

Plasmodium falciparum : épidémiométrie de la transmission homme-moustique et de l'infection chez le vecteur.

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

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

(2) IRD-UR paludisme afro-tropical, Groupe de recherche sur le paludisme, 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

Manuscripts n°2454b. "Entomologie médicale". Reçu le 8 juillet 2002. Accepté le 16 mai 2003.

Summary: Plasmodium falciparum: epidemiometry of the transmission from man to mosquito and of the infection in the vector.

The level of malaria transmission is usually estimated by some entomological parameters (entomological inoculation rate or reproductive rate and its seasonal variations). However, only one aspect of the malaria transmission is explored by this way, i.e. the transmission of Plasmodium from mosquito to man. The transmission from man to mosquito, the development of parasite in the mosquito midgut, and the role of transmission blocking immunity remain poorly documented. Recent studies on vaccination with gamete antigens showed that transmission blocking immunity, and the natural infectiousness of gametocytes after treatment underlined the need for taking into account a new aspect of malaria epidemiology concerning the transmission of Plasmodium from man to mosquito. In this paper, authors propose and discuss different new indicators and methods to improve our knowledge on malaria epidemiology.

Résumé :

Le niveau de transmission du paludisme est classiquement estimé par des paramètres entomologiques comme le taux d'inoculation entomologique ou le taux de propagation et leurs variations saisonnières. Ces indices n'explorent qu'un aspect de la transmission, celui du passage du parasite, du moustique vers l'homme. Récemment, lors d'études sur les tentatives de vaccination avec des antigènes de stades parasitaires sexués, le rôle de l'immunité bloquant la transmission et l'inféctivité naturelle des gamétocytes après traitement ont montré qu'il fallait aussi prendre en compte la transmission du parasite de l'homme vers le moustique. La mise au point de nouvelles méthodologies permet de proposer pour la première fois certains indicateurs destinés à l'étude de cet aspect complémentaire des analyses classiques.

malaria
Plasmodium falciparum
man-mosquito transmission
transmission blocking immunity
indicator
epidemiology

paludisme
Plasmodium falciparum
transmission homme-moustique
immunité bloquant la transmission
indicateur
épidémiologie

Introduction

Les épidémiologistes ont, depuis longtemps, pris l'habitude d'analyser la transmission du paludisme en utilisant des indicateurs essentiellement entomologiques, tels que le taux d'inoculation ou le taux de propagation. Cependant ces indices et leurs variations saisonnières ne reflètent qu'une partie de la transmission qu'on pourrait appeler transmission du moustique à l'homme. L'autre face complémentaire, de l'homme au moustique, est le plus souvent ignorée. Pour que cette dernière puisse s'accomplir, il faut : (i) que l'homme soit porteur de gamétocytes, (ii) que ces gamétocytes soient infectants, (iii) qu'ils soient ingérés par le moustique et (iv) qu'ils poursuivent leur développement chez un vecteur sensible. Au-delà de l'inféctivité des gamétocytes pour le moustique, il est possible d'explorer le rendement du cycle sporogonique, du gamétocyte ingéré au sporozoïte dans les glandes sali-

vaires, et d'estimer ainsi le rôle épidémiologique de l'immunité bloquant la transmission. Dans une perspective épidémiométrique, trois éléments paraissent essentiels : l'inféctivité des gamétocytes pour les moustiques, le rendement du développement sporogonique et l'immunité bloquant la transmission. Pour chacun de ces aspects seront envisagés successivement : la problématique générale, la méthodologie proposée, ainsi que leurs limites et contraintes.

L'inféctivité des gamétocytes pour les moustiques

Tous les porteurs de gamétocytes ne sont pas infectants. Un grand nombre de paramètres "humains", "parasite" ou "moustiques" interviennent sur la réussite du développement parasitaire chez le moustique (23). Seuls quelques-uns de ces

facteurs peuvent être explorés dans une approche épidémiologique.

La prévalence et la densité gamétocytaire, à un moment donné, dans une population considérée, sont des indicateurs très grossiers du pouvoir infectant de cette population pour les moustiques, car il n'existe pas forcément de corrélation entre la charge gamétocytaire et l'infectivité du porteur pour le moustique (5). Pourtant, ce sont actuellement les seuls paramètres utilisés couramment sur le terrain.

Parmi les facteurs "parasite", la proportion de gamétocytes mâles et femelles peut être estimée en routine, à condition que la coloration de la goutte épaisse soit parfaite et que le nombre de gamétocytes lus soit suffisant. Le ratio des sexes influence peu l'infectivité des gamétocytes dans les conditions naturelles. La mise en évidence de l'exflagellation des gamétocytes mâles n'a pas beaucoup d'intérêt épidémiologique, car elle ne rend pas compte de la réussite du développement sporogonique. En outre, elle exige une forte densité gamétocytaire.

La détermination des facteurs de risque pouvant favoriser la gamétocytogénèse dans une population pourrait être beaucoup plus intéressante. Cependant, il est actuellement difficile de prévoir les poussées gamétocytaires chez un individu, mais des facteurs tels que l'âge de l'hôte, les médicaments d'action lente (comme le Fansidar®), les doses subthérapeutiques ou la résistance du parasite aux antipaludiques, ont été identifiés comme étant à l'origine de telles poussées gamétocytaires (23). Par contre, la densité parasitaire asexuée initiale et son cortège de perturbations immunologiques ne semblent pas un déterminisme essentiel de l'accroissement de la densité de gamétocytes (11, 22, 29). Des tests de biologie moléculaire, visant à mettre en évidence des ARN messagers, codant des protéines sexuées précoces de la gamétocytogénèse, sont en cours de mise au point (6, 17) et devraient permettre d'identifier précocement ces poussées gamétocytaires.

La quantité de gamétocytes ingérés par le moustique au cours de son repas sanguin a fait l'objet d'un nombre restreint de travaux. Il est possible que les moustiques absorbent une quantité de sang très variable, ce qui pourrait contribuer à expliquer la surdispersion du nombre de gamètes (18) ou d'oocystes (13, 19) chez le moustique infecté.

Finalement, peu d'éléments permettent d'estimer indirectement le pouvoir gamétocytogène d'une souche plasmodiale et son pouvoir infectant pour les moustiques; il faut alors avoir recours à des mesures directes sur le terrain comme cela a été fait en Afrique (4, 7, 14) et en Papouasie-Nouvelle-Guinée (9).

Nous proposons de nouveaux indicateurs, ainsi qu'une méthodologie qui doit encore être standardisée pour optimiser les futures comparaisons entre les zones ou dans le temps.

Methodologie

La mesure directe de l'infectivité d'une population humaine pour les moustiques se fait classiquement par des enquêtes transversales répétées, à partir d'un échantillon représentatif de cette population. Deux ensembles de paramètres sont analysés: (i) l'indice gamétocytaire, la densité et le sex-ratio des gamétocytes, qui sont obtenus par la confection et l'examen d'étalements sanguins; (ii) l'infectivité des individus, qui est objectivée par des infections expérimentales de moustiques gorgés, soit directement à travers la peau du sujet humain, soit à travers une membrane à partir d'un prélèvement de sang veineux. S'il y a présence de gamétocytes infectants, des oocystes pourront être détectés 7 jours plus tard sur l'estomac des moustiques disséqués.

Le pourcentage de moustiques infectés est corrélé entre les deux méthodes, mais les résultats sont sensiblement supérieurs avec le gorgement à travers la peau par rapport à celui sur membrane (1, 3). Par contre, la corrélation entre ces deux méthodes est très faible pour les densités moyennes d'oocystes chez les moustiques infectés, peut-être en raison des différences de volumes sanguins absorbés lors des gorgements expérimentaux et naturels. Nous ne retiendrons donc pas la densité moyenne d'oocystes.

Parmi les indicateurs potentiels de l'infectivité humaine, il est possible de retenir les cinq suivants.

La proportion de sujets infectant pour les moustiques

Un sujet est dit infectant quand il infecte au moins un moustique par infection expérimentale d'un lot de moustiques gorgés jusqu'à réplétion complète. L'infection des moustiques est évaluée par la présence d'au moins un oocyste par lot de moustique, 7 jours après le gorgement. Il faut remarquer qu'une importante proportion d'individus, voisine de 50 % dans les expériences faites au Cameroun et au Burkina Faso (4, 24), infecte les moustiques tout en étant des "non-porteurs apparents" de gamétocytes. Ces sujets présentent une gamétocytémie qui, bien qu'inférieure au seuil de détection de 2-3 gamétocytes par mm³ en goutte épaisse, apparaît pourtant suffisante pour infecter au moins un moustique par lot en zone de forte endémie.

La proportion de porteurs de gamétocytes infectants

Ce paramètre est estimé par le produit de l'indice gamétocytaire (proportion de sujets avec gamétocytes microscopiquement décelables) et de la proportion d'individus infectants. Il peut être intéressant pour corriger l'imprécision de l'indice gamétocytaire observé. Il donne ordinairement un chiffre voisin du paramètre précédent.

La probabilité qu'un repas sanguin soit infectant

Plusieurs moyens permettent d'estimer cet indicateur. Le plus facile à réaliser utilise le produit de la proportion moyenne de sujets infectants par la proportion moyenne de moustiques infectés sur sujets infectants (9, 26). Ces deux termes du produit sont obtenus à partir des données des enquêtes transversales répétées. Une autre méthode plus précise, mais plus lourde, peut être proposée et associée à la première. Il s'agit de déterminer la proportion de moustiques infectés après gorgement sur un individu quelconque. Les moustiques sont capturés au repos, le matin dans les maisons, et sont immédiatement disséqués pour rechercher dans l'estomac des "formes rondes" qui sont des pré-gamètes, des gamètes ou des zygotes. On peut aussi rechercher des ookinètes au maximum de leur densité, 16 à 18 heures après le gorgement (25). La recherche des formes parasitaires peut se faire par simple coloration au Giemsa de l'étalement du bol alimentaire de chaque moustique (2, 30). Il est aussi possible d'utiliser un anticorps monoclonal anti-Pfs25 ou Pfs48/45 ou Pfs230, marqué à la fluorescéine, que l'on mélange au bol alimentaire après dilacération de l'estomac. La lecture au microscope à fluorescence permet de dépister les formes rondes dans la suspension (8, 24). Enfin, d'autres auteurs ont conservé vivants des moustiques sauvages endophiles pour les disséquer 7 jours après leur capture afin de rechercher des oocystes (28).

Le pouvoir infectant d'un gamétocyte

Bien qu'il n'y ait pas une corrélation nette entre la densité gamétocytaire et l'infection chez le moustique, il existe toutefois une relation entre ces deux variables. Le pouvoir infectant d'un gamétocyte est estimé par le rapport de la proportion

de moustiques infectés (i.e. avec au moins un oocyste par lot de moustiques, 7 jours après le gorgement) sur le nombre estimé de gamétocytes ingérés par moustique (obtenu par le produit de la densité gamétocytaire et du volume moyen de sang ingéré par l'espèce de moustique utilisée pour le gorgement). Ce paramètre n'a de sens que chez les sujets infectants, et il est possible de faire une moyenne entre plusieurs sujets. Ce paramètre pourrait refléter de manière indirecte le rôle de l'immunité naturelle bloquant la transmission.

La contribution d'une tranche d'âge de population au réservoir de moustiques infectés

Elle peut être estimée par le rapport F_i / F_i , avec $F_i = A_i * B_i * C_i$.
 - A_i est la proportion d'une tranche d'âge donnée (i) dans la population (informations issues d'un recensement récent dans la zone),

- B_i est la proportion de sujets infectant les moustiques, dans cette tranche d'âge,

- C_i est la proportion de moustiques infectés avec au moins un oocyste, après gorgement sur des sujets infectants de cette tranche d'âge (7),

La contribution d'une tranche d'âge permet de définir les groupes de population épidémiologiquement les plus dangereux.

Finalement, ces cinq indicateurs donnent un aperçu de l'infectivité d'une population ou des gamétocytes pour les moustiques. Certains peuvent être redondants ou peu fiables. C'est la répétition des études de terrain qui permettra de choisir les indicateurs pertinents.

Les limites

Le gorgement sur la peau pose des problèmes éthiques quoiqu'il soit bien supporté, même par les enfants. Le gorgement sur membrane requiert une prise de sang intraveineuse qu'il est difficile de réaliser chez de jeunes enfants. Aussi les moins de 5 ans sont-ils habituellement exclus en pratique de ce genre d'étude, ce qui est regrettable puisque les plus fortes gamétocytemies sont observées dans cette tranche d'âge.

Les indicateurs ci-dessus ne sont fiables que si l'échantillon de population est représentatif et si les moustiques d'élevage sont gorgés sur tous les individus d'un échantillon de population. Cependant, le choix au hasard des sujets est souvent suivi d'un important taux de refus qui contrarie l'analyse des résultats. On peut contourner la difficulté en sélectionnant un nombre suffisant de familles nucléaires volontaires, sans tenir compte de la gamétocytemie. Comme les taux de porteurs de gamétocytes et de sujets infectants sont relativement modérés, il faut choisir un échantillon de population suffisamment grand dans toutes les tranches d'âge.

Ce type d'enquête, basée sur des infections expérimentales de moustiques, ne donne qu'une image instantanée de ce qui se passe dans la population. Il vaut mieux répéter ces enquêtes à différents moments du cycle de transmission (avant, au maximum, et après le pic de transmission) pour estimer l'ampleur des variations saisonnières et pour établir une moyenne annuelle des indicateurs évalués.

La détection de formes pré-oocystiques chez les moustiques capturés au repos le matin doit être faite dans un grand nombre de maisons et sur un grand nombre de moustiques ("un grand nombre" étant par définition 20). Les taux d'infection des moustiques sont souvent faibles, ce qui peut limiter l'intérêt de cet indicateur dans certaines zones hypoendémiques où les moustiques infectés sont si peu abondants qu'ils deviennent indécélables en pratique (13).

La proportion de sujets infectant les moustiques est vraisemblablement surévaluée car les conditions du développement sporogonique en insectarium sont optimales et *a priori* plus favorables qu'en milieu naturel. Cependant les comparaisons d'un lieu géographique à un autre demeurent valables.

Le rendement du développement sporogonique

Le développement sporogonique est une phase capitale de la transmission du parasite. L'estimation de son rendement est utile pour identifier (i) les stades parasitaires particulièrement vulnérables à une action de lutte chez un vecteur déterminé (8, 31), (ii) les cibles parasitaires de l'immunité bloquant la transmission et (iii) le rôle épidémiologique de cette immunité, par rapport à l'ensemble des mécanismes non immunologiques qui dépendent du parasite et du vecteur.

Le rendement du développement sporogonique, par définition, désigne le nombre de sporozoïtes inoculés par piqûre, par rapport au nombre de gamétocytes ingérés. En pratique, ces deux valeurs sont difficiles à estimer et, comme on va le voir ci-après, c'est principalement les stades des gamétocytes aux oocystes qui sont concernés par cette évaluation du rendement.

La méthodologie d'évaluation du rendement est lourde et non exempte de critiques. Il est donc nécessaire de trouver des indicateurs et des méthodes qui soient aussi simples que possible. Après avoir exposé la méthodologie de l'évaluation du rendement du développement sporogonique, nous proposerons deux indicateurs simples: (i) la proportion de moustiques infectés sur sujets infectants, et (ii) le pouvoir infectant d'un gamétocyte, directement déduit des enquêtes transversales répétées qui permettent l'établissement des indices gamétocytiques et de la détermination des sujets infectants.

Méthodologie

Rendement interstade

Pour étudier précisément le rendement interstade, il faut infecter des moustiques sur des sujets ayant une forte gamétocytemie (> 100 gamétocytes/mm³), afin d'augmenter les chances d'obtenir des densités parasitaires non nulles à tous les stades du développement sporogonique. Il faut alors compter, dans ou sur l'estomac du moustique, les différents stades parasitaires du développement sporogonique. La numération de ces stades se fait après dissection de lots de moustiques gorgés, à différents moments: immédiatement après gorgement pour les gamétocytes (18), après 30 minutes pour les gamètes, 3 heures pour les zygotes, 16 à 18 heures pour les ookinètes (25), 48 heures pour les jeunes oocystes et 7 jours pour les oocystes mûrs. Ces stades peuvent être dénombrés: (i) par immunofluorescence, en utilisant un anticorps monoclonal marqué spécifique de stade (8); (ii) par microscopie classique avec des frottis minces du contenu des estomacs et coloration au Giemsa pour les stades pré-oocystes (30); (iii) en microscopie à contraste de phase pour les ookinètes après avoir lysé les érythrocytes par l'acide acétique à 3% (31). Une densité moyenne de chaque stade est évaluée sur chaque lot de moustiques et pour chaque porteur de gamétocytes. Le rendement entre deux stades parasitaires consécutifs (de la séquence: gamétocytes - gamètes - zygotes - ookinètes - jeunes oocystes - oocystes matures) peut être défini par le rapport des densités parasitaires moyennes stade x / stade $x-1$.

Le rendement global

Le rendement global entre le gamétocyte et l'oocyste est estimé par le produit des rendements interstades. Il est aussi possible d'estimer ce rendement global par le rapport des densités moyennes de gamétocytes femelles ingérés et d'oocystes. Ce rendement global est le plus souvent faible dans les conditions naturelles (8, 31). Un rendement moyen est calculé à partir de plusieurs porteurs de gamétocytes; il varie en fonction de l'espèce vectrice (31).

Les facteurs "humains" versus facteurs "parasite" et "moustique"

Le rendement interstade ou le rendement global peuvent être estimés en présence du sérum "immun" du porteur de gamétocytes, ou en présence de sérum "témoin négatif". La méthodologie du remplacement du sérum est décrite ci-après. Le rendement en présence de sérum immun reflète l'inhibition globale due aux facteurs sériques humains, mais aussi aux facteurs "parasite" et "moustique". Au contraire, le rendement en présence de sérum témoin non immun reflète l'inhibition due aux seuls facteurs "parasite" et "moustique". La comparaison des rendements entre sérums "immun" et "témoin négatif" permet théoriquement d'évaluer le rôle de l'activité sérique anti-développement sporogonique (qui est une composante de l'immunité anti-transmission, voir ci-après). Par exemple, un rendement gamète-zygote fortement diminué en présence de sérum immun par rapport au témoin peut s'expliquer par la présence de facteurs sériques immunitaires agissant sur le développement sporogonique. En revanche, un rendement très voisin entre le sérum immun et le sérum témoin laisse suspecter un faible rôle de l'immunité anti-transmission.

Cette méthode permet d'évaluer l'évolution de ce "facteur sérique" en fonction des classes d'âge, des saisons, des niveaux d'endémie, etc.

La proportion de moustiques infectés sur sujets infectants et le pouvoir infectant d'un gamétocyte

La proportion de moustiques infectés sur sujets infectants est définie comme le rapport moyen du nombre de moustiques avec au moins un oocyste sur le nombre de moustiques examinés 7 jours après le gorgement. La définition du pouvoir infectant d'un gamétocyte a été énoncée précédemment. Ces deux indicateurs peuvent être obtenus à partir des enquêtes transversales répétées pour obtenir les indices gamétocytaires et pour évaluer l'infectivité d'une population. Il est aussi possible d'identifier des porteurs de gamétocytes dans la zone étudiée puis de gorger des moustiques d'élevage.

Les limites

L'analyse du rendement du développement sporogonique est actuellement difficile à cause d'une grande variabilité d'un porteur de gamétocytes à un autre et d'un moustique à un autre. Il faut, là aussi, disséquer un grand nombre de moustiques pour chaque stade parasitaire. La lourdeur de la méthode d'immunofluorescence ne permet pas de tester de nombreux moustiques pour chaque stade examiné et donc les moyennes de densités parasitaires sont probablement biaisées. L'étalement du contenu stomacal, coloré au Giemsa, peut être lu longtemps après la manipulation (2). Il permet d'augmenter le nombre de moustiques testés, mais il n'est pas certain que tout le contenu stomacal soit examiné et la lecture des ookinètes est contrariée par l'abondance de granules pigmentaires. La détermination de la densité de gamétocytes femelles ingérés est aussi rendue difficile par la méconnaissance du volume de sang ingéré par chaque moustique. On peut évaluer cette

densité en multipliant la concentration gamétocytaire dans le sang périphérique par une estimation moyenne du volume de sang ingéré. Le rendement sporogonique (densité moyenne des oocystes / densité moyenne des gamétocytes femelles ingérés) est alors une simple approximation de la réalité qui permet, toutefois, de faire des comparaisons d'une zone d'étude à une autre, à condition que la méthodologie soit bien standardisée.

La valeur épidémiologique de la proportion de moustiques infectés (avec oocystes) sur sujets infectants dépend du nombre de moustiques disséqués et de la représentativité de l'échantillon des porteurs de gamétocytes au sein de l'ensemble de ces porteurs dans la population générale. C'est donc un indicateur qu'il faut analyser avec un esprit critique. En outre, il ne reflète que globalement ce qui s'est passé pendant le développement sporogonique sans donner de détails sur les phases intermédiaires.

Dans tous les cas, le rendement du développement sporogonique, tel qu'envisagé ici, ne va pas au-delà de l'oocyste au 7^e jour après le gorgement. Cette limitation revient à occulter les phases suivantes qui concernent le stade sporozoïte: formation dans l'oocyste âgé, libération dans l'hémolymphe, traversée de l'épithélium des glandes salivaires et pénétration dans le canal salivaire. Dans l'idéal, toutes ces phases devraient être quantifiées sous l'aspect du rendement parasitaire. Ceci a seulement été abordé au laboratoire (voir nombreuses références dans 23) mais, à notre connaissance, n'a pas encore été abordé sur le terrain dans l'optique quantitative qui nous intéresse ici. Il reste donc nombre d'obstacles techniques à la véritable évaluation du rendement du développement sporogonique.

Estimation de l'immunité bloquant la transmission homme-moustique

Pour expliquer les fluctuations naturelles du développement sporogonique ou de la transmission homme-moustique, et leurs niveaux différents en fonction du niveau d'endémie ou des tranches d'âge, il faut tenir compte de l'immunité bloquant le déroulement du développement sporogonique. Il est admis pour l'instant que cette immunité naturelle repose principalement sur l'action d'anticorps spécifiques d'antigènes des stades pré-oocystes (gamétocytes, gamètes, zygotes, ookinètes).

La première possibilité est de mesurer la réponse de ces anticorps comme indicateur de l'immunité anti-transmission. Mais, d'après des travaux réalisés au Cameroun, il ne semble pas exister de corrélation évidente entre taux d'anticorps Pfs230 ou Pfs48/45 et l'inhibition d'infectivité des gamétocytes pour le moustique (15, 27). La seconde possibilité est de mesurer le rôle du sérum immun sur l'infectivité des gamétocytes, par rapport à un sérum témoin non immun.

Différentes méthodologies existent déjà et ont été appliquées sur le terrain, mais la standardisation et le choix des indicateurs de l'inhibition d'infectivité ne font pas encore l'unanimité.

Méthodologie

Le dosage des anticorps spécifiques

Il est possible de détecter les anticorps spécifiques d'un antigène de gamétocyte (Pfs48/45 ou Pfs230) par la technique d'ELISA compétition (27) ou d'immunoprécipitation (10). Avec l'ELISA compétition, il faut déterminer la dernière dilution pour laquelle le sérum est encore inhibiteur par rapport à un témoin négatif, puis d'en calculer le taux géométrique

moyen (TGM) pour plusieurs sérums et comparer ces TGM entre groupes d'âge, ou zones, ou saisons, selon les modalités habituelles de la séro-épidémiologie. L'immunoprécipitation se prête moins bien à une évaluation quantitative; un score en 6 classes a été proposé (10). D'autres tests sérologiques complémentaires sont en cours de mise au point pour améliorer la concordance entre les taux d'anticorps anti-stades sexués et l'inhibition de l'infection chez le moustique.

L'infection expérimentale avec changement de sérum

La méthodologie repose sur deux techniques: le "Standard Membrane Feeding Assay" (SMFA) (12) ou le "Direct Membrane Feeding Assay" (DMFA) (16).

Le premier test utilise des gamétocytes infectants de *P. falciparum*, obtenus en culture. Par l'intermédiaire d'un gorgement expérimental sur membrane, deux lots de moustiques d'élevage ingèrent ces gamétocytes en présence soit du sérum à tester soit d'un sérum témoin négatif non immun. Ce test a été soigneusement standardisé et procure des résultats reproductibles (20).

Le principe du DMFA est différent: des moustiques d'élevage sont infectés avec les globules rouges parasités d'un porteur de gamétocytes, en présence du plasma autologue du porteur, ou en substituant ce plasma par un sérum témoin non immun de groupe sanguin AB (16). Ce test est applicable dans un laboratoire modestement équipé et est peu coûteux. Avec ces deux tests, l'infection du moustique est jugée soit en fonction de la proportion de moustiques infectés, soit en fonction du nombre moyen d'oocystes, 7 jours après le gorgement. Différents indicateurs de l'inhibition ont été proposés: (i) le taux de réduction qui est l'indicateur privilégié du SMFA (12) et (ii) un rapport des densités oocystiques ou des prévalences de moustiques infectés entre sérum test et sérum non immun. Un rapport inférieur à 1, ou mieux, une différence significative entre les pourcentages de moustiques infectés peuvent refléter une inhibition sérique probable. Toutefois, un indicateur unanimement accepté du niveau d'immunité bloquant la transmission dans une population reste à définir. Il pourrait être la proportion de sujets "inhibiteurs" dans cette population. On peut aussi estimer le rôle des facteurs sériques sur le rendement global oocystes/gamétocytes ingérés (voir ci-avant). Plus ce rôle est important, plus l'immunité naturelle anti-transmission pourrait jouer un rôle épidémiologique.

Les limites

Le protocole utilisant des gamétocytes de culture (SMFA) permet de tester tous les sérums, qu'ils soient de porteurs de gamétocytes ou non. Par contre, il n'est réalisable que dans les rares laboratoires capables de maintenir en culture des gamétocytes infectants de *P. falciparum*. En outre, il coûte fort cher et ne peut être réalisé en grandes séries.

Le test DMFA utilisant des gamétocytes frais d'un porteur de gamétocytes ne permet d'étudier que des porteurs de gamétocytes à forte gamétocytemie. Les plus faibles gamétocytemies sont inutilisables dans ce test, car elles entraînent un très faible pourcentage de moustiques infectés, qui empêche les comparaisons entre sérum autologue et sérum témoin. Aussi les faibles gamétocytemies sont-elles habituellement exclues en pratique de ce genre d'étude, ce qui est regrettable puisque les faibles gamétocytemies sont, de loin, les plus nombreuses. La définition d'un sujet "inhibiteur" reste discutée. On ne sait pas encore si les indicateurs proposés et leur seuil de positivité représentent une réalité épidémiologique, et il nous semble essentiel que de futures recherches documentent cette question.

Il existe une certaine variabilité des résultats d'inhibition d'une cellule de gorgement à l'autre et peut-être d'un test à l'autre, au moins pour le DMFA, dont la reproductibilité n'a pas encore été validée. La valeur du test de comparaison des sérums et du taux de sujets "inhibiteurs" va donc dépendre du nombre de moustiques disséqués et des caractéristiques des cellules de gorgement utilisées pour chaque test. Il est important de standardiser la méthodologie pour permettre des comparaisons et il faut rester prudent dans l'analyse des résultats, notamment ceux basés sur un faible nombre de moustiques disséqués (21).

Conclusion

Depuis les travaux de ROSS et de GRASSI, de très nombreux épidémiologistes tentent d'appréhender les différentes phases du développement parasitaire et d'en modéliser les interactions, afin de pouvoir prévoir l'efficacité de certaines mesures de lutte sur un des maillons fragiles du cycle de transmission. Pour l'instant c'est, de loin, la transmission moustique-homme et l'infection chez le réservoir humain qui ont fait l'objet des plus nombreuses recherches. Une attention croissante se porte sur les événements des phases de transmission de l'homme au moustique et du développement sporogonique. Beaucoup de travail reste encore à faire, mais nul doute que s'ouvre un champ d'investigation original pour les paludologues.

Remerciements

Pierre CARNEVALE est chaleureusement remercié pour sa contribution à l'amélioration du manuscrit.

Références bibliographiques

1. AWONO-AMBÉNÉ HP, DIAWARA L & ROBERT V - Comparison of direct and membrane feeding methods to infect *Anopheles arabiensis* with *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*, 2001, **64**, 32-34.
2. BONNET S, GOUAGNA C, SAFEUKUI I, MEUNIER JY & BOUDIN C - Comparison of artificial membrane feeding with direct skin feeding to estimate infectiousness of *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers to mosquitoes. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2000, **94**, 103-106.
3. BOUDIN C, OLIVIER M, MOLEZ JF, CHIRON JP & AMBROISE-THOMAS P - High human malarial infectivity to laboratory-bred *Anopheles gambiae* in a village in Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg*, 1993, **48**, 700-706.
4. CARTER R. & GRAVES PM - Gametocytes. In *Malaria. Principles and practice of malariology*. Eds. : Wernsdorfer WH & McGregor I, Churchill Livingstone, 1988, **1**, 1-59.
5. GITHEKO AK, BRANDLING-BENNETT AD, BEIER M, ATIEMI F, OWAGA M & COLLINS FH - The reservoir of *Plasmodium falciparum* malaria in a holoendemic area of Western Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1992, **86**, 355-358.
6. 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.
7. GRAVES PM, BURKOT TR, CARTER R, CATTAN JA, LAGOG M et al. - Measurement of malarial infectivity of human populations to mosquitoes in the Madang area, Papua New Guinea. *Parasitology*, 1988, **96**, 251-263.
8. GRAVES PM, CARTER R, BURKOT TR, QUAKYI IA & KUMAR N - Antibodies to *Plasmodium falciparum* gamete surface antigens in Papua New Guinea sera. *Parasite Immunol*, 1988, **10**, 209-218.

11. 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.
12. LENSEN A, VAN DRUTEN J, BOLMER M, VAN GEMERT G, ELING W & SAUERWEIN R - Measurement by membrane feeding of reduction in *Plasmodium falciparum* transmission induced by endemic sera. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 1996, **90**, 20-22.
13. MEDLEY GF, SINDEN RE, FLECK S, BILLINGSLEY PF, TIRAWANCHAI N & RODRIGUEZ MH - Heterogeneity in patterns of malarial oocyst infections in the mosquito vector. *Parasitology*, 1993, **106**, 441-449.
14. MUIRHEAD-THOMSON RC - The malaria infectivity of an African village population to mosquitoes (*A. gambiae*). A random xenodiagnostic survey. *Am J Trop Med Hyg* 1957, **6**, 971-979.
15. MULDER B, LENSEN T, TCHUINKAM T, ROEFFEN W, VERHAVE JP *et al.* - *Plasmodium falciparum*: membrane feeding assays and competition ELISAs for the measurement of transmission reduction in sera from Cameroon. *Exp Parasitol*, 1999, **92**, 81-86.
16. MULDER B, TCHUINKAM T, DECHERING K, VERHAVE JP, CARNEVALE P *et al.* - Malaria transmission-blocking activity in experimental infections of *Anopheles gambiae* from naturally infected *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1994, **88**, 121-125.
18. 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.
19. 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.
20. PONNUDURAI TV, LENSEN AHW, BENSINK MPE & MEUWISSEN JHT - Infectivity of cultured *Plasmodium falciparum* gametocytes to mosquitoes. *Parasitology* 1989, **98**, 165-173.
21. 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.
22. ROBERT V, AWONO-AMBENE HP, LE HESRAN JY & TRAPE JF - Gametocytemia and infectivity to mosquitoes of patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria attacks treated with chloroquine or sulfadoxine plus pyrimethamine. *Am J Trop Med Hyg*, 2000, **62**, 210-216.
23. ROBERT V & BOUDIN C - Biologie de la transmission homomoustique du *Plasmodium*. *Bull Soc Pathol Exot*, 2003, **96**, 6-20.
24. 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-25kD monoclonal antibody. *Am J Trop Med Hyg*, 1995, **52**, 366-369.
25. 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.
26. ROBERT V, TCHUINKAM T, MULDER B, COT M, GELAS H *et al.* - Infectivité des porteurs de gamétocytes de *Plasmodium falciparum* pour les anophèles vecteurs dans la ville de Yaoundé, Cameroun. *Rev Epidémiol Santé Publique*, 1993, **41**, suppl. 1, S86.
27. ROEFFEN W, MULDER B, TEELEN 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.
28. SAUL A, GRAVES PM & KAY B - A cyclical model of disease transmission and its application to determining vectorial capacity from vector infection rates. *J Appl Ecol*, 1990, **27**, 123-133.
29. 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.
30. VAUGHAN J, NODEN B & BEIER J - Population dynamics of *Plasmodium falciparum* sporogony in laboratory infected *Anopheles gambiae*. *J Parasitol*, 1992, **78**, 716-724.
31. VAUGHAN J, NODEN B & BEIER J - Sporogonic development of cultured *Plasmodium falciparum* in 6 species of laboratory reared *Anopheles* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*, 1994, **51**, 233-243.