozoïtaires qui est analogue chez toutes les souches d'une même espèce plasmodiale (Miller et al. 1984). Ce qui a amené Dame et al., en 1984 à chercher à cloner la sous-unité immunogène de la CSP.

En 1987, Ballou et al. ont confirmé la faisabilité d'un tel vaccin en testant sur des volontaires humains, le R32T et R₃₂ recombiné par clonage et l'ADN de *P. falciparum* chez *Escherichia coli*. Ce vaccin a été administré par injection. Aucune allergie, ni effet secondaire n'ont été observés.

Les titres d'anticorps induits ont été faibles et pas supérieurs à ceux résultants des infections naturelles suite à un séjour prolongé en zone endémique.

L'antigénicité des protéines récombinantes a été mentionnée par Vreden et al. en 1991 qui ont utilisé une autre protéine constituée de 16 séquences du même épitope immunodominant, conjugué à l'antigène de surface du virus de l'hépatite B (R16HbsAg). Les résultats ont été similaires. Il a été démontré que seule une faible tranche de la population peut être protégée par une sous-unité vaccinale recombinante de la protéine circumsporozoïtaire (CSP). La réponse immunitaire est principalement à médiation humorale, mais peut comporter des composantes à médiation cellulaire (Nardin et al. 1990).

Immunsation avec des protéines synthétiques:

Les résultats avec les vaccins antérieurs ont créé le besoin de synthétiser l'épitope immunodominant de la CSP. C'est un peptide très stable à 4 acides aminés dénommés peptides B selon Zavala et al. 1983.(Asn-Ala-Asn-Pro ou NANP). D'après Nussenzweig et al. 1984, la plupart des anticorps antiparasitaires sont dirigés contre ce peptide.

En Afrique, Guiguemdé et al. (1990) ont testé un vaccin synthétique, le (NANP)₃-TT. C'est un trimère synthétique de la protéine circumsporozoïtaire (CSP) de *P. falciparum* comprenant l'épitope immunodominant, le NANP associé à l'anatoxine tétanique comme véhicule et à l'hydroxyde d'alumine comme adjuvant.

Cette étude menée en même temps que le Programme Elargi de Vaccination (PEV) avait pour objet d'évaluer l'immunogénicité de ce vaccin et son efficacité à protéger les enfants contre les infections palustres.

Le vaccin a été bien toléré et les titres d'anticorps ont été multipliés par 4. Mais cette réponse immunitaire qui concerne surtout les IgG était de courte durée (5 mois). Les indices paludologiques sont restés inchangés.

La mise au point d'un vaccin antiparasitaire synthétique et efficace est donc complexe puisqu'il faut maîtriser les mécanismes d'échappement du parasite et mettre de nouveaux adjuvants performants chez l'homme pour les antigènes utilisés.

- Le stade hépatique:

L'intérêt que suscite le vaccin dirigé contre les stades hépatiques du parasite est de plus en plus croissant puisque la durée de son cycle est supérieure à celle du parcours des sporozoïtes du site de piqûre jusqu'au foie. Guerin et al. en 1987, Druilhe et Marchand en 1989, ont cloné et caractérisé les antigènes des stades hépatiques de *P. falciparum*.

D'autre part, Hoffmann et *al.* en 1989, et Suhrbier en 1991 ont montré que les hépatocytes infestés semblent être la cible des mécanismes d'immunité à médiation cellulaire qui agissent par l'intermédiaire des cytokines ou directement par la cytotoxicité des lymphocytes T.

- Le stade érythrocytaire:

La prolifération de ce stade est responsable des accès fébriles. Une protection assez élevée a été observée après immunisation avec des extraits de mérozoïtes et de schizontes ou à l'aide des protéines recombinantes de la membrane des mérozoïtes (MSA), chez les singes du genre *Aotus* (Michell et *al.* 1977, Siddiqui et *al.* 1987). En 1988, Pattaroyo et *al.* ont montré qu'un mélange de peptides synthétiques de la MSA et CSP, injecté à des volontaires humains, peut retarder ou supprimer le développement des stades érythrocytaires chez trois sujets sur cinq. Des études à grande échelle réalisées en Tanzanie et en Gambie (1992) par les mêmes auteurs ont montré que la protection que confèrent les peptides synthétiques ne dépasse pas les 25-30%.

- Les stades sexués:

Le gamétocyte dans le sang circulant, reste dans l'hématie et n'a pas de contact avec le système immunitaire de l'hôte vertébré. Il est protégé par deux membranes: celle de la vacuole parasitophore et la membrane érythrocytaire. Dans le repas de sang du moustique on rencontre les parasites asexués et les parasites sexués et aussi les produits des réponses immunitaires. Dans le mésentéron du moustique, il y a activation, puis libération des gamétocytes dans la lumière intestinale. Ces derniers peuvent entrer alors en contact avec les anticorps de l'hôte vertébré.

Ainsi si la réponse immunitaire dirigée contre les formes sexuées atteint un niveau suffisant, elle peut perturber le développement du parasite chez le moustique. Le vaccin antigamétocyte et antigamète aura pour but d'induire chez l'hôte humain des facteurs pouvant bloquer le cycle gamogonique et sporogonique. Ce vaccin serait "altruiste" puisqu'il ne protégera pas le sujet vacciné, mais empêchera la transmission du parasite de l'homme au vecteur.

Les candidats vaccins des stades sexués sont: la protéine 48/45 kDa, 230 kDa et 2400 kDa qui existent chez l'hôte vertébré et la protéine 25 kDa néoformée dans le mésentéron du moustique (Alano, 1991).

Le blocage de la transmission par immunisation avec les antigènes des stades sexués du parasite a été mené avec succès dans les modèles utilisant les rongeurs (Mendis et Targett, 1979). De même l'immunisation avec la protéine antigénique de poids moléculaire 25 kDa recombiné chez la levure d'après Barr et *al.* 1991, entraîne la production de grandes quantités d'anticorps spécifiques bloquant la transmission de *P. falciparum*, du singe ou de la souris au moustique.

L'immunisation bloquant la transmission du *Plasmodium* au moustique chez l'homme, n'a pas encore été réalisée. Néanmoins, il est désormais bien établi qu'après le repas infectant du moustique, il y a une apparition de néoantigènes à la surface du parasite et la protéine de poids moléculaire 25 kDa devient la protéine dominante de la membrane parasitaire. Cet antigène néoformé selon Kaslow et *al.* 1991, demeure le candidat vaccin majeur pour le blocage de la transmission. Les variations antigéniques et les mécanismes d'échappement du parasite ne sont pas à redouter puisque cette protéine majeure de

surface des stades pré-oocystes ne se retrouve jamais au contact du stade immunitaire. Elle présente pendant le même temps, d'après Alano en 1991 et Lensen et *al.*(1992), l'avantage de rester abondante durant toute la gamogonie et la sporogonie.

Nous retenons des rappels que:

Les vecteurs de la transmission du paludisme ainsi que leur cycle de développement sont bien connus . Mais la lutte antivectorielle, malgré les efforts déployés pour sa mise en oeuvre a montré des limites à cause de l'apparition chez les moustiques, des mécanismes de résistance aux insecticides disponibles.

La biologie des parasites est bien étudiée et différentes techniques suffisamment sensibles permettent leur détection. Mais il y a apparition voire extension de la résistance des *Plasmodium* aux antimalariques les plus utilisés.

Du point de vue des vaccins, ceux déjà testés n'ont pas comblé les espoirs attendus. Cela à cause de leur faible immunogénicité, leur spécificité par rapport aux stades de développement du parasite et aux espèces. Par ailleurs, le polymorphisme et les variations antigéniques des *Plasmodium* limitent la généralisation des résultats dans une localité donnée.

En réalité, les mécanismes immunitaires qui président à la protection antipalustre chez l'homme restent non élucidés.

Notre étude a donc pour but de générer des données de base de terrain pour des essais de Phase I, II, III de candidats vaccins bloquant la transmission.

REFERENCES .

- 1- Ade-Serrano M. A et al. (1981): Corrélation of *Plasmodium falciparum* gametocytemia with complement titers in rural Nigerian school children. *Journal of clinical microbiology*, **13**: 195-8.
- 2- Alano P. (1991): *Plasmodium* sexual stage Antigens *Parasitology Today*, **7**: 199-203.
- 3- Ballou W. P., Sherwood J. A., Neva F. A., Gordon D. A., Wirtz R. A., Wasserman G. F., Diggs C. L., Hoffman S. L., Hollingdale M. R., Hockmeyer W. T., Schneider I., Young J. F., Reeve P., Chulay J. D. (1987): Safety and efficacy of recombinant DNA *P. falciparum* sporozoite vaccine. *Lancet*, **I**: 1277-81.
- 4- Barker R. H. (1986): Specific DNA probe for diagnosis of *P. falciparum* malaria. *Science*, **231**: 1434-6.
- 5- Barr P. J., Green K. M., Gibson H. L., Bathurst I. C., Quakyi I. A., Kaslow D. C. (1991): Recombinant Pfs25 protein of *Plasmodium falciparum* elicits malaria transmission-blocking immunity. *J. Exp. Med.*, **174**: 1203-8.
- 6- Baruch DJ., Pasloske BL., Singh HB., Bi X., Ma XC., Feldman M., Taraschi TF., Howard RJ: Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEM-1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitised human erythrocytes. *Cell*; 1995, **82**: 77-87.
- 7- Beaudoin R. L (1974): *Plasmodium berghei*: ectopic development of the ANKA strain in *Anopheles stephensi*. *Experimental Parasitology*, **36**: 189-201.
- 8- Bidwell D. E., Voller A. (1981): Malaria diagnosis by enzyme –linked immunosorbent assay. *Britist Med. J.*, **282**: 1747-8.
- 9- Boyd M. F. (1940): On the corrélation between the incidence of stomach and gland infection in *Anopheles quadrimaculatus* infected with *P. vivax*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **20**: 129-31.
- 10- Brown Kn., Hill LA: Antigenic variation and immunity to *Plasmodium Knowlesi*: antibodies which induce antigenic variation and antibodies which destroy parasites. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg*; 1974, **68**:139-42.
- 11- Brannan LR., Turner CM., Philips RS: Malaria parasites undergo antigenic variation at high rates in vivo. *Proc.R.Soc.Lond [Biol] Sci.* 1994; **256**: 71-5.
- 12- Bull PC., Lowe BS., Kortok M., Molyneux CS., Newbold CI., Marsh K: Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. *Nat. Med*; 1998, **47**: 760-6.

- 13-** Buxton P. a. (1935): The effect of proteosoma upon the survival of *Culex*. *Parasitology*, **27**: 547-50.
- 14-** Carnevale P., Robert V., Boudin C., Halna J. M., Pazart L., Gazin P., Richard A., Mouchet J. (1988): La lutte contre le paludisme par des moustiquaires imprégnés de pyréthrinoïdes au Burkina Faso. *Bull. Soc. Path. Ex.*, **81**: 832-46.
- 15-** Carnevale P., Bitsindou P., Diomandé L., Robert V. (1992): Insecticide impregnation can restore the efficiency of torn bed nets and reduce man-vector contact in malaria endemic areas. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **86**: 362-4.
- 16-** Cappai R., Van Schravendijk M R., Anders R F., Peterson M G., Thomas L M., Cowman A F. and Kemp D J. (1989): Expression of the RESA gene in *Plasmodium falciparum* isolate FCR3 is prevented by a subtelomeric deletion. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 3584-7.
- 17-** Carter R., Miller L. (1979): Evidence for environmental modulation of gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum* in continuous culture. *Bulletin de l'OMS*, **57** (suppl.1): 37-52.
- 18-** Carter R., Graves P. M. (1988): Gametocytes, In: Malaria, principles and practice of malariology. Ed. Churchill Livingstone, Edinburg London Melbourne and New York. Vol. 1: 253-306.
- 19-** Carter R., Kumar N., Quakyi I. A., Good M., Mendis K., Graves P., Miller L. (1988): Immunity to sexual stages of malaria parasites. *Prog. Allergy*. **41**: 193-214.
- 20-** Chulay J. D. (1989): Development of sporozoite vaccines for malaria. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **83**: 61-6.
- 21-** Cerami C., Frevert U., Simis P., Takacs B., Clavijo P., Santos MJ., Nussenzweig V: The Basolateral domain of the hepatocyte plasma membrane bears receptors for the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*. *Cell* 1992, **70**: 1021-33.
- 22-** Clyde D. F., McCarty V. C., Miller R. M., Hornick R. B. (1973): Specificity of protection of immunized against sporozoite-induced falciparum malaria. *Am. J. Med. Sci.*, **266**: 398-403.
- 23-** Clyde D. F., McCarty V. C., Miller R. M., Woodward W. E. (1975): Immunization of man against *falciparum* and *vivax* malaria by use of attenuated sporozoites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **24**: 397-401.
- 24-** Dame J. B., Williams J. L., McCutchan T. F. (1984): Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*, **225**: 593-9.

- 25-** Dame JB., Williams JL., McCutchan TF., Weber JL., Wirtz RA., Hockmeyer WT., Maloy WL., Haynes JD., Schneider I., Roberts D., Sanders GS., Roddy EP., Diggs CL., Miller LH: Structure of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* 1984, 225: 593-9.
- 26-** Danis M., Mouchet J. (1991): Paludisme. *UREF. Ed. Ellipse/ AUPELF*, 239p.
- 27-** De Buck A., Swellengrebel N. H. (1935): On the seasonal longitivity of *Anopheles maculipennis* in Holland with reference to their ability to act as malaria vectors. *Compte rendu hebdomadaire des seances de l'Académie des Sciences de Paris*, **186**: 329-31.
- 28-** Diallo M. 1996. *Plasmodium falciparum* au Mali: Epidémiologie, chimiorésistance et variabilité biologique; Mémoire de DEA de l'*Institut Supérieur de Formation et de la Recherche Appliquée* (ISFRA). Bamako - Mali
- 29-** Doumbo. O: Epidémiologie du paludisme au Mali, etude de la chloroquinorésistance et essai de stratégie de contrôle basée sur l'utilisation de rideaux imprégnés de perméthrine associée au traitement systématique des accès fébriles. *Thèse de Doctorat en Sciences Biologiques, Montpellier2*, 1992.
- 30-** Druilhe P., Marchand C. (1989): From sporozoites to liver stages: The saga of the sporozoite vaccine. In McAdam K (ed) *New Strategies in Parasitology*. Churchill Livingstone, Edinburgh. 39-48.
- 31-** Fischer K., Horrocks P., reuss M., Wiesner J., Wunsch S., Camargo AA., Lanzer : Expression of var genes located within polymorphic subtelomeric domains of *Plasmodium falciparum* chromosomes. *Mol. Cell Biol* 1997, **17**: 3679-88.
- 32-** Frabzén L. (1984): analysis of clinical specimens by hybridization with probe containing repetitive DNA from *Plasmodium falciparum*; a novel approach to malaria diagnosis. *Lancet*, **1**: 525-7.
- 33-** Frevert U., Sinnis P., Cerami C., Shreffler W., Takacs B., Nussenzweig V: Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. *J Exp. Med* 1993, **177**: 1287-98.
- 34-** Gad A. M., Maier W., Piekarski G. (1979): Pathology of *Anopheles stephensi* after infection with *Plasmodium berghei*. I. Mortality rate. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, **60**: 249-61.
- 35-** Gamage-Mendis A. C., Rajakaruna J., weerasinghe S., Mendis C., Carter R., Mendis K. N. (1993): Infectivity of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* to *Anopheles tessellatus*: relationship between oocyst and sporozoite development. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **87**: 3-6.

- 36-** Guerin-Marchand C., Druilhe P., Galey B., Londono A., Patarapotikul J., Beaudouin R. L., Dubeaux C. Tartar A., Mercereau-Puijalon O., Langsley G. (1987): A live-stage-specific antigen of *Plasmodium falciparum* characterized by gene cloning. *Nature*, **329**: 164-7.
- 37-** Guiguemde T. R., Sturchler D., Ouédraogo J. B., Drabo M., Etlinger H., Douchet C., Gbary A. R., Haller L., Kambou S., Fernex M. (1990): Vaccination contre le paludisme: premier essai avec un vaccin antisporozoite, le NANP)3-TT (RO 40-2361) en Afrique (Bobo- Dioulasso, Burkina Faso). *Bull. Soc. Path. Ex.* **83**: 217-227.
- 38-** Gilks CF., Waliker D., Newbold CI: Relationships between sequestration, antigenic variation and chronic parasitism in *Plasmodium chabaudi*- a rodent malaria model. *Parasite immunol*, 1990, **12**:45-64.
- 39-** Herrington D. A., Davis J., Nardin E., Beier M., Cortese J., Eddy H., Losonsky G., Hollingdale M. R., Sztein M., Levine M., Nussenzweig R. S., Clyde., Edelman R. (1991): Successful immunization of humans with irradiated malaria sporozoites: Humoral and cellular responses of the protected individuals. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **45**: 539-47.
- 40-** Hoffman S., Isenbarger D., Long G., Sedegah M., Szarfman A., Waters L., Hollingdale M. R., Meide P.H.V.D., Finbloom D. S., Ballou W.R.(1989): Sporozoite vaccine induced cells and their transformation into trophozoites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **32**: 682-90.
- 41-** Howard RJ, Bamwell JW: The detergent solubility properties of a malarial (*Plasmodium Knowlesi*) variant antigen expressed on the surface of infected erythrocytes. *J Cell Biochem.* 1984; **24**:297-306.
- 42-** Kaslow D. C., Isaacs S. N., Quakyi I. A., Gwadz R. W., Moss B., Keister D. B. (1991): Induction of *Plasmodium falciparum* transmission blocking antibodies by recombinant vaccinia virus. *Sciences*, **252**: 1310-2.
- 43-** Klein T. A., Harrison B. a., Grove J. S., Dixon S. V., Andre R. G. (1986): Correlation of survival rates of *Anopheles dirus* A (Diptera: Culicidae) with different infection densities of *Plasmodium cynomolgi*. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, **64**:901-7.
- 44-** Koïta. O (2000): Molecular studies of clonality, transmission and severe disease in malaria; *Thèse de PhD, Université de Tulane, New Orleans.*
- 45-** Leech JH., Bamwell JW., Miller LH., Howard RJ: Identification of a strain-specific malarial antigen exposed on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J.Exp.Med*; 1984, **159**: 1567-75.
- 46-** Lensen A. H. W., Van Gemert G. J .A., Bolmer M. G., Meis J. F. G. M., Kaslow D., Meuwissen J. H. E. Th., Ponnudurai T.(1992): Transmission blocking antibody of the *Plasmodium falciparum* zygote/ookinete surface protein Pfs25 also influences sporozoite development. *Parasite Immunology*, **14**: 471-9.

- 47- Mack S. R., Vanderberg J. P (1978): Hemolymph of *Anopheles stephensi* from noninfected and *Plasmodium berghei*-infected mosquitoes. 1: Collection procedure and physical characteristics. *J. Parasitol.*, **64**: 918-23.
- 48- Mack S. R. et al. (1979): Hemolymph of *Anopheles stephensi* from uninfected and *Plasmodium berghei*-infected mosquitoes. 2. Free Amino acids. *J. Parasitol.*, **65**: 130-6.
- 49- Mackey L. (1982): Diagnosis of *Plasmodium falciparum* infection in man: detection of parasite antigens by ELISA. *Bull. Wld.Hlth. Org.* **60**: 69-75.
- 50- Maier W. a., Becker-Feldman H., Seitz H. M (1987): Pathology of malaria-infected mosquitoes. *Parasitology Today*, **7**:216-8.
- 51- Marsh K., Otoo L., Hayes RJ., Carson DC., Greenwood BM: Antibodies to blood stage antigens of *Plasmodium falciparum* in rural Gambians and their relation to protection against infection. *Trans.R. Soc. Trop. Med. Hyg*; 1989, **83**: 293-303.
- 52- Miller L. H. (1975): erythrocyte receptors for *Plasmodium Knowlesi* malaria: Duffy blood group determinants. *Sciences*. **189**: 561-3.
- 53- Miller L. H. (1977): Hypothesis on the mechanism of erythrocytes invasion by malaria merozoites. *Bull. Wld. Hlth. Org.* **57**: (suppl.): 37-52.
- 54- Miller L. H. (1984): Perspectives for malaria vaccination. *Philosop. Trans. Roy. Soc. London. Series B.* **307**: 99-116.
- 55- Mitchell G. H., Richard W.H.G., Buther G. A., Cohen S. (1977): Merozoite vaccination of douroucouli monkeys against *falciparum* malaria. *Lancet I*: 1335-8.
- 56- Mons B. (1985): Synchronized erythrocytic schizogony and gametocytogenesis of *Plasmodium berghei* in vivo and in vitro. *Parasitology*, **91**: 423-30.
- 57- Meis JFGM., Verhave JP., Jap PHK., Meuwissen JHETH: An ultrastructural study on the role of Kupffer cells in the process of infection by *Plasmodium berghei* rats. *Parasitology* 1983, **86**: 231-42
- 58- Nardin E. h., Nussenweig R. s., Altsuler R., Herrington D. A., Levine M., Murphy., Davis J., Bathurst I., Barr P., Romero P., Zavala F. (1990): Cellular and humoral immune response to a recombinant *P. falciparum* CS protein in sporozoites-immunized rodent and human volunteers. *Bull. Wrld. Hlth. Org.*, **68** (suppl): 85-7.
- 59- Nijhout M. (1979): *Plasmodium gallinaceum*: exflagellation stimulated by a mosquito factor. *Experimental Parasitology*, **48**: 75-80.
- 60- Nussenzweig R., Vanderberg J., Most H., Orton C. (1967): Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature*, **216**: 160-2.

- 61- Nussenzweig R. S., Nussenzweig V. (1984): development of sporozoite vaccines. *Trans. Roy. Soc.* **B307**: 117-28.
- 62- OMS, Série de rapports techniques (1973): Chimiothérapie du paludisme et résistance aux antipaludiques: Rapport d'un groupe scientifique de l'OMS. N^o: **529**.
- 63- OMS. Série de rapports techniques (1982): Lutte Biologique contre les vecteurs de maladies. *Sixième rapport du Comité OMS d'experts de la biologie des vecteurs et de la lutte antivectorielle*. N^o: **679**.
- 64- OMS, Série de rapports techniques (1987): Biologie des Plasmodies. *Rapport d'un groupe scientifique de l'OMS*. N^o: **743**.
- 65- Patarroyo M. E., Amador R., Clavijo P., Moreno A., Guzman F., Romero P., Tascon R., Franco A., Murillo L. A., Ponton G., (1988): A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *P. falciparum* malaria. *Nature*, **332**: 158-62.
- 66- Pradel G., Frevert U: Malaria sporozoites actively enter and passage through rat Kupffer cells prior to hepatocyte invasion. *Hepatology* 2001, in press.
- 67- Pringle G. (1965): A count of the sporozoites in an oocyst of *Plasmodium falciparum*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **59**: 289-90.
- 68- Rieckman K. H., Carson P. E., Beaudoin R. L., Cassells J. S., Sell K. W (1974): Sporozoite induced immunity in man against an Ethiopian strain of *P. falciparum*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **68**: 258-9.
- 69- Rieckman K. H., Beaudoin R. L., Cassells J. S., sell K. W (1979): Use of attenuated sporozoites in the immunization of human volunteers against *falciparum* malaria. *Bull. Wld. Hlth. Org* **57** (suppl.1): 261-5.
- 70- Robert V., Boussinesq M., Boudin C., Conan H., Darriet F., Canevale P.(1987): Réceptivité à *Plasmodium falciparum* d'*Anopheles gambiae* soumis à *Bacillus turingiensis* sérotype H14 ou à *B. sphaericus*. *Cahier ORSTOM, Série entomologie médicale et parasitologie*. **25**: 63-8.
- 71- Robert V., Verhave J. P., Ponnudurai T., Louwe L., Scholtens P., Carnevale P. (1988): study of the distribution of circumsporozoite antigens in *Anopheles gambiae*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **82**: 389-91.
- 72- Robert V., Canevale P., Mouchet J., (1989): Pyrethrinoid-impregnated bed nets in the malaria control strategy at community level. *Acta tropica*, **46**: 267-8.
- 73- Robert V., Verhave J. P., Carnevale P. (1990): *Plasmodium falciparum* infection does not increase the precocious mortality rate of *Anopheles gambiae*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **84**: 346-7.

- 74- Robert V., Canevale P. (1991): Influence of deltamethrin treatment of bed nets on malaria transmission in the Kou Valley, Burkina Faso. *Bull. Wld. Hlth. Org.* **69**: 735-40.
- 75- Robson. K J., Dolo. A., Hackford. I R., Doumbo. O., Richards. M B., Keita. M M., Sidibe. T., Bosman. A., Modiano. D., Crisanti. A (1998): Natural polymorphism in the Thrombospondin-related Adhesive Protein of *P. falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **58**:81-9.
- 76- Rosenberg R., Rungsiwongse J. (1991): The number of sporozoites produced by individual malaria oocysts. *Am. J. Trp. Med. Hyg.* **45**: 574-7.
- 77- Rubio JP., Thomson JK., Cawman AF: The var genes of *Plasmodium falciparum* are located in the subtelomeric region of most chromosomes. *EMBO J* 1996, **15**: 4069-77.
- 78- Robson KJH., Frevert U., Reckmann I., Cowan G., Beier J., Scragg IG., Takehara K., Bishop DHL., Pradel G., Sinden R., Saccheo S., Muller H-M., Crisanti A: Thrombospondin related adhesive protein (TRAP) of *Plasmodium falciparum*: expression during sporozoite ontogeny and aggregate dependent binding to hepatocyte. *EMBO J* 1995. **14**: 3883-94.
- 79- Sakihama. N., Kimura. M., Hirayama. K., Kanda. T., Na-Bangchang. K., Jongwutives. S., Conway. D., Tanabe. K (1999): allelic Recombination and linkage disequilibrium within MSP-1 of *P. Falciparum*. *Military Medecine*, **131 Suppl.**, 1250-62.
- 80- Siddiqui w. a., Tam L. Q., Kramer K. J., Hui G. S. N., Case S.E., Yamaya K. M., Chang S. P., Chan E.B.T., Kan S. C (1987): Merozoite surface coat precursor protein completely protects Aotus monkeys against *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc. Nat. Acad. Sciences (USA)*, **84**: 3014-8.
- 81- Sinden R. E (1991): Asexual blood stages of malaria modulate gametocyte infectivity to the mosquito vector. Possible implications for control strategies. *Parasitology*, **103**: 191-6.
- 82- Shin SCJ., Venderberg JP., Terzakis JA: Direct infection of hepatocytes by sporozoites of *Plasmodium berghei*. *J Protozool* 1982, **29**: 448-54.
- 83- Shute P. G., Maryon M. (1954): The effect of pyrimethamine (Daraprin) on the gametocytes and oocysts of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **48**: 50-63.
- 84- Smalley (1976): *Plasmodium falciparum* gametogenesis *in vitro*. *Nature*, **264**: 271-2.
- 85- Smalley M. E., Brown j. (1981): *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis stimulated by lymphocytes and serum from infected Gambian Children. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **75**: 316-7.

- 86- Snounou. G., Haddad. D., Mattei. D., Enamorado .I G., Figueroa. J., Stahl. S., Berzins. K (1999): Limited genetic diversity of *P. falciparum* in field isolates from Honduras. *Am. J. Tro. Med. Hyg.* **60**: 30-4.
- 87- Su X-Z., Heatwole V M., Weiheimer S P., Guinet F., Herrfeldt J A., Peterson D S., Ravetch J A., Wellem's T E. (1995): The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell* **82**: 89-100.
- 88- Touré Y.T.: Bioécologie des anopheles (Diptera, Culicidae) dans une zone rurale de savane soudanienne au Mali (village de Banambani). Incidence sur la transmission du paludisme et de la filariose de Bancroft. Thèse de 3^{ème} cycle, Centre Pédagogique Supérieur, 1979, Bamako, Mali.
- 89- Vanderberg J. P. (1988). Gametocytogenesis. In: *Malaria, principles and practice of malariology*. Ed. Churchill Livingstone, Edinburg London Melbourne and New York. Vol. 1: 331-48.
- 90- Wilson R. J. M. (1980): Serotyping *Plasmodium falciparum* malaria with S-antigens. *Nature*, **284**: 451-2.
- 91- Zavala F., Cochrane A. H., Nardin E. H., Nussenzweig R. S., Nussenzweig V. (1983): Circumsporozoite proteins of Malaria parasites contain a single immunodominant region with two or more identical epitopes. *J. Exp. Med.*, **157**: 1947-57.

MATERIELS ET METHODES

République du Mali

Site d'étude

Légende

- Capitales régionales
- ▲ Bancoumana
- Cours d'eau

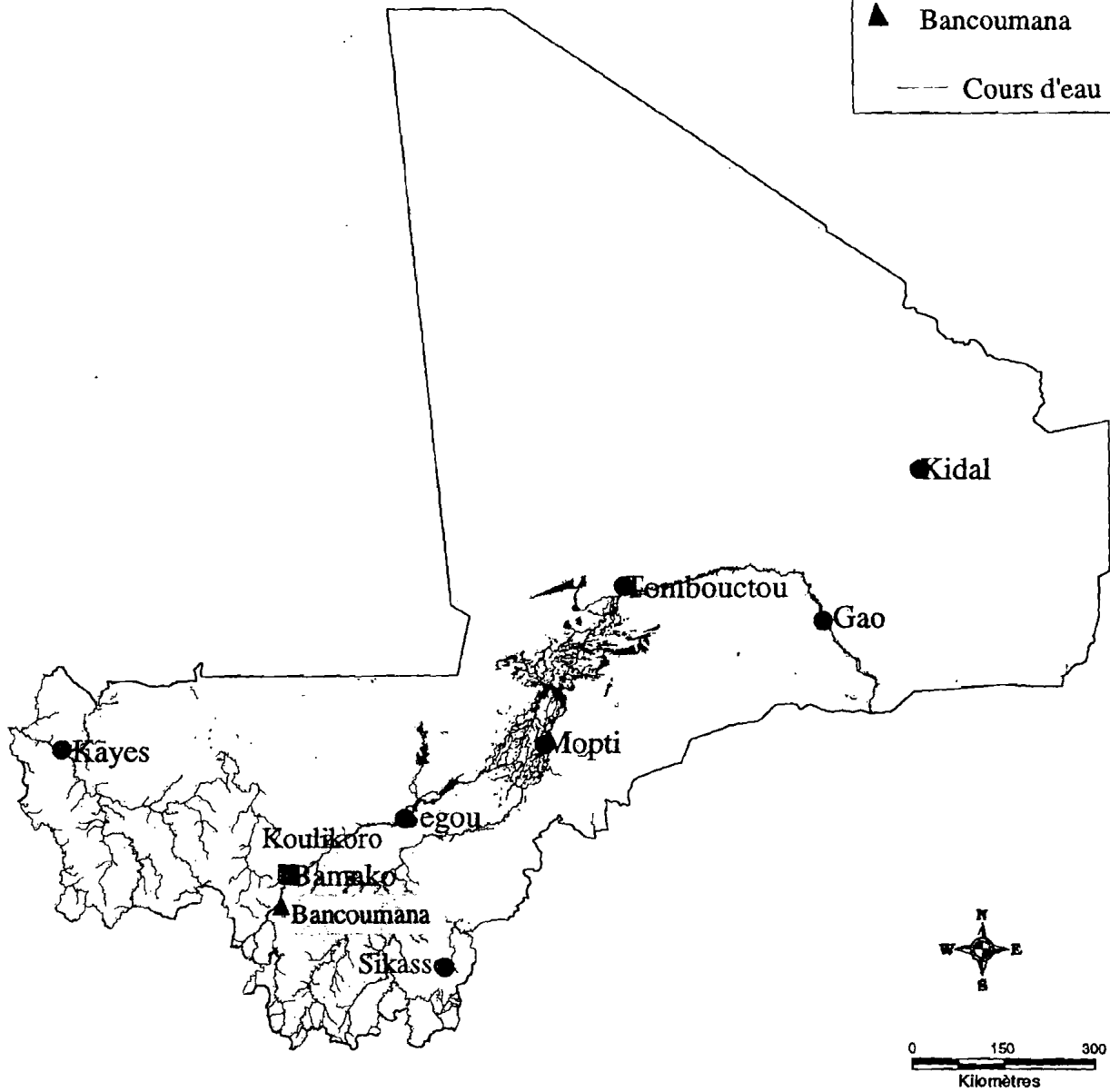
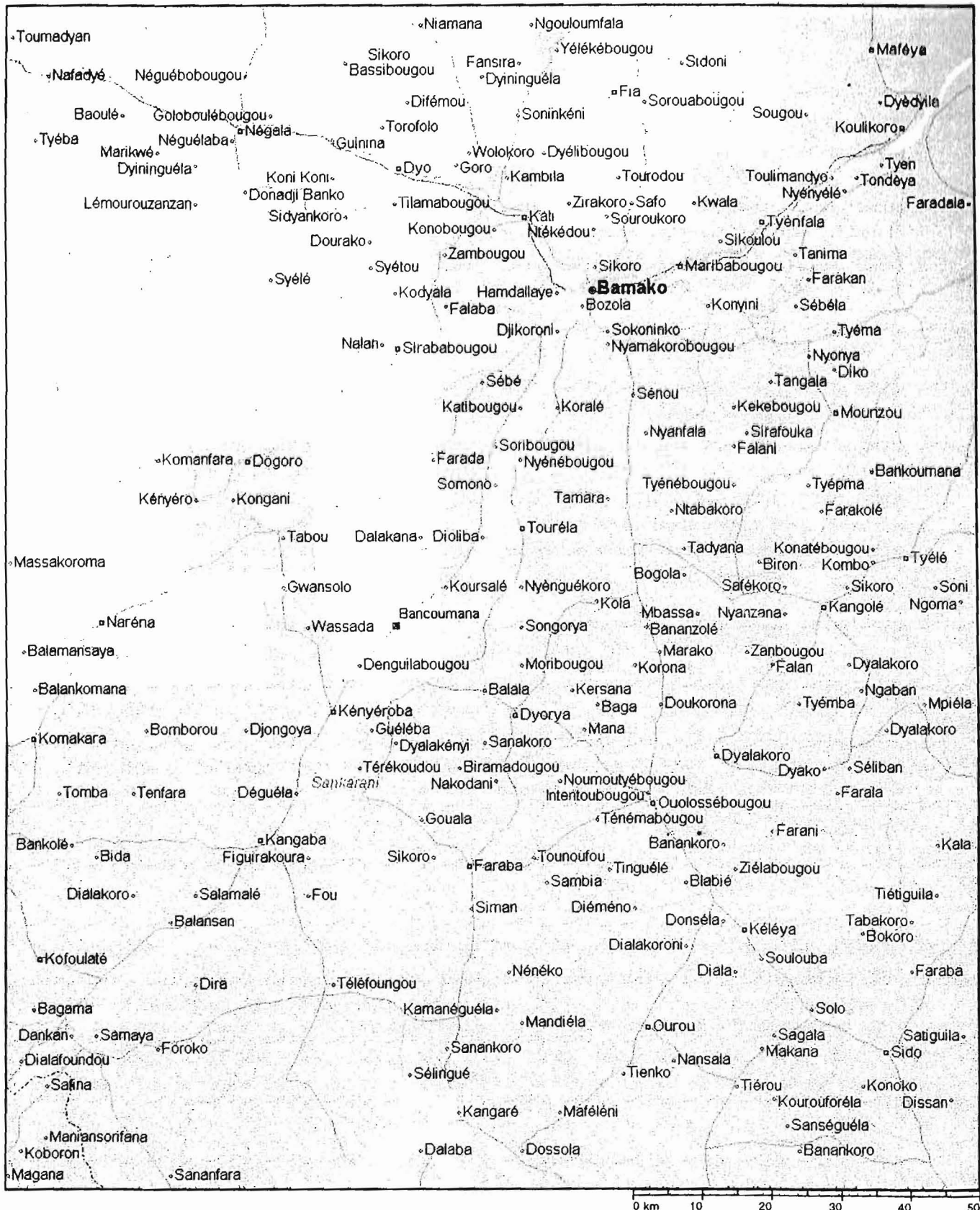


Figure 1: Carte physique du Mali avec la localisation de notre site d'étude



ENCARTA 97
WORLD ATLAS

Figure 2A: Le Village de Bancoumana et ses environs
Cercle de Kati, Mali

2 - Historique:

Bancoumana a été fondé au 16^{ème} siècle par Namanka KEITA. De retour d'une razzia. Il identifia le site de Bancoumana propice à l'agriculture et à la chasse. Ayant conduit ses butins de razzias tels des captifs et autres biens, dans son village natal, Naréna. il revint s'installer à ce qui deviendra plus tard Bankumana [de *Ban*, le refus; de *kuma*, la parole, la communication et de *na*, substantif de lieu]. En effet, Namakan a refusé d'obéir à l'ordre de son frère aîné qui lui avait exigé de revenir auprès de lui à Naréna. La chasse représentait sa plus grande passion comme c'est d'ailleurs de tradition dans cette région du pays.

Par la suite, trois frères Kamara du village de Siby Sorijan, Faran et Kolowilen s'y installèrent sous l'autorisation des descendants de la famille impériale de Sunjata Keïta de Kiniéro. Cependant, il est important de noter que si les Keïta possèdent l'autorité politique, ils l'ont reçu des Kamara sur un protocole d'accord que les deux grands lignages ont établi. Aussi, les graves et difficiles litiges fonciers de terroirs sont laissés à l'arbitrage des Kamara de Tiko [de *n'Te i*, je ne suis pas ou je n'en suis pas et de *kò*, après toi], les *Fidabalala* [de *Fida*, médicaments; de *bala*, maîtres, connaisseurs et de *la*, suffixe de dérivation de lieu, de demeure] et les *Kanibalala* [de *kani*, envoyé chercher; de *bala*, disciples attentionnés et de *la*, suffixe de dérivation de lieu, de demeure].

Bref, c'est ainsi que les trois quartiers tels Sorijanna, Farana et Kolowilenna et Sorijan Kamara, l'aîné des trois frères fut le premier chef du village.

Cependant cette tradition de succession par droit d'aînesse à la chefferie du village est en pleine crise au sein de la communauté rurale de ce village par suite d'incidents que cette communauté préfère taire. Nous respecterons cette volonté selon nos protocoles éthiques d'accord de principe. L'alternance semble être dans la nomination d'un maire de commune.

3 - Climat et végétation:

Le village de Bancoumana se situe dans une zone climatique soudano-guinéenne où deux grandes saisons se succèdent: la saison des pluies de juin à octobre et la saison sèche de novembre à mai avec cependant une courte saison de transition que les communautés rurales désignent sous l'appellation vernaculaire de *fobònda*. Elle est représentée par un adoucissement voire même un rafraichissement des températures par l'arrivée des côtes atlantiques et du désert saharien du vent chaud et sec, l'harmattan. Elle s'étale d'octobre ou novembre à janvier ou février et, elle représente un pic de transmission du paludisme, également identifié par les communautés étudiées.

La température la plus élevée se situe à 38⁰C au mois de Mai et, la plus basse est voisine de 18⁰C au mois de Janvier. D'une manière générale le climat y est assez agréable et la végétation est luxuriante. On y rencontre:

- Une strate arborée où les principaux arbres sont: *Bombax costatum* (kapokier), *Vitellaria paradoxa* (karitier), *Parkia biglobosa* (néré), *Tamarindus indica*, (N'Tomisu) = Tamarinier.

- Une strate arbustive composée essentiellement de *Guiera senegalensis*, *Combretum sp.*, *Jatropha curcas*, *Dicrystachys glamerata*, *Coclospermum tinctorium*.

- Une strate herbacée avec des espèces telles que *Penisetum pedicellatum*, *Cymbopogon giganteus* et *Andropogon sp.*

- Une galerie forestière caractéristique de la savane guinéenne se forme le long de la rivière Koba.

4 - Relief et hydrographie:

Le relief est peu accidenté. Le village est situé dans un demi "Talweg". Au nord on rencontre les prolongements des Monts Manding. Au sud, on observe une plaine inondable où se situe la mare "sacrée" du village; elle constitue un gîte larvaire qui devient assez important en saison des pluies. Il existe à l'ouest une rivière appelée "Kòba" [de *kò*, rivière et de *ba*, grand].

5 - Démographie:

Nous avons effectué le recensement suivant les concessions. Dans ces concessions chaque ménage est recensé individuellement en donnant un numéro d'identification au bloc, à la concession, au ménage puis à l'individu.

La population du village de Bancoumana est estimée à environ 10.000 habitants dont 25% représentent les enfants de moins de dix ans. Le groupe historico-socio-culturel le plus important est représenté par les Malinké, viennent ensuite les Bambara suivis des Peulh.

L'Islam représente la religion la plus dominante soit environ 95% de sujets qui s'en déclarent. Cependant les religions traditionnelles sont assez présentes chez certaines personnes ou sont diffusées dans les pratiques quotidiennes de la vie sociale et culturelle.

L'habitat familial ou lignagère est représenté par trois types de constructions:

- les cases rondes avec un toit de chaume conique;
- les cases rondes ou rectangulaires avec un toit en terrasse;
- les maisons rectangulaires avec un toit en tôle (qui représentent une minorité) des édifices.

Les toits sont en chaume, en terrasse ou souvent en tôles ondulées. Les fentes dans les murs en banco constituent d'excellents lieux de répos pour les moustiques.

6 - Infrastructures socio-sanitaires:

Bancoumana possède un dispensaire qui a été construit en 1958, une maternité en 1963 et, un centre de santé communautaire (CSCOM) créé en 1993 grâce à la volonté d'organisation du village et des villages environnants en une association communautaire des ressortissants du village. Ils ont contribué au développement sanitaire du village avec l'assistance de l'Organisation Non Gouvernementale Franco-Malienne "Santé Sud".

Le centre est dirigé par un médecin-chef de centre, deux aides-soignants au niveau du dispensaire; la maternité sous la responsabilité du médecin-chef de centre emploie deux matrones et abrite un Programme Elargi de Vaccination (P.E.V.). Le centre possède un dépôt de médicaments génériques.

L'école fondamentale créée en 1952 et fréquentée actuellement par environ 700 élèves vient d'être dotée de nouvelles infrastructures grâce à une ONG. Le taux d'alphabétisation des adultes est faible < 5%.

7- Activités économiques:

L'économie de Bancoumana repose essentiellement sur l'agriculture. On peut distinguer deux types de cultures: les cultures vivrières (riz, sorgho, patates, ignames, manioc, bananes), les cultures industrielles (tabac, arachide et coton) et les cultures potagères.

L'élevage des ovins, des caprins et des bovins y est pratiqué comme une activité économique secondaire. La pêche y est également pratiquée.

B- EPIDEMIOLOGIE DU PALUDISME, DYNAMIQUE DE LA DIVERSITE ALLOTYPIQUE de *P. falciparum* A BANCOUMANA.

1- Echantillonnage:

La réalisation du travail a nécessité le consentement éclairé des villageois. Nous avons aussi obtenu l'approbation du comité d'éthique de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie (FMPOS) et celle des Instituts Nationaux de la Santé (NIH) des Etats Unis d'Amérique. Nous avons procédé à une réunion avec le chef de village assisté de ses conseillers et les chefs de famille.

Nous avons procédé à un recensement exhaustif de la population du village. L'étude a porté sur un échantillon formé par tous les enfants âgés de 6 mois à 9 ans sur lesquels une goutte épaisse a été confectionnée.

Un sous échantillon représentatif d'enfants a été constitué pour l'étude du polymorphisme de la MSP1 par sondage aléatoire par grappe ppp (probabilité proportionnelle à la taille de la population) à partir des individus infectés par *Plasmodium*

falciparum. Les porteurs de *P. falciparum* ont été stratifiés en fonction de leur parasitémie.

Cent vingt trois (123) patients ont subi le test de chimiosensibilité. 31 ont été sélectionnés de façon aléatoire pour l'étude du polymorphisme de la MSP 1.

2- Période d'étude:

Notre étude s'est déroulée de juin 1996 à décembre 1998. Les passages transversaux ont lieu pendant la saison de transmission (juin août octobre) et pendant la saison sèche dite saison de non transmission (décembre, février, mars).

3- Techniques d'étude:

Déroulement du travail sur le terrain:

Une semaine avant le passage, une équipe se rendait à Bancoumana pour vérifier la présence des enfants de la cohorte et inclure éventuellement de nouvelles naissances. Pendant le passage le travail était organisé de la manière suivante:

Poste 1: appelé poste d'identification, ce poste était composé de médecins qui ont fait le recensement du village donc, établi la liste démographique du village. Ils étaient aidés par les guides du village.

Les numéros d'ordre, les numéros d'identification, les filiations (mères, chefs de familles) des enfants tous portés sur une carte donnée pendant le premier passage sont vérifiés. Après avoir confirmé tous ces paramètres l'enfant est dirigé vers le poste 2.

Poste 2: ou poste clinique:

Les variables mesurées étaient la température, le poids et la rate par deux médecins. L'enfant était ensuite dirigé au poste 3.

Poste 3: poste de prélèvements biologiques.

Ce poste était constitué de pharmaciens et de biologistes. Après l'identification de l'enfant les gouttes épaisses (GE), les confettis sont confectionnés et gardés dans des boîtes de collection OMS et rangés dans la malle (papier filtre = confettis) jusqu'à leur séchage. Chaque confettis était ensuite mis dans une enveloppe pour une bonne conservation. Les gouttes épaisses étaient colorées 24 heures après leur confection puis classées par ordre croissant dans des paquets et acheminées au Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires (DEAP) à Bamako pour la lecture. Les lectures ont été faites par rapport à 300 leucocytes et rapportés à 7500 leucocytes pour l'estimation de la parasitémie.

3-1 Le suivi longitudinal:

Une campagne d'information et de sensibilisation a été faite par les responsables du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires (DEAP) avant de commencer ce volet de l'étude. Plusieurs réunions ont été tenues pour expliquer les objectifs de l'étude. Nous avons obtenu aussi l'approbation du Comité d'Ethique de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie (FMPOS).

Le travail se faisait souvent de façon passive c'est à dire les patients venaient au centre d'eux-mêmes et active. Dans ce cas les guides locaux se rendaient deux fois par semaine dans les familles pour dépister les cas fébriles et les diriger au centre.

Dans tous les cas le médecin faisait l'examen clinique. En cas de présomption du paludisme il faisait la goutte épaisse qu'il adressait au biologiste pour une confirmation. Les splénomégalies étaient classées suivant la classification de Hackett décrit comme suit:

Rate 0 : Rate normale, non palpable

Rate I: Rate palpable à l'inspiration profonde

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

Rate III: Rate dépassant cette ligne sans dépasser l'ombilic.

Rate IV: Rate dépassant l'ombilic sans franchir l'horizontale passant à égale distance entre l'ombilic et la symphise pubienne.

Rate V: Rate dépassant cette ligne horizontale.

3-2 Test *in vivo* standard de l'OMS de 14 jours:

L'évaluation de la réponse de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine a été réalisée par le test *in vivo* standard de l'OMS (épreuve de 14 jours).

Principe:

Ce test consiste à administrer la dose de 25 mg de chloroquine base par kg de poids corporel répartie en 3 jours et à suivre l'évolution de la parasitémie pendant 14 jours. Nous avons utilisé la chloroquine 100 mg base en comprimés sécables.

Mode opératoire:

Nous avons administré 25 mg de chloroquine base par kg de poids corporel répartis sur 3 jours:

Jour 0: Première dose de 10 mg/kg de poids corporel en prise unique par voie orale,

Jour 1: Deuxième dose de 10 mg/kg de poids corporel en prise unique par voie orale,

Jour 2: Dernière dose de 5 mg/kg de poids corporel en prise unique en par voie orale.

Faire une goutte épaisse le premier jour avant l'administration de la première dose de chloroquine et une goutte épaisse de contrôle de la parasitémie à J3, J7 et J14 avec un contrôle clinique.

4 - Résistances parasitologiques:

Après 14 jours de suivi, nous pouvons nous prononcer sur la sensibilité ou la résistance du parasite.

Une souche de *P. falciparum* est dite sensible lorsque les parasitémies à J3, J7 et à J14 sont nulles ou la parasitémie à J3 est inférieure à 25% de la parasitémie à J0 et que les parasitémies à J7, à J14 sont nulles.

Si la souche de *P. falciparum* n'est pas sensible, elle est résistante. On distingue trois sortes de résistances: résistance RI, une résistance RII et une résistance RIII.

Une souche de *P. falciparum* est dite résistante de type RI lorsqu'à une parasitémie J3 inférieure à 25% de la parasitémie initiale est associée une parasitémie positive entre J7 et J14.

Une souche de *P. falciparum* est dite résistante de type RII lorsque la parasitémie à J3 est inférieure à 25% de la parasitémie à J0 en présence d'une parasitémie positive à J7.

Une souche de *P. falciparum* est dite résistante de type RIII lorsque la parasitémie à J3 est supérieure ou égale à la parasitémie à J0, ou lorsque la parasitémie augmente progressivement de J0 à J14.

5 - Mesure de l'hématocrite:

La ponction digitale capillaire ayant servi à la réalisation du confettis et de la goutte épaisse était utilisée pour prélever du sang dans un tube à hématocrite hépariné (VWW Scientific- West Chester, USA). L'extrémité du tube était placée dans la goutte de sang et inclinée par rapport au doigt. Le sang remonte par capillarité pour remplir le tube au $\frac{3}{4}$ et après avoir bouché l'une des extrémités à l'aide de la cire, le tube est numéroté et centrifugé à 12 000 g/mn pendant 5 mn. La lecture était effectuée à l'aide de l'abaque.

6 - Extraction de l'ADN plasmodial et amplification par PCR:

Six clones de laboratoire (Indochina I, Haïti 135, HB3, 3D7, ItG2 et 7G8) et des souches de terrain provenant de Kambila (25 km au nord Ouest de Bamako) et de Selingué (125 km au sud de Bamako) ont été utilisées pour la mise au point de la technique. L'extraction de l'ADN à partir de spots de confettis imbibés de sang a été faite selon la technique décrite par Wooden *et al.*, (1992). Pour amplifier le bloc 2 du gène de MSP1, nous avons choisi trois paires d'amorces s'hybridant au niveau des régions conservées du bloc 1 et 3 (Miller *et al.*, 1993). Les amorces ont été mises au point à partir des séquences spécifiques de l'une des trois souches, K1, MAD20 et RO33 (Tanabe *et al.*, 1987). Pour

augmenter la sensibilité de la technique notamment pour les faibles parasitémies, nous avons utilisé la PCR dite nichée (nested PCR). Une paire d'amorces (Amorces universelles, MSP1) non polymorphique et s'hybridant au niveau des blocs 1 et 3 a été mise au point. Les différentes amorces ont été sélectionnées à l'aide du programme Power Macintosh 8100/80 MacDNASIS version 3.0 9 hitachi, (San Bruno, CA) à partir de la banque des données "GenBank" (Koïta et al., 1994)

Au total, 5 µl d'ADN ont été utilisés pour chaque réaction. Le volume réactionnel total était de 50 µl contenant 30,5 µl de Mix1, 14,5 µl de Mix2 et 5 µl d'ADN. *Mix1*: 20 µl d'eau distillée; 3 µl de solution Tampon 10X; 1,5 µl MgCl₂ à 50mM; 1 µl pour chaque dNTP à 10mM; 1 µl de chaque amorce à 1 µM. *Mix2*: 12 µl d'eau distillée; 2 µl de Tampon 10X; 0,5 µl de Taq polymérase à 5 U.O. Pour la PCR simple, la dénaturation initiale était effectuée à 95⁰C pendant 2mn10. Les 35 cycles suivants d'amplification étaient la dénaturation à 94⁰C pendant 30 secondes, l'hybridation à 57⁰C pendant 40 secondes et l'extension à 72⁰C pendant 70 secondes. Pour la Nested PCR, nous avons utilisé 1 µl du produit additionné de 4 µl d'eau distillée comme matrice d'ADN. Pour l'amplification, nous avons utilisé une MJ-researcher PTC100 thermocycle. Les fragments d'ADN amplifiés résultant de la PCR étaient directement analysés sur un gel d'agarose à 2% contenant du bromure d'éthidium (0,3 mg/ml). Le produit d'amplification mélangé à 2 µl de "dye" et chargé dans le gel d'agarose était placé dans un bac de migration contenant du TBE X buffer (45 mM tris-HCl pH8.0, 45 mM Boric acid, 1 mM EDTA) pendant 45 mn sous une tension constante 90V. A la fin de la migration, le gel était photographié sous UV. La taille moléculaire des fragments était déterminée en utilisant un marqueur de taille 100pb (Boehringer Mannheim, Indianapolis IN). Sur la photo, les produits amplifiés apparaissent sous forme de bandes. La taille des produits amplifiés était exprimée en nombre de paires de base en référence au standard à l'aide du programme "MacDNASIS software". Les standards utilisés étaient pBR322/*Hae* III, pBR328/*Bgl* I et pBR328/*Hinf* I (Molecular Markers V et VI-Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN).

Technique de la biologie moléculaire:

Les amorces spécifiques pour les gamétocytes n'existant pas pour le moment, les confettis confectés sur les porteurs de gamétocytes pendant les différents passages de l'infestation expérimentale ont été utilisés pour la mise au point de la technique de biologie moléculaire. Le protocole comprend trois étapes qui sont: l'extraction de l'ADN plasmodial, l'amplification génique *in vitro* et la révélation du produit amplifié.

6 – 1 Amplification *in vitro* de l'ADN ou "Polymerase Chain Reaction" PCR:

Principe:

Le principe de la PCR consiste à utiliser de courtes séquences d'ADN (oligonucléotides) comme amorces et une enzyme (la Taq polymérase) pour répliquer en copies multiples une portion d'ADN dont les séquences aux extrémités 3' et 5' sont connues. Les 2 oligonucléotides doivent avoir une séquence complémentaire des extrémités de chacun

des deux brins d'ADN. La synthèse à partir des deux amorces a lieu simultanément et aboutit à la duplication de la séquence matrice initiale.

6 - 2 Choix des amorces:

La région d'ADN à amplifier dans notre étude est le bloc 2 du gène de la MSP-1. Pour cela nous avons choisi en nous référant à la séquence de MSP-1 publiée par MILLER *et al.* (1993), trois paires d'amorces s'hybridant au niveau des régions conservées des blocs 1 et 3. Les amorces ont été mises au point à partir des séquences spécifiques de l'une des trois souches suivantes: K1 (Thaïlande), MAD20 (Madang Papouasie Nouvelle Guinée), RO33 (KOITA *et al.* 1997). Pour augmenter la sensibilité de la technique, nous avons utilisé la PCR dite nichée "Nested PCR". Pour cela une paire d'amorces (Amorces universelles, MSP-1) non polymorphique et s'hybridant au niveau des blocs 1 et 5 a été mise au point. Ces différentes amorces ont été mises au point à l'aide du programme MacDNASIS sur micro-ordinateur Power Macintosh 8100/80 version 3.0 (Hitachi, San Bruno, CA), en nous référant à la banque des données "GenBank".

6 – 3 Préparation des mélanges réactionnels:

Mélange I ou Mix I:

Il est composé de 20 µl d'eau distillée (GIBCO-Grand Island, NY), auxquels on ajoute 3 µl de la solution tampon à la concentration 10X et 1,5 µl de solution de MgCl₂ à 50 mM. Ensuite 1 µl de chacun des 4 dNTPs à 10 mM suivi de 1 µl de chaque oligonucléotide à 50µl. Enfin on ajoute 1 µl de chacun des amorces à la concentration de 1 µM.

Mélange II ou Mix II:

Aux 12 µl d'eau distillée, on ajoute 2 µl de la solution tampon à la concentration de 10X et 0,5 µl de solution de Taq polymérase (Gibco, Grand Island, NY) à 5 unités par µl.

6 –4 Mode opératoire:

L'ensemble de la réaction est réalisée dans un tube à PCR de 600 µl (Robbins Scientific-Sunnyvale, CA) et le volume réactionnel total est de 50 µl. Dans le tube de 600 µl sont disposés 30,5 µl de Mix I auxquels est ajouté un grain de Wax (Perkin Elmer). Le tube est ensuite porté à 73°C pendant 3 mn pour inactiver les enzymes. Après refroidissement, on ajoute 14,5µl du Mix II et 5 µl de la solution contenant l'ADN à amplifier. Le tube ainsi prêt est placé dans la machine à PCR "Robocycler 40" (Stratagene, La Jolla, CA) et le programme d'amplification est finalement appliqué.

Programme:

Pour la PCR simple, la dénaturation initiale est effectuée à 95°C pendant 2 mn 10 puis suivent 35 cycles d'amplification avec dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, hybridation à 57°C pendant 40 secondes et extension à 72°C pendant 70 secondes.

Quant à la "Nested PCR", la première amplification comprend une dénaturation initiale à 95°C pendant 2 mn suivie de 35 cycles d'amplification avec dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, hybridation à 57°C pendant 30 secondes et extension à 72°C pendant 70 secondes. Au moment de la deuxième amplification, 1µl de produit de la première amplification additionné de 4 µl d'eau distillée est utilisé comme ADN matrice. Les conditions d'amplification sont les mêmes que celles de la PCR simple.

6 - 5 Préparation du gel à 2%:

On pèse 1,6 g d'agarose ultra pure (Gibco, Life Technologies) puis on le verse dans un erlenmeyer de 1000 ml. Ensuite 80 ml de TBE 0,5X (Gibco, Life Technologies) sont ajoutés et le mélange est porté à 100°C pendant 3 mn. Après chauffage, 26 µl de BET (0,3 mg/ml- Sigma) (Bromur d'Ethidium) sont ajoutés. La préparation ainsi obtenue est coulée dans un support de gel avec un peigne à 10 dents. La polymérisation du gel a lieu en 30 mn.

6 -6 Révélation des produits amplifiés:

Treize microlitres du produit d'amplification mélangés à 2µl de "Dye"(Quality Biological Inc, Gaithersburg, MD) sont chargés dans un gel d'agarose à 2% placé dans un bac de migration contenant 70 ml de Tris Borate EDTA, 0,5X (GIBCO) et de 240 µl de BET (Gibco). Une tension de 90 v (200mA) est appliquée pendant 45 mn. Au niveau de la première colonne de migration sont déposés 13 µl de marqueur de poids moléculaire (Boehringer Mannheim, Indianapolis IND). Après l'arrêt de la migration le gel était photographié sous UV à l'aide d'une caméra photo (FOTODYNE ®). L'image du gel est ainsi marquée et conservée pour interprétation.

7- Paludisme grave, définition dans le cadre du projet TMRC:

Etait atteint de paludisme grave tout sujet remplissant l'un des critères suivant:

Température axillaire à J0 \geq 40°C avec une parasitémie positive à J0.

Hématocrite < 15% à J0 avec une parasitémie positive à J0.

Parasitémie à J0 \geq 100 000 *P. falciparum*/µl de sang.

Coma ou convulsion avec une parasitémie positive.

8 - Considérations éthiques:

Le protocole d'étude a été approuvé par le comité éthique de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie du mali (FMPOS) avant sa réalisation sur le terrain. Un consentement éclairé signé des parents des enfants nous a été d'abord nécessaire avant d'entreprendre le travail. Outre la construction d'infrastructures socio-sanitaires et la présence permanente d'une équipe médicale sur le terrain, les équipes du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires s'occupent aussi de l'évacuation et de la prise en charge des cas graves de paludisme sur Bamako.

Tous les enfants bénéficiaient aussi de la gratuité des soins pendant toute la durée de l'étude.

9 - Analyse des données:

Les données ont été saisies sur Dbase IV, Microsoft office 95. L'analyse a été faite avec SPSS et Epi-info 6.0 du CDC d'Atlanta/OMS. Le test de Chi carré et le test de probabilité exacte de Fisher ont été utilisés pour les comparaisons de proportions.

C- ETUDE DU POUVOIR INFECTIEUX DES PORTEURS DE GAMETOCYTES A BANCOUMANA.

I Identification des porteurs de gamétocytes – Gorgement des moustiques par contact direct :

Notre étude a porté essentiellement sur les enfants et les adolescents, volontaires âgés de moins de 18 ans. Nous avons regroupé l'échantillon en deux classes d'âge, 4-9 ans et 10-18 ans.

Les moustiques que nous avons utilisés étaient ceux de la génération F1 élevés à l'insectarium de l'unité de Recherche et de Formation sur le Paludisme (Malaria Research and Training Center, MRTC) du DEAP de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie. La méthodologie de recrutement des porteurs de gamétocytes et la technique de gorgement des moustiques se faisaient comme suit :

1 Recrutement :

Les enfants d'âge compris entre 4-18 ans de trente familles sélectionnées au hasard étaient convoqués au centre de santé pour la goutte épaisse. Cela était effectué en deux passages mensuels. Après coloration au Giemsa à 3% et lecture au microscope binoculaire à l'objectif 100 sous immersion, les porteurs de gamétocytes étaient identifiés.

Parmi les enfants porteurs de gamétocytes, deux étaient régulièrement conduits au laboratoire pour gorger les moustiques. Trois millilitres de sang étaient prélevés; 1,5 ml étaient lavés avec le sérum d'un sujet sans antécédent palustre. Une goutte épaisse était confectionnée et lue pour estimer la densité gamétocytaire sur 300 leucocytes et rapportée à 7500 leucocytes/ μ l de sang. Les moustiques utilisés au cours des expériences étaient ceux de la première génération de moustiques capturés à Bancoumana. Les moustiques étaient ensuite élevés dans un insectarium maintenu à une température de 28 °C et à une humidité relative de 70-90%. Au cours du repas de sang, les pots contenant 20-30 moustiques étaient appliqués sur les "feeders" (Ponnudurai et *al.*, 1989) (un feeder contenant du sang total et l'autre du sang lavé) pendant 15 mn. Le sérum servant au lavage provenait des sujets de groupe sanguin O qui n'ont jamais été en contact avec le parasite du paludisme. Il nous a été offert par le National Institut of Health (NIH); USA. Les anophèles gorgés étaient dénombrés et nourris quotidiennement au jus sucré à 5%.

L'analyse des indices parasitologiques a porté sur les données de 1996 à 1998. En revanche, l'infectivité des porteurs gamétocytes a été mesurée en 1997 et 1998.

La population d'étude comprenait au total 4825 enfants parmi lesquels 949 ont été sélectionnés en 1996 (19,7%), 1702 (35,3%) en 1997 et 2174 (45,0%) en 1998. Nous avons identifié 485 porteurs de gamétocytes.

2- Echantillons :

Les variations saisonnières de l'infectivité des gamétocytes ont porté sur 372 porteurs de gamétocytes parmi les 485 volontaires. Les enfants âgés de 4-9 ans représentaient 38,6% % en 1997 et 37,7% en 1998. Les adolescents de 10-18 ans étaient 29% en 1997 et 32,6% en 1998).

Dans l'étude de la comparaison des deux techniques pour évaluer le blocage de la transmission nous avons sélectionné trente cinq enfants dont 62,85 % de garçons et 37,14 % filles. Les enfants étaient âgés de 4-18 ans avec une moyenne d'âge de 7,4 ans (DS = 2,19).

Quant aux facteurs hématologiques sur l'infectivité des gamétocytes, quatre vingt quatre enfants ont été inclus dans cette étude, avec 52.4 % de garçons et 47.6 % filles. La moyenne d'âge était de 8.34 ans (déviation standard = 2.48).

Quarante et quatre enfants ont été inclus dans l'étude des facteurs du plasma, avec 47,7% de garçons et 52,3 % de filles. La moyenne d'âge était de 7,79 ans (déviation standard = 2,57).

Trente enfants ont été inclus dans l'étude du polymorphisme des gamétocytes et des oocystes, avec 47% de garçons et 53% de filles, âgés de 4 à 15 ans. La moyenne d'âge était de 7,4 (deviation standard 2,19).

3- Technique de gorgement :

Il s'agit de faire gorger les moustiques sur les jambes des porteurs de gamétocytes. Deux pots de trentes moustiques chacun sont appliqués pendant 10-15 mn. Après les séances d'infection, les moustiques sont mis au repos. Le lendemain matin les moustiques n'ayant pas pris le repas de sang sont retirés des pots à l'aide d'un aspirateur de transfert.

La recherche des anticorps contre la protéine Pfs25, selon Kaslow et *al.*, 199,1 exprimée à la surface du zygote a été faite par la technique de l'ELISA.

4- Dissection des moustiques:

Huit jours plus tard, les moustiques étaient disséqués. L'estomac était extrait avec les ovaires et/ou les oeufs dans une goutte de mercurochrome à 1% pour la recherche et la détermination des charges oocystiques au microscope électrique.

4.1- Recupération des oocystes:

Les moustiques contenant les oocystes sont retenus. On dépose une goutte de PBS X1 sur la bordure de la lame et on attend 2 à 5 mn. Les oocystes apparaissent sous forme de

filaments roses. Ces éléments sont récupérés avec 10 µl de PBS X1 en pipettant deux fois sur le dépôt. Les oocystes sont ensuite conservés dans les tubes Eppendorf de 500 µl à -70°C.

4.2- Extraction de l'ADN des oocystes:

On procède à une centrifugation à 13 000 trs/mn pendant 3 mn. Le surnageant est rejeté. On ajoute 100 µl de tampon d'extraction. Il faut triturer pour homogénéiser avec le tampon d'extrait. Puis on chauffe au bain-marie à 65°C pendant au moins 30 mn. Cela permet la purification des ADN. Ajouter 14 µl d'acétate de Potassium (8M). Ensuite incubé pendant 45 mn dans de la glace. Centrifuger à 13 000 trs/mn pendant 10 mn. Entre temps préparer les tubes Eppendorf avec 200 µl d'Éthanol à 100%. Après centrifugation, ajouter le surnageant de celle-ci aux tubes contenant l'éthanol à 100%. Incuber à moins 20°C pendant une heure. Ce qui permet une seconde purification des ADN. Centrifuger à 13 000 trs/mn pendant 20 mn et rejeter le surnageant. Ajouter 100 µl d'éthanol à 70%. Centrifuger à 13 000 trs/mn pendant 5 mn. Réjeter le surnageant. Le culot est séché. Ensuite ajouter 50 µl d'eau distillée, agiter éventuellement et on obtient l'extrait d'ADN des oocystes.

4.3- Amplification des oocystes:

En plus du programme normal de la première amplification (citée ci-haut) il faut ajouter un cycle de 10 mn à 72°C. Ce qui portera la durée du cycle à 1 heure 34 mn au lieu 1 heure 24 mn.

II Facteurs hématologiques et infectivité des gamétocytes:

Nous avons utilisé le sang cryoconservé à $\leq -70^{\circ}\text{C}$ pour la recherche des facteurs hématologiques.

1- Principe de l'électrophorèse:

De petites quantités d'hémolysats obtenus à partir du sang total est traité à la plaque d'acétate de cellulose de Titan III[®]-H Les hémoglobines dans le sang sont séparées par électrophorèse en utilisant le tampon alcalin (pH 8,2-8,6) et sont colorées avec le rouge Ponceau S. Les plaques sont lues sur un densitomètre et la taille de chaque bande est déterminée.

2- Procédure:

Préparation de la plaque Titan R III-H:

- 1 - Dissoudre un paquet du tampon Supre-hème dans 980 ml d'eau déionisée
- 2 - Numéroter les plaques Titan R III[®]-H sur leur partie lisse avec un marqueur indélébile.

3- Tremper doucement les plaques numérotées dans le tampon Supre-Hème R afin que celui-ci monte par capillarité à travers la cellulose de la plaque pendant 5 minutes.

3- Préparation de la cuve à électrophorèse:

1 - Mettre approximativement 50 ml du tampon Supre-Hème® dans chaque chambre de la cuve à électrophorèse. C'est à dire du côté de chaque pôle (+) et (-).

2 - Couvrir le pont de chaque pôle du papier buvard, bien adhérer ce papier pour éviter les bulles d'air. Ce papier imprégné dans le tampon Supre-Hème va servir de lien conducteur électrique entre les deux pôles.

3 - Couvrir la cuve à électrophorèse pour empêcher toute évaporation de la solution tampon.

Décongeler le sang et faire une dilution avec la solution hémolysante dans un tube Nunc(13970 A/S NUNC- 65234 Cryo tube: Nalge Nunc International):

sang total (échantillon) = 50 µl avec une micropipette de 200 µl

solution hémolysante = 300 µl avec une micropipette de 1000 µl

Bien homogénéiser ce mélange et le placer au frais (4°C) pendant 5 mn.

Après, centrifuger le mélange à 2500 tours/mn pendant 30 mn.

L'électrophorèse est faite à partir du surnageant obtenu de la centrifugation.

Prendre les plaques à électrophorèse, sur la face lisse écrire la date, un numéro pour la plaque

Porter la plaque sur un ratelier et la tremper doucement dans un bac contenant la solution tampon de migration, laisser cette solution monter par capillarite au travers de la plaque.

Déposer 5 µl du surnageant obtenu de la centrifugation à l'aide d'une micropipette dans les puits de la plaque (un puits pour un patient). Pour éviter l'évaporation, couvrir la plaque à l'aide du papier parafilm.

A l'aide d'un peigne prendre des puits la solution à tester (une dent de peigne pour un patient) et déposer sur la plaque (dans le sens opposé à l'angle préalablement coupé de la plaque). L'autre partie de la plaque est placée du côté "Cathode Application". Appliquer ensuite les peignes en pressant dessus 2 à 3 fois pour bien impressionner sur la plaque.

4- Electrophorèse:

Rapidement, placer les plaques dans la cuve à électrophorèse, l'acétate cellulose en position renversée de façon à voir les échantillons à tester du côté du fond de la cuve. Déposer un poids sur les plaques pour assurer le contact avec les bords de la cuve. Couvrir la cuve à électrophorèse et mettre le contact pour 30 minutes sous 350 volts.

5- Coloration:

Rétirer les plaques de la cuve à électrophorèse:

Colorer les plaques au Ponceau S (0,5% de Ponceau S + 10% d'acide , lot N^o: 265526, Laboratoires-Hélène, Texas).

Décolorer les plaques dans 3 bacs contenant chacun 5% d'acide acétique pendant 5 mn pour chaque bac.

6- Eclaircissement des plaques:

Les plaques sont ensuite trempées dans une solution transparisante (Méthanol absolu 70 ml qui déshydrate les plaques + 30 ml d'acide acétique glacial + 4 ml de solution éclaircissante: Clear Aid), pendant au moins 10 mn. Elles sont enfin placées dans une solution éclaircissante (PermaClear solution) pour rendre bien visibles les bandes pendant 2 mn. Elles sont séchées pour enlever l'excès de solution à la température du laboratoire pendant 15 minutes.

La proportion relative des bandes était déterminée par la lecture des plaques sur un densitomètre.

Les échantillons étaient typés en groupes ABO et Rhésus en utilisant un test d'agglutination en relation avec les instructions du fabricant (Ortho Diagnostics, New Jersey).

III Facteurs de sérum sur l'infectivité des gamétocytes:

Le prélèvement veineux (6ml) des enfants se faisait en présence de l'accompagnant pour rassurer et les enfants et les parents eux-mêmes. Une partie du sang total (1,5ml environ) est placée dans l'eau tiède (37^oC environ). Le reste est centrifugé pour recueillir le sérum. Le culot globulaire est ensuite lavé une fois au RPMI. Une partie (1,5ml) de ce culot globulaire lavé est placée dans l'eau tiède (37^oC).

L'hématocrite est estimée à partir du sang centrifugé: Si Xml = volume globulaire et Yml = volume plasmatique (dans le tube de prélèvement).

$$Hte = Xml \times 100 / Yml$$

Le reste du culot globulaire est lavé deux fois au PBS X1 et conservé à $\leq -70^{\circ}\text{C}$ après avoir ajouté quelques gouttes de glycérolé pour des études biologiques ultérieures. Les sérums ont été conservés pour l'ELISA à la recherche d'anticorps anti-Pfs25. Les confettis ont été utilisés pour des études de la biologie moléculaire liées au parasite. L'enfant, le sang total (1,5ml) et le sang lavé (1,5ml) sont conduits en section entomologie.

Nous avons effectué cette comparaison par l'étude de l'influence des facteurs sanguins intervenant dans le processus de l'infection des moustiques, précisément les anticorps.

Ainsi, quatre pots de 30 moustiques chacun sont utilisés: 2 pots pour le sang lavé et 2 pots pour le sang non lavé.

Une partie des moustiques transportés du terrain est gardée au laboratoire pour l'infection expérimentale. Ces moustiques étaient également mis à jeûn 10 à 12 heures avant le repas de sang.

Le sang total (1,5ml) et le sang lavé (1,5ml) sont placés dans le "feeder" en contact avec les pots de moustiques contenant environ 30 moustiques.

Parallèlement le porteur de gamétocytes est tenu assis sur un tabouret et les jambes découvertes où sont appliqués aussi deux pots de 20-30 moustiques. Cette opération s'effectue en 10-15 minutes.

Toute cette opération est effectuée en présence de l'accompagnant des enfants qui est un adulte.

Au lendemain de chaque séance d'infection, les moustiques non gorgés étaient soustraits des gorgés. Le nombre de moustiques ayant donc pris le repas de sang était enregistré pour évaluer le taux d'engorgement. Ainsi les moustiques ayant pris le repas de sang bénéficient d'une attention particulière d'élevage et de suivi, avec renouvellement quotidien du jus sucré à 5%, contrôle régulier de la température et de l'humidité relative.

RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS:

A- CARACTERES SOCIO-DEMOGRAPHIQUES:

La population du village de Bancoumana est estimée à environ 10.000 habitants dont 25% représentent les enfants de moins de dix ans. Le groupe historico-socio-culturel le plus important est représenté par les Malinké, viennent ensuite les Bambara suivis des Peulhs.

Suivant notre subdivision du village en blocs, nous avons constaté une concentration de la population dans les blocs 1 et 4 du village (tableau 1); (carte 2B).

Le tableau 2, indique la situation de la population d'enfants de 6 mois à 9 ans pendant le dernier passage de la cohorte chaque année. Nous constatons une augmentation progressive de l'échantillon d'une année à l'autre (1840 enfants en 1996, 2130 en 1997 et 2370 enfants en 1998).

Tableau 1: Répartition de la population de Bancoumana par âge/bloc selon le recensement de 1998 effectué par le DEAP.

Age/Bloc	0-5 ans	6-10 ans	11-18 ans	19-45	46-98	Total
1	614	608	548	811	350	2931
2	198	211	175	284	146	1014
3	171	226	224	310	133	1064
4	485	503	445	641	250	2324
Total	1468	1548	1392	2046	879	7333

Ce tableau montre que la population de Bancoumana est jeune. La population de la trache d'âge de 0-5 ans représente 20,01%, celle de 6-10 ans est de 21,11%, celle de 11-18 ans est de 19%, celle de 19-45 ans est de 28%. La tranche des personnes âgées 46-98 ans est de 12%.

Plan du village de Bancoumana

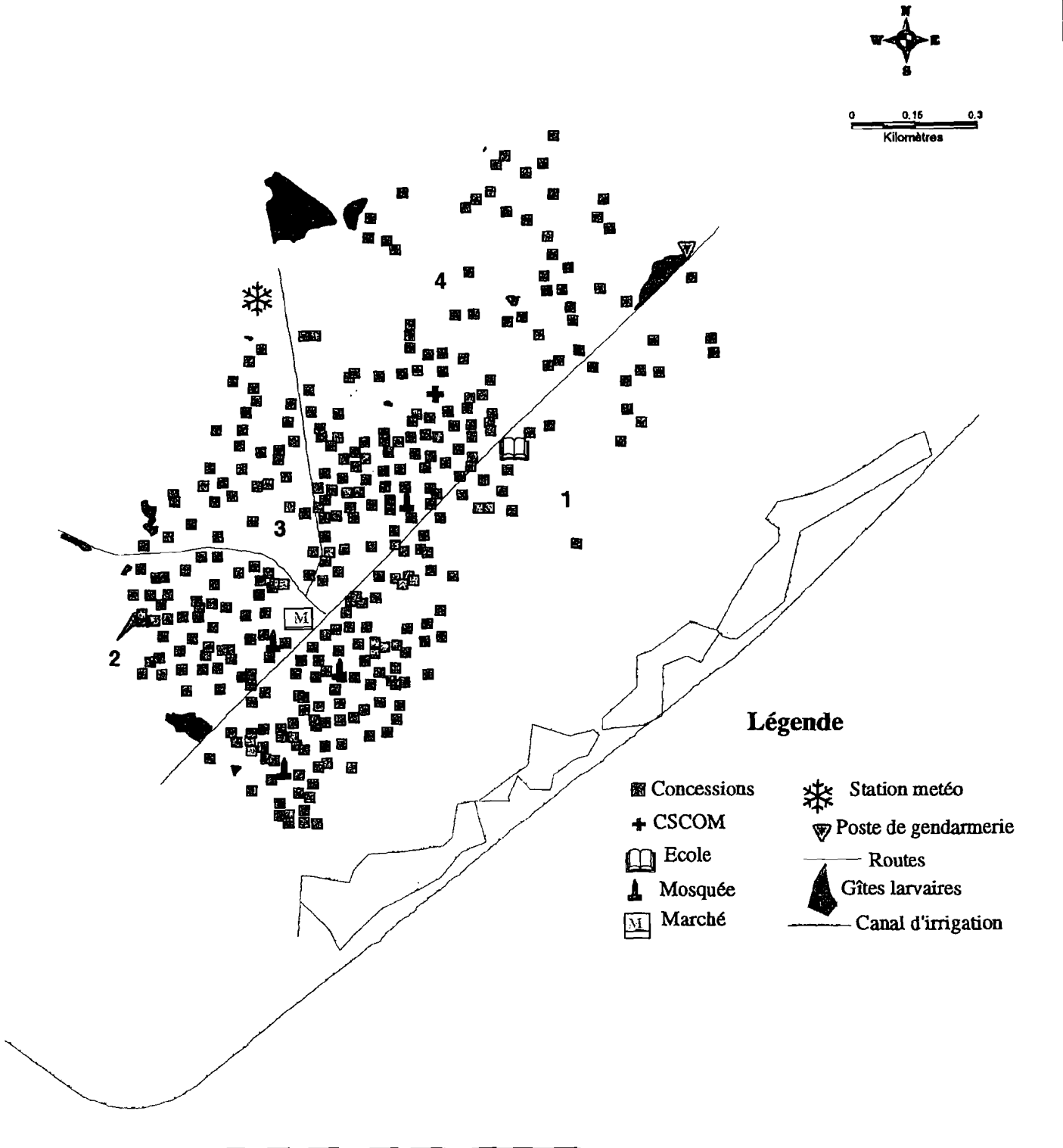


Figure 2B: Carte de base du village de Bancoumana

Tableau 2: Répartition de la population d'étude de Bancoumana par passage de fin de période d'étude et par tranches d'âge de 1996 à 1998:

Tranche âge	Oct.96	Oct. 97	Déc.98	Total
<1 ans	95	164	187	446
1-2 ans	355	393	404	1152
3-4 ans	391	386	603	1380
5-10 ans	999	1187	1176	3362
Total	1840	2130	2370	6340

Nous avons choisi le dernier passage de chaque année pour une estimation de la population d'étude. Nous observons une augmentation progressive de cette population chaque année. Cette augmentation s'explique par de nouvelles inclusions effectuées non seulement à chaque passage mais aussi à chaque année.

L'Islam représente la religion la plus dominante soit environ 95% de sujets qui s'en déclarent. Cependant les religions traditionnelles sont assez présentes chez certaines personnes ou sont diffusées dans les pratiques quotidiennes de la vie sociale, culturelle.

L'habitat familial ou lignagère est représenté par trois types de constructions:

- les cases rondes avec un toit de chaume conique;
- les cases rondes ou rectangulaires avec un toit en terrasse;
- les maisons rectangulaires avec un toit en tôle (qui représentent une minorité) des édifices.

Les toits sont en chaume, en terrasse ou souvent en tôles ondulées. Les fentes dans les murs en banco constituent d'excellents lieux de repos pour les moustiques.

I Données socio-climatiques:

Le village de Bancoumana se situe dans une zone climatique soudano-guinéenne où deux grandes saisons se succèdent: la saison des pluies de juin à octobre et la saison sèche de novembre à mai avec cependant une courte saison de transition que les communautés rurales désignent sous l'appellation vernaculaire de *fobònda*. Elle est représentée par un adoucissement voire même un rafraîchissement des températures par l'arrivée des côtes atlantiques et du désert saharien du vent chaud et sec, l'harmattan. Elle s'étale d'octobre

ou novembre à janvier ou février et, elle représente un pic de transmission du paludisme, également identifié par les communautés sous étude.

La température la plus élevée se situe à 42,4⁰C au mois de Mai et, la plus basse est voisine de 18,4⁰C au mois de Janvier. (Tableau 3). D'une manière générale le climat y est assez agréable et la végétation est luxuriante. On y rencontre:

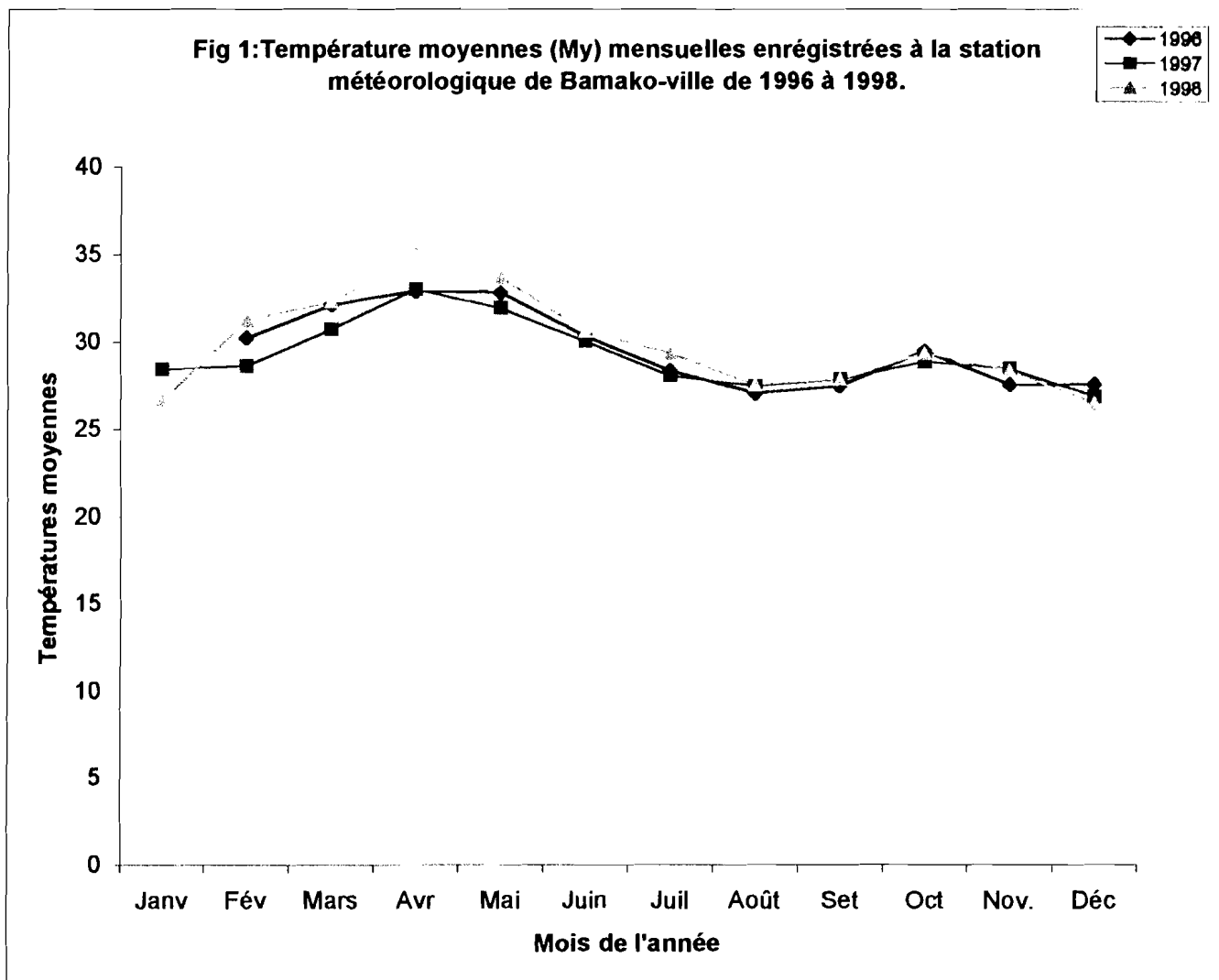
- Une strate arborée où les principaux arbres sont: *Bombax costatum* (kapokier), *Vitellaria paradoxa* (karitier), *Parkia biglobosa* (néré), *Tamarindus indica*, (N'Tomisu) = Tamarinier.
- Une strate arbustive composée essentiellement de *Guiera senegalensis*, *Combretum sp.*, *jatropha curcas*, *dicrystachys glamerata*, *Coclospermum tinctorium*.
- Une strate herbacée avec des espèces telles que *Penisetum pedicellatum*, *Cymbopogon giganteus* et *Andropogon sp.*
- Une galerie forestière caractéristique de la savane guinéenne se forme le long de la rivière Koba.

Tableau 3: Températures moyennes minimales (Mn), maximales (Mx), et moyennes (My) mensuelles enregistrées à la station météorologique de Bamako-ville de 1996 à 1998.

Température										
Mois	1996			1997			1998			
	Mn	Mx	My	Mn	Mx	My	Mn	Mx	My	
J	*	*	*	21,0	35,8	28,4	18,8	34,3	26,6	
F	22,6	37,8	30,2	21,1	36,0	28,6	23,3	39,0	31,2	
M	25,1	39,0	32,1	24,0	37,3	30,7	24,8	39,8	32,3	
A	25,8	40,0	32,9	26,2	39,7	33,0	27,6	42,4	35,0	
M	26,0	39,6	32,8	25,4	38,4	31,9	27,0	40,4	33,7	
J	24,2	36,3	30,3	24,2	35,8	30,0	24,5	36,7	30,6	
J	22,8	33,8	28,3	23,0	33,0	28,0	24,2	34,3	29,3	
A	22,1	31,8	27,0	22,8	32,0	27,4	22,6	32,3	27,5	
S	22,3	32,5	27,4	22,2	33,4	27,8	22,4	33,1	27,8	
O	22,6	36,1	29,4	22,3	35,2	28,8	22,7	35,8	29,3	
N	18,6	36,4	27,5	19,1	37,6	28,4	19,8	36,7	28,3	
D	19,3	35,7	27,5	18,4	35,1	26,8	18,9	33,9	26,4	
M.A*	22,6	36,3	29,6	22,5	35,8	29,2	23,1	36,6	29,9	

* Données non disponibles

* M.A: Moyennes annuelles



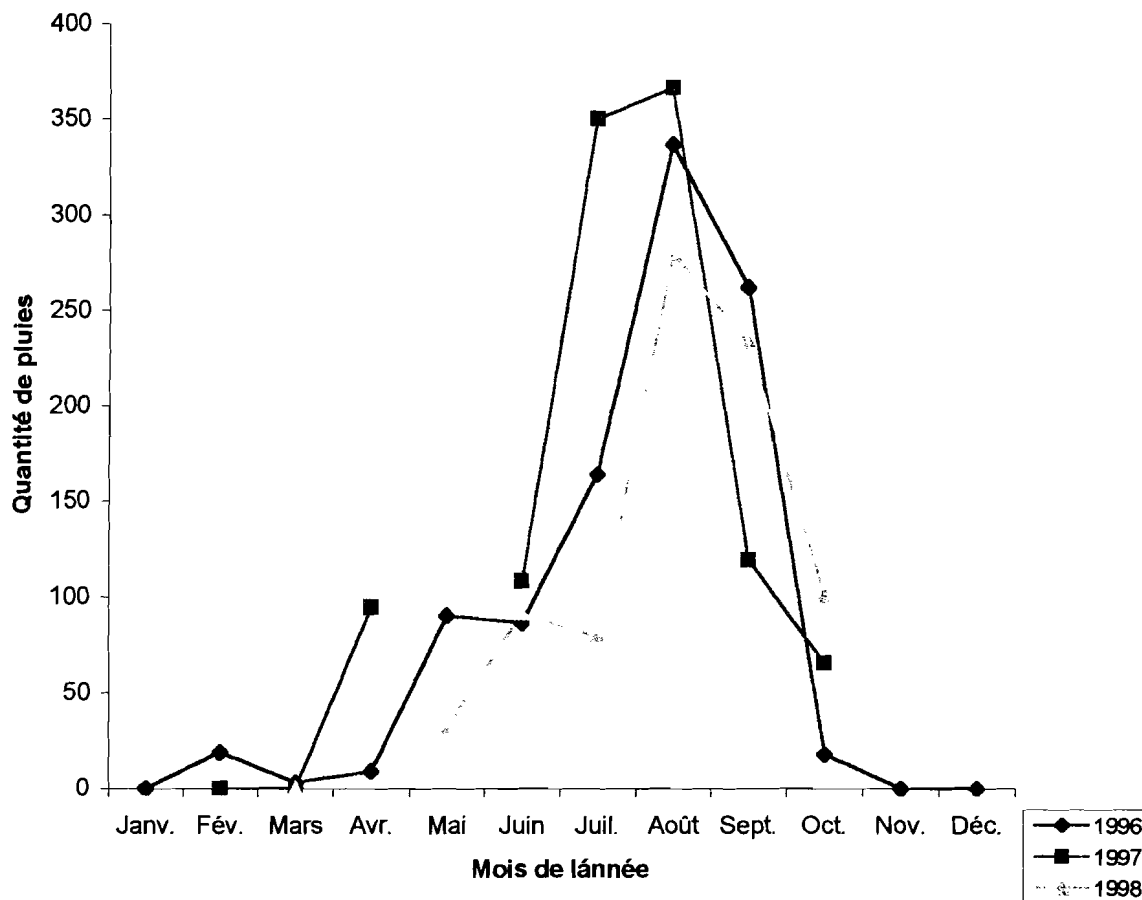
Le village de Bancoumana est une zone bien arrosée (Tableau 4). Les hauteurs de pluies varient de 800 à 1200 mm par an.

Tableau 4: Relevés pluviométriques de la station agro-météorologique du village de Bancoumana de 1996 à 1998.

Pluies Mois	1996		1997		1998	
	Q.P(mm)	Nb.jours	Q.P(mm)	Nb.jours	Q.P(mm)	Nb.j
J	0		-	-	-	-
F	19,0	2	-	-	-	-
M	3	2	-	-	0,2	1
A	9	1	94,7	5	-	-
M	90,4	11	-	-	32,0	7
J	86,6	10	108,4	10	91,9	11
J	164,2	12	350,7	12	79,6	16
A	337,6	15	367,3	19	280,3	23
S	262,4	17	119,7	15	232,7	18
O	17,9	4	65,7	5	101,1	9
N	0	-	-	-	-	-
D	0	-	-	-	-	-
T.A	990,1	74	1106	66	817,8	85

Q.P = quantité de pluie
T.A: Total annuel

Fig 2: Quantité de pluies (mm) mensuelles de 1996 à 1998: Station agro-météorologique de Bancoumana



II Infrastructures socio-sanitaires:

Bancoumana possède un dispensaire qui a été construit en 1958, une maternité en 1963 et, un centre de santé communautaire créé en 1993 grâce à la volonté d'organisation du village et des villages environnants en une association communautaire des ressortissants du village. Ils ont contribué au développement sanitaire du village avec l'assistance de l'Organisation Non Gouvernementale Franco-Malienne "*Santé Sud*".

Le centre est dirigé par un médecin-chef de centre, deux aides-soignants au niveau du dispensaire; la maternité sous la responsabilité du médecin-chef de centre emploie deux mâtresses et abrite un Programme Elargi de Vaccination (P.E.V.). Le centre possède un dépôt de médicaments génériques.

L'école fondamentale créée en 1952 et fréquentée actuellement par environ 700 élèves vient d'être dotée de nouvelles infrastructures grâce à une ONG. Le taux d'alphabétisation des adultes est faible soit < 5%.

III Discussion:

Le village de Bancoumana a été choisi à cause des critères suivants:

Le village situé à environ 60 kms du District de Bamako offrait non seulement un échantillon de près de 2.000 enfants de moins de dix ans, mais également, la communauté était disposée à collaborer dans cette étude de cohorte. L'existence en plus du Centre de Santé Communautaire (C.S.C.O.M.) dirigé par un médecin-chef à compétence paludologique, formé au sein de notre département sous la tutelle de la faculté de Médecine à Bamako.

Nous avons effectué une sensibilisation des familles auprès desquelles l'étude de cohorte avait lieu. Cependant, malgré nos efforts, certaines familles avaient refusé d'y participer. Ce refus s'expliquait d'une part, par un scepticisme voire une absence de confiance dans nos motivations réelles reliées aux prises de sang des sujets, à leur conduite au centre d'infestation expérimentale du paludisme au sein de notre département à la faculté de Médecine localisé à Bamako. D'autre part, il arrivait que les enfants sous protocole d'étude ne correspondaient pas à leur localisation ou attribution filiale naturelle, familiale ou ménagère, mais plutôt à celle d'une structure sociale, lignagère.

Quoique cela ne devrait en principe point poser de difficultés dans une stratification de la famille élargie traditionnelle en milieu rural malien, il est cependant survenu des incidents parce que les éléments de mobilisation sociale sont attribués au chef de lignage, à la famille ou ménage de non parents biologiques de l'enfant sous étude au détriment de ses vrais parents qui se sont ainsi retirés de l'étude. Cet incident, nous a permis de mieux apprécier les mutations ou transformations sociales, culturelles ou idéologiques de la notion de famille ou de filiation des enfants dans la structure familiale.

Fort heureusement, l'association par l'emploi (sous contrat mensuel) de personnel local du village dans la conduite des études, comme des guides locaux a permis d'obtenir une meilleure collaboration de la part des résidents. Les taux de participation ont été en général bons (95 à 98% selon les passages).

La structure de la population du village de Bancoumana est comparable à celle des zones rurales (Atlas Jeune Afrique, le Mali, 1981). Les enfants de moins de dix ans représentent environ 36% de la population.

B: INDICATEURS PALUDOMETRIQUES :

I Indices paludométriques

Evolution des indices paludométriques dans le village de Bancoumana de 1996 à 1998.

Tableau 5: Variations de l'indice plasmodique selon les passages transversaux de 1996 à 1998 à Bancoumana.

Année/Passages	1996		1997		1998	
	IP	n	IP	n	IP	n
Fév.	-	-	-	-	49,35	2185
Mars	-	-	52,43	1829	-	-
Juin	50,47	1692	54,39	1811	34,35	2282
Août	54,73	1807	59,97	1951	41,90	2249
Oct	70,20	1839	65,63	2130	57,60	2361
Déc.	-	-	-	-	38,10	2373
Total	58,7	5338	58,4	7721	44,2	11450

1996 Chi2 = 159,33; P < 10⁻⁶ 1997 Chi2 = 86,67 ; P < 10⁻⁶ 1998 Chi2 = 41,13 ; P, 10⁻⁶

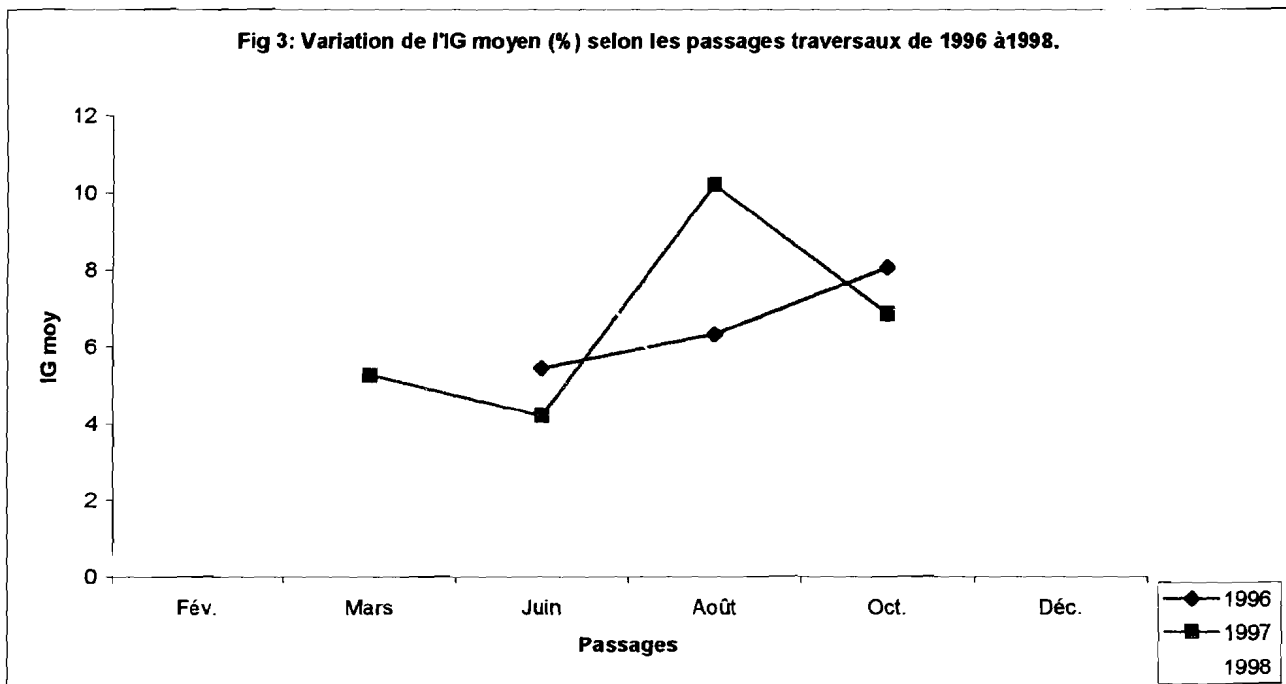
Ce tableau montre que durant les passages transversaux de la période d'étude, les indices plasmodiques les plus élevés (70,20% et 65,63%) sont observés au mois d'octobre, respectivement en 1996 et 1997. Il montre d'autre part que le paludisme a été hyper-endémique durant toute la période de transmission. La différence entre les indices plasmodiques est statistiquement significative durant les 3 années d'étude (P < 10⁻⁶).

Il y eu une réduction significative des indices plasmodiques de 1996 à 1998 par mois et aussi globalement.

Tableau 6: Variations de l'indice gamétocytaire selon les passages transversaux de 1996 à 1998 à Bancoumana.

Année/Passages	1996		1997		1998	
	IG	N	IG	N	IG	N
Fév.	-	-	-	-	9,24	2185
Mars	-	-	5,25	1829	-	-
Juin	5,44	1692	4,20	1811	9,24	2282
Août	6,31	1807	10,20	1951	3,80	2249
Oct	8,05	1839	6,85	2130	6,4	2361
Déc.	-	-	-	-	7,10	2373
Total	6,6	5338	6,7	7721	6,0	11450

1996 1997 1998
 Chi2 = 10,16 ; P = 0,0062 Chi2 = 62,66 ; P < 10⁻⁶ Chi2 = 85,56 ; P < 10⁻⁶



L'indice gamétocytaire le plus élevé (10,20%) est observé en Août 1997, le plus faible (3,80%) est obtenu en Août 1998. Au cours de la même année d'étude la différence entre les IG est statistiquement significative P < 10⁻⁶. Cette différence est significative entre les 3 années d'étude (P < 10⁻⁶).

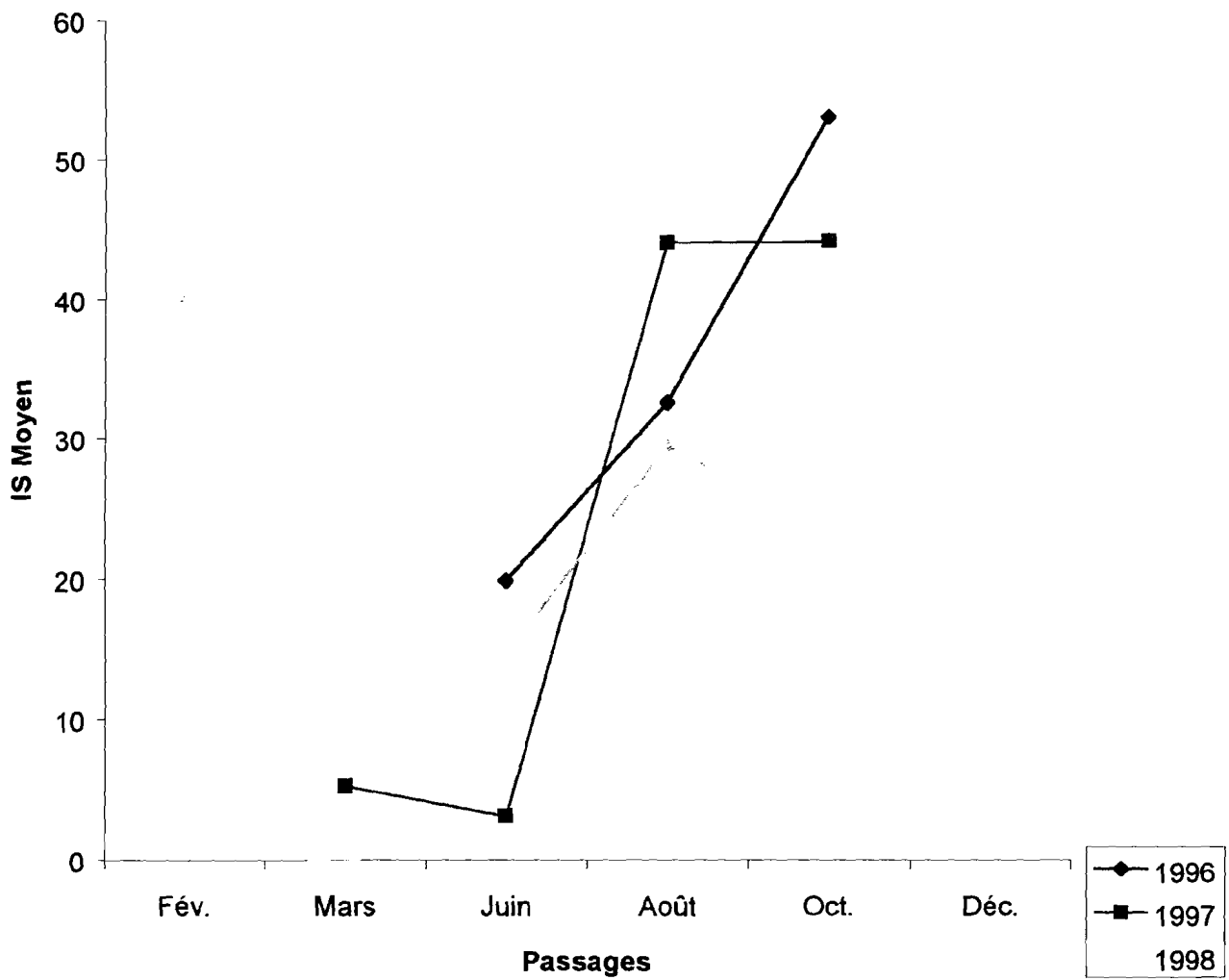
L'indice gamétocytaire moyen n'a pas varié de façon significative de 1996 à 1998

Tableau 7: Variations de l'indice splénique selon les passages transversaux de 1996 à 1998 à Bancoumana.

Année/Passages	1996		1997		1998	
	IS	N	IS	N	IS	N
Fév.	-	-	-	-	40,0	2185
Mars	-	-	5,25	1829	-	-
Juin	19,91	1692	3,14	1811	14,80	2282
Août	32,59	1807	44,07	1951	29,50	2249
Oct	53,01	1839	44,13	2130	23,70	2361
Déc.	-	-	-	-	24,40	2373
Total	35,6	5338	32,1	7721	27,0	11450

Nous avons travaillé sur un échantillon de 2150 enfants en 1996, 1950 en 1997 et 2350 en 1998. La Figure 5 présente l'évolution des différents indices paludométriques observés de 1996 à 1998. L'indice plasmodique (IP) était significativement plus élevé en octobre ($P < 10^{-6}$). Il a baissé progressivement entre 96 et 98 et variait de 70,2% en octobre 96 à 34,3% en juin 98 (tableau 5). L'indice splénique (IS) était également plus élevé (Fig 4) en octobre 1996 (53,0%), 1997 (44,1%). En 1998 l'indice splénique était plus élevé en février (40%) ($P < 10^{-6}$). Les indices gamétocytiques (IG) étaient comparables (Fig 3) d'une année à l'autre. Ces IG variaient de façon significative selon les passages transversaux d'une même année ($P < 10^{-6}$).

Fig 4: Variation des IS selon les passages transversaux de 1996 à 1998.



II Morbidité et mortalité palustres :

1- Accès palustre simple:

Tableau 8: Répartition du taux d'incidence annuel des cas de paludisme par tranches d'âge dans le village de Bancoumana de 1996 à 1998.

Années Age/Paludisme	1996			1997			1998		
	Cas	n	%	Cas	n	%	Cas	n	%
< 1an	78	95	82,1	108	164	66	54	106	5,07
1-2 ans	355	376	94,4	393	538	70	323	211	30,3
3-4 ans	385	391	98,5	386	454	85	443	175	41,6
> 5 ans	496	999	49,6	541	1187	46	244	172	22,9
Total	1335	1840		1641	2130		1064	664	

1996

1997

1998

Chi2 = 531,3 ; P < 10⁻⁸

Chi2 = 221,4 ; P < 10⁻⁶

Chi2 = 319,2 ; P < 10⁻⁶

L'analyse de ce tableau montre que les enfants d'âge compris entre 1 et 4 ans étaient les plus touchés par le paludisme en 1996 et 1997.

Au cours d'une même année, la différence entre les tranches d'âge du taux d'incidence est statistiquement significative (P < 10⁻⁶).

2- Accès palustres graves et compliqués

Tableau 9: Répartition du taux de paludisme grave par tranches d'âge dans le village de Bancoumana de 1996 à 1998.

Années	1996			1997			1998		
	Cas	n	%	Cas	n	%	Cas	n	%
Age/Paludisme Grave									
< 1 ans	26	95	27,4	24	164	14,6	14	160	7,7
1-2 ans	157	355	44,2	164	393	41,7	74	534	40,6
3-4 ans	141	391	36,1	119	386	30,8	73	618	40,1
> 5 ans	116	999	11,6	95	1187	8,0	21	416	11,5
Total	440	1840		402	2130		182	1728	

1996
Chi2 = 195,9 ; P < 10⁻⁸

1997
Chi2 = 263,6; P < 10⁻⁶

1998
Chi2 = 14,17 ; P < 10⁻⁶

Ce tableau montre que les enfants agés de 1 à 2 ans ont fait plus d'accès grave que les autres enfants des autres tranches d'âge pendant les trois années d'étude. La différence est statistiquement significative (P < 10⁻⁶).

3- Taux de Mortalité/ paludisme.

Tableau 10: Taux de mortalité de 1996 à 1998 dans la population d'enfants du village de Bancoumana.

Année	1996	1997	1998
Decès	24	14	3
Nombre d'enfants	2200	2591	2264
Mortalité	1,09%	0,54%	0,13%

Ce tableau montre un enrégistrement de 24 decès soit 1,1% en 1996 qui se trouve être le taux le plus élevé durant la période d'étude. Le taux le plus faible 0,13% est constaté en 1998. En 1997, 14 cas de decès ont été enrégistrés

Tableau 11: Taux de mortalité de 1996 à 1998 dans la population d'enfants du village de Bancoumana.

Année	1996	1997	1998
Decès	3	6	9
Nombre d'enfants	1335	1641	1064
Léthalité	0,22%	0,37%	0,84%

Le taux de léthalité le plus élevé est constaté en 1998, 9 cas soit 0,84% (9/1064). Le plus faible taux est enregistré en 1996 (0,22%), 3 cas parmi 1335 malades.

4- Niveau de résistance de *P. falciparum* à la chloroquine:

Tableau 12: Proportion annuelle des cas de résistance parasitologique observés par tranche d'âge dans la population d'étude de Bancoumana.

Années/ Age	1996			1997			1998		
	Se	R	%R	Se	R	%R	Se	R	%R
>1 an	14	6	30	20	5	20	11	1	8,3
1-2 ans	104	48	31,6	125	50	28,5	71	7	14,4
3-4 ans	158	36	18,6	159	40	20,1	17	3	15
>5ans	245	35	13,2	197	42	17,6	115	3	0,8
Total	521	125	19,3	502	137	21,5	394	18	4,3

1996 1997 1998
 [$X^2 = 15,06$; $P = 0,001$] [$X^2 = 7,64$; $P = 0,051$] [$X^2 = 9,62$; $P = 0,022$]
 (entre les 3 années) ; $X^2 = 2,49$; $P = 0,287$

Nous retenons de ce tableau que la résistance parasitologique a touché avec une plus grande fréquence les enfants de 1-2 ans en 1996 et 1997 respectivement 31,6% et 28,5%. Par contre cette résistance parasitologiques est plus marquée chez les enfants d'âge compris entre 3-4 ans en 1998 (15%).

Tableau 11: Taux de mortalité de 1996 à 1998 dans la population d'enfants du village de Bancoumana.

Année	1996	1997	1998
Decès	3	6	9
Nombre d'enfants	1335	1641	1064
Léthalité	0,22%	0,37%	0,84%

Le taux de léthalité le plus élevé est constaté en 1998, 9 cas soit 0,84% (9/1064). Le plus faible taux est enregistré en 1996 (0,22%), 3 cas parmi 1335 malades.

4- Niveau de résistance de *P. falciparum* à la chloroquine:

Tableau 12: Proportion annuelle des cas de résistance parasitologique observés par tranche d'âge dans la population d'étude de Bancoumana.

Années/ Age	1996			1997			1998		
	Se	R	%R	Se	R	%R	Se	R	%R
>1 an	14	6	30	20	5	20	11	1	8,3
1-2 ans	104	48	31,6	125	50	28,5	71	7	14,4
3-4 ans	158	36	18,6	159	40	20,1	17	3	15
>5ans	245	35	13,2	197	42	17,6	115	3	0,8
Total	521	125	19,3	502	137	21,5	394	18	4,3

$$\begin{array}{ccc}
 1996 & 1997 & 1998 \\
 [X^2 = 15,06 ; P= 0,001] & [X^2 = 7,64 ; P= 0,051] & [X^2 = 9,62 ; P= 0,022] \\
 \text{(entre les 3 années) ; } X^2 = 2,49 ; P= 0,287
 \end{array}$$

Nous retenons de ce tableau que la résistance parasitologique a touché avec une plus grande fréquence les enfants de 1-2 ans en 1996 et 1997 respectivement 31,6% et 28,5%. Par contre cette résistance parasitologiques est plus marquée chez les enfants d'âge compris entre 3-4 ans en 1998 (15%).

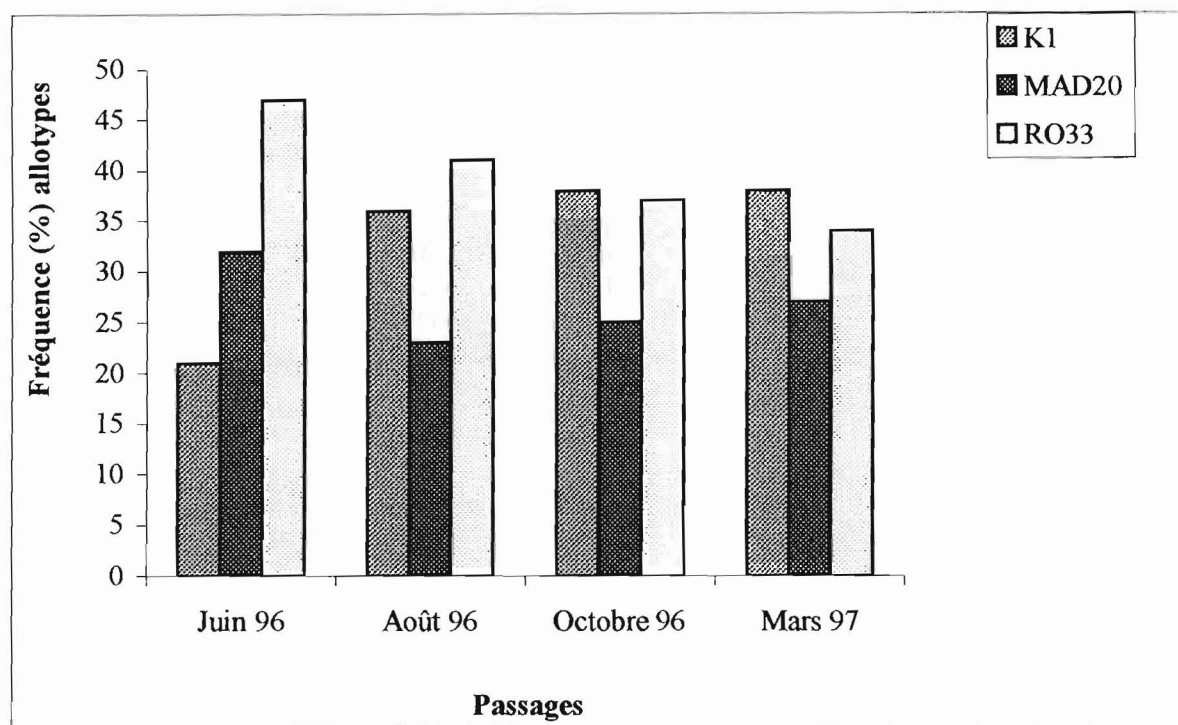
5- Répartition des allotypes de la MSP-1 à Bancoumana de 1996 à 1997.

Tableau 13: Répartition des allotypes rencontrés en fonction des passages transversaux à Bancoumana.

Allotypes Passages	K1	%	MAD20	%	RO33	%	Total
Juin 96	97	21	148	32,1	216	46,9	461
Août 96	183	36	118	23,2	208	40,9	509
Octobre 96	163	37,7	107	24,8	162	37,5	432
Mars 97	218	38,5	156	27,5	193	34	567
Total	661		529		779		1969

Ce tableau montre qu'il existe une augmentation significative de la fréquence de l'allotype K1 de juin (21%) à mars (38,5%) ($P < 0,05$). A l'inverse il y a une diminution progressive de la fréquence de l'allotype RO33 de juin (46,9%) à mars (34%). Cette diminution est significative ($P = 0,0003$). L'allotype MAD20 varie significativement ($P = 0,01$) avec une fréquence de 32,1% en juin et 23,2% en Août.

Figure 6: Fréquence des allotypes rencontrés en fonction des passages transversaux à Bancoumana .



6- Rélation entre allotypes de la MSP-1 et morbidité palustre:

Tableau 14: Répartition des allotypes en fonction de l'accès palustre dans la population d'enfants de Bancoumana.

Allotype	K1	MAD20	RO33	Total
Paludisme +	12	0	6	18
Paludisme -	182	105	261	549
Fréquence (%)	6,2	0	2,2	3,2
Total	194	105	267	566

P = 0,007

L'accès palustre simple était plus fréquent chez les sujets porteurs de K1 (6,2%). Il était de 2,2% chez les sujets porteurs de l'allotype RO33. Aucun cas d'accès palustres n'a été trouvé chez les sujets porteurs de l'allotype MAD20. Cette variation de la fréquence des accès palustres en fonction des allotypes est statistiquement significative; $P = 0,007$.

Tableau 15: Répartition des allotypes en fonction des cas d'anémie dans la population d'étude du village de Bancoumana.

Allotypes/ Anémie	K1	MAD20	RO33	Total
Anémie (+)	5	7	16	28
Anémie (-)	62	43	117	222
Fréquence (%)	7,5	14,0	12,0	11,2
Total	67	50	133	250

$P = 0,02$

L'analyse de ce tableau montre que l'anémie est plus marquée chez les sujets porteurs de l'allotype MAD20 (14,0%). Elle est moins accentuée chez les sujets porteurs de l'allotype K1 (7,5%).

Tableau 16: Répartition des associations d'allotypes en fonction des cas de fièvre dans la population d'enfants de Bancoumana.

Allotypes Fièvre	K1-MAD20	K1-RO33	MAD20-RO33	Total
Fièvre +	5	11	20	36
Fièvre -	100	182	130	412
%	4,8	5,7	13,3	8,0
Total	105	193	150	448

L'analyse du tableau montre une variation significative de la fréquence des accès fébriles en fonction des associations d'allotypes. La fréquence de fièvre la plus élevée était rencontrée chez les sujets porteurs de l'association MAD20-RO33 (13,3%).

Tableau 17: Répartition des allotypes en fonction des classes de parasitémie dans la population d'enfants à Bancoumana.

Allotypes/ Parasitémie	K1		MAD20		RO3		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
75-1000	63	25,5	47	19,0	137	55,5	27	43,6
1001-10000	83	40,1	35	16,9	89	43,0	207	36,6
>10000	8	42,9	23	20,5	41	36,6	112	19,8
Total	94	34,3	105	18,6	26	47,2	566	100

K1

MAD20

RO33

$X^2 = 3,36$; $P = 0,186$

$X^2 = 0,19$; $P = 0,909$

$X^2 = 6,20$; $P = 0,045$

Ce tableau montre que la répartition des allotypes en fonction de la parasitémie varie significativement ($P = 0,001$). L'analyse par classe de parasitémie montre une variation significative des allotypes dans les classes de 75 à 1000 et de 1001 à 10000 (respectivement $P < 10^{-5}$ et $P = 0,02$). Dans chacune des classes de parasitémie l'allotype RO33 est le plus fréquent avec 55,5% dans la classe de 75-1000 et 43% dans la classe de 1001-10000 parasites/ μ l de sang. Dans la classe de parasitémie supérieure à 10000, la fréquence des allotypes ne varie pas significativement ($P = 0,9$).

III DISCUSSION:

Pour décrire l'épidémiologie palustre associée à la dynamique et au polymorphisme allotypique de *Plasmodium falciparum*, nous avons adopté deux types d'enquêtes: les passages transversaux et le suivi longitudinal. Les paramètres parasitologiques ont été évalués dans la population des enfants âgés de 6 mois à 9 ans à cause de leur grande vulnérabilité à l'infection palustre à Bancoumana (Dolo et al., 1996).

Les indices plasmodiques enregistrés au cours des trois années d'étude étaient significativement plus élevés en octobre qu'au cours des autres mois avec 70,2% en 1996, 65,6% en 1997 et 57,6% en 1998 ($P < 10^{-6}$). L'augmentation de l'IP au mois d'octobre pourrait être liée à une augmentation du taux d'inoculation entomologique qui est 8 à 10 fois supérieur à celui des autres mois: 2,3 piqûres infectantes par personne/nuit en octobre contre 0,4 par personne/nuit en août (Bagayogko 1998). L'allongement de l'espérance de vie des moustiques (température et pluviométrie convenables) entraîne une

augmentation de leur parité par un complet déroulement du cycle intrinsèque de *P. falciparum*. Mais la diminution progressive de l'indice entre 1996 et 1998 serait liée à la présence permanente d'une équipe médicale sur le terrain qui interviendrait à chaque fois qu'un cas de palusime maladie se présentait. Le maintien de l'indice à un taux supérieur à 50% au cours de la période d'étude signe un mode hyperendémique de transmission du paludisme à Bancoumana.

L'indice splénique était aussi plus élevé en octobre 1996 (53%); 1997 (44,1%) et en février 98 (40%) ($P < 10^{-6}$). D'une manière générale, les indices spléniques et plasmodiques varient dans le même sens dans toutes les zones d'endémie palustre. L'évolution des indices gamétozytiques a montré qu'il y'a une variation significative de ce paramètre au cours des différents passages ($P < 10^{-6}$). Les indices les plus élevés ont été observés en octobre 1996 (8,0%), en août 1997 (10,2%) et en février 1998 (9,2%). L'augmentation des différents indices paludométriques (IP, IS, IG) entre le début et la fin de la saison de transmission a été retrouvée par d'autres auteurs au Mali (Fondjo et al., 1996).

Nous avons utilisé le test *in vivo* standard de l'OMS (14 jours) pour évaluer la résistance parasitologique de *P. falciparum*. La résistance parasitologique à la chloroquine était de 19,3% en 1996 contre 21,5% en 1997 et 4,3% en 1998. Les taux de résistance les plus élevés ont été observés chez les enfants âgés de 1-2 ans avec 30% en 96 et 28% en 97. Mais en 98, le taux le plus important a été enregistré chez les enfants de 3-4 ans avec 15%. Chez les enfants de moins d'un an, elle était passée de 30% à 8% entre 96 et 98. Par rapport à la période de l'année, les plus fortes proportions étaient associées à la fin de la saison des pluies (septembre-octobre, 26,1%), et les plus faibles à la saison sèche froide (novembre, 15,6%). Au Sénégal, une relation étroite a été observée entre la densité des gamétozytes et la fréquence de la chloroquino-résistance (Robert et al., 1996). Mais les études antérieures réalisées dans ce village n'ont pas mis en évidence une telle relation (Dolo, 1996). Dans une étude *in vivo* de 7 jours portant sur des enfants libériens réfugiés de 1-15 ans vivant dans la région de Tabou en Côte d'Ivoire, la proportion de chloroquino-résistance était de 45,1% dont 34,3% de RII et 10,8% de RIII (Villadary et al., 1997). Le suivi de différents clones de *P. falciparum* après traitement à la chloroquine a montré que les souches persistaient à J14 sans une grande variabilité entre elles: 12 souches de k1, 7 de MAD20 et 11 de RO33. La clonalité ne serait donc pas déterminante dans la résistance des parasites à la chloroquine. La description du gène *Pfmdr1* codant pour une protéine intervenant dans l'efflux de la chloroquine de la vacuole parasitaire chez certaines souches résistantes avait suggéré l'idée de son association à la résistance à ce médicament. Toutefois, ce gène n'a pas été mis en évidence dans toutes les souches résistantes. Par contre, le gène déterminant la chloroquino-résistance a été identifié sur le chromosome 7 de PM... (Fidock et al., 2000). Il code pour la protéine de la vacuole parasitophore avec les domaines transmembranaires. Il a été nommé *Pfcr1* (*Plasmodium falciparum* chloroquine resistant transportor) et est fortement corrélé à la résistance *in vivo* (Djimé et al., 2001). Au cours de notre étude, nous avons observé de nouvelles souches à J14 différentes de celles décrites à J0. L'apparition de ces nouvelles souches s'expliquerait par une réinfestation ou à la non amplification de ces souches à J0 si elles étaient à un faible taux non détectable par la technique utilisée. Par ailleurs, les souches

non détectées à J14 auraient subi une modification génique à l'origine de séquences non amplifiables par les amorces usuelles.

La fréquence de l'anémie était plus élevée chez les enfants en octobre (20,2%) et était en outre associée à un taux élevé de souche MAD20 comme cela avait été observé au Sénégal (Robert et *al.*, 1996.). L'association anémie-MAD20 serait liée au maintien d'un taux élevé de l'allotype pendant la saison sèche lui permettant de s'adapter au système immunitaire de l'homme et d'induire la symptomatologie observée en fin de saison de transmission. A l'opposé de l'idée qu'il n'existerait pas de souches virulentes individuelles (Robert et *al.*, 1996), nous avons observé une forte association de l'allotype K1 à l'accès palustre à cause probablement de l'augmentation significative de la fréquence de K1 de juin à octobre. L'allotype K1 augmente avec la parasitémie. Et si la parasitémie est utilisée comme critère de diagnostique on peut expliquer la liaison entre K1 et la paludisme.

La distribution des clones en fonction des classes de parasitémie indique que les souches monoclonales étaient d'autant plus fréquentes que la parasitémie était élevée. La forte pression immunitaire de l'hôte éliminerait les souches sensibles tout en favorisant l'émergence et la multiplication des souches résistantes (Conway, 1992). L'allotype RO33 était plus fréquent dans les classes de parasitémie de 75-1000 et 1001-10000 parasites par mm³ de sang.

Nous avons enregistré en 1997, 14 cas de décès dans la population générale des enfants soit 0,54% (14/2591). Ce taux était plus élevé en 1996 (1,1%) et plus faible (0,13%) en 1998.

Par ailleurs nous avons noté 0,84% (9/1064) de décès en 1998 qui se trouve être le plus élevé pendant la période d'étude. Le plus faible taux est enregistré en 1996, 3 cas soit 0,22% (3/1335).

IV CONCLUSION:

Ces études permettront d'une part, de mieux apprécier les facteurs et motivations sociaux, culturels ou environnementaux qui sous-tendent la mobilité sociale des résidents du village et en particuliers celle de nos sujets de l'échantillon. D'autre part, la maîtrise de tels phénomènes à l'échelle régionale permettra d'initier une grande mobilisation ou implication effective de toutes les communautés sociales de la commune rurale de Bancoumana autour des activités de leur Centre de Santé Communautaire.

Notre étude nous permet de dire que les trois allotypes décrits par TANABE et *al.* existent au Mali. La recherche de la relation entre la clonalité et les parasitémie nous a permis de constater que plus la parasitémie augmente, plus on observe une monospécificité chez le patient. En ce qui concerne la relation entre la clonalité et les paramètres cliniques, nous avons constaté une relation entre l'anémie et l'allotype RO33, l'accès palustre et l'allotype K1. Nous n'avons pas établi de corrélation entre la résistance clinique *in vivo* à la chloroquine et la clonalité.

Bancoumana représenterait ainsi, assurément, un excellent site d'essai vaccinal contre le paludisme. En cela, l'installation de praticiens-chercheurs de notre département de 1992 constitue un capital d'investissement qu'il faut amener à un véritable contrat social de développement humain durable des communautés de cette région.

REFERENCES:

- 1- Atlas-Jeune Afrique; le Mali. (1981).
- 2- Dolo A. (1996): Reponse immunitaire anti-TRAP (Thrombospondin Related Adhesive Protein) et la morbidité palustre dans une zone d'hyperendémie palustre au Mali (Afrique de l'Ouest). *Thèse de Recherche en Santé Publique, Université de ROME "LA SAPIENZA"*
- 3- Touré A (1990): Evaluation de l'impact des rideaux imprégnés de perméthrine sur la transmission du paludisme en zone d'endémie soudanienne du Mali. *Thèse. Med. Bamako-ENMP; N°: 34.*
- 4- Traoré S. (1995): Epidémiologie du paludisme en zone de savane sud soudanienne au Mali: le village de Pimpéréna dans la région de Sikasso de Juin 1992 à Septembre 1993. *Thèse. Med. Bamako-ENMP; N°:16.*
- 5- Adagu I. S., Warhurst D. C., Ogala W. N., Aguye I., Audu L., Bamgbola F. O., Ovwigho U. B. (1995): Antimalaria drug resistant of *Plasmodium falciparum* from Zaire, Nigéria. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 89(4):422-5.
- 6- Al-Yaman. F., Genton B., Reeder J., Anders R., Smith T. and Alpers M. P; (1997): Reduced risk of clinical malaria in a highly endemic area in children infected with multiple clones of *Plasmodium falciparum*: a prospective community study. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg;* 91: 602-605.
- 7- Allison J. L., O'Brien R.L., Hahn F.E. (1965): DNA: Reaction with chloroquine., *Science.* 149: 1111-1113.
- 8- Babiker H. A., Creasey A. M., Bayoumi R. A.L., Walliker . D., Arnot D. (1991): Genetic diversity of *P. falciparum* in a village in eastern Sudan: drug resistance, molecular karyotypes and the *mdr1* genotype of recent isolates. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg;* 85: 578-583.
- 9- Beck H. P., Felger I., Vounatsou P., Hirt R., Tanner M., Alonso P. and Menendez C. (1997): Effect of iron supplementation and malaria prophylaxis in infants on *Plasmodium falciparum* genotypes and multiplicity of infection. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med Hyg.* 93 (Suppl 1), S1/41- S1/45.
- 10- Conway D. J., B. M Greenwood., J. S McBride. (1991): The epidemiologie of multiple clone *Plasmodium falciparum* in Gambian patients. *Parasitology;* 103: 1-6.

- 11- Conway D. J., Rosario V. Oduola A.M.J., Salako L. A., Greenwood B.M., McBride J.S, (1992): *P. falciparum* intragenic recombination and non random association between polymorphic domains of the precursor of the major merozoite surface antigens. *Ev. Parasitology*; 73: 468-480.
- 12- Färnert A., Snounou G., Rooth I. And Björkman A. (1997): Daily dynamics of *Plasmodium falciparum* subpopulation in asymptomatic children in a holoendemic area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56: 538-547.
- 13- Hugues Contamin., Thierry Fandeur., Serge Bonnefoy., Fériel Skouri., Francine Ntoumi and Odile Mercereau-Pujalon (1995): PCR Typing of field Isolates of *Plasmodium falciparum*. *J. Clin. Microbiol.*, April; p.944-951.
- 14- Kun J. F. F., Schmidt-Ott R. J., Lehman L. G., Lell B., Lukner D., Greve B., Matousek P and Kremsner P. G. (1998): Merozoite Surface Antigen 1 and 2 genotypes and resetting of *Plasmodium falciparum* in severe and mild malaria in Lambaréné, Gabon. *Transaction of the royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 92:110-114.
- 15- Ntoumi F., Contamin H., Rogier C., Bonnefoy S., Trape J. F and Marcereau-Pujalon O; (1995): Age dependent carriage of multiple *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 alleles in asymptomatic malaria infections. *Am. J. Trop. Med Hyg.* 52: 81-88.
- 16- OMS (1992): Grandes lignes du plan d'action de l'OMS pour la lutte contre le paludisme 1993-2000., *Conférence. Ministerielle. Sur le paludisme, Amsterdam, Oct. 1992.*
- 17- OMS (1996): Evaluation de l'efficacité thérapeutique des antipaludiques par le traitement de *Plasmodium falciparum* non compliqué dans les régions de transmission élevée., MAP/96-1077.
- 18- Paul R. E. L., Paker M. L., Walmsley M., Lagog M., Ranford-Cartwright L. C., Paru R. and Day K. (1995): Mating patterns in malaria parasites populations of Papua New Guinea. *Science.* 269: 1709- 1711.
- 19- Robert F., F. Ntoumi., G. Angel., D. Candito., C. Rogier., T. Fandeur., J. L. Sarthou., O. Marcereau Pujalon. (1996): Extensive genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates collected from patients with severe malaria in Dakar, Senegal. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med, Hyg*; 90: 709-711.
- 20- Tanner M., Beck H. P., Felger I and Amith T. (1999): The epidemiology of multiple *Plasmodium falciparum* infections ; General Introduction. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 93 (Suppl.1), S1/1-S1/2.
- 21-Villadary I., Paquet C., Hemelsdaed E., Blanchard G., Sakiz M. (1997): Chimiosensibilité *in vivo* de *Plasmodium falciparum* dans la région de Tabou en Côte d'Ivoire. *Bull. Soc. Pathol.* 90 (1): 10-3.

C: INFESTATION EXPERIMENTALE:

I Variations saisonnières de l'infectivité des porteurs de gamétocytes chez *Anopheles gambiae* en zone de transmission palustre intense de Bancoumana (Mali).

Au total 4825 enfants ont été ponctionnés au bout du doigt parmi lesquels 949 ont été sélectionnés en 1996 (19,7%). 1702 (35,3%) en 1997 et 2174 (45,0%) en 1998. Nous avons identifié 485 porteurs de gamétocytes dont 372 volontaires âgés de 4-18 ans ont servi à gorger les moustiques par la technique de l'infection directe.

1- Prévalence des indices plasmodiques et gamétocytiques au cours du « screening bimensuel » :

Les taux de prévalence de l'indice plasmodique étaient de 58,80%, 34,90% et 39,34% respectivement en 1996, 1997 et 1998 (Tableau 18). Il existe une différence significative entre les indices plasmodiques observés en fonction des années ($X^2 = 140,10$; ddl = 2 ; $p < 10^{-6}$). Les indices les plus élevés ont été observés en 1996, mais ces derniers étaient comparables entre les deux classes d'âge ($X^2 = 1,01$; ddl = 1 ; $p = 0,31$). En 1997 et 1998, nous avons observé une différence significative entre les différents mois (IP₁₉₉₇, $X^2 = 37,02$; $P = 0,00001$) (IP₁₉₉₈, $X^2 = 23,03$; $P = 0,0003$) et entre les deux classes d'âge (IP₁₉₉₇, $X^2 = 10,20$; ddl = 1; $p = 0,004$) (IP₁₉₉₈, $X^2 = 3,98$; ddl = 1; $p = 0,04$). Les enfants âgés de 4-9 ans (38,6% et 37,7% respectivement en 1997 et 1998) étaient plus touchés que les adolescents de 10-18 ans (29% et 32,6% respectivement en 1997 et 1998).

Les taux moyens de l'indice gamétocytique étaient de 15,40%, 12,86% et 9,60% respectivement en 1996, 1997 et 1998 (Tableau 19). Il existe une différence significative entre les indices gamétocytiques en fonction des années ($X^2 = 21,93$; $P = 0,00001$). Les indices les plus élevés ont été observés en 1996. Au cours de la même période, l'indice gamétocytique était comparable entre les classes d'âge ($p = 0,12$). Mais en 1997 et 1998, nous avons observé une différence significative entre les deux (4-9 ans et 10-18 ans) classes d'âge (IG₁₉₉₇, $X^2 = 23,70$; ddl = 1; $p = 10^{-6}$) (IG₁₉₉₈, $X^2 = 6,38$; ddl = 1; $p = 0,01$). L'indice gamétocytique des enfants âgés de 4-9 ans (16,6% en 1997) et (37,7% en 1998) était supérieur à celui des adolescents de 10-18 ans (8,4% en 1997 et 32,6% en 1998).

2- Infectivité des porteurs de gamétocytes selon l'âge et les saisons :

L'infectivité des porteurs de gamétocytes chez *Anopheles gambiae* s.l est présentée sur le Tableau 20. Les taux d'infection des moustiques en oocystes dans les deux classes d'âge 4-9 ans et 10-18 ans étaient respectivement de 64,5% et 52,3% en 1997, 70,9% et 59,3% en 1998. Il était comparable entre les classes d'âge. Les charges oocystiques moyennes (moyenne géométrique) des moustiques infectés étaient aussi comparables entre les classes d'âge en 1997 ($P = 0,05$) et en 1998 ($P = 0,07$).

En 1997, le taux de prévalence globale en oocystes était de 62%, 62,2% et 61,2% respectivement en saison chaude, froide et pluvieuse (Tableau 21). Il était comparable d'une saison à l'autre. Mais pendant la saison des pluies, les enfants de 4-9 ans avaient

infecté plus de moustiques (68,4%) que les adolescents de 10-18 ans (43,5%) ($X^2 = 4,30$; ddl = 2 ; $P = 0,0,03$) ; (OR = 0,36 ; IC = 0,11-1,08).

En 1998, le taux de portage global en oocystes était de 52,5%, 58,2% et 79,1% respectivement pendant la saison chaude, froide et pluvieuse. Il existe une différence statistiquement significative entre l'infectivité des porteurs de gamétocytes en fonction des saisons ($X^2 = 7,44$; ddl = 2 ; $P = 0,0063$) ; (OR = 2,53 ; IC = 1,21-5,29). La proportion de moustiques infectés était plus élevée dans les 4-9 ans et 10-18 ans pendant la saison des pluies qu'au cours des autres saisons.

Tableau 18 : Variations des indices plasmodiques durant les mois d'étude de l'infection expérimentale à Bancoumana de 1996 à 1998.

Mois/An.	1996		1997		1998	
	N	IP	N	IP	N	IP
J	-	-	158	44,55	232	41,37
F	-	-	119	22,68	125	57,60
M	-	-	159	44,65	86	36,04
A	-	-	216	34,25	176	38,06
M	-	-	75	27,33	224	31,25
J	-	-	166	37,95	214	35,51
J	-	-	70	30,00	102	54,90
A	280	56,42	204	22,54	199	36,18
S	170	58,42	70	22,85	227	45,81
O	107	47,66	156	39,74	232	33,18
N	117	57,26	91	41,75	105	40,00
D	231	64,93	209	37,79	139	37,41
Total	857	58,80	1693	34,90	2061	39,34

1996

1997

1998

[$X^2 = 9,58$; $P = 0,048$]

[$X^2 = 37,02$; $P = 0,00001$] [$X^2 = 23,03$; $P = 0,0003$]

[$X^2 = 140,10$; $P < 10^{-6}$]

Les indices plasmodiques les plus élevés sont (64,93%, 44,65% et 57,60%) observés respectivement en décembre 1996, en mars 1997 et en février 1998. La différence entre les indices plasmodiques est statistiquement significative au cours des 3 années d'étude ($P < 10^{-6}$).

Au cours d'une même année d'étude nous avons observé également une différence statistiquement significative entre les IP ($P < 10^{-6}$).

Tableau 19: Variations des indices gamétoctiques durant les mois d'étude de l'infection expérimentale à Bancoumana de 1996 à 1998.

Mois/An.	1996		1997		1998	
	N	IG	N	IG	N	IG
J	-	-	158	16,45	232	12,06
F	-	-	119	10,08	125	14,40
M	-	-	159	13,83	86	10,46
A	-	-	216	15,04	176	8,52
M	-	-	75	14,66	224	6,69
J	-	-	166	9,03	214	10,74
J	-	-	70	14,28	102	6,70
A	280	14,64	204	10,24	199	7,03
S	170	17,41	70	10,00	227	10,13
O	107	17,64	156	17,94	232	6,46
N	117	19,65	91	8,79	105	14,30
D	231	12,12	209	12,91	139	11,51
Total	857	15,40	1693	12,86	2061	9,60

1996

1997

1998

[X² = 4,30 ; P = 0,366]

[X² = 7,52 ; P = 0,481]

[X² = 5,320 ; P = 0,377]

[X² = 21,93 ; P = 0,00001]

Ce tableau montre les indices gamétoctiques les plus élevés respectivement en novembre 1996 (19,65%), en octobre 1997 (17,94%) et en février 1998 (14,40%). Au cours d'une même année, nous n'avons pas observé de différence significative entre les IG. Par contre il y a une différence statistiquement significative entre les IG d'une année d'étude à l'autre (P = 0,00001).

Tableau 20: Infectivité des porteurs de gamétocytes en fonction de l'âge des enfants de Bancoumana.

Années	Age (années)	%M. gorgés / M.expo	% M.infectés/ M.gorgés	Moy.géom oocystes	
1997	4-9	75,6% (90/119)	55,5 (50/90)	2,04	P = 0,9
	10-18	100% (38/38)	55,2 (21/38)	1,70	
	Total	81,5% (128/157)	55,4 (71/128)	1,96	
1998	4-9	78,4% (91/116)	41,7(37/91)	2,20	P = 0,1
	10-18	75,5% (37/49)	64,8 (24/37)	1,91	
	Total	77,5% (128/165)	47,6 (61/128)	2,11	

$$X^2 = 4,80 ; P = 0,308$$

%M.gorgés/M.expo = %Moustiques gorgés/ Moustiques exposés

%M. infectés/M.gorge/s = %Moustiques infectés/Moustiques gorges

L'analyse de ce tableau montre qu' en 1997 , le pourcentage de moustiques infectés est comparable entre les deux tranches d'âge respectivement 4-9 ans = 55,5% et 10-18 ans = 55,2%. Par contre en 1998, nous constatons que la tranche d'âge de 10-18 ans a infecté plus de moustiques (64,8%) que la tranche d'âge de 4-9 ans (41,7%).

Par ailleurs la différence de pourcentage de moustiques infectés entre les deux années n'est pas statistiquement significative (P = 0,308).

Tableau 21: Infectivité des porteurs de gamétoocytes en fonction des périodes de l'année au cours de l'infection expérimentale à Bancoumana.

Année	Age (année)	%Moustiques infectés/Périodes (% infection)			
		Chaude	Froide	Pluies	
1997	4-9	62,1(23/37)	62,5 (30/48)	68,4 (38/57)	P = 0,5
	10-18	61,5 (8/13)	62,5 (5/8)	43,5 (10/23)	
	Total	62,0 (31/50)	62,5 (35/56)	61,2 (48/80)	
1998	4-9	56 (14/25)	63,4 (26/41)	81,9 (50/61)	P = 0,3
	10-18	46,7 (7/15)	42,8 (6/14)	73,3 (22/30)	
	Total	52,5 (21/40)	58,2 (32/55)	79,1 (72/91)	

$$X^2 = 7,44 ; P = 0,0063 \text{ (OR} = 2,53 ; \text{IC} = 1,21\text{-}5,29\text{)}.$$

L'analyse de ce tableau, montre qu'en 1997, la différence de pourcentage de moustiques infectés suivant les périodes de l'année et entre les deux tranches d'âge, n'est pas statistiquement significative (P = 0.5).

Il en est de même pour les périodes et les tranches d'âge de 1998 (P = 0,3).

Par contre, le tableau montre que la différence des taux d'infection entre les années et les périodes d'étude est statistiquement significative (P = 0,0063).

3- Discussion :

Pour tester efficacement le vaccin bloquant la transmission du paludisme, nous avons déterminé certains paramètres parasitologiques et entomologiques et en particulier l'infectivité des porteurs de gamétocytes pour tester la reproductibilité des résultats déjà obtenus (Touré et *al.*, 1998). Les indices plasmodiques et gamétocytiques observés entre 1996 et 1998 étaient comparables à ceux enregistrés au cours de l'enquête préliminaire. Les données ont confirmé le caractère intense et saisonnier de la transmission du paludisme à Bancoumana. Les indices plasmodiques les plus élevés ont été observés en 1996 (58,80%) et les plus faibles ont été enregistrés en 1997 (34,90%). Les indices gamétocytiques variaient significativement suivant les périodes d'étude. Nous avons enregistré un faible taux de l'indice gamétocytique en 1998 certes, cela pourrait s'expliquer par la faible pluviométrie enregistrée (879,7 mm); mais la quantité de pluie ne saurait expliquer la différence entre l'indice plasmodique de 1996 (1019,9 mm de pluie) et celui de 1997 (1243,2 mm de pluie). Paradoxalement, alors que les paramètres cliniques (l'incidence, le nombre d'accès, de cas graves, de chloroquino-résistances ou d'échecs thérapeutiques) (Guindo, 1998) étaient plus élevés en 1997 qu'en 1996 et 1998, nous y avons enregistré les plus faibles taux de l'indice plasmodique. Cette diminution des taux serait consécutive au traitement chimiothérapeutique institué. Les indices plasmodiques étaient comparables entre les deux groupes d'enfants en 1996, mais ils variaient de façon significative en 1997 ($P = 0,004$) et 1998 ($P = 0,04$). Les enfants âgés de 4-9 ans étaient plus touchés que ceux de 10-18 ans. Des résultats analogues ont été également observés avec les indices gamétocytiques.

La proportion de moustiques infectés par les 372 porteurs de gamétocytes en contact direct variait entre 60% et 78%. Ces résultats étaient comparables à ceux obtenus au cours de l'enquête préliminaire (Touré et *al.*, 1998). Cette forte infectiosité des moustiques à Bancoumana au Mali était en faveur d'une possible réduction de la taille de l'échantillon requis pour l'essai du vaccin bloquant la transmission à Bancoumana. Par contre en zone holoendémique (Kisumu, Kenya) moins de 10% des volontaires étaient infectieux pour les moustiques (Githeko et *al.*, 1992). Une telle étude à Kisumu requerrait un échantillon de porteurs beaucoup plus important. Nous n'avons pas observé de différence significative entre le taux d'infection des moustiques en oocystes en fonction des années. La moyenne des oocystes (moyenne géométrique) par moustique était aussi comparable d'une année à l'autre ($P > 0,05$).

Le nombre moyen d'oocystes dénombrés par moustique infecté semble plus élevé que celui observé dans certaines études (Tchuikam et *al.*, 1993; Boudin et *al.*, 1993). Cette différence serait liée à l'utilisation de la première génération de moustiques femelles venant du même village plutôt que des souches de moustiques maintenus au laboratoire dans les autres études. Le taux d'infectivité des gamétocytes était d'autant plus élevé que les densités gamétocytaires étaient faibles. Cette différence de l'infectivité palustre humaine pour le moustique avait été notée par de nombreux auteurs (Gamage-Mendis et *al.*, 1991; Tchuikam et *al.*, 1993)

En 1997, le taux de portage en oocystes variait de façon significative dans les deux groupes d'âge en fonction des saisons ($P = 0,03$). Les enfants âgés de 4-9 ans étaient plus infectieux pour les moustiques que ceux de 10-18 ans notamment pendant la saison des

pluies. La probabilité pour qu'un moustique développe des oocystes était plus faible dans le groupe d'âge de 10-18 ans que dans 4-9 ans [OR = 0,36 ; IC = 0,11-1,08].

En 1998, le taux de moustiques infectés en oocystes était significativement plus élevé pendant la saison des pluies dans les deux groupes d'enfants ($P = 0,0063$). Il y'avait 2,53 fois plus de chance pour les moustiques de développer des oocystes pendant la saison des pluies qu'au cours de la saison chaude ou froide. L'infectivité des porteurs de gamétocytes était donc plus importante pendant la saison des pluies quelque soit l'âge du porteur de gamétocyte au sein du « réservoir infectieux majeur ».

4-Conclusion :

Au terme de cette étude, nous avons constaté que la technique de l'infection directe a l'avantage de mieux mimer la nature. Aussi, notre étude nous a permis de constater que les moustiques avaient plus de 2,53 fois plus de chance de développer des oocystes pendant la saison des pluies que pendant la saison chaude ou froide.

II Comparaison de deux techniques d'infection expérimentale dans l'identification d'outil des antigènes candidats vaccins bloquant la transmission du paludisme à Bancoumana (Mali).

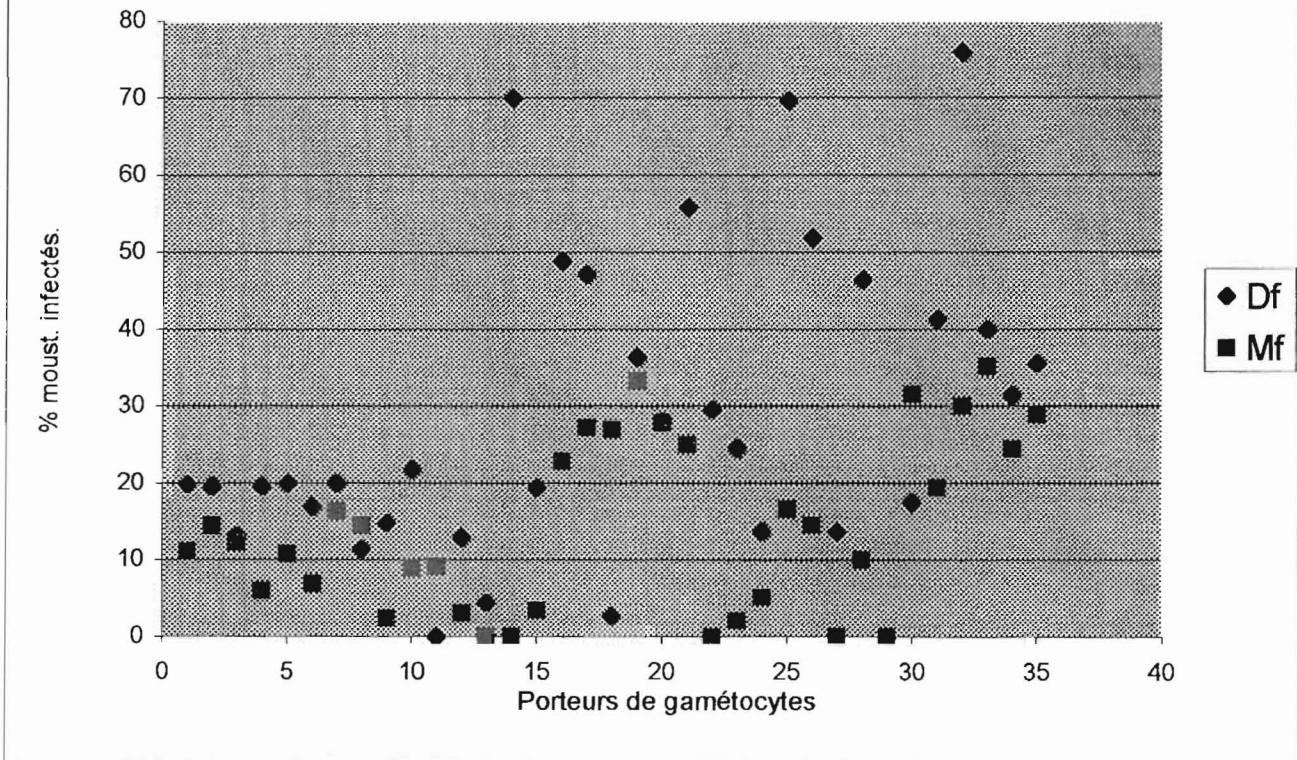
Trente cinq enfants ont été inclus dans cette étude comparative dont 62,85 % étaient des garçons. Les enfants étaient âgés de 4 à 18 ans avec une moyenne d'âge de 7,4 ans. Parmi les porteurs de gamétocytes, 94,3 % (33/35) ont infecté un ou plusieurs moustiques en infection directe contre 85,7% (30/35) en infection à travers la membrane avec le sang non lavé.

Au cours de cette étude, nous avons exposé 8268 moustiques dont 4811 en infection directe et 3451 en infection à travers la membrane avec du sang non lavé (tableau 22). Le pourcentage de moustiques gorgés en infection directe était de 78,4% (3750/4811) et celui observé en infection sur membrane avec du sang non lavé était de 54,1% (1863/3457). La différence était statistiquement significative entre le taux de moustiques gorgés en infection directe et à travers la membrane ($Kw = 27,63$ ddl = 1 et $P < 10^{-6}$). (Tableau 22). Le nombre moyen de moustiques gorgés par porteurs de gamétocytes en infection directe était supérieur au taux moyen de moustiques gorgés en infection sur membrane à sang non lavé ($F = 42,26$; $P < 10^{-6}$).

Le tableau 23 compare les taux d'infection observés pour les deux techniques d'infection. Le taux d'infection moyen en infection directe était de 28,05% contre 13,74% en infection sur membrane. La différence observée entre les taux d'infection des deux techniques était significative ($X^2 = 22,55$ ddl=1; $P < 10^{-5}$). Le nombre moyen de moustiques infectés en infection directe était de 30,05 (10552/35) (sd = 22,62) par porteur de gamétocytes contre 7,31 (256/35) (sd = 22,75) en infection à travers la membrane à sang non lavé. La différence était statistiquement significative ($X^2 = 55,28$; $P < 10^{-6}$).

La charge oocystique moyenne par moustique ($m = 22,52$ soit 23697/1052) en infection directe était 2 fois supérieure à celle observée en infection sur membrane ($m = 9,83$ soit 10259/1043).

Fig 7: Relation entre le taux d'infection des moustiques et la technique utilisée.



La figure 7 montre la relation qui existe entre les taux d'infection des moustiques et la technique d'infection utilisée. Les taux d'infection les plus élevés ont été observés en infection directe. Mais pour la même technique, il existe en outre une variation des taux d'infection suivant l'âge des porteurs de gamétocytes ($X^2 = 175,4$ ddl = 1 et $P < 10^{-6}$).

Df = Direct feeding (Infection directe)

Mf = Membrane feeding (Infection sur membrane)

Cette figure représente en abscisse le pourcentage de moustiques infectés et en ordonnée le nombre de porteurs de gamétocytes soumis à l'expérience (nombre d'expérience): 0-5 comprend les porteurs 1,2,3,4 et 5 ; 30-35 = porteurs 30-31-32-33-34 et 35.

Nous constatons que le pourcentage de moustiques infectés est sensiblement le même jusqu'au porteur 14. C'est à partir du porteur 15 que la différence commence à se créer entre les deux techniques d'infection utilisées et cela en faveur de la technique d'infection directe.

Tableau 22: Comparaison du taux de moustiques gorgés en infection directe et en infection sur membrane.

Techniques	Moustiques exposés	Moustiques gorgés	%
Infection directe	4811	3750	78,4
Infection sur membrane (sang non lavé)	3457	1863	54,1
Total	8268	5613	68,1

$$X^2 = 27,63 ; \text{ddl} = 1 ; P < 10^{-6}$$

Ce tableau montre la capacité des moustiques à se gorger sur un porteur de gamétocytes en fonction de la technique d'infection utilisée.

Nous constatons, bien que le nombre de moustiques exposés dans les deux techniques est différents; que le pourcentage de moustiques gorgés en infection directe (78,4%) est supérieur au pourcentage de moustiques gorgés en infection sur membrane avec du sang total (54,1%). La différence de pourcentage de moustiques gorgés entre les deux techniques est statistiquement significative ($P < 10^{-6}$).

Tableau 23: Comparaison du taux d'infection des moustiques en infection directe et en infection sur membrane avec du sang non lavé.

Porteurs	Infection directe			Sur membrane à sang non lavé			P
	Total	Positif	%	Total	Positif	%	
2142	156	31	19,8	63	7	11,1	0,121
2167	168	33	19,6	90	13	14,4	0,298
2270	144	19	13,1	73	9	12,3	0,857
2220	107	21	19,6	83	5	6	0,006
2362	175	35	20	101	11	10,8	0,050
2333	159	27	16,9	86	6	6,9	0,028
2463	64	13	20	49	8	16,3	0,589
2470	61	7	11,4	62	9	14,5	0,616
2553	114	17	14,9	82	2	2,41	0,003
2544	110	24	21,8	78	7	8,9	0,019
2669	28	0	0	54	5	9,2	
2671	93	12	12,9	94	3	3,1	0,014
3449	88	4	4,5	11	0	0	
3543	10	7	70	34	0	0	
3550	67	13	19,4	56	2	3,5	0,007
3556	47	23	48,9	57	13	22,8	0,005
3786	87	41	47,1	33	9	27,2	0,048
3795	111	3	2,7	52	14	26,6	2.10 ⁻⁵
3880	135	49	36,3	21	7	33,3	0,792
3881	146	41	28	61	17	27,8	0,975
4032	156	87	55,8	28	7	25	0,002
4045	125	37	29,6	57	0	0	
4066	167	41	24,5	45	5	2,1	0,00008
4111	138	19	13,7	57	3	5,2	0,087
4223	125	87	69,6	12	2	16,6	0,0007
4301	129	67	51,9	55	8	14,5	2.10 ⁻⁵
4469	124	17	13,7	0	0	0	
4472	71	33	46,4	20	2	10	0,003
4629	35	0	0	53	0	0	
4598	80	14	17,5	57	18	31,5	0,054
4641	75	31	41,3	67	13	19,4	0,004
4695	91	69	75,8	30	9	30	< 10 ⁻⁶
4850	145	58	40	54	19	35,1	0,535
4852	143	45	31,4	49	12	24,4	0,356
3740	76	27	35,5	38	11	28,9	0,482
Total	3750	1052	28,05	1863	256	13,74	< 10⁻⁶

$$X^2 = 22,55 \text{ ddl}=1; P < 10^{-5}$$

Ce tableau montre que le taux moyen d'infection par la technique directe était de 28,05% contre 13,74% en infection sur membrane. La différence observée entre les taux d'infection des deux techniques était significative ($P < 10^{-5}$). Le nombre moyen de moustiques infectés en infection directe était de 30,05 (10552/35) (sd = 22,62) par porteur de gamétocytes contre 7,31 (256/35) (sd = 22,75) en infection à travers la membrane à sang non lavé. La différence était statistiquement significative ($P < 10^{-6}$).

1- Discussion:

L'infection expérimentale utilise deux techniques pour évaluer le blocage de la transmission du paludisme de l'homme au vecteur et vice versa: l'infection directe qui utilise directement le porteur de gamétocytes, et l'infection sur membrane qui consiste à gorger des moustiques à travers des "feeders" (Mulder et al., 1994). La comparaison entre l'infection directe et l'infection sur membrane à sang non lavé avait pour but d'évaluer la performance de la seconde dans les conditions des essais vaccinaux à cause des problèmes d'éthique que l'infection directe soulève.

Parmi les 35 porteurs de gamétocytes 29 soit 82,85% ont infecté les moustiques par les deux méthodes d'infection. En infection directe 94,28% (33/35) de porteurs ont infecté les moustiques. En infection sur membrane 85,71% (30/35) de porteurs ont infecté les moustiques. Le test de McNemar montre qu'il n'y a pas de différence significative entre le nombre de porteurs de gamétocytes ayant infecté les moustiques en infection directe et celui des porteurs ayant infecté les moustiques en infection sur membrane à sang non lavé ($P = 0,5$).

Des taux relativement faibles de 10-11% (Muirhead-Thomson et al., 1950) et de 77% (Mulder et al., 1992) ont été respectivement observés en Papouasie Nouvelle Guinée et au Cameroun en infection directe. Cette différence entre les taux que nous avons enregistrés et ceux des auteurs précédents pourrait s'expliquer par la forte charge gamétocytaire des porteurs que nous avons utilisés. L'âge des porteurs pourrait aussi influencer sur l'inféctivité des gamétocytes. Pour des sujets de 2-9 ans, les taux d'infection obtenus en Papouasie Nouvelle Guinée (Muirhead-Thomson et al., 1950) étaient seulement de 37%. Dans notre étude, le taux moyen d'infection par la technique directe était de 28,05% contre 13,74% en infection sur membrane à sang non lavé. Cependant, la charge oocystique moyenne par porteur ($m=22,52$ soit 23697/1052) en infection directe était 2 fois supérieure à celle observée en infection à travers la membrane ($m=9,83$ (10259/1043) ($X^2 = 22,55$ ddl = 1: $P < 10^{-5}$). La différence entre les deux techniques s'expliquait par le fait que le contact direct homme/vecteur mimait mieux les conditions naturelles. Toutefois les taux que nous avons obtenus étaient inférieurs à ceux observés (45,9%) dans la même zone en 1994 (Touré et al., 1994) bien que le temps d'application des moustiques soient comparables. Les taux observés sur membrane au Cameroun (18,9%) étaient en outre supérieurs aux nôtres. La moyenne de moustiques gorgés en infection directe était supérieure à celle observée en infection sur membrane (respectivement 107,1 et 53,2) (F de Fisher= 42,26, $P < 10^{-6}$). Ces résultats étaient comparables à ceux observés en Papouasie nouvelle Guinée (Graves et al., 1988).

2- Conclusion:

L'infection expérimentale directe donne de meilleurs résultats que l'infection sur membrane à sang non lavé. Les taux et les charges oocystiques de l'infection directe sont supérieurs à ceux de l'infection à travers la membrane avec du sang non lavé. Mais les pouvoirs infectieux des porteurs de gamétocytes sont comparables.

La technique de l'infection sur membrane limiterait les problèmes éthiques liés à l'infection directe et peut être une technique sensible et spécifique pour l'évaluation des candidats vaccins bloquant la transmission.

III Rôle des facteurs hématologiques sur l'infectivité des gamétocytes de *Plasmodium falciparum* chez les moustiques dans le village de Bancoumana (Mali).

Quatre vingt quatre enfants ont été inclus dans cette étude, avec 52,4 % de garçons et 47,6 % de filles. La moyenne d'âge était de 8,34 ans avec des extrêmes de 4-16 ans . Parmi les porteurs de gamétocytes, 89,3 % ont infecté un ou plusieurs moustiques. La plus forte charge gamétocytaire était de 3925 gamétocytes/ μ l de sang observée chez une fille âgé de 8 ans.

Les différents types d'hémoglobine apparaissaient dans les proportions suivantes: (AA= 76,8%, n=63), (AC= 7,14%, n=6), (AS= 14,28%, n=12), (SS= 1,19%, n=1). L'infectivité des gamétocytes en fonction des différents types d'hémoglobine est présentée dans les Tableaux 24-25-26. Le taux d'infectivité des gamétocytes était très élevé et comparable pour tous les types d'hémoglobine, variant entre 87% pour AA à 100% pour AS (OR=0,64; 0,03-5,96). La comparaison des porteurs d'hémoglobine normale (AA). anormale (AC, AS, SS), montre que l'infectivité n'était pas affectée par la pathologie de l'hémoglobine (OR=0,38; 0,02-3,42). Tous les types de rhésus (positifs et négatifs) avaient un pouvoir infectant comparable (Tableau 24).

Une analyse multifactorielle incluant, le type d'hémoglobine, le groupe/ rhésus et l'âge des enfants n'a pas permis de mettre en évidence une différence significative entre l'infectivité des gamétocytes en fonction de ces différents déterminants. L'infectivité des gamétocytes selon la charge gamétocytaire (Tableau 26) a montré que toutes les charges étaient capables d'assurer une infection des moustiques.

Par ailleurs suivant le groupe ABO, nous avons observé (Fig 8), que les moustiques se gorgeaient mieux sur les sujets porteurs du groupe de sang O. Cela est en terme de repas de sang.

Tableau 24: Différents types d'hémoglobines observé entre 1996 et 1998 et leur relation avec l'infectivité des moustiques à Bancoumana.

HB/Infectivité	Infection +	Infection -	% infection
AA	55	8	87,3
AC	6	0	100
AS	11	1	91,7
SS	1	0	100
Total	73	9	89,0

L'observation de ce tableau montre que les sujets porteurs de l'hémoglobine AA représentaient 67,07%, AC = 7,31%, AS = 13,41% et SS = 1,21%.

En terme d'infection tous les sujets porteurs des types d'hémoglobine SS et AC ont infecté les moustiques, soit respectivement 100%.

Par contre les sujets de type d'hémoglobine AA et AS ont infecté respectivement les moustiques à 87,3% et 91,7%.

Tableau 25: Niveau d'infectivité des moustiques selon que l'hémoglobine est normale ou pathologique.

HB/Infectivité	Infection +	Infection -	% infection
AA	55	8	87,3
AS + SS + AC	18	1	94,7
Total	73	9	89,0

OR = 0,38 (0,02-3,42) P = 0,68.

Ce tableau montre le niveau d'infection entre les porteurs d'hémoglobine normale et d'hémoglobine pathologique. Nous constatons que les sujets porteurs d'hémoglobine pathologique infectent plus les moustiques (94,7%) que les sujets porteurs d'hémoglobine normale (87,3%). La différence du niveau d'infectivité entre les deux types normal et pathologique n'est pas significative (P = 0,681).

Tableau 26: Les groupes sanguins observés dans les systèmes ABO entre 1996-1998 : relation avec le niveau d'infectivité des gamétocytes.

Grpe/Infectivité	Infection +	Infection -	% infection
A+	16	1	94,1
AB+/-	6	1	85,7
B+	17	2	89,4
O+/-	34	5	87,1
Total	73	9	89,0

$$P = 0,066$$

Ce tableau montre la part du Rhésus du groupe sanguin dans l'infectivité d'un sujet porteur de gamétocytes. Nous constatons que tous les sujets de Rhésus positif ou de Rhésus négatif infectent les moustiques. Nous n'avons pas observé de différence statistiquement significative quant à la relation du niveau d'infectivité des porteurs de gamétocytes et le groupe-Rhésus ($P = 0,06$).

Tableau 27: Relation entre l'infectivité chez les porteurs de gamétocytes et le groupe-Rhésus.

Rh/Infection	Infection +	Infection -	Total	% Infection
Rhésus +	70	9	79	88,6
Rhésus -	3	0	3	100
Total	73	9	82	

$$P \text{ (test de Fisher)} = 0,102$$

Ce tableau montre spécifiquement, la relation entre le Rhésus du groupe de sang et l'infectivité des porteurs de gamétocytes. Nous avons 85,4% des porteurs qui sont Rhésus positif et 4,6% Rhésus négatif.

Du point de vue infection, 88,6% (70/79) des sujets Rhésus positif ont infecté les moustiques et 100% (3/3) des sujets Rhésus négatif ont infecté les moustiques. La différence n'est pas significative. ($P = 0,1$).

Tableau 28: Taux d'infectivité selon que les porteurs de gamétocytes appartenaient au groupe sanguin O ou autre dans le système ABO.

Grpe/Infection	Infection +	Infection -	Total	% Infection
A/AB/B	39	4	43	90,7
O	34	5	39	87,1
Total	73	9	82	89,0

P (Chi2 de Yates) = 0,865.

En comparant les groupes sanguins AB et O, nous avons constaté que 47,6% (39/82) des sujets sont du groupe AB et 41,6% sont du groupe O.

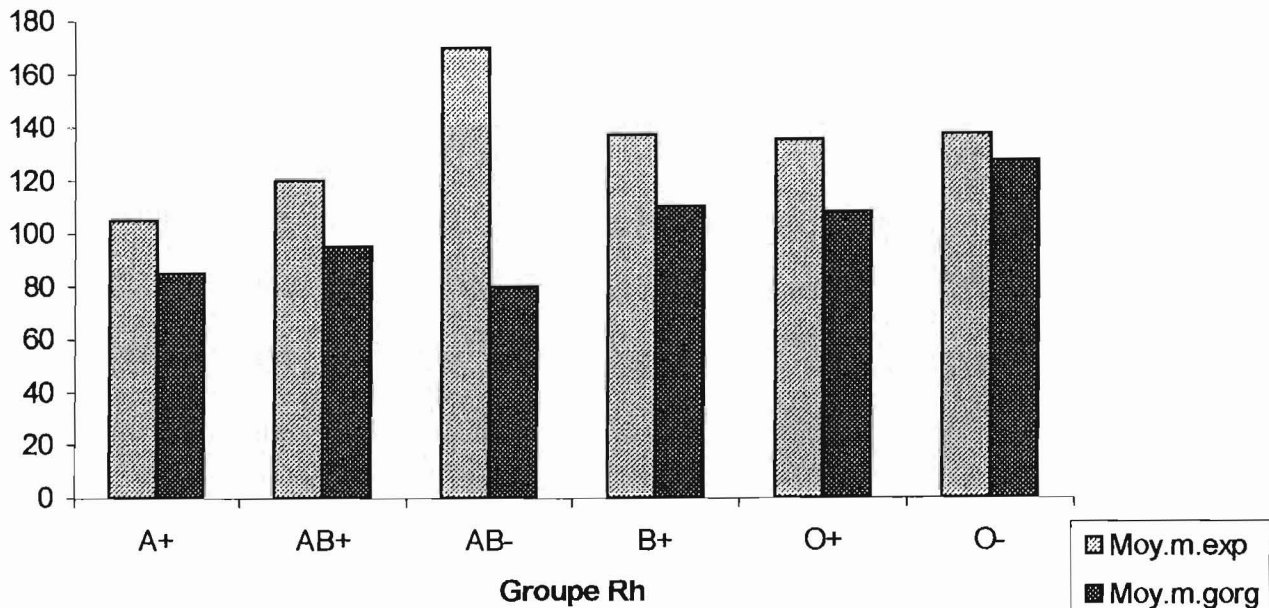
Du Point de vue infection, nous avons constaté que 90,7% des sujets du groupe AB ont infecté les moustques et 87,1% du groupe O ont infecté les moustiques. Nous n'avons pas observé de différence significative (P = 0,86).

Tableau 29: Infectivité des gamétocytes en fonction de la charge gamétocytaire au cours de l'infection expérimentale..

Infectivité/Classe gaméto	Infection +	Infection -	% Infection
25-50	19	4	82,6
75-100	19	2	90,4
125-400	28	3	90,3
425-1000	5	0	100
>=1025	4	0	100
Total	75	9	89,3

Ce Tableau montre que le plus faible taux d'infection (82,6%) est enregistré chez les sujets dont la charge gamétocytaire était comprise entre 25-50 gamétocytes/ μ 3 de sang. Le plus fort taux (100%) était observé chez les sujets dont la charge gamétocytaire comprise entre 425-1000 ou \geq 1025 gamétocytes/ μ 3 de sang.

Fig 8: Relation entre le groupe sanguin Rh du porteur de gamétocyte et le repas de sang des moustiques



Moy.m.ex p = moyenne des moustiques exposés.

Moy.m.gorg = moyenne des moustiques gorgés.

Cette figure montre la relation entre groupe sanguin du porteur de gamétocyte et le repas de sang.

1- Discussion:

Au cours de cette étude, nous avons testé le rôle de certains facteurs hématologiques sur l'infectivité des gamétocytes. Parmi les 84 enfants inclus dans l'étude, 82 ont été typés dans les systèmes de groupe sanguin ABO et rhésus. Les facteurs hématologiques testés étaient le groupe sanguin ABO/rhésus et les différents types d'hémoglobine. Les résultats expérimentaux ont montré que 89% des porteurs de gamétocytes étaient infectieux pour les moustiques. Des résultats similaires utilisant la "membrane feeding" et le "direct feeding" ont été également observés par d'autres auteurs (Githeko et *al.*, 1992; Tchuikam et *al.*, 1993; Boudin et *al.*, 1993). Nous avons trouvé que l'hémoglobine de type AA était fréquente (75,3%, n = 55 le type SS homozygote était de 1,4%, (n=1). Toutefois, le taux d'infectivité des gamétocytes était toujours supérieur à 80% quelque soit le type d'hémoglobine du porteur. La prédominance des formes normales sur les hétérozygotes

et les homozygotes avait été signalée auparavant (Robert et *al.*, 1996). Aussi dans notre étude, les porteurs de l'hémoglobine AS infectaient beaucoup plus les moustiques que ceux portant l'hémoglobine AA: 94,7% contre 87,3%. Aussi pour notre étude le faible nombre de porteurs de AS ne permet pas de faire une comparaison adéquate. En dépit de la fréquence élevée des porteurs de l'hémoglobine AA dans l'échantillon, l'infectivité des gamétocytes ne variait pas significativement d'un type d'hémoglobine à un autre (OR 0,64; 0,03-5,96).]. Tchuinkam et *al.*, en 1993 ont trouvé que chez les porteurs, l'infection positive était observée chez 70,6% des sujets du groupe O, 56,8% des sujets du groupe A, 48% des sujets du groupe B et chez 42,9% des sujets du groupe AB. Selon les mêmes auteurs, la densité gaméocytaire serait le seul facteur déterminant dans le niveau d'infectivité des gamétocytes (Tchuinkam et *al.*, 1993); alors que ni la densité des formes asexuées, ni la nature du groupe rhésus ou la température corporelle n'auraient une influence quelconque. Selon d'autres au contraire, le volume globulaire du sang, le taux de réticulocytes et de lymphocytes étaient étroitement associés à la densité gaméocytaire (Drakeley et *al.*, 1999). Le seuil gaméocytaire de l'ordre de 300 gamétocytes par microlitre serait inhibant pour l'infectivité (Graves et al., 1988) a été aussi observé dans notre enquête au cours de laquelle, tous les cas négatifs ont été enregistrés pour des charges inférieures ou égales à 425 par microlitre. Mulder B et *al.* ont montré que le pouvoir infectieux des gamétocytes était inhibé par certains facteurs plasmatiques tels que les facteurs sériques chez les populations vivant en zone de haute endémicité palustre. D'autres facteurs liés à l'âge auraient aussi un impact, car les plus jeunes volontaires étaient potentiellement infectieux par rapport aux adultes (73% contre 27%) (Boudin et *al.*, 1993).

2- Conclusion:

Notre étude nous a permis de constater que l'infectivité des gamétocytes ne variait pas de façon significative d'un type d'hémoglobine à un autre. Les sujets ayant un antigène de groupe sanguine quelqu'il soit (A, B, AB) transmettent le parasite au moustique.

IV Etude des facteurs du plasma sur l'infectivité des gamétocytes chez Anopheles gambiae dans la population de Bancoumana (Mali).

1- Les porteurs de gamétocytes:

Quarante et quatre enfants ont été inclus dans cette étude, avec 47,7% de garçons. La moyenne d'âge était de 7,79 ans avec des extrêmes de 4-14 ans (déviation standard = 2,57). Selon que le sang des porteurs de gamétocytes était lavé ou non le taux d'infection était égal à 70,45% et 79,54%. La plus forte charge gaméocytaire était de 3925 gamétocytes/ μ l de sang observée chez un enfant âgé de 8 ans.

2- Infection expérimentale

La figure 9 représente la distribution de la densité gaméocytaire et celle de l'infection des moustiques suivant le type de repas (sang non lavé et sang lavé). Pour les deux groupes de repas, l'importance des taux d'infection était fonction de la densité

gamétocytaire. Toutes les classes de charge gamétocytaire ont infecté les moustiques. Les taux les plus élevés ont été observés avec la classe de 25-100 gamétocytes/ μ l de sang. Toutefois, il n'existe pas de différence significative de l'infectivité pour la même classe de densité gamétocytaire quelque soit le repas de sang.

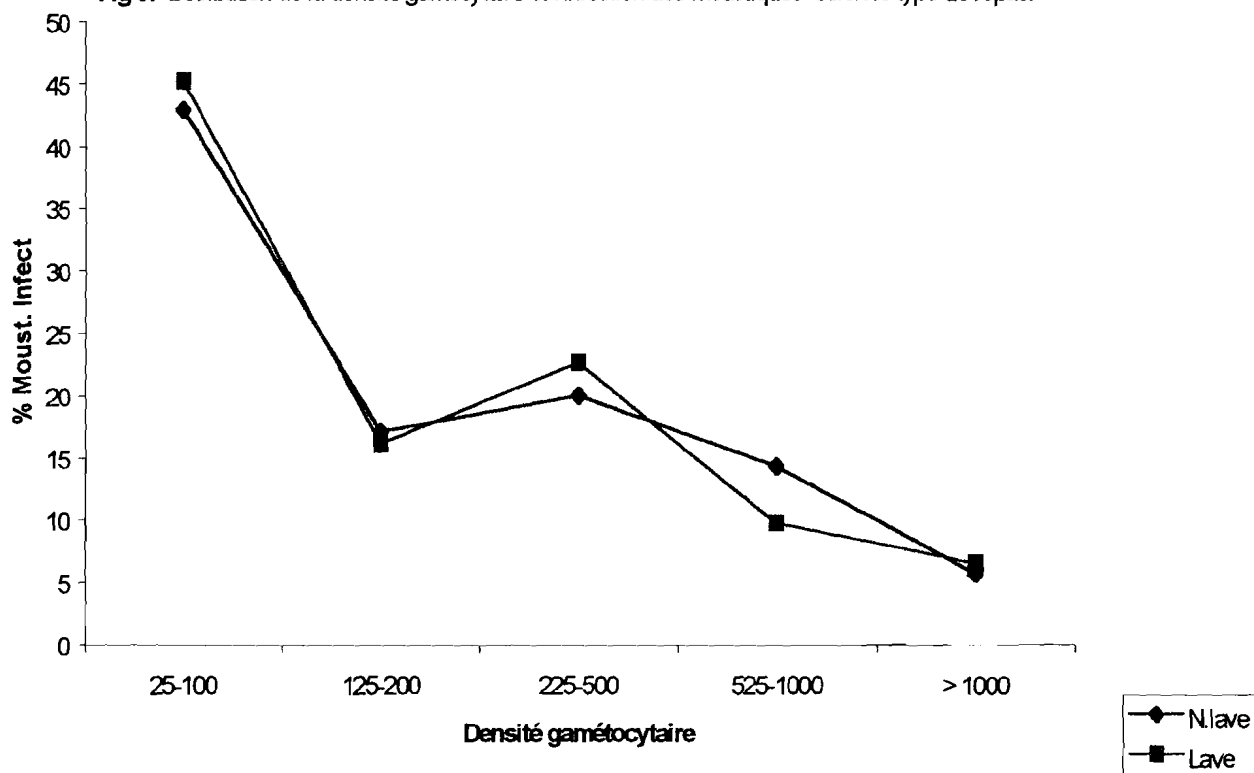
A partir du repas de sang non lavé, nous avons exposé 4408 moustiques parmi lesquels 54,3% (2393/4408) ont été gorgés, 24% (573/2393) ont été infectés. Pour le repas de sang lavé, 4071 moustiques ont été exposés, 49,5% (2018/4071) ont été gorgés et 13,2% (268/2018) ont été infectés. L'infection des moustiques gorgés avec du sang total était significativement supérieur à celle des moustiques gorgés sur sang lavé ($X^2 = 9,43$ ddl = 9 $p < 10^{-6}$).

La figure 10 représente le nombre de moustiques infectés suivant les expériences (porteurs de gamétocytes). Le nombre élevé de moustiques infectés dans les deux groupes de repas de sang ont été observés chez 30 porteurs de gamétocytes soit 68,2% (30/44). Pour l'ensemble des deux types de repas, 13,6% (6/44) des porteurs de gamétocytes n'ont pas été infectants pour les moustiques (Tableau 31). Nous avons observé que 18,2% (8/44) n'ont pas infecté les moustiques avec du sang non lavé. Par ailleurs 25% (11/44) des porteurs n'ont pas infecté les moustiques avec du sang lavé. Dans tous les cas, l'infectivité était encore plus élevée quand les moustiques étaient gorgés sur sang total dans le groupe des 30 porteurs les plus infectants (X^2 (Mantel-Haenzel) = 80,68 $p < 10^{-6}$) avec un risque relatif (RR) d'infection de 1,80 (1,58 <RR < 2,06).

La relation entre l'âge du porteur de gamétocytes et l'infectivité est présentée sur la figure 11. Celle-ci montre que les enfants sélectionnés pour cette étude étaient âgés de 5-12 ans. Les taux d'infection les plus élevés ont été observés chez les sujets d'âge compris entre 5-10 ans pour les deux types de repas de sang. Il existe une différence significative du taux d'infection des moustiques en fonction de l'âge quelque soit le type de repas (X^2 (Mantel-Haenzel) = 78,98 ; $P < 10^{-6}$ avec un risque relatif (RR) d'infection de 2,04 (1,73 <RR < 2,40). L'infection des moustiques gorgés sur sang non lavé était en effet plus élevée que celle observée sur sang lavé quelque soit l'âge.

La recherche des anticorps anti-Pfs 25 a porté sur le sérum de 42 sujets. Ces porteurs ont été sélectionnés suivant le résultat de la dissection des moustiques gorgés sur eux. Certains n'ont pas infecté les moustiques, d'autres ont infecté, mais avec de faibles quantités d'oocystes et d'autres encore avec une grande quantité d'oocystes. Nous avons présenté sur le tableau 30, les résultats obtenus chez 7 sujets, résultats comparables à ceux obtenus avec les autres sujets. L'utilisation du test n'a pas permis d'observer de réponse positive, du moins de titre de densité optique (DO) équivalent à celui du contrôle

Fig 9: Distribution de la densité gamécytaire et l'infection des moustiques selon le type de repas.



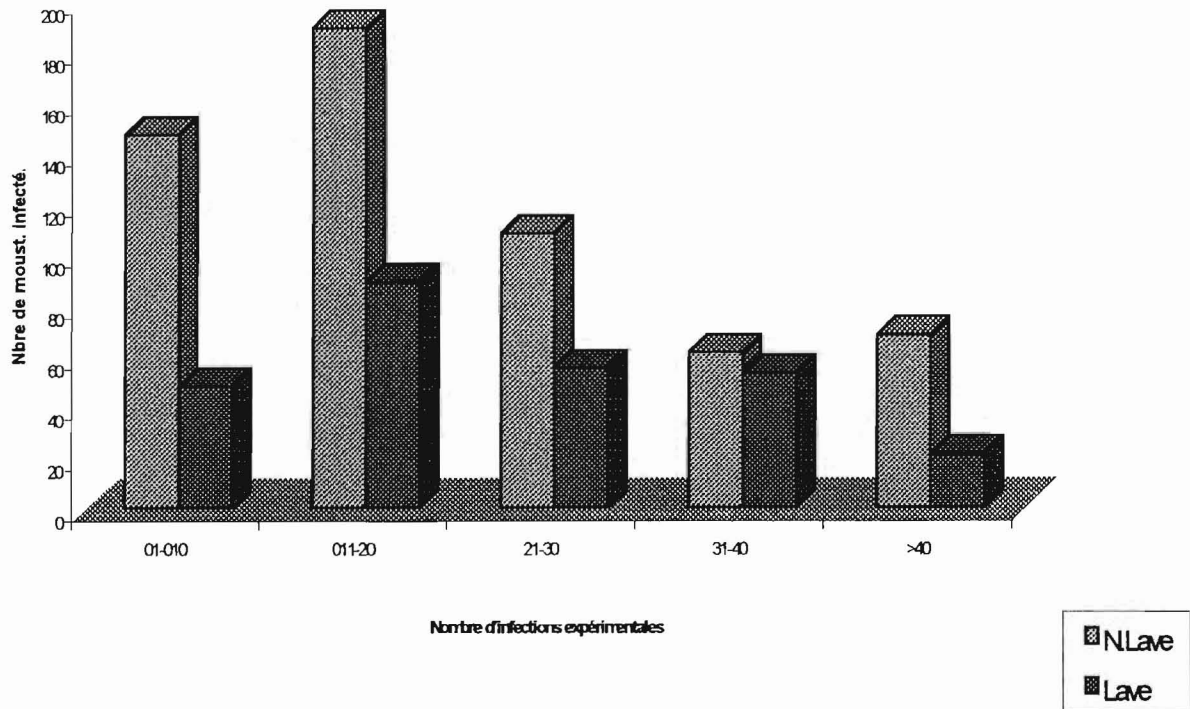
N Lave = non lavé
Lave = lavé

positif. Les charges oocystiques enregistrées étaient par ailleurs très faibles chez certains sujets.

Cette figure montre la relation entre les classes de gamétoctémie et le pourcentage de moustiques infectés selon le type de repas de sang.

Nous constatons que le pourcentage élevé de moustiques infectés s'observe dans les classes de gamétoctémie situées entre 25-100 et 125-200. Ce pourcentage baisse quand la densité gamétoctaire s'accroît.

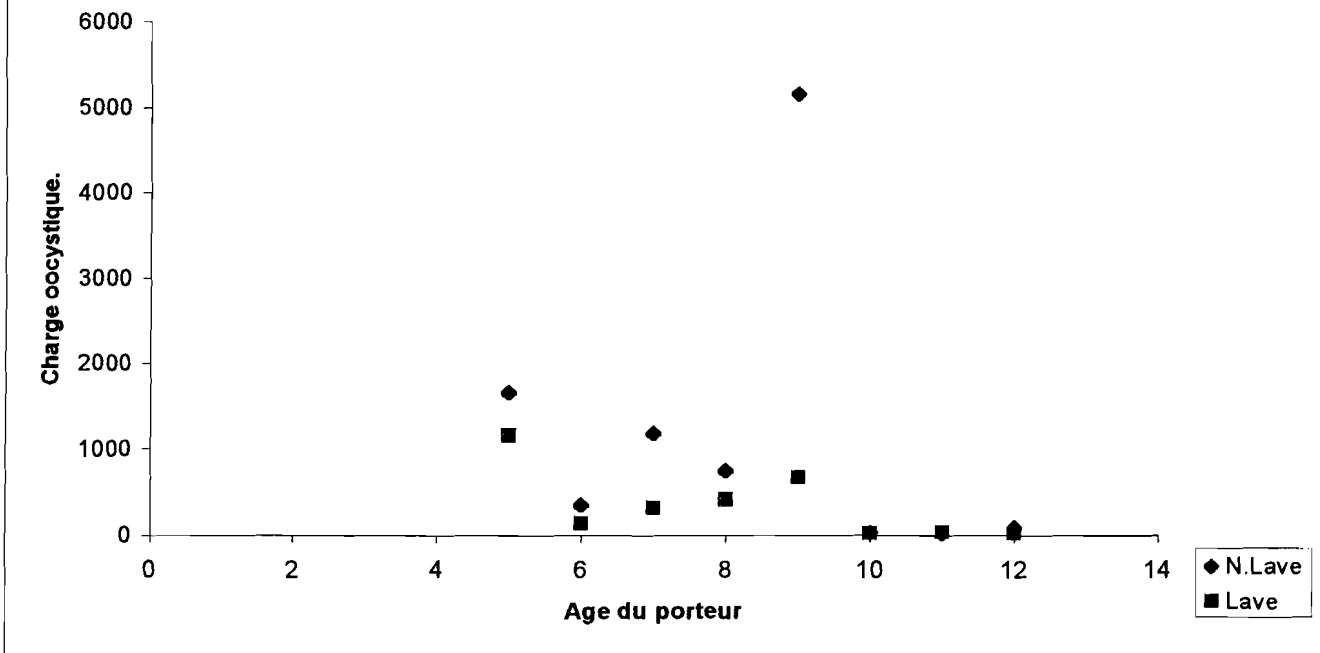
Fig 10: Nombre de moustiques infectés, suivant le nombre d'infection exp.érimentales (porteur de gamétocytes) en fonction du type de repas.



N lave = non lavé
Lave = Lavé

L'analyse de cette figure montre le nombre de moustiques infectés par porteurs de gamétocytes selon le type de repas de sang. (sang total du porteur et sang lavé du même porteur, mais lavé avec le sérum d'un sujet indemne de paludisme). Nous constatons suivant la figure que le repas de sang non lavé a infecté plus de moustiques que le repas de sang lavé.

Fig 11: Relation entre l'âge du porteur de gamétocytes et l'infection en Oocystes en fonction du type de repas.



N lave = non lavé
Lave = Lavé

Cette figure nous montre en abscisse la charge en oocystes et en ordonnée l'âge du porteur de gamétocytes. En effet il s'agit de la relation entre l'infection en oocystes et l'âge du porteur de gamétocytes en fonction du tye de repas sanguin (Sang total et sang lavé avec du sérum d'un sujet non immun de paludisme. Nous constatons donc que les charges oocystiques les plus élevées s'observent chez les sujets d'âge compris entre 5 et 12 ans.

..

Tableau 30: Résultats de la recherche d'anticorps anti-Pfs25 chez les porteurs de gamétocytes.

N ^o Porteur	Age	Charg.gam	M.infect/M.dis		Nbre oocyst	Pfs25OD	
						1/20	1/400
570	-	950	6/73		14	0,098	0,074
580	14	150	2/62		2	0,084	0,070
704	9	75	32/49		329	0,084	0,074
640	15	25	28/65		21	0,081	0,070
817	6	975	25/39		1699	0,084	0,073
841	14	425	20/42		2115	0,078	0,071
870	7	100	11/35		44	0,088	0,078
C (+)	-	-	-		-	1,832	0,687
C (-)	-	-	-		-	0,137	0,099

Ce tableau représente une série des tests ELISA réalisés au NIH et montre quelques résultats obtenus de cette technique. Nous constatons qu'aucun sujet de Bancoumana n'a donné une densité optique (DO) comparable à celles du contrôle positif (C+) du NIH.

Tableau 31: Sujets n'ayant pas infecté les moustiques (présentant un caractère bloquant la transmission) au cours des deux types de repas.

N ^o . Porteurs	IG/μl	Sang non lavé			Sang lavé		
		Mg/Me	(+)	%	Mg/Me	(+)	%
1953	125	82/107	0	0	77/108	0	0
2065	175	75/109	0	0	54/106	0	0
3449	25	11/86	0	0	23/89	0	0
3543	75	34/84	0	0	13/86	0	0
4472	75	20/106	0	0	30/98	0	0
4629	50	53/116	0	0	23/112	0	0

IG = indice gamétocytaire ; Mg = Moustiques gorges ; Me = Moustiques exposés
 (+) = moustiques positives ; % = pourcentage.

3- DISCUSSION:

Il existe deux possibilités permettant d'apprécier la capacité de blocage de la transmission du paludisme à partir d'un sérum suspect par la technique de l'infection sur membrane. La première consiste à entreprendre un bioessai utilisant les gamétoocytes de culture et une colonie standard de moustiques. La seconde consiste à gorger des moustiques à partir du sang total du porteur de gamétoocytes et à remplacer le sérum par celui d'un sujet non immune (Mulder *et al.*, 1994). Le lavage du sang aura pour but de mettre en évidence l'existence d'anticorps naturels capables de bloquer la transmission du paludisme et/ou une déficience en nutriments susceptibles de stimuler le développement des oocystes.

Le taux d'infection total des porteurs de gamétoocytes (sang total et sang lavé) était de 68,2%. Le pouvoir infectieux des porteurs de gamétoocytes était 79,5% (35/44) pour le sang total et 70,4% (31/44) pour le sang lavé. L'infectivité observée à partir du sang non lavé (79,5%) était supérieure à celle obtenue par Drakeley *et al.* (1994). Mais l'étude de Drakeley a porté sur des porteurs de gamétoocytes âgés de 1 à 62 ans. Contrairement à nos résultats, les études antérieures ont montré que l'infection à partir du sang lavé était significativement supérieure à celle observée à partir du sang non lavé (Drakeley *et al.*, 1998). Cette différence serait liée soit à l'âge des porteurs de gamétoocytes, du nombre de moustiques exposés et infectés qui était beaucoup plus important dans notre étude, du mode de transmission du paludisme qui est hyperendémique et saisonnier à Bancoumana alors qu'il est holoendémique mais non saisonnier dans le cas de Drakeley *et al.*

Au total 25% (11/44) des sujets n'ont pas infecté les moustiques gorgés sur du sang lavé. Pour l'ensemble des deux groupes de sang 13,6% (6/44) de porteurs de gamétoocytes n'ont pas infecté les moustiques. Mais en dépit de la tendance générale des résultats seulement 18,2% (8/44) de porteurs de gamétoocytes étaient fortement infectieux. Ce taux est supérieur à celui de Mulder *et al.* (1994), 10,7% (7/65) obtenu également à partir du sang total. Le premier facteur considéré comme médiateur possible bloquant la transmission du paludisme sont les anticorps circulants (Meuwissen *et al.*, 1985). La non infection des moustiques par 13,6% de nos porteurs de gamétoocytes serait probablement due à la présence de ces anticorps circulants. Certains auteurs avaient suggéré l'utilisation d'un modèle mathématique pour prédire le niveau de risque (R) de transmission par la technique de l'infection sur membrane (Lensen *et al.*, 1996). Pour cela ils ont défini trois catégories de sérums: les sérums capables de bloquer la transmission ($R > 0,9$), les sérums capables de réduire la transmission ($0,9 < R < 0,3$) et les sérums incapables de bloquer la transmission ($R < 0,3$). Des résultats similaires avaient été observés auparavant qu'il s'agisse du sang lavé ou non lavé (Ponnudurai *et al.*, 1987).

Nous n'avons pas détecté des anticorps anti-Pfs25 (protéine exprimée à la surface du zygote) dans notre population porteuse de gamétoocytes.

Par contre, il a été bien établi qu'après le repas infectant du moustique, il y a une néoformation antigénique à la surface du parasite et la protéine de PM 25 kD devient dominante sur la membrane parasitaire (Alano *et al.*, 1991). Cet antigène selon Kaslow *et al.*, (1991) demeure le candidat vaccin majeur pour le blocage de la transmission du paludisme.

Cette protéine 25 kD qui apparaît avec le début de la gamétogénèse devient très abondante à la surface des gamètes, du zygote et de l'ookynète (Vermeulen et al., 1985; Kumar et Carter, 1984; Rener et al., 1983; Alano, 1991).

Le mécanisme de blocage de la transmission par l'anticorps dirigé contre l'antigène 230 kD n'est pas encore connu, tandis que ceux des anticorps monoclonaux dirigés contre le doublet 48/45 et contre la protéine 25 kD sont partiellement connus. Les deux bloquent la formation des oocystes; cependant, le premier interfère probablement avec la fécondation du macrogamète alors que le second interagirait avec un ligand de l'ookynète en compétition pour un site récepteur sur la paroi stomacale du moustique, empêchant ainsi la pénétration de l'ookynète (Vermeulen et al., 1985; Meuwissen et Ponnudurai, 1986; Meuwissen, 1989).

4- Conclusion:

La non infection des moustiques par certains de nos porteurs de gamétocytes serait probablement due à la présence chez ces sujets d'anticorps circulants bloquant la transmission.

V Etude du polymorphisme de *Plasmodium falciparum* de l'homme au moustique au cours de l'infestation expérimentale à Bancoumana .

Trente enfants ont été inclus dans cette étude. Il y avait 53% de filles et 47% de garçons. L'âge moyen était de 7,4 ans avec des extrêmes de 4 à 15 ans. Tous les sujets ont infecté les moustiques avec une moyenne de 811 oocystes comptés pour un porteur de gamétocytes.

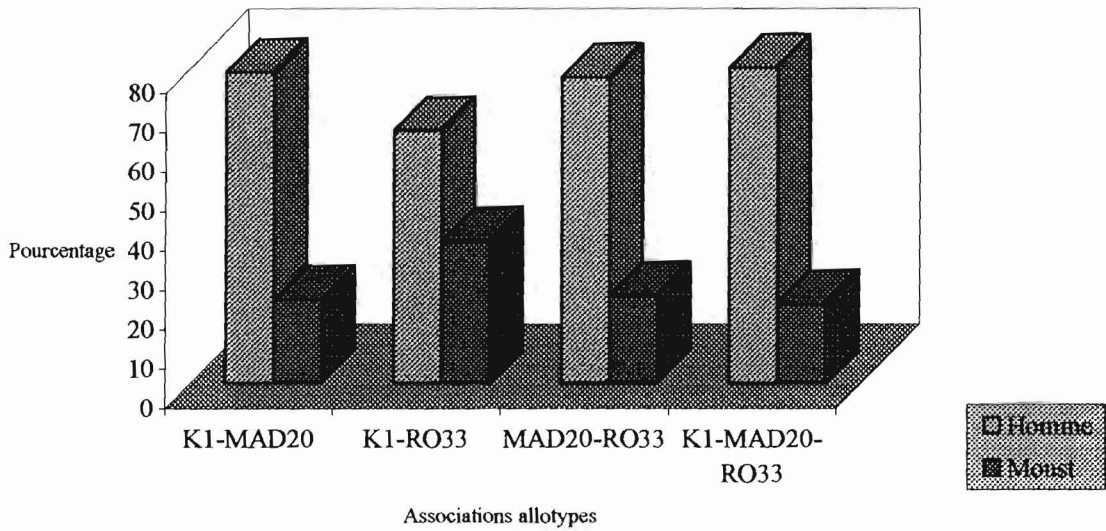
Le tableau 32 montre la répartition des allotypes observés chez l'homme (gamétocyte) et chez le moustique (oocyste). Nous n'avons pas observé de différence significative entre les allotypes K1 et RO33 chez l'homme et chez le moustique ($X^2 = 2,82$ ddl = 5 et $P = 0,727$). A l'intérieur d'un même allotype, nous n'avons pas observé non plus de différence significative ($P = 0,310$) entre l'homme et le moustique. Cependant l'allotype MAD20 apparaît en faible proportion chez le moustique $P < 10^{-6}$ (test exact de Fisher).

Nous avons cherché des associations d'allotypes (Fig 12), nous avons observé la fréquence la plus élevée (78,9%) avec l'association K1-MAD20 chez l'homme alors qu'elle est de 21,1% chez le moustique ($P = 0,628$). L'association des trois allotypes (K1-MAD20-RO33) apparaît en faible proportion (20%) chez le moustique alors qu'elle est de 80% chez l'homme. La différence n'est pas significative ($P = 0,616$).

Nous avons par ailleurs observé la présence des trois allotypes (K1-MAD20-RO33) chez l'homme et un seul allotype (RO33) et un allotype K1 chez le moustique. L'association K1-RO33 chez l'homme a donné l'allotype RO33 chez le moustique.

Comparativement au tableau 32, la figure 12 montre l'association des allotypes

Fig 1: Répartition des associations d'allotypes chez l'homme et le moustique.



$P = 0,05$

rencontrés chez l'homme et chez le moustique. La fréquence la plus élevée (80%) a été observée avec l'association K1-MAD20-RO33 chez l'homme. La différence est significative ($P = 0,05$).

Nous constatons donc que la fréquence des allotypes K1 et RO33 ne varie pas significativement chez l'homme et chez le moustique. L'allotype MAD20, présent chez 70% des porteurs de gamétocytes n'apparaît qu'en faible proportion (29,6%) chez le moustique ($P < 0,0001$).

D'autre part, après dissection des moustiques, nous avons analysé les oocystes de l'infection expérimentale. Nous avons obtenu un cas qui présentait un parasite avec une séquence hybride de MAD20/RO33 avec 150 paires de base dans le bloc 2 de la MSP-1. Cet hybride n'avait pas été observé chez l'homme.

Cette figure montre les associations possibles d'allotypes chez l'homme (gamétocytes) et rencontrés chez le moustique (oocystes) après dissection. On constate l'existence des différentes associations allotypiques de part et d'autre. Mais nous notons une différence statistiquement significative entre les deux hôtes ($P = 0,05$). Les fréquences sont plus élevées chez l'homme que chez le moustique.

Tableau 32: Répartition des allotypes chez l'homme et le moustique observée au cours de l'infection expérimentale à Bancoumana.

Allotypes/Hôte	K1	%	MAD20	%	RO33	%
Confettis (Homme)	21	58,3	19	70,3	22	52,3
Oocyste (Moust)	15	41,7	8	29,6	20	47,7
Total	36		27		42	

$$X^2 = 2,82 \text{ (test exact de Fisher)} \quad P = 0,727$$

$$X^2 = 0,09 \quad P = 0,9$$

$$P = 0,768$$

Ce tableau montre que l'allotype K1a été rencontré à 58,3% chez l'homme (gamétocytes) et 41,7% chez le moustique (oocyste), la différence n'est pas significative ($P = 0,7$). La souche MAD20 est présente chez l'homme à 70,3% et chez le moustique à 29,6%. La souche RO33 a été trouvée à 52,3% chez l'homme et 47,7% chez les moustique.

Tableau 33: Résultats de l'amplification des gamétocytes (sang sur papier filter) et des oocystes (dissection des moustiques): Polymorphisme de *P. falciparum*.

Ordre	STDN	Age	Sexe	Date Passage	Gamétocyte/mm ³	MG/ME	Nombre Oocystes	Polymorphisme /Gaméto.			Polymorphisme /Oocyste		
								K1	MAD20	RO33	K1	MAD20	RO33
33		7	2	4/2/98	200	18/90	1826	4	1	1	0	0	2
5	1773	7	1	4/2/98	125	60/90	34	3	1	1	3	0	0
9		9	2	6/26/97	275	91/120	1298	1	1	0	1	1	0
7	148	4	2	6/26/97	25	67/120	59	2	1	1	1	0	1
0	314	10	2	7/17/97	400	99/120	62	0	1	1	0	1	1
2	320	8	2	17/7/97	125	Oct-90	5	0	0	0	1	0	1
4	1414	6	2	8/11/97	325	53/90	50	3	0	1	0	0	1
5	1699	8	2	8/11/97	6325	51/90	5642	1	0	1	2	0	1
4	711	7	2	10/1/97	50	64/90	4731	2	2	1	1	1	1
2	1298	5	1	10/1/97	675	56/90	6	2	0	1	0	0	1
7	291	9	2	10/1/97	75	134/140	1588	0	0	1	0	0	0
3	860	6	1	11/12/97	75	135/140	136	0	0	1	0	0	1
2	2204	9	1	11/12/97	425	947/160	3782	1	0	0	1	0	0
4	577	9	1	11/12/97	50	39/90	48	1	3	1	1	0	1
0	1028	6	1	12/3/97	225	41/90	45	0	1	0	0	1	0
3	2314	7	1	12/3/97	275	104/120	36	1	2	1	0	1	1
1	14	5	1	12/3/97	75	40/90	467	0	1	0	0	1	0
4	1758	5	1	12/26/97	1075	69/90	2135	0	0	1	2	0	1
6	1221	9	2	1/31/98	50	64/90	34	1	1	1	2	0	0
4	1699	6	2	1/31/98	25	54/90	50	0	0	1	0	0	1
9	272	5	1	1/31/98	75	57/90	223	3	1	0	2	0	0
2	2235	7	2	3/11/98	25	30/60	351	3	1	1	1	0	1
9		15	2	4/16/98	25	43/60	17	2	0	1	0	0	0
1	1622	11	1	3/11/98	75	23/60	142	3	1	1	0	0	1
4	771	7	2	4/16/98	50	33/60	240	0	1	1	0	0	1
2	577	12	1	4/16/98	100	51/60	371	1	0	0	0	0	0
0	994	5	2	5/19/97	325	55/90	171	1	1	1	0	0	1
5	710	4	2	5/19/97	75	63/90	669	1	1	1	1	2	1
5	1734	10	1	3/11/98	50	46/60	73	2	2	1	1	0	1
3	1845	5	1	1/31/98	50	66/90	38	3	2	0	1	1	1

MG = moustiques gorgés
ME = moustiques exposés

Cet tableau représente le résultat de l'amplification de l'ADN des gamétocytes (confettis chez l'homme) et de l'ADN des oocystes (chez le moustique).

1- DISCUSSION:

Nous avons travaillé sur 30 sujets. Le taux d'infection des porteurs de gamétocytes était de 100%. Tous les sujets inclus dans cette étude ont infecté les moustiques gorgés sur eux. Nous avons identifié les allotypes K1, MAD20 et RO33 chez l'homme et chez le moustique. Nous avons par ailleurs identifié des allotypes K1 et RO33 chez le moustique alors qu'aucun allotype n'avait été observé chez l'homme. Ces résultats sont conformes à ceux de Koita et *al.*, (1998) qui ont observé des hybrides MAD20/RO33 chez le moustique (oocyste) alors que ces hybrides n'ont pas été observés chez l'homme (sang sur papier filtre) auparavant.

Nous n'avons pas observé de différence significative entre les allotypes K1 et RO33 entre les deux hôtes ($X^2 = 2,82$ ddl = 5 et $P = 0,727$). A l'intérieur d'un même allotype, nous n'avons pas observé non plus de différence significative. Cependant l'allotype MAD20 apparaît en faible proportion chez le moustique $P < 10^{-6}$ (test exact de Fisher). Dans la recherche des associations d'allotypes, nous avons observé la fréquence la plus élevée (45%) de l'association K1-RO33 chez le moustique. L'association des trois allotypes (K1-MAD20-RO33) apparaît en faible proportion (15%) chez le moustique. La différence est statistiquement significative $P = 0,05$.

Nous avons par ailleurs observé la présence des trois allotypes (K1-MAD20-RO33) chez l'homme et observé chez le moustique gorgé sur ce sujet deux allotypes K1 et RO33. Donc MAD20 n'a pas été observé chez le moustique.

La cassure et le réarrangement des chromosomes durant la mitose d'après Appai et *al.* en 1989, la duplication des régions répétitives, la recombinaison des chromosomes homologues et non homologues durant la méiose chez l'anophèles selon Corcoran et *al.*, en 1988, sont générateurs de polymorphisme chez le parasite.

Ceci confirmerait nos résultats quand nous avons obtenu des allotypes K1 et RO33 chez le moustique alors qu'aucun allotype n'avait été observé dans le repas de sang original d'une part, et la présence des trois allotypes dans le repas de sang original et deux allotypes chez le moustiques.

Selon Tollé et *al.*, (1993) la réponse immunitaire est éphémère, spécifique de souche voire d'isolats et n'a pas de rôle protecteur contre la réinfestation. Ceci est le fait qu'il y avait une variabilité antigénique au cours des mois de transmission donc par échange de gènes durant la phase diploïde du parasite chez le moustique au cours de la sporogonie. Ceci atteste nos résultats quand nous avons observé une diversité allélique dans le repas de sang original (homme) et dans les oocystes (moustique).

L'allotype K1 est observé à 58,3% chez l'homme alors qu'il est de 41,7% chez le moustique. MAD20 est de 70,3% chez l'homme et de 29,6% chez le moustique. Quant à RO33, il a été observé 52,3% chez l'homme et 47,7% chez le moustique.

Les associations allotypiques ont aussi été observées chez l'homme et chez le moustiques, mais à des proportions différentes.

Nous n'avons pas déterminé la taille des souches observées. La sélection des souches de l'homme au moustique pourrait peut être s'expliquer par cette différence de taille. Car d'après Randford et *al.*, (1993) le polymorphisme de taille peut s'expliquer par les délétions et les insertions de bases qui se produiraient dans la séquence de l'ADN au cours de la mitose. Ce polymorphisme peut être également dû selon Sinnis et *al.*, (1988) à une recombinaison génétique par crossing-over.

2- Conclusion:

Notre étude nous permis de constater que les trois allotypes décrits par Tanabé et *al.*, (1987) se rencontrent chez le moustique (oocyste) après un repas sanguin sur le porteur de gamétocytes. Nous avons observé aussi une diversité allélique dans le repas de sang original (homme) et dans les oocystes (moustique).

ELEMENTS VACCINAUX

ELEMENTS D'IDENTIFICATION DE SITE D'ESSAI VACCINAL DU "TRANSMISSION BLOCKING VACCINE".

Après l'étude de l'épidémiologie du paludisme et la technique de l'infection directe supposée "infection dans les conditions naturelles" il serait intéressant de déterminer l'âge des enfants et la période de l'année pendant laquelle la transmission homme-vecteur du paludisme est plus marquée pour l'essai vaccinal à Bancoumana.

L'infection expérimentale des moustiques avec des gamétocytes de *Plasmodium* issus du réservoir naturel est possible suivant deux méthodes. La méthode directe consiste à gorgier des moustiques sur un échantillon représentatif de la population en ignorant la parasitémie; soit directement sur les sujets (Muirhead-Thomson et al., 1957); Gamage-Mendis et al., 1991; Githeko et al., 1992), soit par l'intermédiaire d'une cellule d'alimentation artificielle (Rutledge et al., 1964; Boudin et al., 1993). Le taux de moustiques infestés indique alors l'infectivité de la population. Une approche indirecte, mais plus simple dans la pratique, selon Graves et al., (1988) consiste à déterminer la probabilité K qu'a un moustique de s'infester en prenant un repas de sang sur un membre de la population. Dans ce cas, il faut au préalable rechercher les porteurs de gamétocytes et déterminer ainsi le réservoir potentiel infectant (l'indice gaméocytaire), puis infecter les moustiques seulement avec le sang de ces porteurs pour déterminer la susceptibilité des anophèles aux souches plasmodiales. Le facteur K est défini comme le produit de la prévalence gaméocytaire par le taux moyen de moustiques infestés.

Nous considérons les paramètres paludologiques de 1998 (Epidémiologie du paludisme...) et les taux moyens de moustiques infestés selon l'âge et la période (Variations saisonnières de l'infectivité...).

Ainsi les taux moyens des indices gaméocytaires suivant les saisons (février et Décembre = saison froide) = $(8,8 \pm 0,273)$ et (Juin-Août-Octobre = saison des pluies) = $(4,9 \pm 0,209)$ de 1998 seront multipliés par les taux moyens de moustiques infestés suivant les saisons et l'âge (4 - 9 ans = $63,4 \pm 2,53$; $81,9 \pm 2,53$) respectivement saison froide et saison des pluies et (10 -18 ans = $42,8 \pm 2,53$; $73,3 \pm 2,53$) du porteur de gaméocyte. Ce taux moyen de l'indice gaméocytaire (premier article de l'infection expérimentale en 1998) était de $9,2 \pm 0,310$ (tableaux 6-21). Cela nous permettra d'obtenir la probabilité pour un moustique d'élevage de s'infester en prenant le repas de sang sur un porteur de gaméocyte de Bancoumana.

Dans les conditions expérimentales:

Saison froide:

K_1 = Probabilité pour un moustique de s'infester pendant la saison froide dans les conditions expérimentales dans la population d'enfants de 4 – 9 ans à Bancoumana.

$$K_1 (4 - 9 \text{ ans}) = (0,099 \pm 0,00310) \times (0,0634 \pm 0,0253)$$

$$K_1 = 0,006 \text{ avec } (0,002 \leq K_1 \leq 0,008).$$

K_2 = Probabilité pour un moustique de s'infester pendant la saison froide dans les conditions expérimentales dans la population d'enfants de 10 – 18 ans à Bancoumana.

$$K_2 (10 - 18 \text{ ans}) = (0,099 \pm 0,00310) \times (0,0428 \pm 0,0253)$$

$$K_2 = 0,004 \text{ avec } (0,001 \leq K_2 \leq 0,006)$$

Saison des pluies:

K_3 = Probabilité pour un moustique de s'infester pendant la saison des pluies dans les conditions expérimentales dans la population d'enfants de 4 – 9 ans à Bancoumana.

$$K_3 (4 - 9 \text{ ans}) = (0,099 \pm 0,00310) \times (0,0819 \pm 0,0253)$$

$$K_3 = 0,008 \text{ avec } (0,005 \leq K_3 \leq 0,010)$$

K_4 = Probabilité pour un moustique de s'infester pendant la saison des pluies dans les conditions expérimentales dans la population d'enfants de 10 – 18 ans à Bancoumana.

$$K_4 (10-18 \text{ ans}) = (0,099 \pm 0,00310) \times (0,0731 \pm 0,0253)$$

$$K_4 = 0,007 \text{ avec } (0,004 \leq K_4 \leq 0,010)$$

Dans l'étude des variations saisonnières de l'infectivité des porteurs de gamétocytes pour *Anopheles gambiae*, nous avons travaillé sur 372 volontaires. En admettant que cet échantillon soit représentatif de la population en terme de réservoir infectant, l'exploitation épidémiologique de ces résultats peut être envisagé au niveau de l'ensemble de la population de Bancoumana.

Ainsi, la prévalence gamétocytaire déterminée au cours des passages transversaux de 1998 était de $8,8 \pm 0,273$ en saison froide et de $4,9 \pm 0,209$ en saison des pluies. En multipliant ces paramètres par la proportion moyenne de moustiques qui s'infestent en prenant un repas de sang sur un porteur de gamétocytes et suivant son âge (Epidémiologie du paludisme...) $63,4 \pm 2,53$ et $42,8 \pm 2,53$, nous obtenons la probabilité naturelle K_{1-1} pour un moustique de s'infester en prenant un repas de sang sur un membre quelconque de la population de Bancoumana.

Dans les conditions naturelles:

Saison froide:

K_{1-1} = Probabilité pour un moustique de s'infester pendant la saison froide dans les conditions naturelles dans la population d'enfants de 4 – 9 ans à Bancoumana.

$$K_{1-1} (4 - 9 \text{ ans}) = (0,088 \pm 0,00273) \times (0,0634 \pm 0,0253)$$

$$K_{1-1} = 0,005 \text{ avec } (0,003 \leq K_{1-1} \leq 0,007)$$

K_{2-2} = Probabilité pour un moustique de s'infester pendant la saison froide dans les conditions naturelles dans la population d'enfants de 10 – 18 ans à Bancoumana

$$K_{2-2} (10-18 \text{ ans}) = (0,088 \pm 0,00273) \times (0,0428 \pm 0,0253)$$

$$K_{2-2} = 0,003 \text{ avec } (0,001 \leq K_{2-2} \leq 0,006)$$

Saison des Pluies:

K_{3-3} = Probabilité pour un moustique de s'infester pendant la saison des pluies dans les conditions naturelles dans la population d'enfants de 4 – 9 ans à Bancoumana.

$$K_{3-3} (4 - 9 \text{ ans}) = (0,049 \pm 0,00209) \times (0,0819 \pm 0,0253)$$

$$K_{3-3} = 0,004 \text{ avec } (0,002 \leq K_{3-3} \leq 0,005)$$

K_{4-4} = Probabilité pour un moustique de s'infester pendant la saison des pluies dans les conditions naturelles dans la population d'enfants de 10 – 18 ans à Bancoumana.

$$K_{4-4} (10 - 18 \text{ ans}) = (0,049 \pm 0,00209) \times (0,0731 \pm 0,0253)$$

$$K_{4-4} = 0,003 \text{ avec } (0,002 \leq K_{4-4} \leq 0,005)$$

La probabilité K_{1-1} dans les conditions naturelles est inférieure à celle des infections expérimentales dans les deux groupes d'âge tant pendant la saison froide que la saison des pluies. Mais il est à noter que cette probabilité naturelle dans les deux groupes d'âge est 2 fois plus faible pendant la saison des pluies à celle des infections expérimentales pendant la même période. Dans tous les cas notre probabilité naturelle obtenue est 3 à 4 fois plus faible que celle trouvée par Graves et al., (1988) en Papouasie (Nouvelle Guinée) qui est une zone endémique palustre. Nous avons travaillé exclusivement sur *Plasmodium falciparum*, alors que Graves et al., (1988) ont obtenu 0,012 pour les trois espèces plasmodiales (*P. falciparum*, *P. malariae* et *P. vivax*).

Il est remarquable de constater que quoique faible (inférieure à 1%), notre probabilité K_{1-1} (dans les conditions naturelles) indique que la transmission homme-vecteur est suffisante pour rendre la transmission effective à Bancoumana.

Nous savons qu'au cours de sa vie adulte, l'anophèle prend un repas de sang tous les 2 ou 3 jours selon son cycle gonotrophique. Ce qui augmente ainsi les possibilités de s'infester. Ce facteur K_{1-1} doit donc être multiplié par le nombre de piqûres en tenant compte de la longévité du moustique pour avoir la probabilité pour un moustique de s'infester au cours de sa vie adulte. C'est donc à l'occasion des repas de sang sur d'autres sujets infectants qu'ont lieu les surinfestations. Ces repas de sang supplémentaires constituent en outre un apport nutritionnel pour le développement des oocystes déjà formés (Ponnudurai et al., 1989).

Nous avons défini l'infectivité des porteurs de gamétocytes comme le pourcentage d'infection des anophèles et non par rapport à la densité des oocystes. D'une part, parce que le nombre d'oocyste par estomac est d'une très grande variété et d'autre part, parce que un moustique ayant un seul oocyste dans son estomac est capable de transmettre la maladie (Ponnudurai et al., 1991). Ainsi l'éclatement d'un oocyste peut libérer une dizaine de milliers de sporozoïtes (Pringle, 1965; Rosenberg et Rungsiwongse, 1991), alors que 10 sporozoïtes pour *P. falciparum* et 1000 sporozoïtes pour *P. berghei* suffisent pour transmettre la maladie à l'hôte vertébré (OMS, 1987). En 1989, Ponnudurai et al.,

ont estimé à 500 et 1900 le nombre moyen de sporozoïtes libérés lors d'une piqûre d'anophèle pour des densités de 7800 et 53000 sporozoïtes par moustique respectivement. Le pourcentage de moustiques infestés est donc un critère plus expressif d'évaluation de l'infectivité que la densité oocystique.

Conclusion:

L'efficacité d'un vaccin antigamétocyte et antigamète doit donc être évaluée par rapport à sa réduction du taux d'anophèles infestés.

Au regard donc de nos résultats, nous recommandons de focaliser les interventions en cas de découverte d'un éventuel vaccin contre le paludisme, sur les sujets d'âge compris entre 6 mois et 18 ans et pendant la saison des pluies reconnue comme saison de transmission intense dans le village de Bancoumana.

REFERENCES :

- 1- Boudin C., Olivier M., Molez J.F., Chiron J.P., Ambroise Thomas . (1993). High human malarial infectivity to laboratory-bred *Anopheles gambiae* in a village in Burkina Faso. *Am.J. Trop. Med. Htg.*, **48** : 700-6.
- 2- Gamage-Mendis A.C., Rajakaruna J., Carter R., Mendis K.N. (1991): Infectious reservoir of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria in an endemic region of Sri Lanka. *Am. J.Trop.Med. Hyg.*, **45** :479-87.
- 3- Githeko A.K., Branding-Bennet A.D., Beier M., Atieli F., Owaga M., Collins F.H : (1992): The reservoir of *Plasmodium falciparum* malaria in a holoendemic area of Western Kenya. *Trans. Roy> Soc. Trop. Med. Hyg.*, **86** : 355-8.
- 4- Graves P.M., Burkot T.R., Carter R., Cattani J.A., Lagog M., Parker J., Brabin B.J., Gibson F.D., Bradley D.J., Alpers M.P (1988a) : Measurement of malaria infectivity of human populations to mosquitoes in the Madang area, Papua, New Guinea . *Parasitology* ; **96** :251-63.
- 5- Graves p.M., Carter R., Burkot T.R., Quakyi I.A., Kumar N.K., (1988b) : Antibodies to *Plasmodium falciparum* gamete surface antigens in Papua New Guinea sera. *Parasite immunology.*, **10** : 208-15.
- 6- Mendis K.N., Naoutunne T. De S., Karunaweera N. D., Del Giudice G., Grau G.E., Carter R.(1990) : Anti-parasite effects of cytokines in malaria. *Immunology Letters*, **25** : 217 – 20.
- 7- Muirhead-Thomson R. C. (1957): The malaria infectivity of an african village poulation to mosquitoes (*Anopheles gambiae*): A random xenodiagnostic survey. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **6** : 971-9.
- 8- OMS, Série de rapports techniques (1987) : Biologie des Plasmodies. *Rapport d'un groupe scientifique de l'OMS*. N^o : **743**.
- 9- Ponnudurai T., Lensen A.H.W., Van Gemeri G.J.A., Bensink M.P.E., Bolmer M., Meuwissen J.H.E.Th (1989a): Infectivity of cultured *Plasmodium falciparum* gametocytes to mosquitoes. *Parasitology*, **98** : 165-73.
- 10- Ponnudurai T., Lensen A.H.W., Van Gemeri G.J.A., Bensink M.P.E., Bolmer M., Meuwissen J.H.E.Th (1989b) : Sporozoite load of mosquitoes infected with *Plasmodium falciparum*. *Trans. Roy. Soc. Tro. Med. Hyg.*, **83** : 67-70.
- 11- Ponnudurai T., Lensen A.H.W., Van Gemeri G.J.A., Bensink M.P.E., Bolmer M., Meuwissen J.H.E.Th (1991): Feeding behaviour and sporozoite injection by infected *Anopheles stephensis*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **85** :175-80.

- 12- Pringle G (1965) : A count of the sporozotes in an oocyst of *Plasmodium falciparum*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **59** : 289-90.
- 13- Rosenberg R., Rungsiwongse J (1991) : The number of sporozoites produced by individual malaria oocysts. *Am. J.Trop..Med..Hyg.*, **45** :574-7.
- 14- Rutledge L.C., Ward R.A., Gould D.J (1964) : Studies on the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder. *Mosquito News.*, **24** :401-19.
- 15- Tchuinkam T (1994) : Etude du pouvoir infectant des porteurs de gamétocytes de *Plasmodium falciparum* pour *Anopheles gambiae* en zone d'endémie palustre, Yaoundé (Cameroun)., *Thèse, docteur 3^{ème} cycle en Biologie Animale.*

CONCLUSION

CONCLUSION GENERALE:

La détermination des paramètres épidémiologiques de la transmission du paludisme à Bancoumana nous a permis de savoir que le village est une zone d'endémie palustre.

Bancoumana est une zone d'endémie palustre, certes, mais la résistance parasitologique la plus élevée (26,1%) qui a été observée en Septembre-Octobre (fin de saison des pluies) permet de maintenir la chloroquine comme antimalarique de premier choix dans ce village.

L'étude de la clonalité et de la morbidité a montré qu'il n'existe pas de différence statistiquement significative entre les allotypes observés à des périodes différentes de l'année quant à la fréquence de l'anémie ($P = 0,48$). L'association clonalité et accès palustre a montré que les sujets porteurs de l'allotype K1 (6,2%) étaient fréquemment victimes d'accès simple.

Etude du pouvoir infectieux des porteurs de gamétocytes:

Pour tester efficacement un vaccin capable de bloquer la transmission du paludisme, nous avons déterminé certains paramètres parasitologiques et en particulier l'infectivité des porteurs de gamétocytes pour tester la reproductibilité des résultats déjà obtenus (Touré *et al.*, 1998).

Les indices plasmodiques et gamétocytiques observés entre 1996 et 1998 étaient comparables à ceux enregistrés au cours de l'enquête préliminaire. Les données ont confirmé le caractère intense et saisonnier de la transmission du paludisme à Bancoumana.

Il existe une différence hautement significative entre les indices plasmodiques ($P < 10^{-6}$) d'une part, et gamétocytiques ($P = 1,8.10^{-5}$) d'autre part en fonction des saisons de transmission.

Le faible taux de l'indice gamétocytique en 1998 pourrait certes s'expliquer par la faible pluviométrie enregistrée (879,7 mm); mais la quantité de pluie ne saurait expliquer la différence entre l'indice plasmodique de 1996 (1019,9 mm de pluie) et celui de 1997 (1243,2 mm de pluie). Paradoxalement, alors que les paramètres cliniques (l'incidence, le nombre d'accès, de cas graves, de chloroquino-résistances ou d'échec thérapeutique) (résultats non présentés) étaient plus élevés en 1997 qu'en 1996 et 1998, nous y avons enregistré les plus faibles taux de l'indice plasmodique.

Cette diminution des taux serait consécutive au traitement chimiothérapeutique institué.

La comparaison entre l'infection directe et l'infection sur membrane à sang non lavé avait pour but d'évaluer la performance de la seconde technique dans les conditions des essais vaccinaux à cause des problèmes d'éthique que l'infection directe soulève.

Les facteurs hématologiques testés étaient le groupe sanguin ABO/Rh et les types d'hémoglobine. Les résultats expérimentaux ont montré que 89% des porteurs de gamétocytes étaient infectieux pour les moustiques. Le taux d'infectivité des gamétocytes était toujours supérieur à 80% quelque soit le type d'hémoglobine du porteur. En dépit de

la fréquence élevée des porteurs de l'hémoglobine AA dans l'échantillon, l'infectivité des gamétocytes ne variait pas significativement d'un type d'hémoglobine à un autre (OR= 0,64; 0,03-5,96).

Le lavage du sang avait pour but de mettre en évidence l'existence d'anticorps naturels capables de bloquer la transmission du paludisme et/ou une déficience en nutriments susceptibles de stimuler le développement des oocystes. La différence observée entre nos résultats et ceux d'autres auteurs serait liée soit à l'âge des porteurs de gamétocytes, du nombre de moustiques exposés et infectés qui était beaucoup plus important dans notre étude, du mode de transmission du paludisme qui est hyperendémique et saisonnier à Bancoumana alors qu'il est holoendémique mais non saisonnier dans le cas de Drakeley et *al.* 1998.

Tous les sujets inclus dans l'étude du polymorphisme de *P. falciparum* de l'homme au moustique ont infecté les moustiques gorgés sur eux. Nous avons identifié les allotypes K1, MAD20 et RO33 chez l'homme et chez le moustique.

Au regard donc de nos résultats, nous recommandons de focaliser les interventions en cas de découverte d'un éventuel vaccin contre le paludisme, sur les sujets d'âge compris entre 6 mois et 18 ans et pendant la saison des pluies reconnue comme saison de transmission intense du paludisme dans le village de Bancoumana.

ANNEXE

LISTE DES TABLEAUX :

	Pages
Tableau 1 : Répartition de la population de Bancoumana par âge/bloc selon le recensement de 1998 effectué par le DEAP	49
Tableau 2 : Répartition de la population de Bancoumana par passage de fin de période d'étude et par tranches d'âge de 1996 à 1998.	50
Tableau 3 : Températures moyennes minimales (Mn), maximales (Mx), et moyennes (My) mensuelles enregistrées à la station météorologique de Bamako-ville de 1996 à 1998.	51
Tableau 4 : Relevés pluviométriques de la station agro-météorologique du village de Bancoumana de 1996 à 1998.	53
Tableau 5 : Variations de l'indice plasmodique selon les passages transversaux de 1996 à 1998 à Bancoumana	56
Tableau 6 : Variations de l'indice gamétocytaire selon les passages transversaux de 1996 à 1998 à Bancoumana	57
Tableau 7 : Variations de l'indice splénique selon les passages transversaux de 1996 à 1998 à Bancoumana	58
Tableau 8 : Répartition du taux d'incidence annuel des cas de paludisme par tranches d'âge dans le village de Bancoumana de 1996 à 1998.	61
Tableau 9 : Répartition du taux de paludisme grave par tranches d'âge dans le village de Bancoumana de 1996 à 1998.	62
Tableau 10 : : Taux de mortalité de 1996 à 1998 dans la population d'enfants du village de Bancoumana.	62
Tableau 11 : Taux de mortalité de 1996 à 1998 dans la population d'enfants du village de Bancoumana.	63
Tableau 12 : Proportion annuelle des cas de résistance parasitologique observés par tranche d'âge dans la population d'étude de Bancoumana.	63
Tableau 13 : Répartition des allotypes rencontrés en fonction des passages transversaux à Bancoumana.	64
Tableau 14 : : Répartition des allotypes en fonction de l'accès palustre dans la population d'enfants de Bancoumana	65

Tableau 15 : Répartition des allotypes en fonction des cas d'anémie dans la population d'étude du village de Bancoumana	66
Tableau 16 : Répartition des associations d'allotypes en fonction des cas de fièvre dans la population d'enfants de Bancoumana.	66
Tableau 17 : Répartition des allotypes en fonction des classes de parasitémie dans la population d'enfants à Bancoumana	67
Tableau 18 : Variations des indices plasmodiques durant les mois d'étude de l'infection expérimentale à Bancoumana de 1996 à 1998.	73
Tableau 19 : Variations des indices gamétocytiques durant les mois d'étude de l'infection expérimentale à Bancoumana de 1996 à 1998.	74
Tableau 20 : Infectivité des porteurs de gamétocytes en fonction de l'âge des enfants de Bancoumana.	75
Tableau 21 : Infectivité des porteurs de gamétocytes en fonction des périodes de l'année au cours de l'infection expérimentale à Bancoumana.	76
Tableau 22 : Comparaison du taux de moustiques gorgés en infection directe et en infection sur membrane	80
Tableau 23 : Comparaison du taux d'infection des moustiques en infection directe et en infection sur membrane avec du sang non lavé.	81
Tableau 24 : Différents types d'hémoglobines observé entre 1996 et 1998 et leur relation avec l'infectivité des moustiques à Bancoumana.	84
Tableau 25 : Niveau d'infectivité des moustiques selon que l'hémoglobine est normale ou pathologique.	84
Tableau 26 : Les groupes sanguins observés dans les systèmes ABO entre 1996-1998 : relation avec le niveau d'infectivité des gamétocytes.	85
Tableau 27 : Relation entre l'infectivité chez les porteurs de gamétocytes et le groupe-Rhésus.	85
Tableau 28 : Taux d'infectivité selon que les porteurs de gamétocytes appartenaient au groupe sanguin O ou autre dans le système ABO.	86
Tableau 29 : Infectivité des gamétocytes en fonction de la charge gamétocytaire au cours de l'infection expérimentale.	86
Tableau 30 : Résultats de la recherche d'anticorps anti-Pfs25 chez les porteurs de gamétocytes.	93

Tableau 31 : Sujets n'ayant pas infecté les moustiques (présentant un caractère bloquant la transmission) au cours des types de repas. **93**

Tableau 32 : Répartition des allotypes chez l'homme et le moustique observée au cours de l'infection expérimentale à Bancoumana.

Tableau 33: Résultats de l'amplification des gamétocytes (sang sur papier filter) et des oocystes (dissection des moustiques): Polymorphisme de *P. falciparum*. **98**

LISTE DES FIGURES :

	Pages
Figure 1 : Température moyennes (My) mensuelles enregistrées à la station météorologique de Bamako-ville de 1996-1998	52
Figure 2 : Quantité de pluies (mm) mensuelles de 1996 à 1998 : Station agro-météorologique de Bancoumana	54
Figure 3 : Variation de l'IG moyen selon les passages transversaux de 1996 à 1998 à Bancoumana	57
Figure 4 : Variation des IS selon les passages transversaux de 1996 à 1998	59
Figure 5 : Variation de la moyenne des indices plasmodiques en fonction des mois et des passages à Bancoumana	60
Figure 6 : Fréquence des allotypes rencontrés en fonction des passages transversaux à Bancoumana	65
Figure 7 : Rélation entre le taux d'infection des moustiques et la technique utilisée	79
Figure 8 : Rélation entre le groupe sanguin Rh du porteur de gamétocytes et le repas de sang des moustiques	87
Figure 9 : Distribution de la densité gamétaire et l'infection des moustiques selon le type de repas	90
Figure 10 : Nombre de moustiques infectés suivant le nombre d'infections expérimentales (porteurs de gamétocytes) en fonction du type de repas	91
Figure 11 : Rélation entre l'âge du porteur de gamétocytes et l'infection en oocyste en fonction du type de repas	92
Figure 12 : Répartition des associations d'allotypes chez l'homme et le moustiques	96

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

- 1- Adagu I. S., Warhurst D. C., Ogala W. N., Aguye I., Audu L., Bamgbola F. O., Ovwigho U. B. (1995): Antimalaria drug resistant of *Plasmodium falciparum* from Zaire, Nigéria. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 89 (4) :422-5.
- 2 - Ade-Serrano M. A et al. (1981): Correlation of *Plasmodium falciparum* gametocytemia with complement titers in rural Nigerian school children. *Journal of clinical microbiology*, 13: 195-8.
- 3 - Alano P. (1991): *Plasmodium* sexual stage Antigens *Parasitology Today*, 7: 199-203.
- 4 - Allison J. L., O'Brien R.L., Hahn F.E. (1965): DNA: Reaction with chloroquine., *Science*. 149: 1111-13.
- 5 - Al-Yaman. F., Genton B., Reeder J., Anders R., Smith T. and Alpers M. P; (1997): Reduced risk of clinical malaria in a highly endemic area in children infected with multiple clones of *Plasmodium falciparum*: a prospective community study. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg*; 91: 602-5.
- 6 - Atlas-Jeune Afrique; le Mali: *Les éditions Jeune Afrique* (1981).
- 7 - Babiker H. A., Creasey A. M., Bayoumi R. A.L., Walliker . D., Arnot D. (1991): Genetic diversity of *P. falciparum* in a village in eastern Sudan: drug resistance, molecular karyotypes and the *mdr1* genotype of recent isolates. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg*; 85: 578-3.
- 8 - Ballou W. P., Sherwood J. A., Neva F. A., Gordon D. A., Wirtz R. A., Wasserman G. F., Diggs C. L., Hoffman S. L., Hollingdale M. R., Hockmeyer W. T., Schneider I., Young J. F., Reeve P., Chulay J. D. (1987): Safety and efficacy of recombinant DNA *P. falciparum* sporozoite vaccine. *Lancet*, I: 1277-78.
- 9 - Barker R. H. (1986): Specific DNA probe for diagnosis of *P. falciparum* malaria. *Science*, 231: 1434-36.
- 10 - Barr P. J., Green K. M., Gibson H. L., Bathurst I. C., Quakyi I. A., Kaslow D. C. (1991): Recombinant Pfs25 protein of *Plasmodium falciparum* elicits malaria transmission-blocking immunity. *J. Exp. Med.*, 174: 1203-08.
- 11 - Beaudoin R. L (1974): *Plasmodium berghei*: ectopic development of the ANKA strain in *Anopheles stephensi*. *Experimental Parasitology*, 36: 189-91.
- 12 - Beck H. P., Felger I., Vounatsou P., Hirt R., Tanner M., Alonso P. and Menendez C. (1997): Effect of iron supplementation and malaria prophylaxis in infants on *Plasmodium falciparum* genotypes and multiplicity of infection. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med Hyg.* 93 (Suppl 1), S1/41- S1/45.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

- 1- Adagu I. S., Warhurst D. C., Ogala W. N., Aguye I., Audu L., Bamgbola F. O., Ovwigho U. B. (1995): Antimalaria drug resistant of *Plasmodium falciparum* from Zaire, Nigéria. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 89 (4) :422-5.
- 2 - Ade-Serrano M. A et al. (1981): Correlation of *Plasmodium falciparum* gametocitemia with complement titers in rural Nigerian school children. *Journal of clinical microbiology*, 13: 195-8.
- 3 - Alano P. (1991): *Plasmodium* sexual stage Antigens *Parasitology Today*, 7: 199-203.
- 4 - Allison J. L., O'Brien R.L., Hahn F.E. (1965): DNA: Reaction with chloroquine.. *Science*. 149: 1111-13.
- 5 - Al-Yaman. F., Genton B., Reeder J., Anders R., Smith T. and Alpers M. P; (1997): Reduced risk of clinical malaria in a highly endemic area in children infected with multiple clones of *Plasmodium falciparum*: a prospective community study. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg*; 91: 602-5.
- 6 - Atlas-Jeune Afrique; le Mali: *Les éditions Jeune Afrique* (1981).
- 7 - Babiker H. A., Creasey A. M., Bayoumi R. A.L., Walliker . D., Arnot D. (1991): Genetic diversity of *P. falciparum* in a village in eastern Sudan: drug resistance, molecular karyotypes and the *mdr1* genotype of recent isolates. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg*; 85: 578-3.
- 8 - Ballou W. P., Sherwood J. A., Neva F. A., Gordon D. A., Wirtz R. A., Wasserman G. F., Diggs C. L., Hoffman S. L., Hollingdale M. R., Hockmeyer W. T., Schneider I., Young J. F., Reeve P., Chulay J. D. (1987): Safty and efficacy of recombinant DNA *P. falciparum* sporozoite vaccine. *Lancet*, I: 1277-78.
- 9 - Barker R. H. (1986): Specific DNA probe for diagnosis of *P. falciparum* malaria. *Science*, 231: 1434-36.
- 10 - Barr P. J., Green K. M., Gibson H. L., Bathurst I. C., Quakyi I. A., Kaslow D. C. (1991): Recombinant Pfs25 protein of *Plasmodium falciparum* elicits malaria transmission-blocking immunity. *J. Exp. Med.*, 174: 1203-08.
- 11 - Beaudoin R. L (1974): *Plasmodium berghei*: ectopic development of the ANKA strain in *Anopheles stephensi*. *Experimental Parasitology*, 36: 189-91.
- 12 - Beck H. P., Felger I., Vounatsou P., Hirt R., Tanner M., Alonso P. and Menendez C. (1997): Effect of iron supplementation and malaria prophylaxis in infants on *Plasmodium falciparum* genotypes and multiplicity of infection. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med Hyg.* 93 (Suppl 1), S1/41- S1/45.

- 25 - Clyde D. F., McCarty V. C., Miller R. M., Hornick R. B. (1973): Specificity of protection of immunized against sporozoite-induced *falciparum* malaria. *Am. J. Med. Sci.*, 266: 398-403.
- 26 - Clyde D. F., McCarty V. C., Miller R. M., Woodward W. E. (1975): Immunization of man against *falciparum* and *vivax* malaria by use of attenuated sporozoites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 24: 397-401.
- 27 - Dame J. B., Williams J. L., McCutchan T. F. (1984): Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*, 225: 593-9.
- 28 - Danis M., Mouchet J. (1991): Paludisme. *UREF. Ed. Ellipse/ AUPELF*, 239p.
- 29 - De Buck A., Swellengrebel N. H. (1935): On the seasonal longitivity of *Anopheles maculipennis* in Holland with reference to their ability to act as malaria vectors. *Compte rendu hebdomadaire des séances de l'Académie des Sciences de Paris*, 186: 329-31.
- 30 - Diallo M. 1996. *Plasmodium falciparum* au Mali: Epidémiologie, chimiorésistance et variabilité biologique; Mémoire de DEA de l'Institut Supérieur de Formation et de la Recherche Appliquée (ISFRA). Bamako – Mali.
- 31- Dolo A. (1996): Reponse immunitaire anti-TRAP (Thrombospondin Related Adhesive Protein) et la morbidité palustre dans une zone d'hyperendémie palustre au Mali (Afrique de l'Ouest). *Thèse de Recherche en Santé Publique, Université de ROME "LA SAPIENZA"*
- 32 - Druilhe P., Marchand C. (1989): From sporozoites to liver stages: The saga of the sporozoite vaccine. In McAdam K (ed) *New Strategies in Parasitology*. Churchill Livingstone, Edinburgh. 39-48.
- 33 - Färnert A., Snounou G., Rooth I. And Björkman A. (1997): Daily dynamics of *Plasmodium falciparum* subpopulation in asymptomatic children in a holoendemic area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 56: 538-47.
- 34 - Frabzén L. (1984): Analysis of clinical specimens by hybridization with probe containing repetitive DNA from *Plasmodium falciparum*; a novel approach to malaria diagnosis. *Lancet*, 1: 525-7
- 35 - Gamage-Mendis A. C., Rajakaruma J., Carter R., Mendis K. N (1991) : Infectious reservoir of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria in an endemic region of Sri Lanka. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 45 : 479-87.

- 36** - Gamage-Mendis A. C., Rajakaruna J., weerasinghe S., Mendis C., Carter R., Mendis K. N. (1993): Infectivity of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* to *Anopheles tessellatus*: relationship between oocyst and sporozoite development. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 87: 3-6.
- 37** - Githeko A. K., Brandling-Bennett A. D., Beier M., Atieli F., Owaga M., Collins F. H. (1992) : The reservoir of *Plasmodium falciparum* malaria in a holoendemic area of western Kenya. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86 : 355-8.
- 38** - Graves P. M., Burkot T. R., Carter R., Cattani J. A., Lagog M., Parker., Brabin B. J., Gibson F. D., Bradley D. J., Alpers M. P (1988a) : Measurement of malarial infectivity of human populations to mosquitoes in the Madang area, Papua, New Guinea sera. *Parasitology*, 96 : 251-63.
- 39**- Graves P. M., Carter R., Burkot T. R., Quakyi I. A., Kumar N. K (1988b) : Antibodies to *Plasmodium falciparum* gamete surface antigens in Papua New Guinea sera. *Parasite Immunology*, 10 : 208-15.
- 40** - Gad A. M., Maier W., Piekarski G. (1979): Pathology of *Anopheles stephensi* after infection with *Plasmodium berghei*. I. Mortality rate. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 60: 249-61.
- 41** - Guerin-Marchand C., Druilhe P., Galey B., Londono A., Patarapotikul J., Beaudouin R. L., Dubeaux C. Tartar A., Mercereau-Puijalon O., Langsley G. (1987): A live-stage-specific antigen of *Plasmodium falciparum* characterized by gene cloning. *Nature*, 329: 164-7.
- 42** - Guiguemde T. R., Sturchler D., Ouédraogo J. B., Drabo M., Etlinger H., Douchet C., Gbary A. R., Haller L., Kambou S., Fernex M. (1990): Vaccination contre le paludisme: premier essai avec un vaccin ant sporozoite, le (NANP)³-TT (RO 40-2361) en Afrique (Bobo- Dioulasso, Burkina Faso). *Bull. Soc. Path. Ex.* 83: 217-27.
- 43** - Herrington D. A., Davis J., Nardin E., Beier M., Cortese J., Eddy H., Losonsky G., Hollingdale M. R., Sztein M., Levine M., Nussenzweig R. S., Clyde., Edelman R. (1991): Successful immunization of humans with irradiated malaria sporozoites: Humoral and cellular responses of the protected individuals. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 45: 539-47.
- 44** - Hogg B, Gamage-Mendis A, Butcher GA, Thompson R, Begtrup K, Mendis C, Enosse SM, Dgedge M, Barreto J, Eling W, Sinden RE (1988): The differing impact of chloroquine and pyrimethamine/sulfadoxine upon the infectivity of malaria species to the mosquito vector : Feb. *Am J Trop Hyg* ; 58 (2) : 176-82.
- 45** - Hoffman S., Isenbarger D., Long G., Sedegah M., Szarfman A., Waters L., Hollingdale M. R., Meide P.H.V.D., Finbloom D. S., Ballou W.R.(1989): Sporozoite vaccine induced cells and their transformation into trophozoites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 32: 682-90.

- 46 - Hugues Contamin., Thierry Fandeur., Serge Bonnefoy., Fériel Skouri., Francine Ntoumi and Odile Mercereau-Pujalon (1995): PCR Typing of field Isolates of *Plasmodium falciparum*. *J. Clin. Microbiol.*, April; p.944-51.
- 47 - Kaslow D. C., Isaacs S. N., Quakyi I. A., Gwadz R. W., Moss B., Keister D. B. (1991): Induction of *Plasmodium falciparum* transmission blocking antibodies by recombinant vaccinia virus. *Sciences*, 252: 1310-2.
- 48 - Kaslow D. C. (1996): Malaria vaccine development : a multi-immune response approach. Hoffman S L, ed. *Transmission-Blocking Vaccines*. Washington, DC, *American Society of Microbiology*, 17 :181-228.
- 49 - Klein T. A., Harrison B. a., Grove J. S., Dixon S. V., Andre R. G. (1986): Correlation of survival rates of *Anopheles dirus* A (Diptera: Culicidae) with different infection densities of *Plasmodium cynomolgi*. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 64:901-7.
- 50 - Kun J. F. F., Schmidt-Ott R. J., Lehman L. G., Lell B., Lukner D., Greve B., Matousek. P and Kremsner P. G. (1998): Merozoite Surface Antigen 1 and 2 genotypes and rosetting of *Plasmodium falciparum* in severe and mild malaria in Lambaréné, Gabon. *Transaction of the royal Society of Tropical Medecine and Hygiene*. 92:110-4.
- 51 - Koïta. O (2000): Molecular studies of clonality, transmission and severe disease in malaria; *Thèse de PhD, Universté de Tulane, New Orleans*.
- 52 - Lensen A. H. W., Van Gemert G. J. A., Bolmer M. G., Meis J. F. G. M., Kaslow D., Meuwissen J. H. E. Th., Ponnudurai T. (1992): Transmission blocking antibody of the *Plasmodium falciparum* zygote/ookinete surface protein Pfs25 also influences sporozoite development. *Parasite Immunology*, 14: 471-9.
- 53 - Lines. J D., Wilkes. T J & Lyimo. E O (1991): Human malaria infectiousness measured by age-specific sporozoite rates in *Anopheles gambiae* in Tanzania. *Parasitology*. 102: 167-77.
- 54 - Mack S. R., Vanderberg J. P (1978): Hemolymph of *Anopheles stephensi* from noninfected and *Plasmodium bergeri*-infected mosquitoes. 1: Collection procedure and physical characteristics. *J. Parasitol.*, 64: 918-23.
- 55 - Mack S. R. et al. (1979): Hemolymph of *Anopheles stephensi* from uninfected and *Plasmodium bergeri*-infected mosquitoes. 2. Free Amino acids. *J. Parasitol.*, 65: 130-6.
- 56 - Mackey L. (1982): Diagnosis of *Plasmodium falciparum* infection in man: detection of parasite antigens by ELISA. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 60: 69-75.
- 57 - Maier W. a., Becker-Feldman H., Seitz H. M (1987): Pathology of malaria-infected mosquitoes. *Parasitology Today*, 7:216-8.

- 58** - Miller L. H. (1975): erythrocyte receptors for *Plasmodium Knowlesi* malaria: Duffy blood group determinants. *Sciences*. 189: 561-3.
- 59** - Miller L. H. (1977): Hypothesis on the mechanism of erythrocytes invasion by malaria merozoites. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 57: (suppl.): 37-52.
- 60** - Miller L. H. (1984): Perspectives for malaria vaccination. *Philosop. Trans. Roy. Soc. London. Series B.* 307: 99-116.
- 61** - Mitchell G. H., Richard W.H.G., Buther G. A., Cohen S. (1977): Merozoite vaccination of douroucouli monkeys against *falciparum* malaria. *Lancet I*: 1335-8.
- 62** - Muirhead-Thomson R. C (1957): The malarial infectivity of an african village population to mosquitoes (*Anopheles gambiae*) : A random xenodiagnostic survey. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 6 : 971-9.
- 63** - Meuwissen J H E T. (1989): Current studies related to the development of transmission-blocking malaria vaccines: a review (1989): *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83: supplement 57-60.
- 64** - Meuwissen J H E T & Ponnudurai T. (1986): Some aspects of Transmission Blocking Imunity reviewed. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 81, supplement 2, 69-75.
- 65** - Meuwissen J H E T., Ponnudurai T., Vermeulen A N. & Smits M (1985): Studies on the development of *P. falciparum* malaria vaccine for the introduction of transmission blocking immunity. In: *Proceedings of the Asia and Pacific Conference on Malaria*, Siddiqui. W A (editor). Hawaii: University of Hawaii, PP. 133-142.
- 66** - Motard A., Baccam D., Landau I. (1990): Temporary loss of *Plasmodium* gametocytes infectivity during schizogony. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 65: 218-20.
- 67** - Mons B. (1985): Synchronized erythrocytic schizogony and gametocytogenesis of *Plasmodium berghei* *in vivo* and *in vitro*. *Parasitology*, 91: 423-30.
- 68** - Naotunne T. De S., Karunaweera N. D., Giudice G. Del., Kularatne M. U., Grau G. E., Carter R., Mendis K. N. (1991): Cytokines kill malaria parasites during the infection crisis: extracellular complementary factors are essential. *J. Exp. Med.*, 173: 523-62.
- 69** - Nardin E. h., Nussenweig R. s., Altsuler R., Herrington D. A., Levine M., Murphy., Davis J., Bathurst I., Barr P., Romero P., Zavala F. (1990): Cellular and humoral immune response to a recombinant *P. falciparum* CS protein in sporozoites-immunized rodent and human volunteers. *Bull. Wrlld. Hlth. Org.*, 68 (suppl): 85-7.
- 70** - Nijhout M. (1979): *Plasmodium gallinaceum*: exflagelation stimulated by a mosquito factor. *Experimental Parasitology*, 48: 75-80.

- 71 - Nussenzweig R., Vanderberg J., Most H., Orton C. (1967): Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature*, 216: 160-2.
- 72 - Nussenzweig R. S., Nussenzweig V. (1984): development of sporozoite vaccines. *Trans. Roy. Soc. B307*: 117-128.
- 73 - Ntoumi F., Contamin H., Rogier C., Bonnefoy S., Trape J. F and Marcereau-Puijalon O; (1995): Age dependent carriage of multiple *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 alleles in asymptomatic malaria infections. *Am. J. Trop. Med Hyg*, 52: 81-8.
- 74 - Ouattara A. 1998. Diversité allotypique et morbidité palustre à *Plasmodium falciparum* à Bancoumana. *Thèse de Pharmacie, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université du Mali, Bamako, Mali*.
- 75 - OMS, Série de rapports techniques (1973): Chimiothérapie du paludisme et résistance aux antipaludiques: *Rapport d'un groupe scientifique de l'OMS*. N^o: 529.
- 76 - OMS. Série de rapports techniques (1982): Lutte Biologique contre les vecteurs de maladies. *Sixième rapport du Comité OMS d'experts de la biologie des vecteurs et de la lutte antivectorielle*. N^o: 679.
- 77 - OMS, Série de rapports techniques (1987): Biologie des Plasmodies. *Rapport d'un groupe scientifique de l'OMS*. N^o:743.
- 78 - Patarroyo M. E., Amador R., Clavijo P., Moreno A., Guzman F., Romero P., Tascon R., Franco A., Murillo L. A., Ponton G., (1988): A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *P. falciparum* malaria. *Nature*, 332: 158-62.
- 79 - Pringle G. (1965): A count of the sporozoites in an oocyst of *Plasmodium falciparum*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 59: 289-90.
- 80 - Ponnudurai T., Lensen A. H. W., Van Gemer G.J. A., Bensink M. P. E., Bolmer M., Meuwissen J. H. E. Th. (1989). : Infectivity of cultured *Plasmodium falciparum* gametocytes to mosquitoes. *Parasitology*, 98 : 165-73.
- 81 - Ponnudurai T., Lensen A.H.W., Van Gemer G.J.A., Bensink M.P.E., Bolmer M., Meuwissen J.H.E.Th (1989b) : Sporozoite load of mosquitoes infected with *Plasmodium falciparum*. *Trans. Roy. Soc. Tro. Med. Hyg.*, 83 : 67-70.
- 82 - Ponnudurai T., Lensen A.H.W., Van Gemer G.J.A., Bensink M.P.E., Bolmer M., Meuwissen J.H.E.Th (1991) : Feeding behaviour and sporozoite injection by infected *Anopheles stephensis*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 85 :175-80.

- 83** - Rieckman K. H., Carson P. E., Beaudoin R. L., Cassells J. S., Sell K. W. (1974) : Sporozoites induced immunity in man against an Ethiopian strain of *P. falciparum*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 68 : 258-9.
- 84** - Rieckman K. H., Beaudoin R. L., Cassells J. S., Sell K. W. (1979) : Use of attenuated sporozoites in the immunization of human volunteers against *falciparum* malaria. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 57 (suppl.1) : 261-6.
- 85** - Rieckman K. H., Carson P. E., Beaudoin R. L., Cassells J. S., Sell K. W (1974): Sporozoite induced immunity in man against an Ethiopian strain of *P. falciparum*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 68: 258-9.
- 86** - Rieckman K. H., Beaudoin R. L., Cassells J. S., Sell K. W (1979): Use of attenuated sporozoites in the immunization of human volunteers against *falciparum* malaria. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 57 (suppl.1): 261-5.
- 87** - Robert V., Boussinesq M., Boudin C., Conan H., Darriet F., Canevale P.(1987): Receptivité à *Plasmodium falciparum* d'*Anopheles gambiae* soumis à *Bacillus turingiensis* sérotype H14 ou à *B. sphaericus*. *Cahier ORSTOM, Série entomologie médicale et parasitologie*, 25: 63-8.
- 88** - Robert V., Verhave j. P., Ponnudurai T., Louwe L., Scholtens P., Carnevale P. (1988): study of the distribution of circumsporozoite antigens in *Anopheles gambiae*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 82: 389-91.
- 89** - Robert V., Canevale P., Mouchet J., (1989): Pyrethrinoid-impregnated bed nets in the malaria control strategy at community level. *Acta tropica*, 46: 267-8.
- 90** - Robert V., Verhave J. P., Carnevale P. (1990): *Plasmodium falciparum* infection does not increase the precocious mortality rate of *Anopheles gambiae*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 84: 346-7.
- 91** - Robert V., Canevale P. (1991): Influence of deltamethrin treatment of bed nets on malaria transmission in the Kou Valley, Burkina Faso. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 69: 735-40.
- 92** - Robson. K J., Dolo. A., Hackford. I R., Doumbo. O., Richards. M B., Keita. M M., Sidibe. T., Bosman. A., Modiano. D., Crisanti. A (1998): Natural polymorphism in the Thrombospondin-related Adhesive Protein of *P. falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58:81-9.
- 93** - Rosenberg R., Rungsiwongse J. (1991): The number of sporozoites produced by individual malaria oocysts. *Am. J. Trp. Med. Hyg.* 45: 574-7.
- 94** -Sakihama. N., Kimura. M., Hirayama. K., Kanda. T., Na-Bangchang. K., Jongwutiwes. S., Conway. D., Tanabe. K (1999): allelic Recombination and linkage disequilibrium within MSP-1 of *P. Falciparum*. *Military Medecine*, 131 Suppl., 1250-62.

- 95** - Shute P. G., Maryon M. (1954): The effect of pyrimethamine (Daraprin) on the gametocytes and oocysts of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 48: 50-63.
- 96** - Siddiqui w. a., Tam L. Q., Kramer K. J., Hui G. S. N., Case S.E., Yamaya K. M., Chang S. P., Chan E.B.T., Kan S. C (1987): Merozoite surface coat precursor protein completely protects Aotus monkeys against *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc. Nat. Acad. Sciences (USA)*, 84: 3014-8.
- 97** - Sinden R. E (1991): Asexual blood stages of malaria modulate gametocyte infectivity to the mosquito vector. Possible implications for control strategies. *Parasitology*, 103: 191-6.
- 98** - Smalley (1976): *Plasmodium falciparum* gametogenesis *in vitro*. *Nature*, 264: 271-272.
- 99** - Smalley M. E., Brown j. (1981): *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis stimulated by lymphocytes and serum from infected Gambian Children. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 75: 316-7.
- 100** - Snounou. G., Haddad. D., Mattei. D., Enamorado .I G., Figueroa. J., Stahl. S., Berzins. K (1999): Limited genetic diversity of *P. falciparum* in field isolates from Honduras. *Am. J. Tro. Med. Hyg.* 60: 30-4.
- 101**- Suhrbier A (1991): Immunity to liver stage of malaria, *Parasitol. Today*, 7 (7), 160-3
- 102** - Su X-Z., Heatwole V M., Weitheimer S P., Guinet F., Herrfeldt J A., Peterson D S., Ravetch J A., Wellem's T E. (1995): The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell* 82: 89-100.
- 103** - Touré A (1990): Evaluation de l'impact des rideaux imprégnés de perméthrine sur la transmission du paludisme en zone d'endémie soudanienne du Mali. *Thèse. Med. Bamako-ENMP*; N^o: 34.
- 104**- Yéya .T Touré, Ogobara Doumbo, Abdoulaye Touré, Mangara Bagayoko, Mouctar Diallo, Amagana Dolo, Kenneth D. Vernick, David B. Keister, Olga Muratova and David C. Kaslow .(1998) : Gametocyte infectivity by direct mosquito feeds in a area of seasonal malaria transmission : Implications for Bancoumana, Mali as a Transmission-Blocking vaccine site. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59 (3) , 481-6.
- 105** - Traoré S. (1995): Epidémiologie du paludisme en zone de savane sud soudanienne au Mali: le village de Pimpéréna dans la région de Sikasso de Juin 1992 à Septembre 1993. *Thèse. Med. Bamako-ENMP*; N^o:16.

106 -TCHUINKAM Timoléon (1993): Etude du pouvoir infectant des porteurs de gamétocytes de *Plasmodium falciparum* pour *Anopheles gambiae* en zone d'endémie palustre, Yaoundé (Caméroun). Thèse 3^{ème} cycle (Biologie animale).

107 - Vanderberg J. P. (1988). Gametocytogenesis. In: Malaria, principles and practice of malariology. Ed. Churchill Livingstone, Edinburg London Melbourne and New York. Vol. 1: 331-8.

108 - Wilson R. J. M. (1980): Serotyping *Plasmodium falciparum* malaria with S-antigens. *Nature*, 284: 451-2.

109 - Zavala F., Cochrane A. H., Nardin E. H., Nussenzweig R. S., Nussenzweig V. (1983): Circumsporozoite proteins of Malaria parasites contain a single immunodominant region with two or more identical epitopes. *J. Exp. Med.*, 157: 1947-57.