

INFECTIONS EXPERIMENTALES D'ANOPHELES GAMBIAE AVEC DES GAMETOCYTES DE PLASMODIUM FALCIPARUM : EPIDEMIOLOGIE DE LA TRANSMISSION HOMME-VECTEUR DU PALUDISME EN MILIEU URBAIN

T. TCHUINKAM, B. MULDER, J.-P. VERHAVE, C. BOUDIN, P. CARNEVALE, V. ROBERT

L'infection expérimentale des anophèles par les plasmodies est une technique difficile, mais ce n'est pas une fin en soi. Il s'agit d'un outil mis au point dans plusieurs buts : évaluer la susceptibilité des espèces d'anophèles aux différentes espèces plasmodiales (1), estimer l'inféctivité d'une population humaine pour une souche de moustiques (2,3,4,5) ou étudier les facteurs qui déterminent la transmission homme-vecteur du parasite (6,7,8,9).

Le pouvoir infectant d'une population donnée pour les vecteurs locaux du paludisme ou la susceptibilité de ces vecteurs aux souches plasmodiales circulant dans la population sont des indices épidémiologiques importants de la transmission homme-vecteur du paludisme. Ces deux indices peuvent être résumés et exprimés par un seul paramètre, la probabilité K qu'a un moustique de s'infester en prenant un repas de sang sur un membre quelconque de la population.

Deux méthodes permettent de déterminer expérimentalement ce facteur K. La méthode directe, la plus adaptée à la zone rurale, consiste à gorger des moustiques sur un échantillon démographiquement représentatif de la population générale sans s'intéresser au préalable à la parasitémie, soit directement sur les sujets (3,4, 10), soit par l'intermédiaire d'une cellule d'alimentation artificielle (2,11). Le pouvoir infectant de la population exprimé comme le taux moyen de moustiques infectés par rapport au nombre gorgé représente alors la probabilité K.

Une approche indirecte, plus simple dans la pratique en milieu urbain, consiste à rechercher d'abord les porteurs de gamétocytes, à déterminer ainsi le réservoir infectant potentiel (indice gamétocytaire), puis à infecter expérimentalement les moustiques d'élevage avec le sang de ces porteurs pour déterminer la susceptibilité des anophèles aux différentes souches plasmodiales (5). Dans ce deuxième cas, le facteur K est défini comme le produit de la prévalence gamétocytaire par le taux moyen de moustiques infestés. Nous avons utilisé cette dernière

approche pour examiner la cinétique du développement extrinsèque du parasite dans les conditions de laboratoire et pour évaluer le niveau de la transmission homme-vecteur du paludisme humain à *Plasmodium falciparum* par *Anopheles gambiae* dans la ville de Yaoundé, Cameroun.

MATERIELS ET METHODES

Pour mener ce travail, nous avons besoin de très grandes quantités de moustiques : nous avons de ce fait entrepris d'élever dans des conditions de laboratoire une souche locale d'*Anopheles gambiae* (12). Cette souche a été progressivement adaptée au gorgement sur des animaux de laboratoire (lapin) puis, par sélection, au gorgement sur des cellules d'alimentation artificielle de 1134 mm² à travers une membrane Parafilm® (13).

La recherche des porteurs de gamétocytes s'est faite quotidiennement au dispensaire de Messa, quartier central de Yaoundé proche de l'O.C.E.A.C., par des gouttes épaisses colorées au Giemsa et examinées à l'O.C.E.A.C.

Pour chaque porteur de gamétocytes dépisté, du sang veineux a été prélevé au pli du coude dans 2 tubes Vacutainer® de 5 ml, l'un sans anticoagulant, l'autre hépariné. A partir du tube sec, une nouvelle goutte épaisse et un frottis ont été faits pour déterminer la parasitémie au moment de l'infection expérimentale. Le sang hépariné a rapidement été introduit dans la cellule de gorgement et immédiatement offert pendant 15 minutes à un lot de moustiques âgés de 4 à 5 jours.

Les moustiques gorgés ont été triés et élevés séparément, dans les mêmes conditions climatiques que les autres moustiques, et examinés ultérieurement.

RESULTATS

L'enquête parasitologique

La prévalence parasitaire au dispensaire de Messa, évaluée sur 10781 gouttes épaisses, a été de 37,1 ± 7,8%. La répartition plasmodiale a confirmé que *Plasmodium falciparum* est le principal agent du paludisme à Yaoundé avec une prévalence de 90,5 %, les autres étant *Plasmodium malariae* (13%) et *Plasmodium ovale* (2%). Chez 5,5% des patients positifs, nous avons observé une infection mixte consistant en une association de *Plasmodium falciparum* avec l'une des 2 autres espèces présentes. L'association des

- Travail de l'Unité de recherches sur le Paludisme, O.C.E.A.C., Yaoundé, Cameroun (T.T., DEA entomologie médicale ; C.B., MD PhD directeur de recherches), de l'Université Catholique de Nimègue, Pays-Bas (B.M., immunologiste ; J.P.V., MSc) et de l'ORSTOM, Paris, France (P.C., entomologiste médical, directeur de recherches ; V.R., entomologiste médical, directeur de recherches).

- Correspondance : Timoléon TCHUINKAM, O.C.E.A.C., BP 288, Yaoundé, Cameroun.



3 espèces existantes n'a pas été observée au cours de cette enquête.

Le réservoir infectant potentiel, constitué des porteurs de gamétocytes, a été estimé à $5,4 \pm 1,8\%$ pour un seuil de détection égal à 4 gamétocytes/microlitre. Les deux indices parasitologiques (plasmodique et gamétocytaire) ont varié très peu au cours de l'année. La transmission a été permanente avec un pic de prévalence des accès palustres de mars à mai. Les allures sont comparables à celles obtenues par MANGA (14) dans la même ville mais sur un échantillon de population générale en bonne santé physique apparente. Elles indiquent que Yaoundé est une zone mésendémique d'après la classification de METSELAAR et VAN THIEL citée par RODHAIN et PEREZ (15).

Développement extrinsèque du parasite au laboratoire

Lors du repas de sang expérimental, les moustiques absorbent à la fois des globules rouges sains et des hématies parasitées. Ces parasites peuvent être au stade trophozoïte ou schizonte et donc asexués, ou au stade gamétocyte. Les gamétocytes sont sexués et on distingue des microgamétocytes mâles et des macrogamétocytes femelles (fig. 1). Les autres stades du parasite sont digérés : seuls subsistent les gamétocytes qui s'activent après une quinzaine de minutes et sortent des hématies. Les microgamétocytes subissent une exflagellation (fig. 2) et les gamètes mâles vont féconder les gamètes femelles pour donner un zygote. Observé en immunofluorescence trois heures au moins après le repas infectant en utilisant l'anticorps monoclonal dirigé contre la protéine 25 kDa conjugué à la fluorescéine isothiocyanate, le zygote est une cellule globulaire riche en pigment cytoplasmique (fig. 3). Il émet un pseudopode après 12 à 24 heures et prend une forme cornue (fig. 4). Ce pseudopode s'allonge de plus en plus et le zygote, auparavant immobile, devient fusiforme et mobile : c'est l'ookinète (fig. 5). Ce dernier traverse l'épithélium intestinal et se loge sous l'assise basale où il s'enkyste et devient oocyste après 24 à 36 heures. Sept jours après l'infection, les dissections de moustiques dans du mercurochrome à 2% permettent de dénombrer les oocystes sur les estomacs : au grossissement $\times 100$, ils se présentent sous forme de petits cercles sur le mésentéron (fig. 6) ; grossis 400 fois, on constate qu'il s'agit en réalité de kystes sphériques (fig. 7). Un agrandissement de 1000 fois permet d'observer une double membrane entourant le kyste et un cytoplasme riche en granulations de pigments (fig. 8). A ce stade, l'oocyste est logé dans une dépression de l'assise basale et continue à se développer (fig. 9). Cette assise se rompt par la suite et l'oocyste fait saillie sur l'estomac du moustique. Vers le dixième jour après l'infection et si les conditions de température et d'humidité sont bien maintenues à leurs *optima*, les sporoblastes apparaissent dans l'oocyste (fig. 10). A maturité, c'est-à-dire douze jours au moins après l'infection, l'oocyste éclate et libère les sporozoïtes qui migrent dans les glandes salivaires (fig. 11). Le moustique devenu infectant peut alors transmettre le parasite en piquant un individu.

Les infections expérimentales

Les résultats portent sur 139 porteurs de gamétocytes des 2 sexes, d'âge moyen égal à 19,5 ans (extrêmes :

4 et 60), d'une gamétocytemie moyenne de 163 par microlitre (μl) (extrêmes : 8 et 1200). Seules ont été retenues les infections pour lesquelles au moins 20 moustiques ont pu être disséqués au septième jour.

Le stade oocyste à J7 a été arbitrairement choisi pour déterminer la susceptibilité des anophèles à *Plasmodium falciparum*. Un total de 5149 anophèles a été disséqué, ce qui représente une moyenne de 37 moustiques par patient (extrêmes : 20 et 88). Dans 86 expérimentations, au moins un moustique a été infecté : 62% de porteurs de gamétocytes ont donc été infectants pour les anophèles. Le taux moyen global d'infection des moustiques a été de $11,51 \pm 2,79\%$ (extrêmes : 0 et 72,4) avec une moyenne d'oocystes par estomac de $1,59 \pm 0,39$ (extrêmes : 0 et 14,5). En considérant les seules infections réussies, le taux moyen d'infection des moustiques a été de $18,60 \pm 3,80$, le nombre moyen d'oocystes par estomac étant de $2,56 \pm 0,53$. L'infectivité d'un gamétocyte a été évaluée à 0,07%.

Aperçu épidémiologique

La prévalence gamétocytaire au sein des patients fébriles du dispensaire a été de $5,4 \pm 1,8\%$. Lorsqu'on multiplie cet indice gamétocytaire par le taux moyen de moustiques infesté après le repas de sang expérimental, on obtient la probabilité Kd pour un moustique de notre souche d'élevage de s'infester en prenant un repas sanguin sur un patient du dispensaire présentant des symptômes palustres :

$$Kd = (0,0540 \pm 0,0180) \times (0,1151 \pm 0,0279) = 0,006$$

(avec $0,003 \leq Kd \leq 0,010$).

L'exploitation épidémiologique de ces résultats peut s'envisager au niveau de l'ensemble de la population urbaine de Yaoundé dont le taux de prévalence des gamétocytes est de $1,7 \pm 0,8\%$, pour un seuil de détection égal à 8 gamétocytes/ μl . En multipliant ce paramètre par la proportion moyenne de moustiques qui s'infectent en prenant un repas de sang sur un porteur de gamétocytes confirmé, on obtient la probabilité naturelle Kn pour un moustique de s'infecter au cours d'un repas sanguin sur un membre quelconque de la population urbaine en bonne santé physique apparente :

$$Kn = (0,0170 \pm 0,0080) \times (0,1151 \pm 0,0279) = 0,002$$

(avec $0,001 \leq Kn \leq 0,004$).

La probabilité Kn est 3 fois inférieure à celle des infections expérimentales avec le sang des sujets malades. Elle est six fois plus faible encore que celle calculée par GRAVES et coll. (5) en Papouasie-Nouvelle Guinée qui est une zone de forte endémie. Nous avons déterminé cette valeur pour *Plasmodium falciparum* exclusivement, alors que Yaoundé est en zone de sympatrie plasmodiale. GRAVES et coll. avaient obtenu 0,012 pour la somme des 3 espèces : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae* et *Plasmodium vivax*. Quoiqu'il en soit, notre valeur de Kn indique que la transmission homme-vecteur du paludisme est relativement faible à Yaoundé comparée à celle de Papouasie-Nouvelle Guinée et étant donnée la faible infectivité des autres espèces plasmodiales (16). Les indices paludologiques placent d'ailleurs la région de Yaoundé en zone méso-endémique d'après la classi-

fication de METSELAAR et VAN THIEL, tandis que Papouasie-Nouvelle Guinée est en zone holo-endémique.

Au cours de sa vie adulte, l'anophèle prend plusieurs repas de sang, augmentant ainsi les occasions de s'infecter. Ce facteur K doit donc être multiplié par le nombre de piqûres du moustique en tenant compte de sa longévité et de son cycle gonotrophique, pour avoir la probabilité pour un moustique de s'infecter au cours de sa vie adulte.

CONCLUSION

Il est frappant de constater que la probabilité K_n , quoique faible, est largement suffisante pour assurer une transmission permanente estimée selon les quartiers entre 3 et 30 piqûres infectantes d'anophèles par homme et par an (17,18) et pour maintenir un certain niveau d'endémie dans le périmètre urbain et sub-urbain.

REFERENCES

- 1 - KLEIN T. A., LIMA J. B. P., TADA M. S., MILLER R. - Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes in Rondonia, Brazil to infection by *Plasmodium vivax*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1991 ; 45 : 463-470.
- 2 - BOUDIN C., OLIVIER M., MOLEZ J. F., CHIRON J. P., 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.
- 3 - GAMAGE-MENDIS A. C., RAJAKARUNA J., CARTER R., MENDIS K. N. - Infectious reservoir of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria in an endemic region of Sri Lanka. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1991 ; 45 : 479-487.
- 4 - GITHEKO A. K., BRANDING-BENNET A. D., BEIER M., ATIEMI F., OWAGA M., COLLINS F. H. - The reservoir of *Plasmodium falciparum* malaria in a holoendemic area of Western Kenya. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1992 ; 86 : 355-358.
- 5 - GRAVES P. M., BURKOT T. R., CARTER R., CAITANI J. A., LAGOG M., PARKER J., BRABIN B. J., GIBSON F. D., BRADLEY D. J., ALPERS M. P. - Measurement of malarial infectivity of human populations to mosquitoes in the Madang area, Papua, New Guinea. *Parasitology* 1988 ; 96 : 251 - 263.
- 6 - GAMAGE-MENDIS A. C., RAJAKARUNA J., CARTER R., MENDIS K. N. - Transmission blocking immunity to human *Plasmodium vivax* malaria in an endemic population in Kataragama, Sri Lanka. *Parasite Immunology* 1992 ; 14 : 385-396.
- 7 - MENDIS K. N., MUNESINGHE Y. D., SILVA DE Y. N. Y., KERALA L., CARTER R. - Malaria transmission-blocking immunity induced by natural infections of *Plasmodium vivax* in humans. *Infection and immunity* 1987 ; 55 : 369-372.
- 8 - MULDER L., TCHUINKAM T., DECHERING K., VERHAVE J. P., CARNEVALE P., MEUWISSEN J. H. E. T., ROBERT V. - Malaria transmission-blocking activity in experimental infections of *Anopheles gambiae* with naturally infected *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1994 ; 88 : 121-125.
- 9 - MUNESINGHE Y. D., MENDIS K. N., CARTER R. - Anti-gamete antibodies block transmission of human vivax malaria to mosquitoes. *Parasite Immunol.* 1986 ; 8 : 231-238.
- 10 - MUIRHEAD-THOMSON R. C. - The malarial infectivity of an african village population to mosquitoes (*Anopheles gambiae*) : A random xenodiagnostic survey. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1957 ; 6 : 971 - 979.
- 11 - RUTLEDGE L. C., WARD R. A., GOULD D. J. - Studies on the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder. *Mosquito News* 1964 ; 24 : 407-419.
- 12 - TCHUINKAM T., MULDER B., DECHERING K., STOFFELS H., VERHAVE J. P., COT M., CARNEVALE P., MEUWISSEN J. H. E. TH., ROBERT V. - 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.
- 13 - PONNUDURAI T., LENSEN A. H. W., VAN GEMERT G. J. A., BENSINK M. P. E., BOLMER M., MEUWISSEN J. H. E. TH. - Infectivity of cultured *Plasmodium falciparum* gametocytes to mosquitoes. *Parasitology* 1989 ; 98 : 165- 173.
- 14 - MANGA L. A. E. - La faune culicidienne agressive et la transmission du paludisme à Yaoundé (Cameroun). Thèse de 3ème Cycle, Faculté des Sciences, Université de Yaoundé, 1992.
- 15 - RODHAIN F., PEREZ C. - Précis d'entomologie médicale et vétérinaire. Maloine Ed., Paris, 1985, 113-156.
- 16 - TCHUINKAM T., MULDER B., BOUDIN C., VERHAVE J. P. - Contribution de *Plasmodium malariae* et *Plasmodium ovale* au réservoir infectant dans la population urbaine de Yaoundé. *Bull. liais. doc. OCEAC*, (sous presse).
- 17 - FONDJO E., ROBERT V., LE GOFF G., TOTO J. C., CARNEVALE P. - Le paludisme urbain à Yaoundé (Cameroun) : 2 -Etude entomologique dans deux quartiers peu urbanisés. *Bull. Soc. Path. Exot.* 1992 ; 85 : 57-63.
- 18 - MANGA L. A. E., ROBERT V., MESSI J., DESFONTAINE M., CARNEVALE P. - Le paludisme urbain à Yaoundé (Cameroun) : 1 -Etude entomologique dans deux quartiers centraux. *Mém. Soc. r. belge Ent.* 1992 ; 35 : 155-162.