

PARASITOLOGIE

Biologie de la transmission homme-moustique du Plasmodium.

V. Robert (1) & C. Boudin (2)

(1) IRD - UR 077 paludisme afro-tropical et Groupe de recherche sur le paludisme de l'Institut Pasteur de Madagascar, B.P. 1274 Antananarivo 101, Madagascar. Tél:261 20 22 401 64. Fax:261 20 22 415 34.E-mail :robert@pasteur.mg

(2) IRD - UR 077 paludisme afro-tropical.Laboratoire de paludologie, B.P. 1386 Dakar, Sénégal.Tél:221 849 3535. Fax:221 832 4307.E-mail :boudin@ird.sn

Manuscrit n°2454a. "Parasitologie". Reçu le 8 juillet 2002. Accepté le 26 décembre 2002.

Summary: Biology of the man-mosquito transmission of Plasmodium.

The transmission of Plasmodium is a complex process that requires the encounter of three organisms: the parasite, the host and the mosquito vector. For a better understanding, the transmission of this parasite can be divided in four cyclical steps: 1) the development in man, including gametocytogenesis, 2) the transfer from man to mosquito, 3) the sporogonic development in the mosquito, 4) the transfer from mosquito to man. The present article proposes a review of these different aspects and focuses especially to recent biological knowledge on Plasmodium falciparum in the gametocytogenesis issues, infectivity of gametocytes, sporogonic development and natural factors limiting this development.

Résumé :

La transmission du Plasmodium est un processus complexe qui requiert la rencontre de trois organismes: le parasite, l'hôte vertébré et le moustique vecteur. Afin de faciliter sa présentation, on peut diviser la transmission de ce parasite en quatre phases cycliques: 1) le développement chez l'homme, incluant la gamétocytogénèse, 2) le passage de l'homme vers le moustique, 3) le développement sporogonique chez le moustique et 4) le passage du moustique vers l'homme. Le présent article passe en revue ces différents aspects en portant une attention particulière aux acquisitions biologiques récentes concernant Plasmodium falciparum dans les domaines de la gamétocytogénèse, de l'infectivité des gamétocytes, du développement sporogonique et des facteurs naturels limitant ce développement.

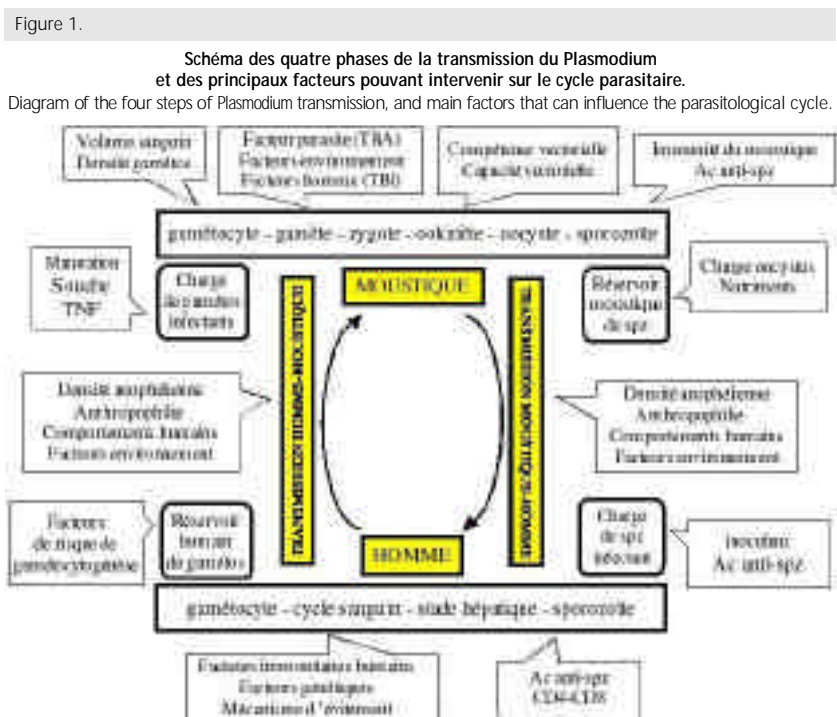
biology
malaria
Plasmodium falciparum
transmission
review

biologie
paludisme
Plasmodium falciparum
transmission
revue

Introduction

L'expression "transmission du paludisme" est parfois utilisée abusivement. Puisque la présence du parasite n'entraîne pas nécessairement le déclenchement de la maladie, c'est souvent de transmission du Plasmodium dont il est question.

Il est possible de diviser cette transmission en 4 phases cycliques: (i) le développement parasitaire chez l'homme, depuis la migration du sporozoïte vers le foie jusqu'aux gamétocytes, en passant par le cycle érythrocytaire asexué, (ii) la "transmission homme-moustique", considérant le réservoir humain infectant pour le moustique et l'ingestion des gamétocytes, (iii) le développement sporogonique chez le moustique, depuis les gamétocytes dans l'estomac du moustique jusqu'aux sporozoïtes dans les glandes salivaires, et (iv) la "transmission moustique-homme", depuis le réservoir de moustiques infectant jusqu'à l'inoculum sporozoïtaire (figure 1).



Le présent article envisage la transmission du *Plasmodium* du réservoir humain infectant pour le moustique jusqu'à l'achèvement du développement sporogonique. Une attention particulière est apportée aux acquisitions biologiques récentes dans les domaines de la gamétocytogénèse, de l'infectivité des gamétocytes, du développement sporogonique et des facteurs naturels limitant ce développement. Les informations sur *P. falciparum*, lorsqu'elles sont disponibles, seront privilégiées par rapport aux autres espèces plasmodiales.

Biologie des gamétocytes et du développement sporogonique

Gamétocytogénèse et gamétocytes

Définition

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

Origine des gamétocytes

Les gamétocytes de *P. falciparum* proviennent de stades sanguins asexués (172). On n'observe pas chez les *Plasmodium* humains de production de gamétocytes directement à partir des mérozoïtes hépatiques. Le nombre de gamétocytes est ordinairement très inférieur à celui des stades asexués, de l'ordre de 1 à 3 gamétocytes pour 100 trophozoïtes (45). Deux notions peuvent concourir à expliquer ce phénomène. D'une part, la densité de stades asexués, le plus souvent de 10 à 100 fois supérieure à celle des gamétocytes, monopoliserait la réponse immunitaire de l'hôte et donc protégerait les gamétocytes. D'autre part, une forte charge parasitaire pouvant être néfaste à la survie du vecteur, la transmission vectorielle nécessiterait une faible gamétocytémie (47, 184).

Les facteurs de risque de la gamétocytogénèse de *P. falciparum*

La gamétocytogénèse est à considérer comme un processus spontané qui accompagne une infection palustre. Cependant, toute modification environnementale occasionnant une situation de stress pour les formes asexuées circulantes peut être à l'origine d'une forte poussée gamétocytaire. Ceci fait dire que le gamétocyte est une forme d'évasion du parasite, d'un hôte hostile vers un autre hôte, par l'intermédiaire du moustique. Les facteurs de risque de la gamétocytogénèse sont très variés.

- Les fortes charges parasitaires asexuées sont ordinairement associées, avec un délai d'une semaine, à un pic de gamétocytémie. Il est possible que ces pics de gamétocytémie ne soient qu'une conséquence de la multiplication des formes asexuées à potentialité sexuée, mais il est également possible qu'une forte densité de stades asexués occasionne des désordres immunologiques ou inflammatoires à l'origine de poussées gamétocytaires. C'est probablement pourquoi un fort indice gamétocytaire est observé chez les jeunes enfants particulièrement sujets aux accès palustres à forte densité asexuée (190).
- L'anémie est aussi une situation de stress et s'accompagne souvent de poussées gamétocytaires (202).
- Un traitement à doses subcuratives peut être responsable d'une poussée gamétocytaire. Le parasite, qui a souffert sans être tué, oriente alors son développement vers la gamétocytogénèse. Une preuve expérimentale a été apportée avec la

chloroquine et *P. chabaudi* (25). L'augmentation de la gamétocytémie est également observée chez des patients inclus dans des tests de chloroquino-sensibilité *in vivo* dans le cas d'infections résistantes par rapport aux patients à infections sensibles (139, 144) ; cette réponse est proportionnelle au niveau de résistance, donc de souffrance parasitaire.

- On peut rapprocher de cette observation le traitement avec certains antimalariques à action lente comme le proguanil, ou la pyriméthamine ou l'association sulfadoxine + pyriméthamine qui, agissant avec un certain retard, peuvent favoriser la gamétocytogénèse (178).

- Certains médicaments ont un rôle direct sur la gamétocytogénèse. La chloroquine, comme les amino-4-quinoléines, est gamétocytocide sur les stades gamétocytaires jeunes (I à III), mais des observations récentes ont montré que ce médicament est également gamétocytogène (25, 26). L'association sulfadoxine + pyriméthamine est non seulement gamétocytogène, mais également sporonticide. Les dérivés de l'artémisinine sont fortement gamétocytocides (182). En particulier pour les nouvelles molécules antimalariques ou leurs nouvelles associations, il semble indispensable de connaître leur effet sur la gamétocytogénèse et la transmission, pour pouvoir les utiliser de façon optimale en santé publique. Actuellement, on privilégie beaucoup les associations médicamenteuses (67). Les combinaisons qui retiennent un dérivé de l'artémisinine présentent le considérable avantage d'inclure un composé gamétocytocide, propre à réduire le pic de gamétocytémie classiquement observé après le déclenchement d'un accès palustre (203).

- Le retard au traitement de l'accès palustre est probablement aussi un facteur de risque de la gamétocytogénèse, à cause de l'augmentation du temps de souffrance du parasite asexué avant traitement. Au contraire, une prise en charge très rapide et efficace de l'accès palustre ou des fortes charges parasitaires asexuées diminue fortement la gamétocytémie dans la population (178).

- Certaines souches sont probablement plus gamétocytogènes que d'autres (58). Mais ceci est très variable en fonction du temps. La culture continue de *P. falciparum* fait généralement perdre à la longue la capacité gamétocytogène (58, 125). Par contre, le passage régulier d'un hôte intermédiaire à un hôte définitif maintient cette capacité (20). Des souches ne produisant plus de gamétocytes après plusieurs passages chez un même hôte pourraient redevenir gamétocytogènes en changeant d'hôte.

La gamétocytogénèse

Les gamétocytes de *P. malariae*, *P. ovale* et *P. vivax* se développent en 1 à 3 jours et sont le plus souvent contemporains de la poussée asexuée qui leur a donné naissance. Par contre, la gamétocytémie de *P. falciparum* présente une longue période de maturation de 7 à 12 jours selon les auteurs (40), et les premiers gamétocytes matures apparaissent bien après la poussée asexuée initiale.

La culture des parasites sanguins de *P. falciparum* a permis de savoir que la gamétocytogénèse se réalise avec davantage de succès dans les réticulocytes (189). Elle a également autorisé la description de cinq stades au cours de la gamétocytogénèse. Le stade I est morphologiquement semblable à un trophozoïte, puis le gamétocyte s'individualise progressivement en prenant une forme allongée chez *P. falciparum* et arrondie chez les autres espèces, riche en pigment, avec un gros noyau unique. Le stade V de *P. falciparum* est le seul à être présent dans le sang périphérique. Il faut généralement un certain délai de 2 à 3 jours avant qu'un gamétocyte de stade V, nou-

vement apparu dans la circulation sanguine périphérique, soit infectant pour le moustique, au moins chez *P. falciparum*. La capacité d'exflageller signe la maturation physiologique du gamétocyte mâle. On considère que le gamétocyte, quel que soit son sexe, est haploïde (77).

Le sexe des gamétocytes

Les *Plasmodium* sont des parasites hermaphrodites. Les gamétocytes, mâles et femelles, sont discernables (i) par un cytoplasme coloré au Giemsa en rose pâle chez le mâle (il y a peu de ribosomes et de mitochondries) et en violet dense chez la femelle (il y a beaucoup de ribosomes, d'ARNm et de mitochondries); (ii) par la présence d'une alpha-tubuline II chez le gamétocyte mâle à partir du stade II et d'une protéine Pfg377 chez le gamétocyte femelle, présente dès le stade III. Des anticorps contre ces protéines ont été synthétisés et utilisés pour reconnaître, précocement et sans ambiguïté, les mâles et les femelles de *P. falciparum* (168, 177).

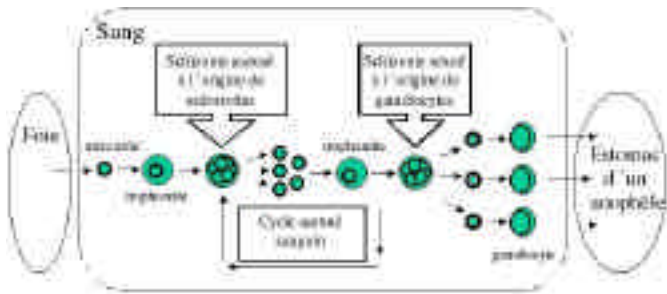
La présence de gamétocytes des deux sexes est indispensable pour le succès du développement sporogonique (29). Par définition, le sex-ratio désigne le rapport entre le nombre de mâles sur le nombre de femelles dans une population. Chez les *Plasmodium*, le sex-ratio est fortement biaisé vers davantage de gamétocytes femelles. Ordinairement, on observe un gamétocyte mâle pour trois ou quatre femelles, mais d'importantes variations ont été observées (130, 140, 141). Un gamétocyte mâle, après exflagellation, libère jusqu'à 8 gamètes mâles, alors qu'un gamétocyte femelle, après activation, se différencie en un unique gamète femelle. On comprend ainsi comment la forte proportion de femelles au stade gamétocyte occasionne un sex-ratio à peu près équilibré au stade gamète. Une facilitation de l'infécondité des gamétocytes a été observée pour les sex-ratios les plus élevés (140).

La différenciation sexuelle n'est pas le résultat d'un processus relevant d'un chromosome sexuel. La preuve en est apportée *in vitro* par le fait que des clones provenant d'un seul parasite asexué produisent à la fois des gamétocytes mâles et femelles. L'engagement dans la voie de la différenciation sexuelle intervient avant la maturation d'un schizonte (168). Tous les mérozoïtes issus de la descendance d'un seul schizonte deviennent soit mâles soit femelles (figure 2). Le nombre de gamétocytes produits par schizonte est égal pour les deux sexes. La forte proportion de gamétocytes femelles est due au fait que davantage de schizontes produisent des gamétocytes femelles (177). On a observé que le sex-ratio d'un clone est resté stable pendant 15 sous-cultures successives. Cela suggère que la valeur du sex-ratio pourrait être spécifique de clone. Dans le cas où l'autofécondation (*i.e.* la fécondation entre deux gamètes issus du même clone et génétiquement semblables) est la règle, les clones à forte proportion de gamétocytes femelles sont avantagés. À l'inverse, dans le cas où la fécondation intervient entre des gamètes de stocks génétiques différents, les clones à forte proportion de gamétocytes mâles sont avantagés (130, 207). Ceci s'explique par le fait qu'en zone de faible endémie, la transmission est un événement rare et une faible proportion de la population humaine est parasitée par un seul ou par un petit nombre de clones. Dans ces conditions, le taux d'autofécondation est très élevé (de l'ordre de 90 % en Guyane Française (4)) et favorise une forte proportion de gamétocytes femelles. Au contraire, en zone de forte endémie, la transmission est un événement fréquent; à tout moment, la quasi-totalité de la population humaine est parasitée par plusieurs clones. L'autofécondation est moins fréquente même si elle reste majoritaire, et la sélection favorise les clones à forte proportion de gamétocytes mâles.

Figure 2.

Schéma de la phase sanguine du cycle de *Plasmodium falciparum* (d'après réf. 168 et 177).

Diagram of the blood phase in the *Plasmodium falciparum* cycle (from ref. 168 et 177).



Il est à souligner que schizontes et gamétocytes en formation ne sont pas localisés dans le sang périphérique et que la descendance d'un schizonte sexué est d'un même sexe. It must be underlined that pre-schizontes and gametocytes are not localised in the peripheral blood, and that the individual schizonts committed to yield sexual parasite progeny produce gametocytes of the same sex.

En marge de cette régulation du sex-ratio sur le long terme, *P. falciparum* dispose aussi de mécanismes de régulation rapide du sex-ratio qui optimise le succès reproductif en fonction de la variabilité de l'environnement. Deux facteurs ont récemment été identifiés pour leur action sur le sex-ratio.

- Le premier facteur est l'anémie de l'hôte, associée à une forte proportion de gamétocytes mâles. L'érythropoïétine est l'hormone humaine synthétisée en réponse à une anémie. Elle stimule la production d'érythrocytes, et augmente la proportion de gamétocytes mâles (117). Cette régulation est interprétée comme favorable au succès reproductif du parasite à un moment où une situation de stress (l'anémie) apparaît. Une autre interprétation, également favorable au parasite, concerne le plus petit volume de sang, effectivement ingéré par repas sanguin, en cas d'anémie (183). La proportion supérieure de gamétocytes mâles rétablirait ainsi les chances de fécondation.
- Le second facteur est un pic de gamétocytémie, associé à une forte proportion de gamétocytes femelles, au moment de ce pic et pendant les deux semaines suivantes, au cours de la décroissance de la gamétocytémie (141). Cette régulation est interprétée comme favorable au succès reproductif du parasite lorsque le nombre de gamétocytes mâles ingérés par estomac de moustique n'est plus un facteur limitant, c'est-à-dire lorsque la proximité moyenne entre deux gamètes de sexe différent est alors suffisante pour que la rencontre des gamètes ait une issue favorable.

La séquestration des gamétocytes

Le développement des gamétocytes de *P. falciparum* des stades I à IV se fait dans des organes profonds du fait d'une cytoadhérence à l'endothélium des capillaires, en particulier ceux de la moelle osseuse. Seuls les stades V sont non adhérents et visibles dans la circulation sanguine périphérique. Le parasite peut clairement bénéficier de cette séquestration, parce que cette dernière évite, durant la période de formation du gamétocyte (qui est exceptionnellement longue pour un *Plasmodium*), le passage répété dans des tissus comme la rate, spécialisés dans la phagocytose.

Le mécanisme de séquestration diffère entre les formes sexuées et asexuées. La structure "knob" n'apparaît pas chez les jeunes gamétocytes (171, 174). *In vitro*, seuls les stades I et II de *P. falciparum* adhèrent au récepteur CD36 des cellules endothéliales (70).

La gamétocytémie

Potentiellement, toute personne infectée peut être un porteur de gamétocytes. En pratique, ceci se vérifie pour *P. malariae*, *P. ovale* et *P. vivax* (172), mais n'est pas systématique pour

P. falciparum. Toutes les souches de *P. falciparum* ne sont pas également gamétocytogènes, et toutes les poussées parasitaires asexuées n'entraînent pas obligatoirement une vague de gamétocytes. Les gamétocytes de *P. falciparum* apparaissent une dizaine de jours après la première poussée asexuée lors d'une primo-infection. Ensuite, les poussées de trophozoïtes ayant tendance à se renouveler, la gamétocytemie apparaît, elle aussi, par poussées successives. Cependant, il est admis que la proportion de mérozoïtes qui s'engagent vers la voie sexuée diminue progressivement avec le nombre de cycles asexués sanguins accomplis (78). C'est souvent au décours d'accès palustres que l'on observe des poussées gamétocytaires transitoires.

On estime ordinairement qu'il n'existe pas de périodicité circadienne de la gamétocytemie circulante mais, en l'état de nos connaissances, un tel phénomène ne peut être définitivement écarté (53).

La survie maximale d'un gamétocyte de *P. falciparum* est estimée à 3-4 semaines (176), et la période moyenne de circulation à 7,4 jours (45). Un sujet humain peut cependant présenter une gamétocytemie continue sur de longues périodes pouvant dépasser une année, même en absence de réinfection. La mortalité des gamétocytes n'apparaît pas constante, mais positivement liée à l'âge des gamétocytes. De plus, cette mortalité augmente lors de fortes densités de parasites asexués (45).

L'infektivité des gamétocytes

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

- le rôle inhibiteur de l'immunité naturelle bloquant la transmission chez certains porteurs,
- l'absence d'infektivité des gamétocytes de stade V encore trop jeunes,
- un mauvais rendement du développement gamétocyte-oocyste,
- l'impact d'un traitement préalable du porteur de gamétocytes par un sporonticide (comme sulfadoxine + pyriméthamine),
- un grand déséquilibre du sex-ratio des gamètes.

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

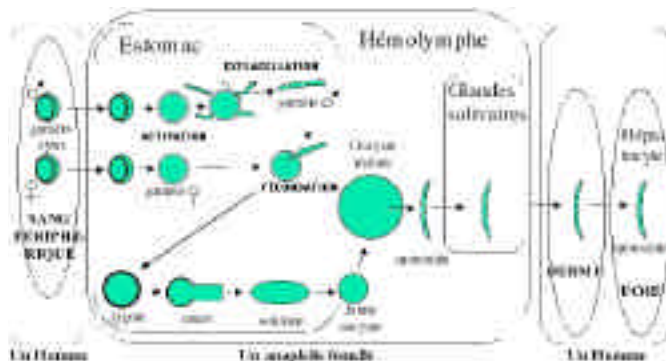
- la densité gamétocytaire est en dessous du seuil de détection du test ; la détection des gamétocytes peut alors être améliorée en faisant sécher rapidement la goutte épaisse, par exemple dans un four à micro-ondes (85) ou bien en utilisant la méthode QBC (103, 198) ou une technique PCR, le QT-NASBA (40, 108),
- d'anciennes publications font mention de la présence de gamétocytes dans le derme, ou dans le compartiment lymphatique (34, 191) ; il est alors imaginable que les moustiques puissent s'infecter sur ces sujets sans gamétocytes dans le sang circulant,
- la non-équivalence entre la densité gamétocytaire mesurée dans le sang capillaire et la densité ingérée par le moustique, notamment à cause d'une grande variabilité du volume sanguin ingéré par chaque moustique, ou du fait d'une agrégation des gamétocytes circulants (119),
- une dernière hypothèse pourrait être le décollement des gamétocytes durant la coloration de la goutte épaisse non fixée, comme cela a été observé pour les trophozoïtes de *P. falciparum* (24, 44, 166).

Le développement sporogonique

La phase sporogonique débute avec l'ingestion des gamétocytes au cours d'un repas de sang et se termine par l'éjection de sporozoïtes à l'extrémité du canal salivaire, également lors d'une autre piqûre (figure 3). Ce développement est une succession de phénomènes biologiques complexes qui peuvent être inhibés ou bloqués par une grande variété de mécanismes naturels. Le rendement entre gamétocyte et oocyste va généralement en diminuant progressivement (57) mais est compensé par la forte multiplication parasitaire entre les stades oocyste et sporozoïte.

Figure 3.

Schéma du développement sporogonique d'un Plasmodium.
Diagram of sporogonic development of Plasmodium.



Le gorgement des moustiques

La piqûre d'anophèle recouvre trois étapes qui sont liées mais qu'il faut bien distinguer : la pénétration des pièces buccales ("probing" des anglo-saxons), l'injection de salive contenant ou non des sporozoïtes, et le gorgement ("feeding").

Avec des mouvements alternés des mandibules et des maxilles, les pièces buccales vulnérantes pénètrent dans la peau de l'homme à la recherche d'un vaisseau sanguin. Le sang peut alors être ingéré soit par canulation directe d'un vaisseau sanguin, soit par pompage dans une micro-hémorragie due à la pénétration des pièces buccales (55, 63), avec une fréquence nettement supérieure pour la canulation (95, 136).

La salive est synthétisée par les glandes salivaires et est éjectée, via le canal salivaire, à l'extrémité distale de l'hypopharynx. Elle a des propriétés anticoagulantes, contient des enzymes digestives, a un effet vasodilatateur, et entraîne une inflammation locale. La salive du moustique est en grande partie réingérée, avec un grand nombre des sporozoïtes injectés (11). Le comportement de la piqûre d'anophèle avec des sporozoïtes dans les glandes salivaires est modifié, selon les espèces de vecteurs, et peut-être aussi selon l'espèce plasmodiale. On observe généralement une augmentation du temps de pénétration des pièces buccales, et/ou une augmentation de la fréquence des repas interrompus, favorables à la dissémination du parasite (80, 150, 151). Un anophèle femelle ingère en moyenne de 1 à 2µl de sang ainsi que les gamétocytes circulants, mais ce volume moyen est très variable d'une espèce à l'autre, et même d'un individu à l'autre.

La gamétogénèse

Dans les quelques minutes qui suivent l'ingestion par un moustique, les gamétocytes mâles et femelles réalisent une activation. L'aboutissement de ce processus désigne des cellules sphériques d'un volume supérieur à celui des gamétocytes, et leur libération dans le bol alimentaire du moustique après rupture de la membrane plasmique de leur hématie hôte. Les deux facteurs principaux qui induisent la gamétogénèse sont

la chute de température entre le sang chez l'homme et le contenu stomacal du moustique, et la présence de l'acide xanthurénique produit par l'estomac du moustique (19). Cet acide a également une action positive sur l'infectivité pour le vecteur (15). La variation de pH, entre le sang circulant et le sang ingéré, est maintenant considérée comme secondaire dans la gamétogénèse. L'intense duplication d'ADN nucléaire lors de la gamétogénèse se réalise sans condensation, c'est-à-dire sans formation de chromosomes individualisés. Pendant cette phase de transformation morphologique, une grande activité de synthèse protéique est observable. Certains antigènes apparaissent *de novo* à la surface de ces stades parasitaires. Ce sont généralement des antigènes communs avec le gamétocyte, qui s'extériorisent et deviennent accessibles aux anticorps spécifiques absorbés avec le repas sanguin. Il s'agit du Pfs48/45 (199), Pfs230 (30) et Pf11-1 (154, 155).

Les transformations sont profondément différentes selon le sexe. Les gamétocytes mâles réalisent une multiplication cellulaire initiée par la mise en place de 8 kinéosomes et suivis par trois mitoses successives aboutissant à la formation de 8 flagelles qui se détachent du corps globulaire du microgamétocyte activé (172). Ce phénomène a été nommé exflagellation. Il a été observé pour la première fois par LAVERAN (84), compris par SIMOND (169) et la preuve qu'il s'agissait bien de la gamétocytogénèse a été apportée par McCALLUM (92). Chaque gamète mâle contient essentiellement du matériel nucléaire et des organites de locomotion. Il ne contient en particulier aucune mitochondrie ni plastide (un plastide est un organite cytoplasmique semi-autonome dont le génome est présumé être originellement celui d'une cyanobactérie (208)). La gamétogénèse mâle est manifestement un processus complexe qui n'aboutit pas toujours favorablement, puisque jusqu'à 60 % des microgamètes seraient anormaux et anucléés (170).

Les gamétocytes femelles se bornent au processus d'activation sans multiplication cellulaire, si bien qu'un gamétocyte femelle produit un seul gamète femelle, appelé aussi macrogamète. Le cytoplasme du gamète femelle est riche en organites cellulaires et contient en particulier des mitochondries et un plasmide.

La fécondation

Les gamètes mâles nagent activement par des mouvements ondulatoires dans le bol alimentaire à la recherche d'un gamète femelle. Jusqu'à présent, aucun chimiotactisme ou signalisation, issus du gamète femelle, n'a été mis en évidence; mais il a déjà été suggéré qu'un tel mécanisme facilitant pourrait exister (69, 137).

La fécondation intervient une heure après la prise du repas sanguin. Il y a fusion des membranes plasmiques des deux gamètes; le noyau mâle ainsi que l'axonème mâle pénètrent dans le macrogamète. Les deux noyaux haploïdes, mâle et femelle, fusionnent et il y a formation d'un œuf diploïde ou zygote. Les deux génomes parentaux s'apparient. On parle de fécondation croisée si ces génomes sont différents et d'autofécondation s'ils sont identiques (*i.e.* provenant d'un même clone). Le typage moléculaire, réalisé sur les oocystes isolés un à un permet de distinguer ces deux types de fécondation (7, 129).

L'ADN du zygote est compartimenté en trois sous-ensembles: l'ADN nucléaire (quantitativement le plus important) dont l'origine est pour moitié en provenance du gamète mâle et pour moitié en provenance du gamète femelle, l'ADN des mitochondries et l'ADN du plastide. L'origine de l'ADN de ces deux derniers organites, ou ADN cytoplasmique, est radicalement différente de celle de l'ADN nucléaire. L'ADN

cytoplasmique provient exclusivement du gamète femelle. Comme cette hérédité perdue au fil des générations, on parle de transmission maternelle. Ce mode particulier de transmission doit être pris en compte dans l'analyse génétique des caractères définis par l'ADN des mitochondries et du plastide.

À l'intérieur de l'enveloppe nucléaire, le matériel génétique du zygote entreprend deux divisions. La première division intervient au stade zygote et la seconde intervient lors de la transformation retort-ookinète. Ces deux divisions permettent d'une part la recombinaison et le réassortiment par *crossing-over* des génomes parentaux et d'autre part un retour à l'haploïdie. On ne peut encore certifier s'il y a un seul, deux ou quatre génotypes par ookinète (et donc par oocyste qui en résulte) mais, dans l'état actuel de nos connaissances, on pense que le zygote passe par un stade tétraploïde avant la réalisation des deux divisions méiotiques, et c'est donc "quatre génotypes par ookinète" qui semble l'hypothèse la plus probable (94). On peut espérer que de futures recherches de génétique moléculaire sur un oocyste isolé ciblant des gènes à une seule copie par génome puissent rapidement trancher cette question. Le zygote est insensible aux facteurs du complément chez l'hôte invertébré susceptible. Cette résistance au complément disparaît si le stade parasitaire est soumis à une protéase, faisant suspecter l'acquisition d'une protéine de surface pendant la phase de formation des gamètes et des zygotes (64, 65).

L'ookinète

L'ookinète débute sa formation par un bourgeonnement du zygote en un point qui deviendra l'extrémité antérieure du complexe apical de l'ookinète. Ce bourgeonnement se poursuit jusqu'à ce que la totalité du contenu du zygote se retrouve dans l'ookinète. Le stade intermédiaire où le zygote garde une partie de sa substance et où l'ookinète n'est pas morphologiquement achevé est désigné "stade retort". Pour *P. falciparum*, le début du stade retort est observé vers 6-10 heures et l'ookinète est achevé vers 12-17 heures après le repas sanguin à 27 °C (138). L'ookinète a une forme allongée. C'est un stade mobile dont la finalité est de s'échapper de l'estomac du moustique avant d'être détruit par la digestion en cours. Durant sa maturation, l'ookinète synthétise et exprime à sa surface une protéine antigénique majeure, le Pfs25, tandis qu'il perd la capacité de produire les antigènes de gamètes Pfs48/45, Pfs230 et Pf11-1. Il sécrète des substances lytiques qui lui permettent de traverser les deux barrières physiologiques constituées par la matrice péritrophique (MP) et l'épithélium stomacal du moustique (ES).

L'ookinète est un stade mobile grâce à son complexe locomoteur, l'axonème formé d'alpha-tubuline. Les mécanismes qui favorisent la migration de l'ookinète sont encore inconnus. On pense que la MP comme l'ES présenteraient des récepteurs, reconnus par l'ookinète, lui permettant de se fixer et de déclencher sa sécrétion enzymatique destinée à lui frayer un passage. Ces mécanismes sont détaillés dans le paragraphe sur les facteurs limitant le développement sporogonique. L'ookinète poursuit son avancée dans l'espace entre la MP et l'ES puis il adhère aux cellules de cet épithélium (161). Il y a débat sur le mécanisme de reconnaissance du récepteur de traversée de l'ES. Les chaînes oligosaccharidiques à la surface des cellules digestives pourraient être des récepteurs pour la reconnaissance par l'ookinète de l'ES. La reconnaissance de ces chaînes serait favorisée par les lectines qui existent à la surface de l'ookinète. Des lectines artificielles ajoutées avec le repas sanguin bloquent l'adhérence des ookinètes à l'ES. Enfin, des anticorps expérimentaux anti-tube digestif du moustique peuvent empêcher, ou inhiber, l'infectivité du parasite pour le

moustique, peut-être en bloquant les récepteurs tissulaires de l'ookinète. Un autre récepteur pour l'ookinète a été évoqué, c'est le ligand pour l'antigène Pfs25 à la surface de l'ookinète. Les anticorps monoclonaux contre Pfs25 inhibent l'infectivité de *P. falciparum* (102).

Cette rencontre entre l'ookinète et le tube digestif survient principalement dans la zone distale de l'estomac par un effet de l'apesanteur. Si on maintient "à l'envers" le moustique, avec la tête en bas et l'abdomen en haut, c'est la portion proximale de l'estomac qui sera principalement le siège du développement des oocystes. Après cette rencontre, l'ookinète traverse de part en part la rangée de cellules épithéliales ou bien pénètre entre les cellules en arrêtant son mouvement alors qu'il rencontre la lame basale de l'épithélium stomacal. Le type de traversée est différent selon les espèces plasmodiales et cela explique que certaines espèces parasitaires soient plus traumatisantes que d'autres pour le moustique et puissent occasionner sa mort. L'ookinète de *P. gallinaceum* reconnaît et pénètre préférentiellement un type cellulaire stomacal mineur, dépourvu de microvillosités apicales et riche en vésicule d'ATPase, dénommé "Ross cells" et découvert chez *Aedes aegypti*, vecteurs de ce parasite (164). Ce type cellulaire n'existe pas chez les anophèles.

C'est entre les cellules épithéliales de l'estomac et leur lame basale que l'ookinète perd ses caractéristiques invasives et se transforme en un jeune oocyste, 24 à 36 h après le repas de sang.

L'ocyste

Le mécanisme moléculaire par lequel l'ookinète reconnaît avoir atteint son but (la lame basale) est encore inconnu. Soit l'ookinète est incapable de franchir la lame basale (incompétence enzymatique par exemple), soit il reconnaît un motif spécifique de cette lame basale qui déclenche l'arrêt de sa migration et sa transformation en oocyste (14). Cependant, la localisation naturelle de l'ocyste, entre les cellules de l'épithélium stomacal et la lame basale, n'est pas indispensable au bon déroulement de la maturation de l'ocyste. En effet, l'injection expérimentale d'ookinètes ou même de gamétocytes dans l'hémolymphe du moustique permet la formation d'ocystes matures sans lien de proximité avec l'estomac. La lame basale ne semble donc pas un site essentiel, même si elle reste importante pour le développement optimal de l'ocyste (8).

L'ocyste de *P. falciparum* est de forme sphérique. Il est le siège d'une duplication génomique qui se renouvelle sans isolement par des structures membranaires : c'est un syncytium. On estime qu'il y a 13 divisions mitotiques, synchrones dans l'ensemble d'un oocyste, aboutissant à la formation de quelque 8 000 sporozoïtes par oocyste ($2^{13} = 8 192$). En prélevant des nutriments dans l'hémolymphe du moustique, l'ocyste grossit régulièrement et atteint un diamètre de l'ordre de 20 à 60 μ au bout de 9 à 15 jours, selon la température extérieure. Dans l'ocyste âgé, des secteurs cytoplasmiques appelés sporoblastes apparaissent, dans la périphérie desquels se différencient les sporozoïtes. Au fur et à mesure de la formation des sporozoïtes, les sporoblastes perdent de leur substance et deviennent des structures résiduelles.

En dénombant les oocystes par estomac après une détection précoce par immunofluorescence contre l'antigène Pfs25, ou tardive par lecture optique, il a été possible d'estimer un taux moyen de survie des oocystes de 0,115 entre le 3e et le 8e jour après l'infection chez *An. arabiensis* (6). Ce taux moyen a été de 0,78 chez *An. gambiae* entre le 2e et le 7e jour (56, 57) suggérant une meilleure susceptibilité chez *An. gambiae* que chez *An. arabiensis*.

La protéine circumsporozoïtaire (CSP) est exprimée en grande quantité par l'ocyste dès le 9e jour de l'infection et est à la base d'un test ELISA pour révéler l'infection des moustiques (23, 27).

Dans une zone hyper-endémique de Tanzanie, ce nombre d'ocystes était généralement faible, 63 % des *An. gambiae* positifs en oocystes contenant entre 1 et 4 oocystes, 87 % contenant moins de 25 oocystes, et 3 % contenant plus de 100 oocystes (127). De fait, le nombre d'ocystes trouvés par estomac d'anophèles suit une distribution binomiale négative (120, 153).

Le sporozoïte

Les sporozoïtes peuvent sortir de l'enveloppe oocystique de deux façons, soit individuellement par effraction et ils laissent un trou de sortie dans la lame basale, bien visible en microscopie électronique à balayage, soit après la déchirure de cette enveloppe.

Les sporozoïtes sont libérés dans l'hémolymphe du moustique. On ne sait pas s'ils retrouvent le chemin des glandes par un phénomène de chimiotactisme. Pour *P. falciparum*, moins de 25 % d'entre eux atteignent les glandes salivaires (195); on ignore si les autres s'égarer dans les différents tissus du moustique ou s'ils sont activement éliminés par une réaction de défense du moustique (145). Pour *P. vivax*, 15 % des moustiques avec des oocystes échouent à développer des sporozoïtes dans les glandes salivaires (49).

Les sporozoïtes pénètrent préférentiellement dans les glandes salivaires au niveau du lobe médian et de l'extrémité distale des lobes latéraux. Ils passent à travers la lame basale de l'épithélium salivaire, puis traversent le cytoplasme des cellules (100). Enfin, ils pénètrent dans les acini où ils attendent d'être injectés avec la salive *via* le canal salivaire. Les sporozoïtes qui pénètrent dans les glandes salivaires dans la partie proximale des lobes latéraux semblent perdus pour la transmission car ils se trouvent bloqués par une barrière de chitine et ne peuvent atteindre le canal salivaire.

Les sporozoïtes n'adhèrent qu'au tissu des glandes salivaires, probablement par un mécanisme de reconnaissance d'un récepteur. Il a été démontré que des anticorps anti-glandes salivaires et des lectines pouvaient bloquer l'invasion des glandes par les sporozoïtes (9, 187). On sait en outre que le développement sporogonique *in vitro* nécessite une matrice artificielle riche en oligosaccharides (Matrigel™) (16). Il semble donc bien exister un récepteur tissulaire pour l'invasion des glandes par le sporozoïte. L'association lectines (parasitaires) - oligosaccharides (tissulaires) semble là encore un phénomène moléculaire essentiel à la reconnaissance épithéliale des sporozoïtes sur certaines régions des glandes salivaires (99, 112).

Seuls les sporozoïtes issus des oocystes sont capables d'envahir les glandes salivaires (188). Les sporozoïtes prélevés dans l'ocyste sont moins infectants que ceux des glandes salivaires (104). Ceci implique que des maturations successives dans l'ocyste puis dans les glandes salivaires sont importantes pour mettre en place les mécanismes moléculaires de ces adhérences successives dans les glandes et le foie.

La protéine circumsporozoïtaire (ou CSP) est une protéine antigénique majeure essentielle à la biologie des sporozoïtes. Le rôle de la CSP est multiple.

- Tout d'abord elle permettrait la survie du parasite lors de sa migration dans un environnement hostile chez l'homme et chez le moustique. Le manteau antigénique, constamment renouvelé, serait perdu par le parasite et servirait de leurre pour mobiliser les mécanismes de défense des sujets humains (179, 180).

- Cette protéine a aussi un rôle essentiel pour l'établissement de la polarité de l'oocyste et la maturation des sporozoïtes dans l'oocyste (97, 186).

- La région I de la CSP pourrait servir de ligand au récepteur tissulaire des glandes salivaires, favorisant l'invasion de ces glandes (167).

- Enfin, la CSP interviendrait sur l'inféctivité des sporozoïtes et, *via* sa région II, favoriserait l'invasion de l'hépatocyte (146, 181).

À la surface du sporozoïte, il existe une autre protéine, la Thrombospondine Related Adhesive Proteine (TRAP ou SSP2) qui a, elle aussi, un rôle essentiel pour la biologie des sporozoïtes (48, 97). La TRAP joue un rôle dans l'attachement du sporozoïte à l'hépatocyte (32, 35, 112, 146) et est impliquée dans la mobilité et dans le mécanisme de reconnaissance des cellules de l'épithélium des glandes salivaires (96, 206).

Le nombre de sporozoïtes présents dans les glandes salivaires est très variable. Il a été estimé entre une dizaine et plusieurs centaines de milliers, avec une médiane de l'ordre de 1000 sporozoïtes (12, 123, 124, 152). Dans les glandes salivaires, les sporozoïtes peuvent survivre au moins 39 jours et rester infectant pour l'hôte vertébré. En généralisant, on considère qu'un anophèle infecté reste infectant toute sa vie.

Il est probablement utile de souligner le fabuleux destin du sporozoïte. Il doit sortir de l'oocyste, traverser la lame basale, voyager dans l'hémolymphe, affronter les mécanismes de défense du moustique, traverser l'épithélium salivaire, un acinus et pénétrer dans le canal salivaire, attendre d'être injecté avec la salive dans la peau d'un homme, être véhiculé jusqu'au niveau du foie et traverser l'endothélium hépatique. Ce voyage d'une cellule unique ne peut aboutir sans motilité propre et sans profondes transformations biochimiques et antigéniques (14, 54, 121).

Le développement sporogonique complet a été réussi *in vitro* pour *P. gallinaceum* (204), pour *P. falciparum* (205) et récemment pour *P. berghei* (1). Les conditions de culture requièrent une lignée cellulaire de drosophile et du Matrigel™, structure synthétique mimant la lame basale d'un épithélium. Jusqu'à présent, ces exploits techniques ont connu étonnement peu d'implications, en fort contraste avec l'utilisation en routine du cycle asexué *in vitro* dès sa mise à disposition.

Au cours du développement sporogonique, chaque stade parasitaire constitue une cible pour un éventuel blocage naturel ou induit. De très nombreuses recherches envisagent cet aspect (156).

Les facteurs influant sur le déroulement du développement sporogonique

Les facteurs influençant le développement des *Plasmodium* chez l'anophèle sont nombreux (171, 172, 173). Ils peuvent dépendre : des conditions environnementales, du parasite, de l'homme et du moustique. Sauf mention contraire, seule l'espèce *P. falciparum*, la plus importante en santé humaine, sera considérée dans ces paragraphes.

Facteurs environnementaux

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

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

- La température influence la durée du développement sporogonique du parasite, la durée du développement pré-imaginal du vecteur et la survie de l'anophèle adulte. Au-delà de 35 °C et en deçà de 18 °C, le développement sporogonique de *P. falciparum* est stoppé ; aux températures de 20 °, 24 ° et 30 °C, il est respectivement de 20, 11 et 9 jours. L'espèce *P. vivax* supporte des températures plus modérées, jusqu'à 15 °C, et aux températures de 20 °, 24 ° et 30 °C, le développement sporogonique est respectivement de 16, 9 et 7 jours.

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

Facteurs liés au parasite

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

- La densité gamétocytaire a une influence sur l'inféctivité des porteurs de gamétocytes pour les moustiques. Il est connu depuis longtemps que les fortes gamétocytemies sont celles qui réussissent le mieux à infecter les moustiques, vraisemblablement parce que le rendement du développement sporogonique est mauvais entre gamétocyte et oocyste (57, 195). Cependant, il n'existe qu'une faible corrélation linéaire positive entre densité et inféctivité.

- Le sex-ratio des gamétocytes module le développement sporogonique. Il faut en général 3 à 6 fois plus de femelles que de mâles. Cette observation peut être importante, principalement dans le cas des faibles gamétocytemies (qui correspondent justement à des sex-ratios à forte proportion de mâles), ou quand le moustique ingère un petit nombre de gamétocytes et que le nombre de gamétocytes mâles est critique (116).

- L'âge des gamétocytes influence également le succès de l'inféctivité pour les moustiques. Les jeunes gamétocytes de stade V sont peu (ou pas) infectants. Il existe un délai de maturation infectante. *In vitro*, seules les cultures synchrones de gamétocytes morphologiquement matures depuis 4-9 jours ont la capacité d'infecter des moustiques, et présentent un maximum d'inféctivité sur deux jours consécutifs (87). On sait aussi que les gamétocytes présents dans la circulation périphérique depuis plus d'une semaine présentent une inféctivité réduite qui n'est pas due à la chute progressive de la densité gamétocytaire (74). Il est donc clair qu'il existe une période d'inféctivité maximale pour les gamétocytes, ni trop jeunes ni trop vieux.

- Les infections mixtes, très habituelles en zone d'endémie, sont plus nombreuses chez le moustique que ce que le calcul prédit sur la base des prévalences gamétocytaires spécifiques. Il semble donc exister une facilitation des infections pluri-spécifiques chez le vecteur (93).

- La distribution agrégée des gamétocytes pourrait favoriser l'infection chez le moustique, même si le repas sanguin a été réduit. Elle diminue la probabilité qu'un gamétocyte se retrouve isolé dans un repas de sang (119).

- Une forte parasitémie asexuée réduit parfois l'inféctivité des gamétocytes. Le mécanisme est inconnu. Il pourrait s'agir du rôle inhibiteur sur l'inféctivité de certaines cytokines, comme le TNF par exemple (86, 105), abondamment secrétées lors des poussées parasitaires asexuées. Mais ce phénomène n'existe que rarement dans les infections à *P. falciparum*, du fait du retard de maturation des gamétocytes par rapport à la poussée asexuée qui leur a donné naissance.

- L'apoptose est le dernier facteur récemment mis en évidence. Il joue un rôle important sur la réduction des parasites intra-stomacaux: plus de 50 % de ces stades de *P. bergheise* "suicident" avant la traversée de l'estomac d'*An. stephensi*(2).

Facteurs liés à l'Homme

Lors du repas sanguin, le moustique absorbe, en même temps que les gamétocytes, des facteurs sériques ou des cellules sanguines qui peuvent avoir un rôle sur le développement du parasite. Parmi ces facteurs inhibiteurs humains, certains existent naturellement chez l'homme sensibilisé vivant en zone d'endémie (anticorps anti-sexués, anticorps anti-sporozoïtes, cytokines, complément, cellules immuno-compétentes), d'autres peuvent être induits artificiellement par vaccination (anticorps contre Pfs25, anticorps contre les tissus de moustique). D'autres facteurs ne sont pas contenus dans le sang ingéré, mais sont quand même en relation avec la prise du repas sanguin. Les facteurs jugés essentiels sont listés ci-après en regard de leur rôle potentiel dans le bon déroulement du développement sporogonique.

- Les anticorps (Ac) anti-sporozoïtes

L'homme vivant en zone d'endémie synthétise des anticorps anti-sporozoïtes (73, 107, 110). Les IgG de l'hôte vertébré, ingérées au cours de n'importe quel repas sanguin par le moustique, passent du tube digestif vers l'hémocèle (193). Ce mécanisme peut avoir des conséquences si un repas de sang est pris sur un homme avec des Ac anti-CSP et si le moustique héberge à ce moment des sporozoïtes à la suite d'un précédent repas de sang infectant. Dans le système *P. falciparum* - *A. stephensi*, les Ac anti-sporozoïtes traversent non seulement la paroi digestive, mais aussi la paroi des glandes salivaires (13). La concentration atteint son maximum 3heures après ingestion puis les Ac disparaissent vers 18-24 heures (194, 197). Ces Ac s'attachent aux sporozoïtes circulant dans l'hémolymphe, mais progressivement la fluorescence de membrane se perd, évoquant un mécanisme de perte progressive du manteau antigénique CSP (194). Les mécanismes d'action de ces Ac anti-CSP sont très divers, mais ils peuvent déclencher une réaction de précipité à la surface du parasite (192), entraînant l'immobilisation du sporozoïte. Dans ces conditions, on peut penser que des repas sanguins successifs, riches en Ac anti-CSP et pris pendant la phase de migration des sporozoïtes, peuvent réduire la charge sporozoïtaire des glandes salivaires. Cependant, la concentration des anticorps anti-sporozoïtes chez le moustique est nettement moins importante que la concentration chez l'homme (197). On a montré que seuls des taux élevés d'Ac anti-sporozoïtes pouvaient inhiber l'infectivité, détruire le parasite ou empêcher l'invasion tissulaire par les sporozoïtes. Au contraire, de faibles taux seraient plutôt potentialisateurs (109, 118, 122). Dans ces conditions, il est fort peu probable que de telles concentrations dans l'hémocèle du moustique puissent avoir un effet inhibiteur sur la maturation oocystique, la migration des sporozoïtes et sur l'invasion des glandes salivaires du moustique. Une question non résolue est de savoir si les taux d'Ac naturels rencontrés dans les zones endémiques peuvent avoir un effet facilitateur.

- L'immunité bloquant la transmission (TBI) naturelle

L'homme vivant en milieu endémique acquiert des anticorps naturels contre des antigènes de gamétocyte. Certains de ces antigènes sont communs aux gamètes ou zygotes comme Pfs48/45 et Pfs230 pour *P. falciparum* (59, 60, 61, 62, 111, 128, 148) et GAM-1 pour *P. vivax* (98). Les anticorps anti-sexués n'ont aucun rôle chez l'homme car les antigènes du gamétocyte sont internes au parasite, lui-même étant entouré de la membrane du globule rouge. Par contre, après la gamé-

togénèse chez le moustique, ces antigènes apparaissent en surface du gamète et du zygote libres et les anticorps deviennent alors fonctionnels.

La protéine de surface de 25 kD du zygote/ookinète est déjà synthétisée chez le gamète. Elle ne semble pas exister chez le gamétocyte. On n'a jamais trouvé d'Ac naturels anti-Pfs25 chez l'homme. La variation antigénique de cet antigène est pratiquement nulle, ce qui en fait une molécule vaccinnante de choix (172). Un Ac monoclonal anti-Pfs25 ingéré avec un repas sanguin aux 3e ou 6e jours après le repas infectant est capable d'atteindre la surface du jeune oocyste et de réduire la production de sporozoïtes (89). Cet anticorps réduit aussi le nombre d'oocystes (199).

Certains anticorps monoclonaux contre Pfs48/45 sont capables de bloquer le développement sporogonique du parasite (31, 131). Toutefois, cette observation n'a pas été confirmée en Papouasie-Nouvelle-Guinée (62). Six épitopes ont été identifiés (199). Une corrélation a été observée entre la présence d'anticorps Pfs48/45 (épitopes 2 et 3) et la capacité de blocage de la transmission au Cameroun (149).

Certains anticorps monoclonaux contre Pfs230 peuvent entraîner la lyse du gamète ou du zygote en présence du complément (128, 147). On reconnaît 5 épitopes au Pfs230. Sur ces 5 épitopes, 2 seulement sont des cibles de monoclonaux pouvant bloquer la transmission (147). Seuls les IgG2a (fixateur du complément) semblent inhiber/bloquer le développement parasitaire chez le moustique. En outre, différents monoclonaux bloqueurs et non bloqueurs peuvent réagir avec un même épitope et donc rentrer en compétition, en donnant des résultats imprévisibles sur l'inhibition. En Papouasie-Nouvelle-Guinée, une corrélation positive a été observée entre la présence d'anticorps anti-Pfs230 détectés en immunoprécipitation et la perte d'infectivité du gamétocyte pour le moustique (62). Cette corrélation n'a pas été observée dans les sérums de porteurs de gamétocytes camerounais (147) ni sri lankais (126) en ELISAc.

La protéine Pf11.1 est une énorme molécule de 2400 kD rencontrée dès le stade I du gamétocyte. Cet antigène est transitoirement exposé sur la membrane de la vacuole parasitophore à l'intérieur du globule rouge parasité par des gamétocytes (46). Les anticorps monoclonaux inhibent très fortement la transmission de *P. falciparum* au moustique. Le mécanisme exact est inconnu, mais semble entraîner une lyse du gamète en présence de complément. Il existe des anticorps naturels chez l'homme (46).

- Les leucocytes

Il a été démontré que la phagocytose des gamètes existait dans l'estomac du moustique (88, 175). De par la courte demi-vie des gamètes, de l'ordre de quelques minutes, ce stade parasitaire ne peut probablement pas être la cible d'une phagocytose dans l'estomac du moustique. La phagocytose simple n'expliquerait que 7 % des pertes parasitaires *in vivo* (175). Par contre, des études expérimentales semblent montrer que l'association, leucocytes activés par des opsonines et cytokines, jouerait un rôle non négligeable en contrariant le développement parasitaire dans l'anophèle (88, 105).

- Le complément

L'importance du complément dans l'activité inhibitrice des anticorps anti-Pfs230 a été largement démontrée (71). Le complément pourrait aussi intervenir seul après activation par la voie alterne qui ne dépend pas de la formation d'immun-complexes. En fait, les études *in vivo* ne semblent pas montrer de rôle inhibiteur sur l'infectivité pour les sérums immuns décomplémentés ou non, au moins au Cameroun, où les anticorps Pfs230 sont rarement rencontrés (TCHUINKAM, comm. pers.).

- Les facteurs inflammatoires et les cytokines

La présence de protéine C réactive ne semble pas inhiber l'infectivité des porteurs de gamétocytes (MULDER, comm. pers.). Nous avons mentionné ci-dessus le rôle potentiel du TNF avec les leucocytes ingérés. Cependant, le TNF a une courte durée de vie et a généralement disparu quand les gamétocytes mûrs de *P. falciparum* apparaissent. Aucune autre étude n'a abordé directement le rôle des facteurs inflammatoires et des cytokines sur l'infectivité des porteurs de gamétocytes (185).

- La drépanocytose

Les gamétocytes qui se développent dans des hématies contenant de l'hémoglobine de type S sont morphologiquement normaux. La drépanocytose chez un porteur de gamétocytes facilite le développement sporogonique. Ceci est vrai aussi bien pour les génotypes hémoglobiniques AS que SS. Cette augmentation est de quatre fois supérieure chez un homme drépanocytaire AS, par rapport à un homme à hémoglobine normale AA (142).

- Les femmes enceintes

On a récemment découvert que l'attractivité des femmes enceintes pour les anophèles vecteurs est très nettement supérieure à celle des femmes témoins. Ceci se vérifie aussi bien pour l'attraction à grande distance (15 mètres) qu'à courte distance (1m) (3, 90). Cette augmentation de la fréquence de contact homme-vecteur pour un hôte humain immunologiquement déprimé est de nature à augmenter la transmission vecteur-homme par une inoculation accrue de sporozoïtes. Il serait intéressant de savoir si la transmission homme-vecteur est également accrue par un apport supplémentaire de gamétocytes mais, à notre connaissance, la littérature ne met pas encore à notre disposition des données sur les gamétocytes des femmes enceintes par rapport aux gamétocytes des femmes non enceintes.

- Les médicaments antipaludiques

Un certain nombre de médicaments sont gamétocytocides ou gamétocytogènes. Ils peuvent donc influencer indirectement sur la transmission par le biais d'une forte réduction ou augmentation de la densité gamétocytaire. À titre d'exemple, on peut signaler que la chloroquine est gamétocytogène (25) et que la primaquine est gamétocytocide et sporonticide (28). Mais ils peuvent aussi influencer directement l'infectivité des gamétocytes par leur rôle sporonticide. L'exemple typique est l'association sulfadoxine + pyriméthamine qui est à la fois fortement gamétocytogène et sporonticide (28, 74, 135).

D'autres facteurs liés à l'Homme restent certainement encore à découvrir. Mais, d'ores et déjà, certaines variables analysées se sont montrées neutres quant à l'infectivité pour le moustique; en particulier: le sexe du porteur de gamétocytes, son groupe sanguin, son facteur rhésus, sa température (185).

Facteurs liés au moustique

Sur quelque 460 espèces d'anophèles décrites, seulement une soixantaine sont des vecteurs de *Plasmodium* humains et une vingtaine, à elles seules, sont à l'origine de la plupart des cas de paludisme (68, 101). Les autres ne sont pas de bons vecteurs pour des raisons variées: ils sont rares dans la nature, zoophiles, ou ont une longévité trop brève.

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

- Les enzymes de la digestion

L'ingestion d'un repas sanguin déclenche chez le moustique une sécrétion enzymatique protéolytique abondante (17). L'activité enzymatique digestive atteint son apogée à des moments variables après l'ingestion du repas sanguin qui dépendent de l'espèce de moustique en cause.

Ces enzymes digestives peuvent détruire le parasite. L'ookinète semble plus résistant aux enzymes que les stades précédents (51, 52, 81, 209). Il doit probablement mettre en jeu des mécanismes de protection qui sont encore inconnus. Le développement de l'ookinète, contemporain du pic de sécrétion enzymatique ou de la formation d'une matrice péritrophique étanche, doit vraisemblablement avorter ou être fortement inhibé. Inversement, un développement de l'ookinète avant le pic de sécrétion enzymatique ou avant la formation complète de la matrice péritrophique permet l'évolution du parasite vers les stades ultérieurs. Le rôle des enzymes digestifs du moustique peut ainsi être facilitateur ou inhibiteur de l'infectivité du parasite selon la période du développement sporogonique à laquelle ils sont sécrétés et selon le rôle concomitant de la matrice péritrophique.

Un autre rôle serait dévolu aux enzymes digestives. Elles activeraient la pro-chitinase sécrétée par l'ookinète sous forme inactive, au moins chez *P. gallinaceum* (75, 163, 165), favorisant ainsi la traversée de la matrice péritrophique. Mais un tel mécanisme a été récemment mis en question (82). Enfin, les enzymes digestives du moustique détruiraient les facteurs du complément, pouvant ainsi empêcher la destruction des zygotes (64).

- La matrice péritrophique (MP)

La majorité des moustiques produisent une sorte d'enveloppe, de structure lamellaire, enserrant le bol alimentaire. Un stimulus de cette sécrétion serait la distension stomacale, mais il doit être associé à la présence de composés sanguins puisque l'absorption de sérum ou de jus sucré n'entraîne pas la formation de MP (18, 132). Elle est sécrétée par les cellules de l'épithélium stomacal et entoure tout le bol alimentaire en quelques heures. La nature chimique et la cinétique de sécrétion de la MP dépendent de l'espèce du moustique. On comprend qu'il faille au parasite un équipement enzymatique spécifique pour passer cette première barrière physiologique quand la mise en place de la MP est précoce. C'est le cas dans le couple *P. gallinaceum/Ae. aegypti*. Par contre, chez les couples *An. stephensi/P. falciparum* ou *An. atroparvus/P. berghei*, la MP est d'apparition plus tardive et ne gêne pratiquement pas la migration de l'ookinète. D'autres études ont concerné des couples parasites-moustiques réfractaires ou sensibles, en présence ou après inhibition de la synthèse de la matrice chez le moustique, pour apprécier le rôle de celle-ci sur l'infectivité (18, 160, 165); il en ressort qu'il n'existe pas d'argument formel sur le rôle limitant de la MP sur l'infectivité des *Plasmodium*.

- Les mécanismes génétiques et systèmes de défense du moustique

Les mécanismes génétiques contrôlant le développement sporogonique sont encore peu connus. La taille du moustique et la quantité de sang absorbé, la nature et la cinétique des sécrétions digestives, la nature et la cinétique de la formation de la matrice péritrophique, les mécanismes de défenses humoraux ou cellulaires du moustique, la reconnaissance d'un récepteur sur la matrice péritrophique, l'estomac et les glandes salivaires, sont autant de facteurs génétiquement contrôlés qui peuvent moduler la susceptibilité ou l'incompatibilité vecteur-parasite. Pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui président à la susceptibilité ou à l'incompatibilité moustique-parasite, une voie de recherche possible

concerne la comparaison des espèces de vecteurs réfractaires et sensibles pour une même espèce plasmodiale et l'élaboration de cartes génétiques comparant ces vecteurs (43, 159). Ce type d'étude est en plein essor.

Chez les anophèles, on a recensé plusieurs systèmes de défense: la lyse de l'ookinète dans les cellules épithéliales de l'estomac du moustique (201), l'encapsulation-mélanisation de l'oocyste consécutive à des réactions de type inflammatoire (37), la phagocytose, la formation de nodules et la sécrétion de nombreux peptides antimicrobiens (42, 66).

L'encapsulation est un phénomène général chez les insectes. Des ookinètes de *P. berghei* inoculés dans l'hémolymphe d'*An. albimanus* ont été encapsulés par des hémocytes et mélanisés en une heure (83). La mélanisation est ordinairement un phénomène secondaire à l'encapsulation, mais elle peut survenir sans encapsulation comme chez *An. gambiae* - *Plasmodium* (5, 37, 106, 113, 114). L'encapsulation de *Plasmodium* et la mélanisation chez les vecteurs réfractaires sont sous le contrôle d'un faible nombre de gènes (37, 38, 200). Ces gènes sont situés sur la même région du chromosome 2 (158). La transmission du phénotype mélanisation/encapsulation est autosomale dominante. Le mécanisme d'encapsulation de *P. falciparum* chez *An. gambiae* réfractaire est sous contrôle génétique et fait intervenir trois locus distincts mais interactifs (210). L'un exerce un rôle majeur dans la mélanisation des jeunes oocystes, un autre est associé à une mélanisation plus modérée, mais contrôle également l'activité du premier locus (200). L'incompatibilité *An. gambiae* - *P. gallinaceum* a aussi été étudiée. Il semble qu'elle est sous le contrôle d'un locus majeur (200, 201).

Cependant, il faut souligner que la mélanisation des oocystes n'est qu'exceptionnellement observée dans la nature (157). Ceci est à relier au fait que la capacité de mélaniser est plus faible chez des moustiques infectés, au moins dans le modèle *Ae. aegypti/P. gallinaceum* (21). Il faut aussi souligner que la souche d'*An. gambiae* réfractaire, mélanisante pour les jeunes oocystes de nombreuses espèces plasmodiales incluant des souches de *P. falciparum* de diverses provenances géographiques, s'est tout de même révélée incapable de mélaniser les *P. falciparum* africains de même origine géographique que la souche de moustique (37). Ceci a deux implications. Premièrement, des variants géographiques existent au cours du développement sporogonique et les relations vecteurs-parasites sont d'expression locale. Deuxièmement, l'utilisation pour la lutte antipaludique de cette souche d'anophèle réfractaire n'est pas envisageable dans l'instant.

Les lectines/agglutinines sont des substances qui se lient à des sucres à la surface du pathogène. Il en existe donc plusieurs sortes en fonction de leur spécificité. Les lectines peuvent aussi favoriser l'attachement de la phényloxydase activée, ce qui concentre son activité très toxique dans une aire très localisée autour du pathogène. Parmi les lectines, les défensines ont une activité lytique sur le *Plasmodium* (133). Une défensine a été récemment isolée et un clone ADNc a été identifié chez *Ae. aegypti/An. gambiae* (33). L'administration de défensine de synthèse a inhibé le développement des oocystes chez *Ae. aegypti* parasité par *P. gallinaceum* et a tué les sporozoïtes dans l'hémocèle (162). La liste des molécules antimicrobiennes chez les moustiques va en s'allongeant progressivement. Quelque 30 gènes codent la synthèse de ces multiples peptides de défense. La drosophile, comme dans bien d'autres domaines, constitue un modèle pour la compréhension des mécanismes moléculaires d'activation et de sécrétion de ces peptides de défense (72).

La reconnaissance du "non soi" chez le moustique est encore mal connue. HUMPHREYS & REINHERZ (76) ont proposé un modèle séduisant. Les hémocytes ou immunocytes auraient deux récepteurs de reconnaissance: l'un de large spécificité couvrant toute la gamme d'histocompatibilité de l'insecte et l'autre serait un "ligand générique" largement rencontré dans la nature (aussi bien "soi" que "non soi"). L'activation des immunocytes serait bloquée par la reconnaissance simultanée des deux récepteurs. L'engagement du seul récepteur générique déclencherait l'activation de l'immunocyte. La charge électrique pourrait aussi être un stimulus de l'activation des immunocytes vis-à-vis d'un pathogène (115).

- Certains paramètres biologiques et éthologiques

La taille des moustiques est importante en ce sens que les plus gros ingèrent davantage de sang à chaque repas (91). Il s'ensuit qu'une "grosse" espèce comme *An. gambiae* présente ordinairement un indice sporozoïtique supérieur dans la nature à celui d'une "petite" comme *An. nili* par exemple (138). Entre les individus d'une même espèce, la variabilité du volume sanguin ingéré est probablement un facteur important de l'infection chez le moustique. Or, très peu d'études se sont penchées sur ce problème: la moyenne de sang ingéré par un lot de moustique a bien été rapportée (36) mais, à notre connaissance, la distribution des valeurs n'a pas été publiée. L'âge est important, puisque le premier repas de sang est celui où le moustique s'infecte le plus facilement, probablement parce qu'un repas de sang accélère la vitesse de digestion du repas suivant (196). Un âge trop avancé du moustique lors de la prise d'un repas de sang infectant est défavorable à l'achèvement du développement sporogonique, à cause d'une survie amoindrie de l'anophèle (22).

La nutrition du moustique femelle est également un facteur important sous l'angle de l'alternative entre un repas de jus sucré ou un repas de sang. Après un repas de sang infectant, un repas de jus sucré est préférable à un repas de sang pour une infectivité supérieure du moustique (79). Par ailleurs, les moustiques qui prennent exceptionnellement des repas de jus sucré ont un développement gonotrophique court. Ceci est peut-être lié à l'exigence d'un apport nutritif important exigé par certaines espèces de moustiques et plus aisément procuré par le repas de sang. Même si un repas de jus sucré est disponible dans l'environnement, ces espèces rechercheraient plutôt un repas de sang, et telle qu'*An. gambiae* par exemple, ont donc une fréquence de piqûres élevée et sont plus fréquemment en contact avec un homme infectant (10, 50).

Conclusion

Le *Plasmodium* a une biologie singulière qui lui permet d'achever son cycle compliqué de phases de multiplication, d'inhibition et de différenciation, nécessaire à sa survie chez deux hôtes différents. Ce développement est l'aboutissement d'interactions complexes avec l'hôte vertébré et l'hôte moustique, qui constituent l'environnement du parasite. L'ensemble des processus permettant à un vecteur de s'infecter puis de transmettre apparaît hypercomplexe et fragile (134). Au Cameroun, la probabilité qu'un repas sanguin soit infectant pour le moustique semble très faible, la réussite complète du développement sporogonique est un événement qui semble rare avec moins de 10 % de chances sur un porteur de nombreux gamétocytes (57, 143). Il semble utile de souligner l'opposition apparente entre le faible succès du développement sporogonique et le niveau global de transmission moustique-homme, largement suffisant pour entraîner les conséquences

que l'on sait en termes de morbidité et de mortalité pour près d'un tiers de l'humanité. Cette distinction entre un développement sporogonique incertain et la gravité extrême de la transmission moustique-homme ne recouvre pas les mêmes notions. Un faible succès reproductif du parasite dans le vecteur coexiste manifestement avec un faible niveau de défense de l'homme contre le parasite (39).

Est-il réaliste d'espérer perturber le développement sporogonique dans le dessein de réduire grandement, voir même d'annuler durablement la transmission moustique-homme? Pour le moment, il est clair que cette question ne relève pas encore du domaine opérationnel (54), mais le constat de la relative fragilité du développement sporogonique est en soi une donnée encourageante.

Remerciements

Les auteurs remercient vivement Pierre CARNEVALE, Milijaona RANDRIANARIVELOJOSIA, Frédéric ARIEZ et les deux référés anonymes pour leurs nombreuses suggestions à diverses étapes de la rédaction de cette revue. V. ROBERT émerge au grand programme horizontal *Anopheles* de l'Institut Pasteur.

Références bibliographiques

- AL-OLAYAN EM, BEETSMA AL, BUTCHER GA, SINDEN RE & HURD H - Complete development of mosquito phases of the malaria parasite *in vitro*. *Science*, 2002, **295**, 677-679.
- AL-OLAYAN EB, WILLIAMS GT & HURD H - Apoptosis in the malaria protozoan, *Plasmodium berghei*: a possible mechanism for limiting intensity of infection in the mosquito. *Int J Parasitol*, 2002, **32**, 1133-1143.
- ANSELL J, HAMILTON KA, PINDER M, WALRAVEN GEL & LINDSAY SW - Short-range attractiveness of pregnant women to *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2002, **96**, 113-116.
- ARIEY F, CHALVET W, HOMMEL D, PENEAU C, HULIN A *et al.* - *Plasmodium falciparum* parasites in French Guiana: limited genetic diversity and high selfing rate. *Am J Trop Med Hyg*, 1999, **61**, 978-985.
- ASHIDA M & BREY PT - Recent advances in research on the insect prophenoloxidase cascade. In BREY PT & HULTMARK D (Eds), *Molecular mechanisms of immune responses in insects*. Chapman & Hall, London, 1998, pp. 135-172.
- AWONO-AMBÉNÉ HP & ROBERT V - Estimation of *Plasmodium falciparum* survival in *Anopheles arabiensis*. *Ann Trop Med Parasitol*, 1998, **92**, 889-890.
- BABIKER HA, RANFORD-CARTWRIGHT LC, CURRIE D, CHARLWOOD JD, BILLINGSLEY P *et al.* - Random mating in natural population of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*, 1994, **109**, 413-421.
- BALL JH & CHAO J - Development *in vitro* of isolated oocyst of *Plasmodium reticulum*. *J Parasitol* 1957, **43**, 409-412.
- BARREAU C, TOURAY M, PIMENTA PF, MILLER LH & VERNICK KD - *Plasmodium gallinaceum* - Sporozoite invasion of *Aedes aegypti* salivary glands is inhibited by anti-gland antibodies and by lectins. *Exp Parasitol*, 1995, **81**, 332-343.
- BEIER JC - Frequent blood feeding and restrictive sugar-feeding enhance the malaria vector potential of *Anopheles gambiae s.l.* and *An. funestus* (Diptera: Culicidae) in Western Kenya. *J Med Entomol*, 1996, **33**, 613-618.
- BEIER MS, DAVIS JR, PUMPINI CB, NODEN BH & BEIER JC - Ingestion of *Plasmodium falciparum* sporozoites during transmission by anophelines mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*, 1992, **47**, 195-200.
- BEIER JC, ONYANGO FK, RAMADHAN M, KOROS JK, ASIAGO CM *et al.* - Quantitation of malaria sporozoites in the salivary glands of wild Afrotropical *Anopheles*. *Med Vet Entomol*, 1991, **5**, 63-70.
- BEIER JC, OSTER CN, KOROS JK, ONYANGO FK, GITHEKO AK *et al.* - Effect of human circumsporozoite antibodies in *Plasmodium*-infected *Anopheles* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*, 1989, **26**, 547-53.
- BEIER JC & VANDERBERG JP - Sporogonic development in the mosquito. In: SHERMAN IW (Ed), *Malaria: parasite biology, pathogenesis, and protection*. American Society for Microbiology Press, Washington DC, 1998, pp. 49-61.
- BHATTACHARYYA MK & KUMAR N - Effect of xanthurenic acid on infectivity of *Plasmodium falciparum* to *Anopheles stephensi*. *Int J Parasitol*, 2001, **31**, 1129-1133.
- BILLINGSLEY PF - Vector-parasite interactions for vaccine development. *Int J Parasitol* 1994, **24**, 53-58.
- BILLINGSLEY PF & HECKER H - Blood digestion in the mosquito, *Anopheles stephensi*: activity and distribution of trypsin, aminopeptidase and alpha-glucosidase in the midgut. *J Med Entomol* 1991, **28**, 865-871.
- BILLINGSLEY PF & RUDIN W - The role of the mosquito peritrophic membrane in bloodmeal digestion and infectivity of *Plasmodium* species. *J Parasitol*, 1992, **78**, 430-40.
- BILLER O, LINDO V, PANICO M, ETIENNE AE, PAXTON T *et al.* - Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature*, 1998, **392**, 289-292.
- BIRAGO C, BUCCI A, DORE E, FRONTALI C & ZENOBI P - Mosquito infectivity is directly related to the proportion of repetitive DNA in *Plasmodium berghei*. *Mol Biochem Parasitol*, 1982, **6**, 1-12.
- BOËTE C, PAUL REL & KOELLA JC - Reduced efficacy of the immune melanization response in mosquitoes infected by malaria parasites. *Parasitology*, 2002, **125**, 93-98.
- BOUDIN C, LYANNAZ J, BOSSENO MF, CHAIZE J & CARNEVALE P - Production de sporozoïtes de *Plasmodium* humains à Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. *Ann Soc Belge Méd Trop*, 1989, **69**, 3-23.
- BOUDIN C, ROBERT V, VERHAVE JP, CARNEVALE P & MEUWISSEN J - Utilisation de la technique ELISA dans le dépistage des moustiques infectés par *Plasmodium falciparum*. *Bull Org Mond Santé*, 1988, **66**, 87-97.
- BROOKE MM & DONALDSON AW - Transfer of malaria parasites between blood films mass staining procedures. *Publ Hlth Reports*, 1948, **63**, 991-1004.
- BUCKLING A, RANFORD-CARTWRIGHT LC, MILES A & READ AF - Chloroquine increases *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis *in vitro*. *Parasitology*, 1999, **118**, 339-346.
- BUCKLING A & READ A - The effect of chloroquine treatment on the infectivity of *Plasmodium chabaudi* gametocytes. *Int J Parasitology*, 1999, **29**, 619-625.
- BURKOT TR, WILLIAMS JL & SCHNEIDER I - Identification of *Plasmodium falciparum* infected mosquitoes by a double antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg*, 1984, **33**, 783-788.
- BUTCHER GA - Antimalarial drugs and the mosquito transmission of *Plasmodium*. *Int J Parasitol*, 1997, **27**, 975-987.
- CARTER R & GRAVES PM - Gametocytes. In WERNSDORFER WH & MCGREGOR I (Eds), *Malaria. Principles and practice of malariaology*. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1988, vol 1, pp. 1-59.
- CARTER R, GRAVES PM, CREASEY A, BYRNE K, READ D *et al.* - *Plasmodium falciparum*: an abundant stage specific protein expressed during early gametocyte development. *Exp Parasitol*, 1989, **69**, 140-149.
- CARTER R, KUMAR N, QUAKYI I, GOOD M, MENDIS K *et al.* - Immunity to sexual stages of malaria parasites. *Prog Allergy*, 1988, **41**, 193-214.
- CERAMI C, KWAKYE-BERKO F & NUSSENZWEIG V - Binding of malarial circumsporozoite protein to sulfatides [Gal(3-SO4)beta 1-Cer] and cholesterol-3-sulfate and its dependence on disulfide bond formation between cysteines in region II. *Mol Biochem Parasitol*, 1992, **54**, 1-12.
- CHALK R, TOWNSON H, NATORI S, DESMOND H & HAM PJ - Purification of an insect defensin from the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*, 1994, **4**, 403-410.
- CHARDOME M & JANSSEN PJ - Enquête sur l'incidence malarienne par la méthode dermique dans la région du Lubilash, Congo Belge. *Ann Soc Belge Méd Trop*, 1952, **32**, 209-211.
- CHAROENVIT Y, FALLARME V, SACCI JB, AGUIAR JC & YUAN LF - Development of 2 MoAbs against *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2 and mapping of B-cell epitopes. *Infect Immun*, 1997, **65**, 3430-3437.
- CLEMENTS AN - *The biology of mosquitoes*. Chapman & Hall, London, 1992, vol 1, p.509.
- COLLINS FH, SAKAI RK, VERNICK DD, PASKEWITZ S, SEELEY DC *et al.* - Genetic selection of a *Plasmodium*-refactory strain of the malaria vector *An. gambiae*. *Science*, 1986, **234**, 607-610.
- COLLINS FH, ZHENG L, PASKEWITZ SM & KAFATOS FC - Progress in the map-based cloning of *Anopheles gambiae* genes responsible for the encapsulation of malaria parasites. *Ann Trop Med Parasitol*, 1997, **91**, 517-521.
- COLUZZI M - *Plasmodium falciparum* en Afrique subsaharienne. Spéciation récente des vecteurs, transmissibilité, évolution de la pathogenèse / contrôle de la maladie, et capacité vectorielle. *Ann Inst Pasteur/ actualités*, 2002, **13**, 81-89.

40. DAY KP, HAYWARD RE & DYER M - The biology of *Plasmodium falciparum* transmission stages. *Parasitology*, 1998, **116**, suppl., S95-S109.
41. DECHERING KJ, KAAAN AM, MBACHAM W, WIRTH DF, ELING W *et al.* - Isolation and functional characterization of two distinct sexual-stage-specific promoters of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Biol*, 1999, **19**, 967-978.
42. DIMOPOULOS G, RICHMAN A, MULLER HM & KAFATOS FC - Molecular immune responses of the mosquito *Anopheles gambiae* to bacteria and malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**, 11508-11513.
43. DIMOPOULOS G, SEELEY D, WOLF A & KAFATOS FC - Malaria infection of the mosquito *Anopheles gambiae* activates immune-responsive genes during critical transition stages of the parasite life cycle. *EMBO J*, 1998, **17**, 6115-6123.
44. DOWLING M & SHUTE GT - A comparative study of thick and thin blood films in the diagnosis of scanty malaria parasitaemia. *Bull Org Mond Santé*, 1966, **34**, 249-267.
45. EICHNER M, DIEBNER HH, MOLINEAUX L, COLLINS WE, JEFFERY GM & DIETZ K - Geneis, sequestration and survival of *Plasmodium falciparum* gametocytes: parameter estimates from fitting a model to malariatherapy data. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2001, **95**, 497-501.
46. FENG Z, HOFFMANN NR, NUSSENZWEIG RS, TSUJI MORIYA, FUJIOKA H *et al.* - Pfs2400 can mediate antibody-dependent malaria transmission inhibition and may be the Pf 11.1 gene product. *J Exp Med*, 1993, **177**, 273-281.
47. FERGUSON HM & READ AF - Why is the effect of malaria parasites on mosquito survival still unresolved?. *Trends Parasitol*, 2002, **18**, 256-261.
48. 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**, 1287-1298.
49. GAMAGE-MENDIS AS, RAJAKARUNA J, WEERASINGHE S, MENDIS C, CARTER R & MENDIS KN - Infectivity of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* to *Anopheles tessellatus*; relationship between oocyst and sporozoite development. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1993, **87**, 3-6.
50. GARY RE & FOSTER WA - Effects of available sugar on the reproductive fitness and vectorial capacity of malaria vector *Anopheles gambiae*. *J Med Entomol*, 2001, **38**, 22-28.
51. GASS RF - Influences of blood digestion on the development of *Plasmodium gallinaceum* in the midgut of *Aedes aegypti*. *Acta Trop*, 1977, **34**, 127-140.
52. GASS RF & YEATES RA - *In vitro* damage of cultured ookinete of *Plasmodium gallinaceum* by digestive proteinases from susceptible *Aedes aegypti*. *Acta Trop*, 1979, **36**, 243-252.
53. GAUTRET P - *Plasmodium falciparum* gametocyte periodicity. *Acta Tropica*, 2001, **78**, 1-2.
54. GHOSH A, EDWARDS MJ & JACOBS-LORENA M - The journey of the malaria parasite in the mosquito: hopes for the new century. *Parasitol Today*, 2000, **16**, 196-201.
55. GORDON RM & CREWE W - The mechanism by which mosquitoes and tsetse flies obtain their blood meal, the histology of the lesions produced, and the subsequent reactions of the mammalian host, together with some observations on the feeding of *Chrysops* and *Cimex*. *Ann Trop Med Parasitol*, 1948, **42**, 334-356.
56. GOUAGNA LC, BONNET S, GOUNOUER R, TCHUINKAM T, SAFEUKUI I *et al.* - The use of anti-Pfs25 monoclonal antibody for early determination of *Plasmodium falciparum* oocyst infections in *Anopheles gambiae*: comparison with the current technique of direct microscopic diagnosis. *Exp Parasitol*, 1999, **92**, 209-214.
57. GOUAGNA LC, MULDER B, NOUBISSI E, TCHUINKAM T, VERHAVE JP & BOUDIN C - The early sporogonic cycle of *Plasmodium falciparum* in laboratory-infected *Anopheles gambiae*: an estimation of parasite efficacy. *Trop Med Int Health*, 1998, **3**, 21-28.
58. GRAVES PM, CARTER R & McNEILL KM - Gametocyte production in cloned lines of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*, 1984, **33**, 1045-1050.
59. GRAVES PM, DOUBROVSKY A & BECKERS P - Antibody responses to *Plasmodium falciparum* gametocyte antigens during and after malaria attacks in schoolchildren from Madang, Papua New Guinea. *Parasite Immunol*, 1991, **13**, 291-299.
60. GRAVES PM, DOUBROVSKY A, CARTER R, EIDA S & BECKERS P - High frequency of antibody response to *Plasmodium falciparum* gametocyte antigens during acute malaria infections in Papua New Guinea highlanders. *Am J Trop Med Hyg*, 1990, **42**, 515-520.
61. GRAVES PM, DOUBROVSKY A, SATTABONGKOT J & BATTIS-TUTTA D - Human antibody responses to epitopes on the *Plasmodium falciparum* gametocyte antigen PFS 48/45 and their relationship to infectivity of gametocyte carriers. *Am J Trop Med Hyg*, 1992, **46**, 711-719.
62. GRAVES PM, WIRTZ RA, CARTER R, BURKOT TR, LOOKER M & TARGETT GA - Naturally occurring antibodies to an epitope on *Plasmodium falciparum* gametes detected by monoclonal antibody-based competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect Immun*, 1988, **56**, 2818-2821.
63. GRIFFITHS RB & GORDON RM - An apparatus which enables the process of feeding by mosquitoes to be observed in tissues of a rodent, together with an account of the ejection of saliva and its significance in malaria. *Ann Trop Med Parasitol*, 1952, **46**, 311-319.
64. GROTENDORST CA & CARTER R - Complement effects on the infectivity of *Plasmodium gallinaceum* to *Aedes aegypti* mosquitoes. II) Changes in sensitivity to complement like factors during zygote development. *J Parasitol*, 1987, **73**, 980-984.
65. GROTENDORST CA, CARTER R, ROSENBERG R & KOONTZ LC - Complement effects on the infectivity of *Plasmodium gallinaceum* to *Aedes aegypti* mosquitoes. I. Resistance of zygotes to the alternative pathway of complement. *J Immunol*, 1986, **136**, 4270-4274.
66. GRUBHOFFER L & HYPASA V - Lectins (haemagglutinins) in the gut of the important disease vectors. *Parasite*, 1997, **4**, 203-216.
67. GUERIN PJ, OLLIARO P, NOSTEN F, DRUILHE P, LAXMINARAYAN R *et al.* - Malaria: current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for research and development. *Lancet Inf Dis*, 2002, **2**, 564-573.
68. GWADZ R & COLLINS FH - Anopheline mosquitoes and the agents they transmit. In BEATY BJ & MARQUARDT WC (Eds) - *The biology of disease vectors*. University Press of Colorado, 1996, pp. 73-84.
69. HAJI H, SMITH T, CHARLWOOD JD & MEUWISSEN JHT - Absence of relationship between selected human factors and natural infectivity of *Plasmodium falciparum* to mosquitoes in an area of high transmission. *Parasitology*, 1996a, **113**, 425-431.
70. HAYWARD RE, TIWARI B, PIPER KP, BARUCH DI & DAY KP - Virulence and transmission success of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**, 4563-4566.
71. HEALER J, MCGUINNESS D, HOPCROFT P, HALEY S, CARTER R & RILEY E - Complement-mediated lysis of *Plasmodium falciparum* gametes by malaria-immune human sera is associated with antibodies to the gamete surface antigen Pfs230. *Infect Immun*, 1997, **65**, 3017-3023.
72. HOFFMANN JA, REICHHART JM & HETRU C - Innate immunity in higher insects. *Cur Opin Immunol*, 1996, **8**, 8-13.
73. HOFFMAN SL, WISTAR R, BALLOU WR, HOLLINGDALE MR, WIRTZ RA *et al.* - Immunity to malaria and naturally acquired antibodies to the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*. *N Engl J Med*, 1986, **315**, 601-606.
74. HOGH B, GAMAGE-MENDIS A, BUTCHER GA, THOMPSON R, BEGTRUP K *et al.* - The differing impact of chloroquine and pyrimethamine/sulfadoxine upon the infectivity of malaria species to the mosquito vector. *Am J Trop Med Hyg*, 1998, **58**, 176-182.
75. HUBER M, CABIB E & MILLER LH - Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**, 2807-2810.
76. HUMPHREYS T & REINHERZ EL - Invertebrate immune recognition, natural immunity and the evolution of positive selection. *Immunol Today*, 1994, **5**, 316-320.
77. JANSE CJ, BOORSMA EG, RAMESAR J, VAN VIANEN P, VAN DER MEER R *et al.* - *Plasmodium berghei*: gametocyte production, DNA content, and chromosome-size polymorphisms during asexual multiplication *in vitro*. *Exp Parasitol*, 1989, **68**, 274-282.
78. JANSE CJ, RAMESAR J, VANDENBERG FM & MONS B - *Plasmodium beghei* - *In vivo* generation and selection of karyotype mutants and nongametocyte producer mutants. *Exp Parasitol*, 1992, **74**, 1-10.
79. KELLY R & EDMAN JD - Infection and transmission of *Plasmodium gallinaceum* (Eucoccidia: Plasmodiidae) in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): effect of preinfection sugar meals and postinfection blood meals. *J Vect Ecol*, 1997, **22**, 36-42.
80. KOELLA JC & PARKER MJ - Malaria parasites enhance blood-feeding of their naturally infected *Anopheles punctulatus*. *Parasitology*, 1996, **113**, 105-109.
81. KUMAR N & CARTER R - Biosynthesis of 2 stage specific membrane proteins during transformation of *Plasmodium gallinaceum* zygotes into ookinetes. *Mol Biochem Parasitol*, 1985, **14**, 127-139.

82. LANGER RC & VINETZ JM - *Plasmodium* ookinete-secreted chitinase and parasite penetration of the mosquito peritrophic matrix. *Trends Parasitol*, 2001, **17**, 269-272.
83. LANZ-MENDOZA H, HERNANDEZ-MARTINEZ S, KU-LOPEZ M, RODRIGUEZ MCD, HERRERA-ORTIZ A & RODRIGUEZ MH - Superoxide anion in *Anopheles ambimani* hemolymph and midgut is toxic to *Plasmodium berghei* ookinetes. *J Parasitol*, 2002, **88**, 702-706.
84. LAVERAN A - Note sur un nouveau parasite trouvé dans le sang de plusieurs malades atteints de fièvre palustre. *Bull Acad Méd 2nd Série*, 1880, **9**, 1235-1236.
85. LE GOFF G, LE HESRAN JY & ROBERT V - Le four à micro-ondes pour le séchage des gouttes épaisses. Intérêt et limites dans l'observation microscopique des trophozoïtes et des gamétocytes de *Plasmodium falciparum*. *Bull Soc Pathol Exot*, 1998, **91**, 214-216.
86. LENSEN AH, BOLMER-VAN DE VEGTE M, VAN GEMERT GJ, ELING WM & SAUERWEIN RW - Leukocytes in a *Plasmodium falciparum*-infected blood meal reduce transmission of malaria to *Anopheles* mosquitoes. *Infect Immun*, 1997, **65**, 3834-3837.
87. LENSEN A, BRIL A, VAN DE VEGTE M, VAN GEMERT GJ, ELING W & SAUERWEIN R - *Plasmodium falciparum*: infectivity of cultured, synchronized gametocytes to mosquitoes. *Exp Parasitol*, 1999, **91**, 101-103.
88. LENSEN A, MULDER L, TCHUINKAM T, WILLEMSSEN L, ELING W & SAUERWEIN R - Mechanisms that reduce transmission of *Plasmodium falciparum* malaria in semiimmune and nonimmune persons. *J Infect Dis*, 1998, **177**, 1358-1363.
89. LENSEN AH, VAN-GEMERT GJ, BOLMER MG, MEIS JF, KASLOW D *et al.* - Transmission-blocking antibody of the *Plasmodium falciparum* zygote ookinete surface protein Pf25 also influence sporozoite development. *Parasite Immunol*, 1992, **14**, 471-479.
90. LINDSAY SW, ANSELL J, SELMAN C, COX V, HAMILTON K, & WALRAVEN GEL - Effect of pregnancy on exposure to malaria mosquitoes. *Lancet*, 2000, **355**, 1972.
91. LYIMO EO & KOELLA JC - Relationship between body size of adult *Anopheles gambiae* s.l. and infection with the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*, 1992, **104**, 233-237.
92. MCCALLUM WG - Notes on the pathological changes in the organs of birds infected with haemocytozoan. *J Exp Med*, 1898, **3**, 103-116.
93. MCKENZIE FE & BOSSERT WH - Mixed-species *Plasmodium* infections of *Anopheles* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*, 1997, **34**, 417-425.
94. MCKENZIE FE, FERREIRA MU, BAIRD JK, SNOUNOU G & BOSSERT WH - Meiotic recombination, cross-reactivity, and persistence in *Plasmodium falciparum*. *Evolution*, 2001, **55**, 1299-1307.
95. MAGNARELLI LA - Feeding behavior of mosquitoes (Diptera: Culicidae) on man, racoons and white-footed mice. *Ann Entomol Soc Am*, 1979, **72**, 162-166.
96. MATUSCHEWSKI K, NUNES AC, NUSSENZWEIG V & MENARD R - *Plasmodium* sporozoite invasion into insect and mammalian cells is directed by the same dual binding system. *EMBO J*, 2002, **21**, 1597-1606.
97. MENARD R, SULTAN AA, CORTES C, ALTSZULER R, VAN DIJK MR *et al.* - Circumsporozoite protein is required for development of malaria sporozoites in mosquitoes. *Nature*, 1997, **385**, 336-340.
98. MENDIS KN, MUNESINGHE YD, DE SILVA YN, KERAGALLA I & CARTER R - Malaria transmission-blocking immunity induced by natural infections of *Plasmodium vivax* in humans. *Infect Immun*, 1987, **55**, 369-372.
99. MOHAMED HA & INGRAM GA - Salivary gland surface carbohydrate variations in 3 species of *Anopheles gambiae* complex. *Ann Soc Belge Med Trop*, 1993, **73**, 197-207.
100. MOTA MM, PRADEL G, VANDERBERG JP, HAFALLA JC, FREVERT U *et al.* - Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science*, 2001, **291**, 141-144.
101. MOUCHET J & CARNEVALE P - Les vecteurs et la transmission. In *Paludisme*, DANIS & MOUCHET Ed, ELLIPSES/ AUPÉLF, 1991, 35-59.
102. MULDER B, ROEFFEN W, SAUERWEIN R, TCHUINKAM T, BOUDIN C & VERHAVE JP - Anti-Pf25 monoclonal antibody 32F81 blocks transmission from *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers in Cameroon. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1996, **90**, 195.
103. MULDER B, VAN DER LIGT W, SAUERWEIN R & VERHAVE JP - Detection of *Plasmodium falciparum* gametocytes with the QBC test and Giemsa-stained thick blood films for malaria transmission studies in Cameroon. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1998, **92**, 395-396.
104. NAITZA S, SPANO F, ROBSON KJH & CRISANTI A - The thrombospondin-related protein family of apicomplexan parasites: the gears of the cell invasion machinery. *Parasitol Today*, 1998, **14**, 479-484.
105. NAOTUNE TS, KARUNAWEEERA ND, MENDIS KN & CARTER R - Cytokine-mediated inactivation of malarial gametocytes is dependent on the presence of white blood cells and involves reactive nitrogen intermediates. *Immunology*, 1993, **78**, 555-562.
106. NAPPI AJ & VASS E - Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect-cellular immune reaction. *Pigment Cell Res*, 1993, **6**, 117-126.
107. NARDIN EH, NUSSENZWEIG RS, MCGREGOR IA & BRYAN JH - Antibodies to sporozoites. Their frequency occurrence in individuals living in an area of hyperendemic malaria. *Science*, 1979, **206**, 597-599.
108. NIEDERWIESER I, FELGER I & BECK HP - *Plasmodium falciparum*: expression of gametocyte-specific genes in monolayer cultures and malaria-positive blood samples. *Exp Parasitol*, 2000, **95**, 163-169.
109. NUDELMAN S, RENIA L, MILTGEN F & MAZIER D - Dual action of anti-sporozoite antibodies *in vitro*. *J Immunol*, 1989, **143**, 996-1000.
110. NUSSENZWEIG V & NUSSENZWEIG RS - Circumsporozoite proteins of malaria parasites. *Cell*, 1985, **42**, 401-403.
111. ONG CS, ZHANG KY, EIDA SJ, GRAVES PM, DOW C *et al.* - The primary antibody response of malaria patients to *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens which are potential transmission blocking vaccine candidates. *Parasite Immunol*, 1990, **12**, 447-456.
112. PANCAKE SJ, HOLT GD, MELLOUK S & HOFFMAN SL - Malaria sporozoites and circumsporozoite proteins bind specifically to sulfated glycoconjugates. *J Cell Biol*, 1992, **117**, 1351-1357.
113. PASKEWITZ SM, BROWN MR, COLLINS FH & LEA AO - Ultrastructural localization of phenoloxidase in the midgut of refractory *Anopheles gambiae* and association of the enzyme with encapsulated *Plasmodium cynomolgi*. *J Parasitol*, 1989, **75**, 594-600.
114. PASKEWITZ SM, BROWN MR, LEA AO & COLLINS FH - Ultrastructure of the encapsulation of *Plasmodium cynomolgi* (B strain) on the midgut of a refractory strain of *Anopheles gambiae*. *J Parasitol* 1988, **74**, 432-439.
115. PASKEWITZ SM & RIEHLE MA - Response of *Plasmodium* refractory and susceptible strains of *Anopheles gambiae* to inoculated sephadex beads. *Dev Comp Immunol*, 1994, **18**, 369-375.
116. PAUL REL, BREY PT & ROBERT V - *Plasmodium* sex determination and transmission to mosquitoes. *Trends Parasitol*, 2002, **18**, 32-38.
117. PAUL REL, COULSON TN, RAIBAUD A & BREY PT - Sex determination in malaria parasites. *Science*, 2000, **287**, 128-131.
118. PEIRIS JS, PREMAWANSA S, RANAWAKA MB, UDAGAMA PV, MUNASINGHE YD *et al.* - Monoclonal and polyclonal antibodies both block and enhance transmission of human *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg*, 1988, **39**, 26-32.
119. PICHON G, AWONO-AMBÉNÉ HP & ROBERT V - High heterogeneity in the number of *Plasmodium falciparum* gametocytes in the bloodmeal of mosquitoes fed on the same host. *Parasitology*, 2000, **121**, 115-120.
120. PICHON G, ROBERT V, TCHUINKAM T, MULDER B & VERHAVE JP - Analyse quantitative de la distribution des oocystes de *Plasmodium falciparum* chez *Anopheles gambiae*. *Parasite*, 1996, **3**, 161-167.
121. PIMENTA PF, TOURAY M & MILLER L - The journey of malaria sporozoites in the mosquito salivary glands. *J Eukaryot Microbiol*, 1994, **41**, 608-624.
122. PONNUDURAI TV, LENSEN AHW, BENSINK MPE & MEUWISSEN JHT - Infectivity of cultured *Plasmodium falciparum* gametocytes to mosquitoes. *Parasitology* 1989, **98**, 165-173.
123. PONNUDURAI TV, LENSEN AHW, BENSINK MPE & MEUWISSEN JHT - Sporozoite load of mosquitoes infected with *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1989, **83**, 67-70.
124. PONNUDURAI T, LENSEN AHW, VAN GEMERT GJA, BOLMER G & MEUWISSEN TJHE - Feeding behaviour and sporozoite ejection by infected *Anopheles stephensi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1991, **85**, 175-180.
125. PONNUDURAI TV, MEUWISSEN JHT & VERHAVE JP - The production of mature gametocytes of *Plasmodium falciparum* in continuous cultures of different isolates infective to mosquitoes. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1982, **76**, 242-250.
126. PREMAWANSA S, GAMAGE-MENDIS A, PERERA L, BEGARNIE S, MENDIS K & CARTER R - *Plasmodium falciparum* malaria

- transmission-blocking immunity under conditions of low endemicity as in Sri Lanka. *Parasite Immunol*, 1994, **16**, 35-42.
127. PRINGLE G - A quantitative study of naturally-acquired malaria infections in *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus* in a highly malarious area of East Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1966, **60**, 626-632.
128. QUAKYI I, CARTER R, RENER J, KUMAR N, GOOD MF & MILLER LH - The 230-kDa gamete surface protein of *Plasmodium falciparum* is also a target for transmission-blocking antibodies. *J Immunol*, 1987, **139**, 4213-4217.
129. RANFORD-CARTWRIGHT LC, BALFE P, CARTER R & WALLIKER D - Genetic hybrids of *Plasmodium falciparum* identified by amplification of genomic DNA from single oocysts. *Mol Biochem Parasitol*, 1991, **49**, 239-244.
130. READ AF, NARARA A, NEE S, KEYMER AE & DAY KP - Gametocyte sex ratios as indirect measures of outcrossing rates in malaria. *Parasitology*, 1992, **104**, 387-395.
131. RENER J, GRAVES PM, CARTER R, WILLIAMS JL, BURKOT TR - Target antigens of transmission-blocking immunity on gametes of *Plasmodium falciparum*. *J Exp Med* 1983, **158**, 976-981.
132. RICHARDS AG & RICHARDS PA - The peritrophic membrane of insect. *Annu Rev Entomol* 1977, **22**, 219-240.
133. RICHMAN AM, BULET P, HETRU C, BARILLAS-MURY C, HOFFMANN JA & KAFATOS FC - Inducible immune factors of the vector mosquito *Anopheles gambiae*: biochemical purification of a defensin antibacterial peptide and molecular cloning of preprodefensin cDNA. *Insect Mol Biol*, 1996, **5**, 203-210.
134. ROBERT V - Letter to the editor. Gametocytes and infectivity. *Am J Trop Med Hyg*, 1999, **61**, 863.
135. ROBERT V, AWONO-AMBÈNÈ HP, LE HESRAN JY & TRAPE JF - Gametocytemia and infectivity to mosquitoes of patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria attacks treated with chloroquine or sulphadoxine plus pyrimethamine. *Am J Trop Med Hyg*, 2000, **62**, 210-216.
136. ROBERT V & BREY PT - Biting physiology of *Anopheles* affecting *Plasmodium* transmission. *Res Rev Parasitol*, 1998, **58**, 203-208.
137. ROBERT V, LE GOFF G, ESSONG J, TCHUINKAM T, FASS B & VERHAVE JP - Detection of *falciparum* malarial forms in naturally infected anophelines in Cameroon using a fluorescent anti-25 kD monoclonal antibody. *Am J Trop Med Hyg*, 1995, **52**, 366-369.
138. ROBERT V, LE GOFF G, GOUAGNA LC, SINDEN M, KIEBOOM J *et al.* - Kinetics and efficiency of *Plasmodium falciparum* development in the midguts of *Anopheles gambiae*, *An. funestus* and *An. nili*. *Ann Trop Med Parasitol*, 1998, **92**, 115-118.
139. ROBERT V, MOLEZ JF & TRAPE JF - Gametocytes, chloroquine pressure, and the relative parasite survival advantage of resistant strains of *falciparum* malaria in West Africa. *Am J Trop Med Hyg*, 1996, **55**, 350-351.
140. ROBERT V, READ A, ESSONG J, TCHUINKAM T, MULDER B *et al.* - Effect of gametocyte sex ratio on infectivity of *Plasmodium falciparum* to *Anopheles gambiae*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1996, **90**, 621-624.
141. ROBERT V, SOKHNA C, ROGIER C, ARIEY F & TRAPE JF - Sex-ratio of *Plasmodium falciparum* gametocytes in inhabitants of Dielmo, Senegal. *Parasitology*, 2003, in press.
142. ROBERT V, TCHUINKAM T, MULDER B, BODO JM, VERHAVE JP *et al.* - Effect of sickle cell trait status of gametocyte carriers of *Plasmodium falciparum* on infectivity to anophelines. *Am J Trop Med Hyg*, 1996, **54**, 111-113.
143. ROBERT V, TCHUINKAM T, MULDER L, COT M, GELAS H *et al.* - Infectivité des porteurs de gamétoctes de *Plasmodium falciparum* pour les anophèles vecteurs dans la ville de Yaoundé, Cameroun. *Rev Epidémiol Santé Publique*, 1993, **41** suppl. 1, S86.
144. ROBERT V & TRAPE JF - Dynamiques de la gamétoctémie à *Plasmodium falciparum* en fonction de la réponse thérapeutique à la chloroquine en zone de mésoendémie palustre. *Bull Soc Pathol Exot*, 1998, **91**, 142-145.
145. ROBERT V, VERHAVE JP, PONNODURAI T, LOUWEL L, SCHOLTENS P & CARNEVALE P - Study of the distribution of circumsporozoite antigen in *Anopheles gambiae* infected with *Plasmodium falciparum*, using the enzyme-linked immunosorbent assay. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1988, **82**, 389-391.
146. ROBSON KJ, FREVERT U, RECKMANN I, COWAN G, BEIER J *et al.* - Thrombospondin-Related Adhesive Protein (Trap) of *Plasmodium falciparum* - Expression during sporozoite ontogeny and binding to human hepatocytes." *EMBO J*, 1995, **14**, 3883-3894.
147. ROEFFEN W, BECKERS PJ, TEELLEN K, LENSEN T, SAUERWEIN RW *et al.* - *Plasmodium falciparum*: a comparison of the activity of Pfs230-specific antibodies in an assay of transmission-blocking immunity and specific competition ELISAs. *Exp Parasitol*, 1995, **80**, 15-26.
148. ROEFFEN W, BECKERS PJ, TEELLEN K, VERHAVE JP, ELING W & SAUERWEIN R - Comparison of serological tests and bio-assay for malaria transmission blocking capacity in field sera. *Parasitologia*, 1993, **35** suppl., 95-97.
149. ROEFFEN W, MULDER B, TEELLEN K, BOLMER M, ELING W *et al.* - Association between anti-Pfs48/45 reactivity and *Plasmodium falciparum* transmission-blocking activity in sera from Cameroon. *Parasite Immunol*, 1996, **18**, 103-109.
150. ROSSIGNOL PA, RIBEIRO JMC & SPIELMAN A - Increased intradermal probing time in sporozoite-infected mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*, 1984, **33**, 17-20.
151. ROSSIGNOL PA, RIBEIRO JMC & SPIELMAN A - Increased biting rate and reduced fertility in sporozoite-infected mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*, 1986, **35**, 277-279.
152. ROSENBERG R, WIRTZ RA, SCHNEIDER I & BURGE R - An estimation of the number of malaria sporozoites ejected by a feeding mosquito. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1990, **84**, 209-212.
153. RUTLEDGE LC, WARD RA & BUCKWALTER RM - *Plasmodium* spp.: dispersion of malarial oocyst populations in anopheline and culicine mosquitoes. *Exp Parasitol*, 1973, **34**, 132-141.
154. SCHERF A, BEHR C, SARTHOU JL, PLA M, ROGIER C *et al.* - Immune response in mouse and malaria-exposed humans to peptides derived from Pf11-1, a highly repetitive megadalton protein of *Plasmodium falciparum*. *Eur J Immunol*, 1993, **23**, 1574-1581.
155. SCHERF A, CARTER R, PETERSEN C, ALANO P, NELSON R *et al.* - Gene inactivation of Pf11-1 of *Plasmodium falciparum* by chromosome breakage and healing: identification of a gametocyte-specific protein with a potential role in gametogenesis. *EMBO J*, 1992, **11**, 2293-301.
156. SCHERMAN IW - *Malaria: parasite biology, pathogenesis, and protection*, 1998, American Society for Microbiology Press, pp. 575.
157. SCHWARTZ A & KOELLA JC - Melanization of *Plasmodium falciparum* and C-25 sephadex beads by field-caught *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) from southern Tanzania. *J Med Entomol*, 2002, **39**, 84-88.
158. SEVERSON DW, MORI A, ZHANG Y & CHRISTENSEN BM - Chromosomal mapping of the two loci affecting filarial worm susceptibility in *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol*, 1994, **3**, 67-72.
159. SEVERSON DW, THATHY V, MORI A, ZHANG Y & CHRISTENSEN BM - Restriction fragment length polymorphism mapping of quantitative trait loci for malaria parasite susceptibility in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics*, 1995, **139**, 1711-1718.
160. SHAHABUDDIN M - Chitinase as a Vaccine. *Parasitol Today*, 1995, **11**, 46-47.
161. SHAHABUDDIN M & COSTERO A - Spatial distribution of factors that determine sporogonic development of malaria parasites in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol*, 2001, **31**, 231-240.
162. SHAHABUDDIN M & KASLOW DC - *Plasmodium*: parasite chitinase and its role in malaria transmission. *Exp Parasitol*, 1994, **79**, 85-88.
163. SHAHABUDDIN M, LEMOS FJA, KASLOW DC & JACOBS-LORENA M - Antibody mediated inhibition of *Aedes aegypti* midgut trypsin blocks sporogonic development of *Plasmodium gallinaceum*. *Infect Immunol*, 1996, **64**, 739-743.
164. SHAHABUDDIN M & PIMENTA PF - *Plasmodium gallinaceum* preferentially invades vesicular ATPase-expressing cells in *Aedes aegypti* midgut. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**, 3385-3389.
165. SHAHABUDDIN M, TOYOSHIMA T, AIKAWA M & KASLOW DC - Transmission-blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitinase by mosquito protease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**, 4266-4270.
166. SHUTE GT - Transfer of blood parasites (Plasmodia and Trypanosoma) between thick blood films during mass staining. *WHO/MAL*, 1960, N° 280.
167. SIDJANSKI S, VANDERBERG JP & SINNIS P - *Anopheles stephensi* salivary glands bear receptors for region 1 of the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 1998, **90**, 33-41.
168. SILVESTRINI F, ALANO P & WILLIAMS JL - Commitment to the production of male and female gametocytes in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*, 2000, **121**, 465-471.
169. SIMOND PL - Recherches sur les formes de reproduction asporulée dans le genre *Coccidium*. *C R Soc Biologie* (1^{er} mai 1897), 1897, 425-428.
170. SINDEN RE - Microgametogenesis in *Plasmodium yoelii nigeriensis*: a scanning electron microscope investigation. *Protistologica*, 1975, **11**, 263-268.

171. SINDEN RE - Sexual development of malaria parasites. *Adv Parasitol*, 1983, **22**, 153-216.
172. SINDEN RE - Gametocytes and sexual development. In: SHERMAN IW (Ed), *Malaria: parasite biology, pathogenesis, and protection*. American Society for Microbiology Press, Washington DC, 1998, pp. 25-48.
173. SINDEN RE, BUTCHER GA, BILLKER O & FLECK SL - Regulation of infectivity of *Plasmodium* to the mosquito vector. *Adv Parasitol*, 1996, **38**, 53-117.
174. SINDEN RE, CAMMING EU, BRAY RS & SMALLEY ME - Gametocyte and gamete development in *Plasmodium falciparum*. *Proc R Soc London B Biol Sci*, 1978, **201**, 375-399.
175. SINDEN RE & SMALLEY ME - Gametocytes of *Plasmodium falciparum*. Phagocytosis by leucocytes *in vivo* and *in vitro*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1976, **70**, 344-345.
176. SMALLEY ME & SINDEN RE - *Plasmodium falciparum* gametocytes: their longevity and infectivity. *Parasitology*, 1977, **74**, 1-8.
177. SMITH TG, LOURENCO P, CARTER R, WALLIKER D & RANFORD-CARTWRIGHT LC - Commitment to sexual differentiation in the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*, 2000, **121**, 127-133.
178. SOKHNA CS, TRAPE JF & ROBERT V - Gametocytes in Senegalese children with uncomplicated *falciparum* malaria treated with chloroquine, amodiaquine or sulfadoxine plus pyrimethamine. *Parasite*, 2001, **8**, 243-250.
179. STEWART MJ & VANDERBERG JP - Malaria sporozoites leave behind trails of circumsporozoite protein during gliding motility. *J Protozool*, 1988, **35**, 389-393.
180. STEWART MJ & VANDERBERG JP - Malaria sporozoites release circumsporozoite protein from their apical end and translocate it along their surface. *J Protozool*, 1991, **38**, 411-21.
181. SULTAN AA - Molecular mechanisms of malaria sporozoite motility and invasion of host cells. *Int Microbiol*, 1999, **2**, 155-160.
182. TARGET G, DRAKELEY C, JAWARA M, VON SEIDLEIN L, COLEMAN R *et al.* - Artesunate reduces but does not prevent post-treatment transmission of *Plasmodium falciparum* to *Anopheles gambiae*. *J Infect Dis*, 2001, **183**, 1254-1259.
183. TAYLOR PJ & HURD H - The influence of host haematocrit on the blood feeding success of *Anopheles stephensi*: implication for enhanced malaria transmission. *Parasitology*, 2001, **122**, 491-496.
184. TAYLOR LH & READ AF - Why so few transmission stages? Reproductive restraint by malaria parasites. *Parasitol Today*, 1997, **13**, 135-140.
185. TCHUINKAM T, MULDER B, DECHERING K, VERHAVE JP, COT M *et al.* - Experimental infections of *Anopheles gambiae* with *Plasmodium falciparum* of naturally infected gametocyte carriers in Cameroon: factors influencing the infectivity to mosquitoes. *Trop Med Parasitol*, 1993, **44**, 271-276.
186. THATHY V, FUJIOKA H, GANTT S, NUSSENZWEIG R, NUSSENZWEIG V & MENARD R - Levels of circumsporozoite protein in the *Plasmodium* oocyst determine sporozoite morphology. *EMBO J*, 2002, **21**, 1586-1596.
187. TOURAY MG, SEELEY DC & MILLER LH - *Plasmodium gallinaceum*: differential lysis of the two developmental stages of malaria sporozoites by the alternative pathway of complement. *Exp Parasitol*, 1994, **78**, 294-301.
188. TOURAY MG, WARBURG A, LAUGHINGHOUSE A, KRETTLI AU & MILLER LH - Developmentally regulated infectivity of malaria sporozoites for mosquito salivary glands and the vertebrate host. *J Exp Med*, 1992, **175**, 1607-1612.
189. TRAGER W, GILL GS, LAWRENCE C & NAGEL RL - *Plasmodium falciparum*: enhanced gametocyte formation *in vitro* in reticulocyte-rich blood. *Exp Parasitol*, 1999, **91**, 115-118.
190. TRAPE JF, ROGIER C., KONATE L, DIAGNE N, BOUGANALI H *et al.* - The Dielmo project: a longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal. *Am J Trop Med Hyg*, 1994, **51**, 123-137.
191. VAN DEN BERGHE L, CHARDOME M & PEEL E - Supériorité des préparations de scarification du derme sur les préparations de sang périphérique pour le diagnostic de malaria. *Anais do Inst Med Trop*, 1952, **9**, 553-563.
192. VANDERBERG JP, NUSSENZWEIG RS & MOST H - Protective immunity produced by the injection of X irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. V) *In vitro* effects of immune serum on sporozoites. *Milit Med*, 1969, **134**, 1183-1190.
193. VAUGHAN JA & AZAD AF - Passage of host immunoglobulins G from blood meal into haemolymph of selected mosquito species. *J Med Entomol*, 1988, **25**, 472-474.
194. VAUGHAN JA, DO ROSARIO V, LELAND P, ADJEPONG A, LIGHT J *et al.* - *Plasmodium falciparum*: ingested anti-sporozoite antibodies affect sporogony in *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Exp Parasitol*, 1988, **66**, 171-182.
195. VAUGHAN JA, NODEN BH & BEIER JC - Sporogonic development of cultured *Plasmodium falciparum* in six species of laboratory-reared *Anopheles* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*, 1994, **51**, 233-243.
196. VAUGHAN JA, NODEN BH & BEIER JC - Prior blood feeding effects on susceptibility of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) to infection with cultured *Plasmodium falciparum* (Haemosporida: Plasmodiidae). *J Med Entomol*, 1994, **31**, 445-449.
197. VAUGHAN JA, WIRTZ RA, DO ROSARIO VE & AZAD AF - Quantitation of antisporozoite immunoglobulins in the hemolymph of *A. stephensi* after blood feeding. *Am J Trop Med Hyg*, 1990, **42**, 10-16.
198. VERHAVE JP, FASS B, TCHUINKAM T, ARENS T & ROBERT V - Detection of *Plasmodium falciparum* gametocytes by quantitative buffy coat (QBC) analysis. *Ann Trop Med Parasitol*, 1995, **89**, 214.
199. VERMEULEN AN, PONNUDURAI TV, BECKERS PJA, VERHAVE JP & MEUWISSEN JHT - Sequential expression of antigens on sexual stages of *Plasmodium falciparum* accessible to transmission blocking antibodies in the mosquito. *J Exp Med*, 1985, **162**, 1460-1476.
200. VERNICK KD - Mechanisms of immunity and refractoriness in insect vectors of eukaryotic parasites. In: BREV PT & HULTMARK D (Eds), *Molecular mechanisms of immune responses in insects*. Chapman & Hall, London, 1998, pp. 261-309.
201. VERNICK KD, FUJIOKA H, SEELEY DC, TANDLER B, AIKAWA M & MILLER LH - *Plasmodium gallinaceum*: a refractory mechanism of ookinete killing in the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Exp Parasitol*, 1995, **80**, 583-595.
202. VON SEIDLEIN L, DRAKELEY C, GREENWOOD B, WALRAVEN G & TARGETT G - Risk factors for gametocyte carriage in Gambian children. *Am J Trop Med Hyg*, 2001, **65**, 523-527.
203. VON SEIDLEIN L, JAWARA M, COLEMAN R, DOHERTY T, WALRAVEN G & TARGETT G - Parasitaemia and gametocytaemia after treatment with chloroquine, pyrimethamine/sulfadoxine, and pyrimethamine/sulfadoxine combined with artesunate in young Gambians with uncomplicated malaria. *Trop Med Int Health*, 2001, **6**, 92-98.
204. WARBURG A & MILLER LH - Sporogonic development of a malaria parasite *in vitro*. *Science*, 1992, **255**, 448-450.
205. WARBURG A & SCHNEIDER I - *In vitro* culture of the mosquito stages of *Plasmodium falciparum*. *Exp Parasitol*, 1993, **76**, 121-126.
206. WENDELNIK K, SPACCAPELO R, NAITZA S, ROBSON KJH, JANSE CJ *et al.* - The A-domain and the thrombospondin-related motif of *Plasmodium falciparum* TRAP are implicated in the invasion process of mosquito salivary glands. *EMBO J*, 1999, **18**, 5195-5204.
207. WEST SA, REECE SE & READ AF - Gametocyte sex ratio of malaria and related Apicomplexa (Protozoa) parasites. *Trends Parasitol*, 2001, **17**, 525-531.
208. WILSON RJM & WILLIAMSON DH - Extrachromosomal DNA in the Apicomplexa. *Microbio Mol Biol Rev*, 1997, **6**, 1-16.
209. YEATES RA & STEIGER S - Ultrastructural damage of *in vitro* cultured ookinetes of *Plasmodium gallinaceum* (Brumpt) by purified proteinases of susceptible *Aedes aegypti*. *Z Parasitenkd*, 1981, **66**, 93-97.
210. ZHENG L - Genetic basis of encapsulation response in *Anopheles gambiae*. *Parasitologia*, 1999, **41**, 181-184.