

# Université Cheikh Anta Diop de Dakar

Faculté des Sciences et Techniques



THESE DE TROISIEME CYCLE DE BIOLOGIE ANIMALE

présentée par

**Herman Parfait AWONO-AMBENE**

## Gamétocytémie de *Plasmodium falciparum* chez des patients en accès palustre traités avec un antimalarique, et sporogonie chez des vecteurs du complexe *Anopheles gambiae*

soutenue le 22 Octobre 1999 devant la commission d'examen:

Président : Mr. **Bhen Sikina TOGUEBAYE**

Membres : MM **Oumar GAYE**  
**Lassana KONATÉ**  
**Vincent ROBERT**

# Sommaire

	page
Remerciements .....	6
Introduction.....	9
Chapitre 1. <u>Généralités sur la transmission du paludisme</u> .....	13
1. 1. <b>Historique</b> .....	14
1. 2. <b>La transmission du paludisme chez l'homme</b> .....	15
1. 2. 1. L'agent pathogène.....	15
1. 2. 2. Le vecteur .....	16
1. 2. 3. Le cycle parasitaire de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	17
1. 3. <b>Le contrôle du paludisme</b> .....	21
1. 3. 1. La chimiothérapie .....	21
1. 3. 2. La lutte antivectorielle.....	22
1. 4. <b>La chimiorésistance</b> .....	23
1. 5. <b>Données générales sur le paludisme au Sénégal</b> .....	24
1. 5. 1. Les espèces plasmodiales.....	24
1. 5. 2. Les vecteurs du paludisme.....	24
1. 5. 3. Epidémiologie du paludisme.....	25
1. 5. 4. La chimiorésistance au Sénégal .....	26
1. 5. 5. Les mesures de contrôle de l'affection palustre .....	26
1. 6. <b>Les nouvelles approches de la lutte antivectorielle</b> .....	27
Chapitre 2. <u>Description du cadre de l'étude</u> .....	29
2. 1. <b>La région de Dakar</b> .....	30
2. 2. <b>La région de Thiès</b> .....	33

Chapitre 3. <u>Gamétocytémie des patients en accès palustres à <i>P. falciparum</i> traités avec la chloroquine, la sulfadoxine-pyriméthamine ou la quinine, et infectivité de ces patients pour <i>An. arabiensis</i></u> .....	39
<b>3. 1. Introduction</b> .....	40
<b>3. 2. Matériels et Méthodes</b> .....	41
3. 2. 1. Recrutement des patients en accès palustre à Dakar .....	41
3. 2. 2. Prélèvement sanguin et gorgement des moustiques avant le traitement .....	42
3. 2. 3. Tests de chimiosensibilité de <i>P. falciparum</i> .....	43
3. 2. 4. Tests d'infectivité des gamétocytes de <i>P. falciparum</i> après le traitement .....	45
3. 2. 5. Traitement et analyse statistique des données .....	51
<b>3. 3. Résultats</b> .....	52
3. 3. 1. Les accès palustres à <i>P. falciparum</i> à Dakar. ....	52
3. 3. 2. Chimiosensibilité de <i>P. falciparum</i> à Dakar.....	55
3. 3. 3. Résistance parasitaire et échec thérapeutique.....	58
3. 3. 4. Echecs thérapeutiques et parasitémie après le traitement à Thiès .....	62
3. 3. 5. Evolution de la gamétocytémie après le traitement ... ..	63
3. 3. 6. Xénodiagnostic et infections de moustique avant le traitement.....	66
3. 3. 7. Infections des moustiques après le traitement .....	68
3. 3. 8. Rendement de l'infection des moustiques entre J3 et J7.....	72
3. 3. 9. Comparaison de l'infection avant et après le traitement.....	73
<b>3. 4. Discussion</b> .....	76
Chapitre 4. <u>Infections expérimentales d'<i>An. arabiensis</i> et comparaison entre le gorgement direct et le gorgement à travers une membrane</u> .....	80
<b>4. 1. Introduction</b> .....	81
<b>4. 2. Matériels et Méthodes</b> .....	82
4. 2. 1. Recrutement des porteurs de gamétocytes de <i>P. falciparum</i> .....	82
4. 2. 2. Collecte et préparation des moustiques avant le gorgement.....	82
4. 2. 3. Le gorgement expérimental des moustiques.....	83
4. 2. 4. Traitement des moustiques après le gorgement.....	84

<b>4. 3. Résultats</b> .....	85
4. 3. 1. Le taux de gorgement des moustiques.....	85
4. 3. 2. Conditionnement et survie des femelles gorgées .....	85
4. 3. 3. Infectivité des porteurs de gamétocytes de <i>P. falciparum</i> .....	87
4. 3. 4. Rendement au stade oocyste des infections de moustiques par <i>P. falciparum</i> .....	88
4. 3. 5. Comparaison de l'infection des moustiques entre le gorgement direct et le gorgement à travers la membrane.....	90
<b>4. 4. Discussion</b> .....	91
<b>Chapitre 5. <u>Susceptibilité comparée entre <i>An. arabiensis</i> et <i>An. gambiae s.s</i></u></b> .....	93
<b>5. 1. Introduction</b> .....	94
<b>5. 2. Matériels et Méthodes</b> .....	95
5. 2. 1. Collection et élevage des moustiques .....	95
5. 2. 2. Recherche des porteurs de gamétocytes de <i>P. falciparum</i> et gorgement de moustiques.....	96
5. 2. 3. Maintien en insectarium des moustiques gorgés et recherche des oocystes de <i>P. falciparum</i> .....	96
5. 2. 4. Mesure de la longueur des ailes de moustique et du diamètre des oocystes prématures.....	97
<b>5. 3. Résultats</b> .....	98
5. 3. 1. Le taux de gorgement.....	98
5. 3. 2. Rendement au stade oocyste des infections de moustiques.....	100
5. 3. 3. Infections comparées entre <i>An. arabiensis</i> et <i>An. gambiae s.s</i> .....	102
5. 3. 4. Influence de la taille des moustiques sur le rendement de l'infection.....	102
5. 3. 5. Relation entre la taille des oocystes et leur densité dans l'estomac du moustique.....	104
<b>5. 4. Discussion</b> .....	108

Chapitre 6. <u>Distribution des gamétocytes de <i>P. falciparum</i> chez <i>Anopheles arabiensis</i></u> .....	110
<b>6. 1. Introduction</b> .....	111
<b>6. 2. Matériels et Méthodes</b> .....	112
6. 2. 1. Recrutement des porteurs de gamétocytes et collecte des moustiques .....	112
6. 2. 2. Gorgement des moustiques et confection des frottis avec du sang contenu dans l'estomac .....	112
6. 2. 3. Comptage des gamétocytes dans le repas de sang ingéré par un moustique .....	113
6. 2. 4. Traitement et analyse statistique des données .....	113
<b>6. 3. Résultats</b> .....	114
6. 3. 1. Les porteurs de gamétocytes .....	114
6. 3. 2. Distribution des gamétocytes ingérés par le moustique dans un repas de sang .....	114
6. 3. 3. Relation entre le nombre de gamétocytes et le nombre de globules blancs ingérés par le moustique .....	118
<b>6. 4. Discussion</b> .....	120
Conclusion .....	121
Bibliographie .....	124
Annexes .....	138
Liste des publications .....	144
Abstract .....	145

# Remerciements

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Paludologie de l'Institut de Recherche pour le Développement (anciennement ORSTOM) sous la direction du Docteur Vincent ROBERT, et en collaboration avec le Département de Biologie Animale de l'Université Cheikh Anta DIOP de Dakar. Mes remerciements vont:

A Monsieur Jean René DURAND, représentant de l'IRD au Sénégal.

Au Docteur Vincent ROBERT; vous avez accepté de diriger mes travaux de DEA et de thèse. J'ai été impressionné par la disponibilité et la rigueur scientifique dont vous avez fait preuve pendant toute la durée de mon initiation à la recherche. Vos conseils et vos remarques ont été d'un grand apport dans la réalisation de ce travail. En effet vous n'avez ménagé aucun effort, ni aucune critique pour l'analyse des données et la rédaction de cette thèse. Recevez ici toute ma reconnaissance et ma gratitude.

Au Professeur Bhen Sikina TOGUEBAYE; vos enseignements ont contribué à ma formation et mon orientation dans la Biologie Animale. La disponibilité et l'attention que vous manifestez à l'égard de vos étudiants malgré vos multiples occupations, vous honorent. Veuillez recevoir toute ma gratitude pour l'honneur que vous me faites en acceptant de présider ce jury.

Au Docteur Lassana KONATÉ, vous avez été à la base de ma formation; votre humilité, vos conseils et votre disponibilité m'ont été utiles. Je vous remercie d'accepter de juger ce travail.

Au Professeur Oumar GAYE, vous me faites honneur en acceptant de juger ce travail. Votre simplicité et la spontanéité avec laquelle vous avez répondu à ma demande m'ont profondément ému. Veuillez recevoir ici toute ma respectueuse considération.

Au Docteur Didier FONTENILLE; vous avez contribué à la réalisation de cette étude en mettant à ma disposition les moustiques de Dielmo élevés à l'insectarium. Recevez ici toute ma gratitude.

Au Docteur Ousmane FAYE; vous avez été à la base de ma formation depuis mes premières années universitaires et suivi mon évolution dans le monde de la recherche jusqu'à la réalisation de cette thèse. Malgré votre affectation en dehors du pays, vos conseils et vos encouragements m'ont accompagnés dans ce travail. Je vous remercie de toute cette disponibilité.

Au Docteur Jean François TRAPE; vous m'avez accordé la même attention qu'aux étudiants placés sous votre direction, et mes connaissances de la parasitologie du paludisme ont été renforcées au sein de votre équipe. Vos conseils m'ont été bénéfiques dans la réalisation de mes travaux de recherche.

A Cheikh S. SOKHNA, ta disponibilité et tes conseils ont été d'un apport considérable pendant tout mon séjour au Laboratoire de paludologie de l'IRD à Dakar. Daignes recevoir ici toute ma reconnaissance pour ton aide précieuse, et aussi toutes mes sincères excuses pour les fois que j'ai été imparfait.

Au Docteur Jean-Yves LE HESRAN; vos conseils et votre disponibilité m'ont beaucoup aidé dans la réalisation de ce travail, notamment dans l'interprétation et l'analyse statistique des données.

Au Docteur Jean-François MOLEZ pour vos conseils et votre disponibilité, particulièrement dans la recherche bibliographique et l'utilisation de l'outil informatique.

Au Docteur Lamine DIAWARA, responsable du Service de Lutte Antiparasitaire (SLAP) de Thiès qui a servi de cadre pour les études menées à Thiès.

Au Docteur Christian ROUSSILHON du Laboratoire d'Immunologie de l'Institut Pasteur de Dakar, sous la responsabilité duquel les tests de chimiosensibilité parasitaire *in vitro* ont été effectués, et particulièrement à Monsieur Malick FALL qui les a effectués.

Au personnel du laboratoire de Paludologie, particulièrement Pape NDIAYE, Louis BARBOZA, Paul SENGHOR, El Hadj Konko Ciré BA, Hubert BASSENE, Mme Fambaye BA, El Hadj NDOUR, René BIAGUI, Hilaire BOUGANALI et Gora NDIAYE, pour leur contribution et leur dévouement;

Aux aînés et collègues du Laboratoire de Paludologie de l'IRD; particulièrement Farba FAYE, Mme Fatou FALL, Dr Abdoulaye DIOP, Dr Jean Louis NDIAYE, Dr Mariama Sene WADE, Dr Nafissatou Diagne MBENGUE, Dr Demba DIONE, Dr Cheikh Tidiane NDAW, Demba SARR, Jean AKIANA, Timoléon KENMEGNE, ... pour leurs conseils et leurs encouragements.

Aux aînés et collègues du Laboratoire de Zoologie Médicale de l'IRD à l'Institut Pasteur de Dakar; Dr Maouloud DIALLO, Ibrahima DIA, Mathurin DIATTA, ... pour leur contribution dans ce travail.

Au personnel du SLAP, particulièrement Moussa DIAGNE, Samba NGOM, NIANG, Cheikh YADE, et tous ceux que je n'ai pas cité ici, pour leur contribution et leur dévouement.

Aux Sœurs et au personnel des dispensaires Anne-Marie JAVOUHEY (Derklé), Saint Laurent (Centenaire) et Notre Dame du Cap-Vert (Pikine).

A la population de Ndioukhane-Serer (Région de Thiès).

A la famille BA, pour son hospitalité et son soutien.

A mon "grand frère" et ami: Nicolas AMOUGOU.

A tous mes amis, en témoignage d'estime et d'affection.

A mes parents, frères et sœurs au Cameroun.

**A Dieu, le père ...**

---

Ce travail a reçu un soutien financier de la République Française sous la forme d'une allocation de recherche de l'IRD. du budget de fonctionnement de l'IRD de Dakar, et de SmithKline Beccham Int. Africa.





# Introduction

Le paludisme est dû à un hématozoaire du genre *Plasmodium* qui est transmis à l'homme par l'anophèle femelle. Quatre espèces parasitent l'homme, dont *P. falciparum* responsable d'accès aigus mortels et causant chaque année entre 1,5 et 2,7 millions de décès dans le monde. Selon l'OMS (1996), environ 40% de la population mondiale est exposée au paludisme. Cette parasitose est endémique dans les régions tropicales où les conditions bioclimatiques sont favorables au développement du vecteur, notamment en Afrique, en Asie et en Amérique latine.

L'Afrique subsaharienne est la région la plus touchée. Elle totalise 90% des décès attribués mondialement au paludisme chez les enfants de moins de 5 ans (Touze & Charmot, 1992). La lutte contre le paludisme y est rendue difficile à cause des conditions socio-économiques défavorables qui ne permettent pas toujours aux populations d'accéder à un traitement approprié. A ceci s'ajoute une extension de la chimiorésistance du parasite dans toutes les régions endémiques. Trape et al. (1998) ont montré que l'extension de la chimiorésistance, en particulier chez les enfants pouvait se traduire par l'augmentation des décès dus au paludisme. Le principal recours contre le paludisme grave reste encore la quinine avec cependant quelques cas de résistance signalés en Asie du Sud-Est (Werndorfer & Payne, 1991). L'utilisation de nouvelles molécules telles la méfloquine, la pyriméthamine et l'halofantrine seules (Bygbjerg et al., 1983; Basco et al., 1991; Brasseur et al., 1992) ou en association avec des antibiotiques (Charmot et al. 1994) n'a pas toujours donné les résultats escomptés.

En attendant la mise au point d'un vaccin, la seule approche de la lutte contre le paludisme qui semble admise pour le court et le moyen termes est basée sur la réduction de la morbidité et de la mortalité palustres. Contre l'extension de la chimiorésistance, Vial & Olliaro (1994) préconisent la mise au point de nouveaux médicaments. En effet les nouveaux antipaludéens dérivés de l'Artémisinine (ou qinghaosu) donnent des résultats satisfaisants dans le traitement des accès palustres graves (Taylor et al., 1993). D'autres auteurs sont favorables à une redéfinition des schémas thérapeutiques basés sur l'utilisation appropriée et rationnelle des antipaludéens disponibles (Druihe & Brasseur, 1994, Bourgeade & Delmont, 1998).

Un autre volet du contrôle de l'affection palustre est constitué par la lutte antivectorielle. Elle consiste à réduire les populations anophéliennes vectrices et/ou à protéger l'homme contre les piqûres infectantes. La lutte contre les anophèles a pu être menée avec succès en Italie (Missiroli, 1950; Pampana, 1951) et en Amérique latine sur *An. gambiae* après son introduction accidentelle (Soper & Wilson, 1949). Dans les autres régions du monde notamment en

Afrique, la lutte contre le vecteur n'a pas donné les mêmes résultats. Elle a été confrontée à des difficultés techniques et économiques et à l'apparition des foyers de résistance du vecteur au DDT. De nos jours, l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides est préconisée comme moyen de protection et comme moyen de lutte dans les zones de faible transmission. Leur efficacité sur la réduction des populations anophéliennes est effective (Darriet *et al.*, 1984; Carnevale *et al.*, 1988). Pour les populations vivant en zones d'endémie palustre, ce mode de protection contre les piqûres infectantes reste encore inaccessible car onéreux. Par ailleurs des recombinaisons génétiques ont été tentées sur les anophèles dans le but de les rendre inaptes à transmettre le paludisme (Crampton *et al.*, 1990; Collins & Besansky, 1994). La lutte contre les stades aquatiques (larves et nymphe) reste difficilement applicable sur le terrain et les résultats des essais sur les populations sauvages ne sont pas encore satisfaisants.

Certains antipaludéens notamment la chloroquine, l'amodiaquine et la sulfadoxine-pyriméthamine sont associés à une augmentation de la gamétocytemie de *P. falciparum* chez les sujets traités (Schapira & Schwalbach, 1988; Roche *et al.*, 1995; Robert *et al.*, 1996; Robert & Trape, 1998). Des études ont rapporté une activité létale de la chloroquine sur les jeunes gamétocytes de *P. falciparum*, mais pas sur les gamétocytes matures (Wilkinson *et al.*, 1976; Smalley, 1977; Tchuikam *et al.*, 1993). En effet, l'ingestion de ces gamétocytes matures conditionne la poursuite du cycle de développement du parasite chez le vecteur. Les gamétocytes de *P. falciparum* sont observés au niveau du sang périphérique dix jours après la sortie des premiers mérozoïtes du foie (Smalley, 1976; Jensen, 1979). Ils peuvent conserver leur capacité à infecter le moustique pendant 3 semaines après leur maturation.

Depuis la mise au point du gorgement sur membrane pour l'infection des moustiques (Rutledge *et al.*, 1964), la dynamique de la transmission du paludisme entre l'homme et le moustique est mieux appréhendée. On envisage maintenant d'intervenir sur la transmission du paludisme en bloquant le déroulement du cycle parasitaire chez le moustique (Warburg & Miller, 1991; Touray *et al.*, 1992; Shahabuddin & Kaslow, 1993). Ce blocage a pu être réalisé avec succès chez les rongeurs et les simiens (Mendis & Targett, 1979; Barr *et al.*, 1991). Selon certains auteurs, les stades préocystes (gamétocytes, gamètes, zygote et ookinète) seraient plus susceptibles à l'action des facteurs bloquant la transmission que les stades oocyste et sporozoïte (Vermeulen *et al.*, 1985; Meuwissen & Ponnudurai, 1986; Alano, 1991; Feng *et al.*, 1993).

La détermination des paramètres entomologiques de la transmission naturelle du paludisme s'est initialement effectuée à partir du sporozoïte. Cependant depuis qu'il est possible d'infecter expérimentalement les

moustiques, le rôle du stade oocyste comme marqueur potentiel de l'infection des moustiques est devenu effectif. On a ainsi pu évaluer les capacités de *P. falciparum* à poursuivre son développement chez le moustique et inversement les capacités du vecteur à transmettre le parasite (Muirhead-Thomson, 1957; Line et al., 1991; Chutmongkonkul et al., 1992; Githeko et al., 1992; Boudin et al., 1993).

Notre étude a été réalisée de 1996 à 1998 au sein du Laboratoire de Paludologie de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD, ex-Orstom), en collaboration avec l'Université de Dakar et le Service de Lutte Antiparasitaire (SLAP) de Thiès. Cette étude a été principalement menée en période de transmission du paludisme (Septembre à Décembre) parmi les populations naturellement impaludées par *Plasmodium falciparum* de Dakar et Thiès, deux régions caractérisées par une période de transmission généralement inférieure à 4 mois. L'étude a eu pour but: (1) d'évaluer l'impact du traitement antipalustre sur la gamétoctémie de *P. falciparum* et l'infectivité de ces gamétoctes pour le vecteur; (2) de comparer le rendement de l'infection entre le gorgement à travers la peau et le gorgement sur membrane chez le moustique, et (3) enfin de comparer la susceptibilité à l'infection par *P. falciparum* entre *An. arabiensis* et *An. gambiae s.s.*

Après une revue de synthèse sur la transmission du paludisme (**chapitre 1**) et une présentation des milieux d'étude (**chapitre 2**), nous proposons de présenter nos résultats en quatre chapitres, sans se référer à la chronologie des protocoles effectués au cours de l'étude.

Le **chapitre 3** porte sur la cinétique de la gamétoctémie après le traitement d'un accès palustre simple à *P. falciparum* avec la chloroquine (CQ) ou la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) et de l'infectivité de ces gamétoctes avant et après le traitement. Dans le **chapitre 4**, nous proposons de comparer le rendement de l'infection de moustique entre deux méthodes de gorgement: le gorgement direct à travers la peau du porteur et le gorgement à travers une membrane (ici la baudruche). La susceptibilité à l'infection par des porteurs de gamétoctes de *P. falciparum* est comparée entre *An. arabiensis* et *An. gambiae s.s.* dans le **chapitre 5**. Le dernier chapitre (**chapitre 6**) porte sur l'étude de la distribution des gamétoctes de *P. falciparum* ingérés par le moustique au cours d'un repas de sang.

Les références bibliographiques citées pour discuter nos observations complètent notre plan.



# Chapitre 1.

Généralités sur la transmission du paludisme

## 1. 1. Historique

Les premières références de la littérature ont été rapportées par de nombreux auteurs contemporains (Jones, 1909; Ross, 1911; Celli, 1925; Russell, 1955; McNeill, 1977). C'est au 18<sup>ème</sup> siècle que les fièvres récurrentes reconnues aujourd'hui comme une symptomatologie du paludisme ont été désignées sous le terme italien de "mal aria" (mauvais air). Même si l'origine de ces fièvres et leur mode de transmission étaient encore inconnus, on se protégeait toutefois contre les piqûres de moustique dans certaines régions marécageuses d'Égypte plusieurs siècles avant l'ère chrétienne. Par ailleurs les infusions de quinquina (*Artemisia annua*) en Chine et l'écorce de quinquina ou arbre du Pérou (*Cinchona ledgeriana*) se révélaient parfois efficaces dans le traitement de ces fièvres.

Pelletier et Caventou en isolant en 1820 le principe actif à partir d'écorces de *Cinchona ledgeriana* importées d'Amérique centrale au 17<sup>ème</sup> siècle par les jésuites, ont été à l'origine des premiers traitements à base de quinine. Cette dernière a permis de traiter et de guérir des millions de personnes atteintes de paludisme. La lutte antipaludique a véritablement débuté avec la découverte de l'agent pathogène en 1880 par Laveran et du rôle de l'anophèle dans la transmission du paludisme par Ross en 1897. Ainsi naquit le concept de l'éradication du paludisme avec la découverte dans les années 30-40 d'un insecticide: le DDT et d'un nouvel antipaludique efficace: la chloroquine.

Ainsi le programme d'éradication lancé par l'OMS entre 1959 et 1969 et basé sur la lutte contre le moustique a été couronné de succès, avec l'arrêt de la transmission du paludisme dans les pays d'Amérique du Nord, de l'Europe et d'Asie Centrale. Par contre dans la plupart des pays d'Asie et d'Amérique latine où les campagnes ont été conduites, les résultats sont variables et le paludisme persiste. En Afrique ce programme s'est limité à des essais dans quelques zones pilotes, dont la zone de Thiès. Malgré la découverte de nouveaux antipaludéens (amodiaquine, primaquine, pyriméthamine, chlorproguanil et proguanil) favorisée par les fortes demandes de la seconde guerre mondiale, le paludisme persiste de manière endémique en Amérique du Sud, en Asie du Sud-Est et particulièrement en Afrique où le haut niveau d'endémicité et les difficultés logistiques perturbent la lutte contre le paludisme (OMS, 1973 et 1980; Cavalie & Mouchet, 1962). Par ailleurs l'apparition des foyers de résistance des anophèles au DDT, l'émergence et l'extension de la chimiorésistance de *P. falciparum* à la chloroquine rendent plus difficile la lutte contre le vecteur et le parasite chez l'homme; à tel point que les recherches ont été réorientées vers le "contrôle" de l'affection palustre.

## 1. 2. La transmission du paludisme chez l'homme

### 1. 2. 1. L'agent pathogène

Les *Plasmodium* sont des Haemosporidae (parasites intracellulaires) du groupe des Sporozoaires (Apicomplexa) dont le développement s'effectue chez un hôte vertébré (homme, singe, oiseau, reptile, rongeur, chauve-souris) et un hôte invertébré (l'anophèle femelle). On dénombre 146 espèces de *Plasmodium* dont seulement quatre espèces sont retrouvées chez l'homme:

- *P. malariae* Laveran, 1881
- *P. vivax* Grassi & Feletti, 1890
- *P. falciparum* Welch, 1897
- *P. ovale* Stephens, 1922

*P. falciparum* est l'agent de la fièvre tierce maligne. La phase hépatique (phase d'incubation) dure environ 6 jours. C'est l'espèce la plus importante en zone endémique (Afrique subsaharienne, Amérique du Sud et Centrale, Asie du Sud) en terme de morbidité palustre et la plus redoutable car responsable de l'accès pernicieux. Compte tenu de son importance en santé publique, cette espèce est au centre de nombreuses attentions.

*P. malariae* est l'agent de la fièvre quarte et il parasite surtout les hématies âgées. La phase d'incubation dure en moyenne 15 jours. Il est essentiellement localisé en Afrique, en Amérique centrale et du Sud et en Asie.

*P. vivax* est responsable d'une fièvre tierce bénigne. La phase d'incubation dure 11 à 15 jours. Cette espèce est caractérisée par l'existence des hypnozoïtes responsables des nombreuses rechutes qui peuvent survenir pendant plusieurs dizaines d'années après le traitement d'une primo-infection. Elle est surtout rencontrée en Asie. Quelques foyers subsistent cependant dans quelques pays du bassin méditerranéen (Turquie, Moyen-Orient et Afrique du Nord) et d'Afrique tropicale en dehors des pays de l'Afrique de l'Ouest situés entre la Mauritanie et l'Angola.

*P. ovale* est l'agent d'une fièvre tierce bénigne dont la phase d'incubation dure 12 à 15 jours. Comme pour *P. vivax*, les rechutes sont possibles du fait de la présence d'hypnozoïtes. *P. ovale* est essentiellement localisé en Afrique Centrale et Occidentale. C'est l'espèce la plus rare.

## 1. 2. 2. Le vecteur

Le *Plasmodium* est transmis à l'homme par les femelles de moustiques (Diptères) du genre *Anopheles*. On dénombre actuellement 442 espèces d'anophèles dont 68 sont associées à la transmission du paludisme. Selon Service (1983), 40 d'entre elles sont des vecteurs majeurs et 28 sont des vecteurs secondaires. En Afrique subtropicale, la transmission du paludisme est essentiellement assurée par les anophèles du complexe *An. gambiae* et par *An. funestus*. Le complexe *An. gambiae* est constitué de 7 espèces jumelles toutes africaines (Hunt et al., 1998): *An. gambiae s.s.*, *An. arabiensis*, *An. quadriannulatus A*, *An. quadriannulatus B*, *An. bwambae*, *An. melas* et *An. merus*. Les méthodes de détermination des membres du complexe sont actuellement basées sur la cytogénétique et la technique de polymérisation en chaîne (PCR).

*Anopheles gambiae* et *Anopheles arabiensis* assurent la majorité de la transmission du paludisme dans la zone soudano-guinéenne (Robert, 1989). Leurs larves sont surtout rencontrées à la surface des points d'eau claire résiduelle, peu profonds et ensoleillés. Après l'éclosion des œufs, les larves subissent 4 mues successives (I, II, III et IV) et se transforment en nymphes. Les larves sont détritophages et les nymphes ne se nourrissent pas. La durée de la phase aquatique est tributaire des conditions climatiques et varie de 9 à 12 jours à 24-26 °C. Les adultes émergent 36 à 48 heures après la nymphose. L'émergence est suivie par une période de repos des adultes néonates d'environ 24 heures pendant laquelle les ailes et les pattes se consolident. De même une rotation de 180° de l'hypopygium des mâles survient pendant cette phase. Avant cette rotation les mâles sont incapables de copuler. La durée moyenne de développement larvaire des mâles est plus courte que celle des femelles. Les adultes ne se nourrissent que de liquides; les mâles et les femelles se nourrissent de nectar de plantes. Seules les femelles sont aussi hématophages. La vie aérienne de la femelle se décompose en plusieurs étapes ou cycles gonotrophiques. Chaque cycle est composé de trois phases: (1) la recherche d'un hôte convenable pour la prise du repas de sang, (2) la digestion du repas sanguin qui est concomitante à la ponte et (3) la recherche d'un gîte de ponte. Selon Brengues & Coz (1973), le cycle gonotrophique dure 2 à 3 jours. La durée de vie des femelles en zones tropicales est ordinairement de 3 à 4 semaines au cours de laquelle elles peuvent effectuer plusieurs cycles gonotrophiques. C'est au moment de la prise de sang que le transfert du parasite s'effectue entre l'hôte et le vecteur, et entre le vecteur et l'hôte.



### 1. 2. 3. Le cycle parasitaire de *Plasmodium falciparum*

#### a. La phase hépatique

Cette phase autrefois appelée schizogonie exoérythrocytaire s'effectue dans les tissus hépatiques de l'homme (figure 1. 1.) et débute 30 à 60 minutes environ après l'inoculation des sporozoïtes infectants par le moustique (Fairley, 1947). Les sporozoïtes disparaissent rapidement de la circulation sanguine et gagnent les hépatocytes. Beaucoup sont détruits par les macrophages. On a pendant longtemps admis que les sporozoïtes empruntaient la voie sanguine et pénétraient dans le parenchyme du foie *via* les cellules de Kupffer à partir d'un récepteur de nature inconnue (Hollindale, 1983). D'autres auteurs ont émis l'hypothèse que les sporozoïtes de *P. cynomolgi* et *P. berghei* peuvent emprunter d'autres voies et parvenir directement aux hépatocytes (Krotoski et al., 1982 a et b; Meis et al., 1983; Mazier et al., 1984). On pense maintenant que seuls les sporozoïtes injectés au niveau de la peau sont infectants (Sidjanski & Vanderberg, 1997); ceux injectés dans la circulation sanguine sont réingérés par le moustique et sont détruits dans l'estomac de ce dernier. Dans l'hépatocyte, chaque sporozoïte infectant se transforme en schizonte. La maturation du schizonte dure environ 6 jours chez *P. falciparum*. A maturité, l'hépatocyte "parasité" éclate et libère des mérozoïtes dans la circulation sanguine qui pénètrent activement dans les hématies. C'est le début de la phase sanguine.

#### b. La phase sanguine

Dans les hématies, les mérozoïtes se transforment en trophozoïtes caractérisés par une forme arrondie. Le diamètre du mérozoïte avoisine 1  $\mu\text{m}$  et il est constitué d'un noyau unique entouré de cytoplasme. Le stade trophozoïte est le siège d'importants mécanismes métaboliques se traduisant par l'accumulation dans la vacuole nutritive de l'hémozoïne ou pigment malarique issu de la dégradation progressive de l'hémoglobine (Danis & Mouchet, 1991). Les noyaux issus de plusieurs multiplications s'entourent de cytoplasme et se transforment en schizonte. Le schizonte mûr ou "corps en rosace" éclate, entraînant la lyse de l'hématie. Les mérozoïtes libérés dans le plasma parasitent alors d'autres hématies et plusieurs cycles érythrocytaires sont ainsi effectués. La lyse des hématies parasitées peut se manifester cliniquement par des accès fébriles ou par d'autres symptômes tels que les céphalées, vomissements, asthénie, etc.

L'accès palustre est caractérisé par des frissons, des sensations de chaleur et la transpiration. Le diagnostic biologique qui consiste à mettre en évidence la présence des parasites dans le sang est essentiellement basé sur la microscopie (goutte épaisse, frottis sanguin, numération parasitaire, etc.), les méthodes immunologiques (immunofluorescence, ELISA, etc.) ou les marqueurs moléculaires (sondes nucléiques, PCR).

Après plusieurs cycles érythrocytaires, certains mérozoïtes en pénétrant dans les hématies se transforment en gamétocytes (stades sexués). Les mécanismes de la gamétocytogénèse ne sont pas encore élucidés (Vanderberg, 1988). Toutefois il est admis que le taux de conversion des stades sexués en gamétocytes varie en fonction des conditions environnementales du parasite (Smalley et al., 1981). Par ailleurs des facteurs limitant de développement des formes asexuées tels le niveau de prémunition des populations (Molineaux & Grammiccia, 1980; Smalley & Brown, 1981) et certains antimalariques (Findlay et al., 1946; Shute & Maryon, 1951, OMS, 1973; Robert & Trape, 1998) influent sur la gamétocytémie. Contrairement aux autres espèces plasmodiales où les gamétocytes peuvent être observés dans le sang en même temps que les premiers parasites asexués, les gamétocytes immatures de *P. falciparum* se concentrent dans la rate et la moelle en moins de 24 heures après l'invasion des hématies par les premiers stades asexués (Garnham, 1931; Thomson & Robertson, 1935; Smalley et al., 1980). Les gamétocytes apparaissent dans le sang périphérique 10 jours après la formation des premiers mérozoïtes (OMS, 1987) et leur demi-vie dans l'organisme humain est en moyenne de 2,4 jours. Au microscope optique, les gamétocytes de *P. falciparum* sont légèrement incurvés. Avec une coloration au May-Grunwald Giemsa à 6%, le gamétocyte mâle est caractérisé par un noyau diffus et un cytoplasme rouge violacé contenant des pigments dispersés dans le cytoplasme. Le gamétocyte femelle est constitué d'un noyau arrondi bien différencié de coloration rouge autour duquel sont concentrés les pigments; le cytoplasme présente généralement une coloration bleue. La présence des stades sexués dans le sang confère à l'individu porteur un statut de "réservoir" de parasites. Cependant un individu infecté peut être considéré comme un "réservoir potentiel" puisque tôt ou tard les stades asexués peuvent se transformer en stades sexués (ou gamétocytes).

### c. La sporogonie

Elle se déroule au voisinage de l'estomac du moustique. En effet, la présence de gamétocytes dans le repas sanguin que la femelle de l'anophèle prélève chez l'homme conditionne le déroulement du cycle sporogonique de

*P. falciparum*. De nombreux facteurs sont susceptibles d'influencer le déclenchement et le déroulement du cycle parasitaire chez le vecteur: la densité de gamétocytes ingérés (Boudin *et al.*, 1989), les facteurs immunitaires (Sinden & Smalley, 1976; Harte *et al.*, 1985 et Ponnudurai *et al.*, 1986), les facteurs physicochimiques du sang tels le pH, le CO<sub>2</sub> (Bishop & McConnachie, 1960), la température (Roller & Desser, 1973) et les facteurs spécifiques du vecteur (âge physiologique, espèce, etc...).

Après l'ingestion du repas de sang par l'anophèle femelle, les stades asexués (mérozoïtes, schizontes et trophozoïtes) sont digérés. Mais les gamétocytes matures aptes se transforment en gamètes 10 minutes environ après leur ingestion: c'est la gamogonie. Le gamétocyte femelle s'active immédiatement après son ingestion et prend un aspect arrondi, caractéristique du macrogamète. Le gamétocyte mâle subit 3 mitoses dont une réductionnelle au terme desquelles se forment 8 microgamètes prolongés par des filaments fins : c'est le phénomène de l'exflagellation. Ces microgamètes de 20-25 µm mobiles sont libérés dans la lumière de l'estomac du moustique. Le zygote qui résulte de la fusion de deux noyaux (mâle et femelle) est une cellule sphérique diploïde (2n chromosomes) de 8 µm de diamètre environ. Le zygote subit des modifications morphologiques 18 à 20 heures après l'ingestion des gamétocytes et prend une forme fusiforme de 20 µm de longueur appelée ookinète. L'ookinète traverse la paroi de la membrane péritrophique de l'estomac du moustique et gagne la face interne de l'épithélium mésentérique. Il s'arrondit et s'enkyste entre les cellules épithéliales et leur lame basale sous la forme d'un jeune oocyste de 6-8 µm de diamètre 24 à 72 heures après l'ingestion des gamétocytes. L'oocyste se développe en prélevant les nutriments indispensables à son développement dans l'hémolymphe (Mack & Vanderberg, 1978). Cependant, certaines études ont montré que la paroi d'épithélium stomacal n'est pas indispensable au développement de l'oocyste (Weathersby, 1960; Beaudoin, 1974). Au cours de son développement, l'oocyste augmente de taille et de nombreuses vacuoles apparaissent dans son cytoplasme; la diamètre de l'oocyste mûr de *P. falciparum* varie de 40 à 60 µm à 25 °C. Chaque vacuole correspond à un sporoblaste dans lequel se différencient les sporozoïtes. D'après Beier & Vanderberg (1998), la formation des sporozoïtes dans les sporoblastes débute 6 à 9 jours après l'ingestion des gamétocytes, ceci en fonction de la température ambiante et de l'espèce plasmodiale. A maturité, les oocystes éclatent et libèrent dans l'hémocèle les sporozoïtes non infectants car encore immatures. Un oocyste peut renfermer 1000 à 10 000 sporozoïtes (Pringle, 1965; Garnham, 1966; Rosenberg & Rungsiwongse, 1991), avec une moyenne de 2000 sporozoïtes.

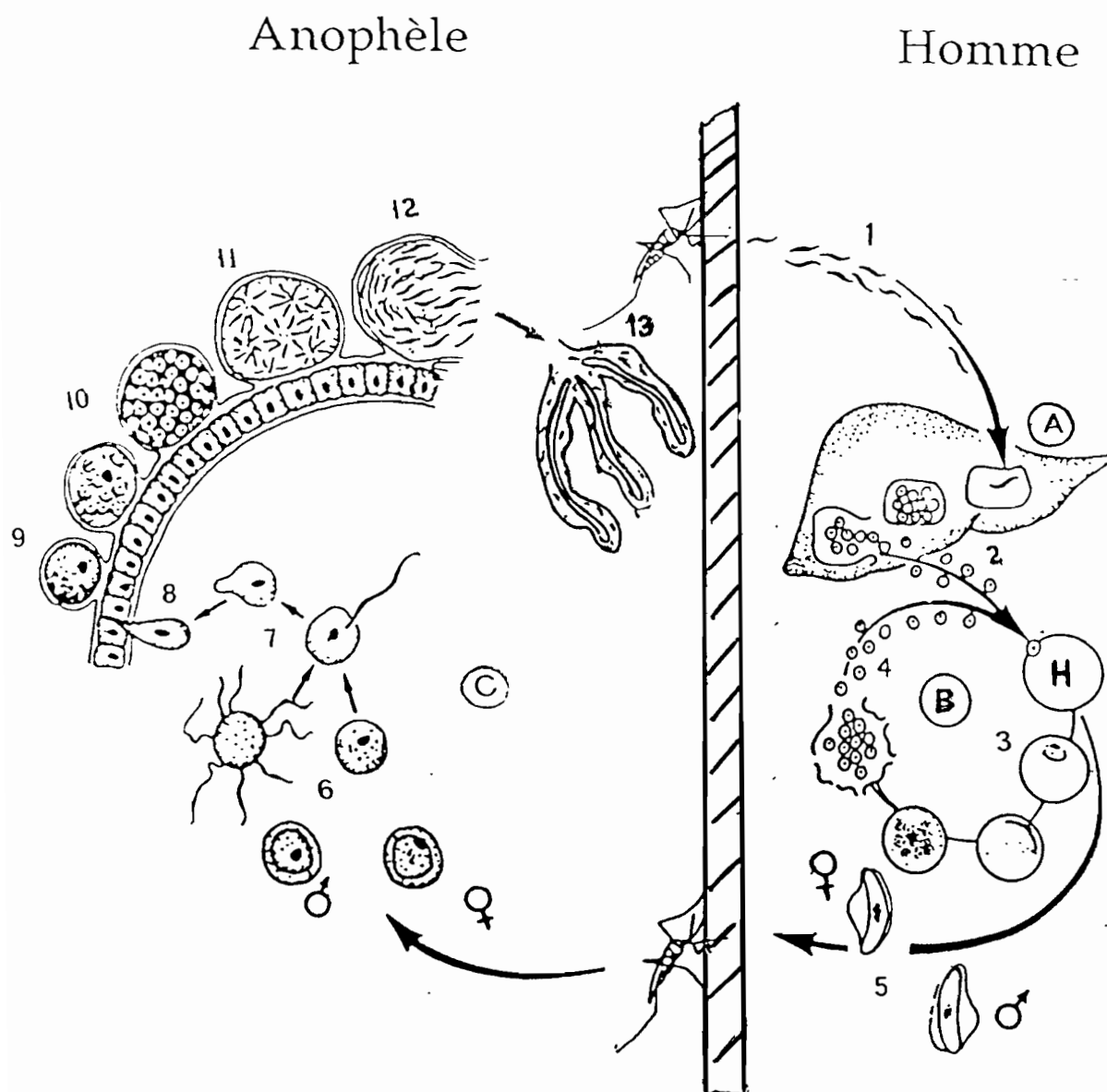


Figure 1. 1. Le cycle de développement de *Plasmodium falciparum*

- Chez l'Homme: 1- sporozoïtes; A: phase hépatique; 2- mérozoïtes.

B- phase sanguine; 3- trophozoïtes dans l'hématie (H), 4- mérozoïtes, 5-gamétocytes.

- Chez le moustique: 6- gamètes, 7- formation du zygote; 8- ookinète,

C: sporogonie; 9- oocyste, 10 et 11- maturation de l'oocyste, 12- sporozoïtes migrant dans les glandes salivaires (13).

Au microscope, les sporozoïtes se présentent sous forme de filaments fins et mobiles de 12 à 15 µm de longueur et 1µm de diamètre. Ils présentent des marqueurs antigéniques caractéristiques tels que la protéine circumsporozoïtaire (CSP) (Zavala et *al.*, 1983). A la fin de leur migration vers les glandes salivaires du moustique, 20 à 30% des sporozoïtes parviennent jusqu'aux glandes salivaires (Rosenberg & Rungsiwongse, 1991; Vaughan et *al.*, 1992, 1994). Les autres sporozoïtes aboutissent probablement vers d'autres tissus où ils dégénèrent ou sont détruits. Dans les canaux excréteurs des glandes salivaires, les sporozoïtes acquièrent leur pouvoir infectant avant d'être injectés à l'homme lors d'une piqûre. Le nombre moyen de sporozoïtes présents dans les glandes salivaires est estimé à 1000 (Beier & Vanderberg, 1998). Dans certains cas, ce nombre peut varier de 10 à plus de 100 000 (Beier et *al.*, 1991 et Kabiru et *al.*, 1997). Cependant le nombre moyen de sporozoïtes réellement injectés dans la salive au point de piqûre est de l'ordre d'une dizaine; il varie de 0 à 1000 sporozoïtes injectés. Vanderberg & Gwadz (1980) ont montré que les sporozoïtes peuvent conserver leur pouvoir infectant pendant toute la vie du moustique. La durée du cycle sporogonique de *P. falciparum* chez l'anophèle varie en fonction de la température de 9 à 12 jours à 25-27°C et 22 jours à 20°C.

### 1. 3. Le contrôle du paludisme

L'éradication du paludisme n'étant pas actuellement envisageable, la seule ambition raisonnable concerne le contrôle de la maladie et de ses conséquences. Conformément à ce concept de contrôle de l'affection palustre, les programmes de lutte contre le paludisme en Afrique tropicale sont actuellement basés sur la chimiothérapie et la lutte contre le vecteur.

#### 1. 3. 1. La chimiothérapie (d'après Wery, 1995)

Les monothérapies employées pour lutter contre les accès palustres simples sont principalement à base de chloroquine, amodiaquine, quinine, méfloquine, halofantrine et dérivés de l'*Artemisia annua* (artémisinine, artémether, artésunate). L'halofantrine et les dérivés de l'artémisinine sont généralement efficaces dans les zones de paludisme à *P. falciparum* résistant aux autres antimalariques (Watkins et *al.*, 1988; Warhurst & Schofield, 1989). Par ailleurs, l'artémether et l'artésunate sont utilisés pour le traitement des accès palustres graves (Anonyme, 1994; Taylor et *al.*, 1993) en raison d'une action anti-parasitaire rapide.

Les produits cités ci-dessus peuvent également être utilisés en associations notamment: (1) à base de quinine (quinine-sulfadoxine-pyriméthamine, quinine-cyclines) souvent mal supportées par les patients, (2) à base de dérivés d'*Artemisia annua* (artémisinine-méfloquine, artésunate-méfloquine), et (3) sulfadoxine-pyriméthamine.

Pour les personnes non-immunes entrant en zone endémique, une chimioprophylaxie est recommandée avec la chloroquine pour les zones où elle reste efficace. L'association chloroquine-proguanil est plus largement utilisée. La méfloquine reste limitée aux courts séjours (trois mois maximum) en zone de forte résistance à la chloroquine.

### 1. 3. 2. La lutte antivectorielle

Cette lutte constitue un volet essentiel dans la stratégie du contrôle de l'affection palustre. Elle a pour objectif de réduire la transmission du paludisme à partir d'une lutte dirigée contre les populations anophéliennes. Elle a montré son efficacité contre les populations d'*An. gambiae* au Brésil et en Egypte et dans quelques régions d'Afrique et de l'Inde (Russell & Knipe, 1939). Après l'émergence de la résistance des anophèles au DDT en Asie, en Afrique et en Amérique latine (WHO, 1980), de nouvelles méthodes de lutte ont été mises au point. Ainsi la découverte de nouveaux insecticides et la mise en place d'une lutte biologique là où elle est efficace sont aujourd'hui les atouts de la lutte contre le vecteur.

En effet les moustiquaires imprégnées d'insecticides (Deltaméthrine, Perméthrine, etc.), les insecticides en spray intradomiciliaire (K-Othrine, etc.), les répulsifs et les fumigènes sont les moyens de lutte les plus utilisés contre les populations adultes. L'efficacité des moustiquaires imprégnées a été démontrée en Afrique sub-saharienne (Darriet *et al.*, 1984; Carnevale *et al.*, 1988; ...).

La lutte antilarvaire est beaucoup plus complexe car les gîtes sont très nombreux, variés et parfois inaccessibles. L'utilisation des poissons larvivores ("guppies", tilapias, etc.) et des micro-organismes tels que les bactéries (*Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus*, ...), les champignons (*Coelomomyces iliensis*, ...) et certains nématodes de la famille des *Mermithidae* comme moyen de lutte biologique a donné des résultats ponctuellement satisfaisants, mais globalement décevant à large échelle. A côté de cette lutte biologique, il existe une lutte chimique basée sur l'utilisation des pesticides (organochlorés: DDT, HCH, etc.; organophosphorés: téméphos, malathion, etc.; carbamates: propoxur, ...). Compte tenu de la variabilité des gîtes et de leur toxicité, leur utilisation et leur efficacité restent limitées. On sait depuis les

années 1960 que certaines souches d'anophèles sont résistantes aux pesticides notamment au DDT. Outre la lutte biologique et chimique, l'amélioration des conditions environnementales (assainissement des puits, élimination des eaux stagnantes, ...) constitue un volet essentiel de la lutte antivectorielle.

#### 1. 4. La chimiorésistance

Selon l'OMS, c'est l'aptitude d'une souche parasitaire à survivre ou à se reproduire malgré l'administration et l'absorption d'un médicament aux doses recommandées.

La résistance de *P. falciparum* aux antipaludéens constitue le problème majeur dans la stratégie de contrôle de la morbidité palustre. Elle est déterminée *in vivo* par un contrôle de la parasitémie au cours des 7 jours qui suivent l'administration d'un antipaludéen. La souche est dite sensible lorsque la parasitémie disparaît définitivement dès le troisième jour. La résistance se traduit par une recrudescence de la parasitémie après le traitement en absence de réinfection. En fonction de l'évolution de la parasitémie dans le temps, 3 niveaux de résistance ont été définis: (1) une résistance de type R1 marquée par une négativation temporaire suivie d'une recrudescence avant quatre semaines; (2) une résistance de type R2 marquée par une baisse de la parasitémie inférieure à 25% de la parasitémie initiale et (3) une résistance de type R3 caractérisée par une persistance de la parasitémie à plus de 25% de la parasitémie initiale.

Il convient de faire la différence entre la résistance et la non réponse au traitement. Cette dernière peut être évoquée dans les cas où le produit n'a pas été convenablement résorbé dans l'organisme (vomissements, diarrhées, arrêt du traitement, sous-dosage des médicaments, associations avec d'autres affections immunodépressives).

Les premiers cas de résistance aux antimalariques ont été observés en Colombie en 1960 avec la chloroquine. Le même phénomène a été observé peu après en Asie du Sud-Est. La chimiorésistance a très vite progressé dans ces régions (Asie du Sud-Est et Amérique Latine) avant d'atteindre l'Afrique. Les premiers cas de chimiorésistance ont été observés en Afrique de l'Est en 1978 (Fogh et *al.*, 1979; Kean, 1979). La chimiorésistance s'est étendue progressivement en Afrique Centrale (Sansone et *al.*, 1985), puis plus tardivement en Afrique de l'Ouest (Brandicourt et *al.*, 1986; Druilhe et *al.*, 1986).

La résistance du parasite à la chloroquine est la plus importante. Toutefois, des cas de résistance aux autres antimalariques ont également été signalés; notamment avec la quinine, l'amodiaquine, l'halofantrine et la méfloquine (Ringwald et *al.*, 1990; Brasseur et *al.*, 1992 et 1993).

## 1. 5. Données générales sur le paludisme au Sénégal

Les premières références historiques sur le paludisme au Sénégal datent du 19<sup>ème</sup> siècle avec les écrits de Hippolyte Vivien en 1856, Adolfe Doue en 1872 et Clarac en 1898.

Les premières études mettant en exergue les conséquences de l'affection palustre sur les populations ont été entreprises avec la création du Service de Lutte Antiparasitaire (SLAP) et la Faculté de médecine de l'université de Dakar. C'est ainsi que les travaux de Larivière et *al.* (1961), Diallo et *al.* (1979), Vercruysse & Jancloes (1981), Vercruysse (1985), Petrarca et *al.* (1987), ... ont permis de mettre en plan les premiers tableaux épidémiologiques du paludisme au Sénégal.

### 1. 5. 1. Les espèces plasmodiales

Trois espèces de *Plasmodium* humains ont jusqu'à ce jour été recensées au Sénégal; il s'agit par ordre d'importance de *P. falciparum*, *P. malariae* et *P. ovale*. En effet *P. falciparum* représente habituellement plus de 90% de la morbidité palustre, et est fréquemment associé aux deux autres espèces.

### 1. 5. 2. Les vecteurs du paludisme

La faune anophélienne du Sénégal compte à ce jour une vingtaine d'espèces, dont seulement trois sont impliquées dans la transmission du paludisme (Diagne et *al.*, 1994); ce sont *Anopheles gambiae s.s.*, *Anopheles arabiensis* et *Anopheles funestus*.

*An. gambiae* et *An. arabiensis* appartiennent au complexe *An. gambiae* et sont distribués sur tout le territoire national. Bien que ces deux espèces sont souvent sympatriques, *An. gambiae* est généralement plus fréquent en milieu humide et prédomine dans la partie Sud du pays (Petrarca et *al.*, 1987; Fontenille et *al.*, 1993). *An. arabiensis* par contre prédomine dans la région sahéenne (Nord du pays) et en milieu urbain (Vercruysse & Jancloes, 1981; Faye et *al.*, 1992; Trape et *al.*, 1992, Robert et *al.*, 1998). *An. gambiae* est en principe plus anthropophile qu'*An. arabiensis*, mais ces deux espèces peuvent présenter des taux d'anthropophilie comparables (74% pour *An. gambiae* et 70% pour *An. arabiensis* à Barkedji: Lemasson et *al.*, 1997).

*An. funestus*, autrefois largement distribué sur le territoire (Hamon et *al.*, 1966), est maintenant rencontré dans la moitié Sud du pays (Saloum, Boundou, Ferlo...: Faye et *al.*, 1993) et Sud-Est du pays (Fouladou: Cornet et *al.*, 1979;



Camicas et *al.*, 1987). C'est une espèce très anthropophile (79% à Dielmo) qui abonde souvent en début de saison sèche, lorsque les densités des populations d'*An. gambiae* et *An. arabiensis* diminuent. Ses gîtes larvaires sont constitués de collections d'eau permanente très ombragées. Les larves ne se rencontrent pas dans les eaux salines et c'est probablement la conséquence de l'absence d'*An. funestus* en Basse Casamance.

### 1. 5. 3. Epidémiologie du paludisme

Au Sénégal on distingue deux principaux faciès épidémiologiques: le faciès tropical et le faciès sahélien.

Le faciès tropical est marqué par une longue période de transmission étroitement liée au régime des précipitations. Il est retrouvé en Basse Casamance et dans le Boundou où la saison de pluies dure de 4 à 6 mois. Le taux d'inoculation entomologique annuel est généralement supérieur à 100 piqûres infectées par homme. Dans ce faciès *An. gambiae* s.s. assure l'essentiel de la transmission du paludisme. Cependant les deux autres espèces vectrices peuvent être associées à la transmission dans certaines localités.

Le faciès sahélien est caractérisé par une transmission saisonnière inférieure à 4 mois. La transmission est surtout assurée par *An. arabiensis* et localement par *An. gambiae* s.s.. Le taux d'inoculation entomologique annuel varie de 0 à 20 piqûres infectées par homme. Ce faciès est rencontré dans les régions Nord et centre du pays (Saloum, Cap-Vert, Ferlo, ...).

Les caractéristiques du milieu peuvent créer des conditions nouvelles en fonction desquelles l'expression de la transmission du paludisme peut varier. C'est le cas de la localité de Dielmo située en milieu soudanéen et où la présence d'un cours d'eau permanent entretient une transmission continue.

La morbidité palustre enregistrée au niveau des postes privés de santé a en moyenne varié de 7% à 30% sur une période de cinq ans (1989-1993); les plus fortes proportions ont été observées dans les régions de Fatick, Kaolack et Ziguinchor alors que les régions de Dakar, Louga et Saint-Louis ont été les moins touchées. Par ailleurs, la morbidité palustre est comparable entre les adultes (>15 ans) et les enfants; ceci est une conséquence de la faible prémunition de la majeure partie de la population, qui vit dans un contexte de transmission instable.

#### 1. 5. 4. La chimiorésistance au Sénégal

Au Sénégal, les premiers cas de résistance *in vivo* du *Plasmodium* à la chloroquine datent de 1988 avec une prévalence de 7,2% à Pikine (banlieue de Dakar); la chloroquinorésistance de niveaux 1 et 2 a rapidement progressé dans cette région avant de se stabiliser entre 40-50% (47,5 % en 1990: Gaye et al., 1991; 45% en 1994: Sokhna et al., 1997). Cependant Gaye et al. (1993) ont enregistré 24% de cas chloroquinorésistants en 1992. Dans les autres régions du Sénégal, la prévalence de la chloroquinorésistance a été de l'ordre de 50% à Mlomp (Basse Casamance) entre 1991-1994 (Sokhna et al., 1997; Robert & Trape, 1998), 42% entre 1993-1995 à Niakhar et 12-16% en 1994-1995 à Bandafassi-Ibel (Sokhna et al., 1997). Par ailleurs, des cas de chimiorésistance du parasite ont été signalés *in vivo* en 1997 à Niakhar avec l'amodiaquine (16%) et la sulfadoxine-pyriméthamine (7%) par Sokhna et al. (non publiés).

#### 1. 5. 5. Les mesures de contrôle de l'affection palustre

##### a. La chimiothérapie

La chloroquine est le médicament recommandé en première intention contre les accès palustres simples par le programme national de lutte contre le paludisme. Cependant, d'autres antimalariques sont utilisés à cet effet notamment l'amodiaquine.

Les produits utilisés en deuxième intention sont généralement la sulfadoxine-pyriméthamine, la méfloquine et l'halofantrine.

La quinine est en principe utilisée comme produit de troisième ligne ou pour le traitement des accès pernicioeux ou compliqués.

Par ailleurs un point essentiel de cette lutte est l'augmentation des capacités d'accès au traitement des populations, en particulier en milieu rural.

##### b. La lutte antivectorielle

Cette lutte est basée sur les pulvérisations d'insecticide à l'intérieur des habitations et sur l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide. Des pulvérisations intradomiciliaires effectués à Pout (région de Thiès) ont montré une bonne sensibilité des vecteurs aux organophosphorés (Faye et al., 1992). Par contre les essais avec les moustiquaires imprégnées d'insecticide restent limités; pourtant les effets sur l'incidence du paludisme ont été satisfaisants (Faye et al., 1998). Alonso et al. (1991) ont montré que l'utilisation des moustiquaires imprégnées pouvaient réduire la mortalité palustre chez les enfants en Gambie.

La lutte antilarvaire est menée depuis les années 30 par le Service National d'Hygiène, avec le drainage et la pulvérisation d'insecticides pendant l'hivernage et l'introduction de poissons larvivores (*Gambusia* ou "guppies") dans les gîtes permanents. Cette lutte n'a pas donné les résultats escomptés relativement à l'incidence du paludisme. Des études entomologiques conduites dans les différentes régions sont prioritaires pour la mise en place d'une lutte antilarvaire efficace.

## 1. 6. Les nouvelles approches de la lutte antivectorielle

La lutte antivectorielle constitue avec la recherche de nouveaux produits et l'élaboration d'un vaccin, les priorités pour le contrôle de l'affection palustre. En ce qui concerne la lutte contre le vecteur, les stratégies diffèrent selon les régions du monde en fonction du faciès épidémiologique (endémicité, capacité vectorielle, ...). Cette lutte qui consiste à réduire la transmission du paludisme comporte plusieurs volets:

- un volet portant sur la réduction des populations anophéliennes par l'utilisation d'insecticides en sprays ou de moustiquaires imprégnées. Des résultats satisfaisants ont été obtenus en Gambie, au Ghana et au Kenya avec une réduction de l'incidence du paludisme (Alonso et *al.*, 1991; Binka et *al.*, 1996; Nevill et *al.*, 1996; Jawara et *al.*, 1998). Cette approche est applicable en zones de transmission faible et intermédiaire.

- un volet génétique qui consisterait à libérer dans la nature une souche d'anophèle génétiquement modifiée et très compétitive par rapport aux souches sauvages, et surtout inaptes à transmettre le paludisme (Crampton, 1994).

- un volet immunologique basé:

- (1) d'une part sur l'identification de facteurs antigéniques exprimés par le parasite et susceptibles de bloquer le développement du parasite chez le vecteur. Des tentatives de blocage de la transmission de *P. falciparum* ont ainsi pu être effectuées chez la souris et le lapin à partir de l'anticorps Pfs 25 dirigé contre l'anticorps spécifique 25-kDa des formes préocystes (Kaslow et *al.*, 1988 et 1992; Kaslow, 1993); Les principaux autres anticorps connus comme spécifiques des stades sporogoniques du parasite sont: Pfs 230, Pfs 48/45 et Pfs 28 (Kaslow et *al.*, 1988 et 1992).

- (2) d'autre part l'identification chez le moustique des facteurs physiologiques susceptibles de limiter le développement sporogonique. Il semble admis que la chitinase produite par le parasite conjuguée à la trypsine sécrétée par le moustique jouent un rôle actif dans les mécanismes de passage de l'ookinète à travers la membrane péritrophique. Par conséquent, une inhibition de la production de ces molécules pourrait entraver le développement de l'ookinète en oocyste (Shahabuddin et *al.*, 1993 et 1995).

- enfin un volet portant sur l'élaboration d'un vaccin antimoustique (Ramasamy & Ramasamy, 1990; Kay & Kemp, 1994). Noden et *al.* (1995) ont observé que 72% des moustiques gorgés sur un lapin immunisé avec des extraits d'estomacs d'*An. gambiae* périssaient moins de 7 jours après le gorgement. Par conséquent, l'identification dans le moustique des facteurs susceptibles d'induire une réponse immunitaire létale pour le moustique constitue une priorité pour l'élaboration d'un tel vaccin.



## Chapitre 2.

Description du cadre de l'étude

## 2. 1. La région de Dakar

Située à l'extrême ouest de la façade atlantique du Sénégal (figure 2. 1.), la région de Dakar (ancienne région du Cap-Vert) couvre une superficie de 550 km<sup>2</sup>. Elle renferme près de deux millions d'habitants selon des estimations publiées en 1992 (à partir des relevés de 1988 sur la population du Sénégal), soit près de 21% de la population du Sénégal. C'est la région la plus fortement peuplée avec environ 2700 habitants au kilomètre carré. Cette forte densité est due en partie à un exode rural important. La région de Dakar est divisée en trois départements: Dakar, Pikine et Rufisque (figure 2. 2.). La population de la région de Dakar est fortement urbanisée (96%). Dakar et Pikine renferment respectivement 46% et 42% de la population totale de la région. Le reste de la population est répartie dans la commune et la zone rurale de Rufisque (tableau 2. 1.).

Sur le plan bioclimatique, la région de Dakar est soumise à l'influence des alizés marins prédominants sur le littoral entre Dakar et Saint Louis. Cette situation littorale qui se traduit par un rafraîchissement des températures confère à cette région un climat doux. Le climat est qualifié de "sub-canarien" sec et le régime de type sahélien comporte deux saisons:

- une saison humide de Juillet à Octobre avec des températures moyennes mensuelles oscillant entre 25-28,5 °C et une humidité relative de 70-90%. Les températures les plus élevées sont enregistrées en Octobre. La moyenne annuelle des précipitations ne dépasse guère 500 mm. Elle a été de 492 mm de pluies entre 1850 et 1995.

- une saison sèche de Novembre à Juin marquée par la circulation de l'alizé continental. Les températures moyennes mensuelles oscillent entre 21-26 °C et l'humidité relative entre 40-70%. La prépondérance de l'alizé maritime de direction Nord-Ouest à Nord-Est en Janvier et Février sur la frange occidentale de la presqu'île du Cap-Vert se traduit par des températures moyennes mensuelles basses variant entre 21-22 °C.

En 1996, 1997 et 1998, la précipitation annuelle a été respectivement de 455 mm, 202 mm et 341 mm. Les moyennes mensuelles les plus élevées ont été enregistrées en Août-Septembre; le maximum a été observé en Septembre 1996 avec 240 mm de pluies (figure 2. 3.). Les températures moyennes les plus basses ont été enregistrées en Janvier-Février (20-21°C) et les plus élevées en Octobre (28°C). Les écarts de températures n'ont pas dépassé +6°C et ont peu varié dans l'année (figure 2. 5.). L'humidité relative a augmenté en moyenne de 40% en début de saison sèche à 80% en milieu de saison humide (figure 2. 7.).

Dakar est à la fois la capitale politique et économique du Sénégal. L'essentiel des activités administratives et industrielles y est concentré. Sur le plan social, le revenu moyen par habitant est relativement plus élevé à Dakar que dans les autres départements (Pikine et Rufisque). En effet la population active dakaroise se retrouve dans les secteurs formels à revenus constants (administration, industries,...).

La commune urbaine de Pikine-Guediawaye située à environ 15 km de Dakar regroupe plusieurs quartiers: Pikine, Guediawaye, Thiaroye, Diamaguene, etc. La commune de Pikine est une extension de la capitale créée initialement pour héberger le surplus de la population de Dakar. Sa population essentiellement constituée de personnes à faibles revenus augmente considérablement avec l'exode rural et un taux de croissance de la population de 4,0% contre une moyenne nationale de 2,9%. L'essentiel de la couverture sanitaire est assuré par les centres de santé privés. La vie économique s'organise autour des secteurs informels comme le commerce et le maraîchage. Une partie des bas fonds de la zone est couverte par les eaux d'affleurement ou "niayes". L'activité maraîchère y est pratiquée de manière intensive en saison sèche pendant 8 à 9 mois, facilitée par la proximité de la nappe phréatique. L'approvisionnement en eau pour l'arrosage des cultures s'effectue au niveau des puits que les maraîchers creusent dans le sable. Ces puits sont désignés localement sous le terme de "céanes". Environ 5000 puits ont été recensés dans toute la presqu'île du Cap-Vert dont plus de 80% en zone périurbaine (Pikine, Guediawaye, Thiaroye, etc.).

Les céanes et les niayes constituent des gîtes potentiels pour le développement de plusieurs espèces de moustique, dont *An. arabiensis* vecteur du paludisme dans la région de Dakar (Vercruyse & Jancoes, 1981; Robert et al., 1998). Robert et al. (1998) ont montré que 30% des céanes hébergent *An. arabiensis* au moins pendant la saison humide. La transmission du paludisme est saisonnière d'Août à Décembre. En 1992, Gaye et al. (1993) ont observé une prévalence de *P. falciparum* de 13,7% et 12,4% respectivement à Dakar et Pikine. L'indice sporozoïtique estimé à partir des études de Vercruyse & Jancoes (1981) pourrait varier entre 0,01 en saison humide et 0,001 le reste de l'année. La prévalence de chloroquinorésistance de *P. falciparum* enregistrée dans cette région a varié en 1994-1995 entre 38% et 45% (Robert et al., 1996; Sokhna et al., 1997).

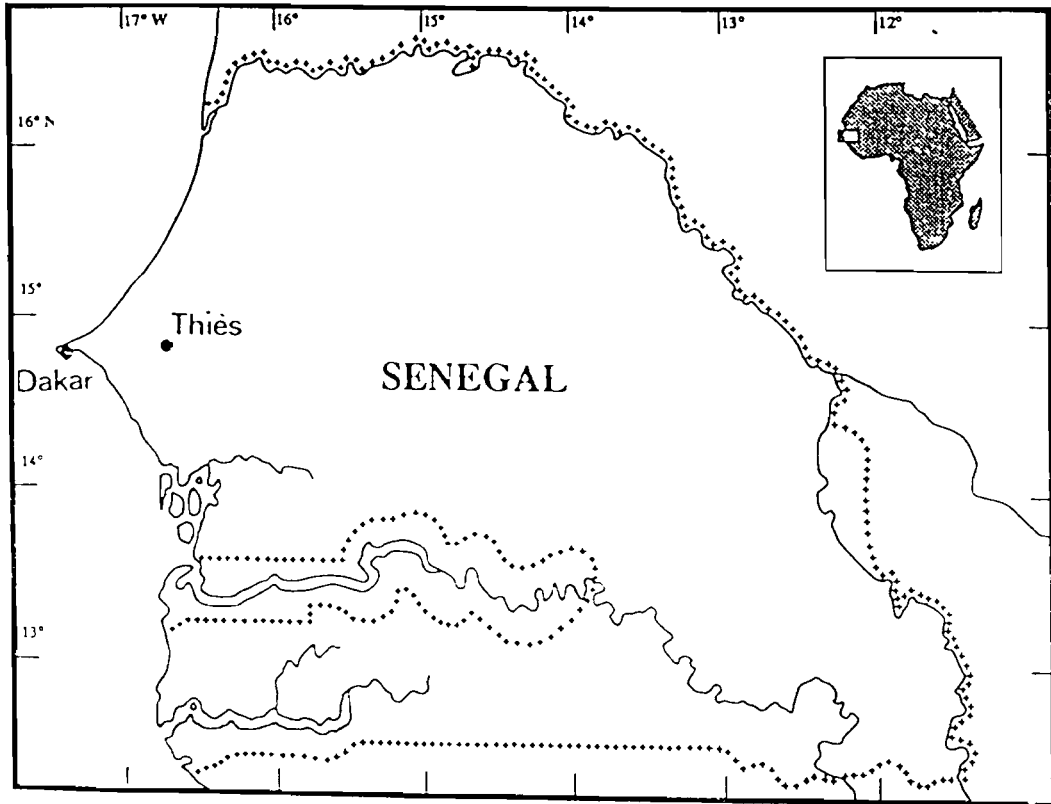


Figure 2.1. Carte du Sénégal et localisation des villes principales des régions d'étude.

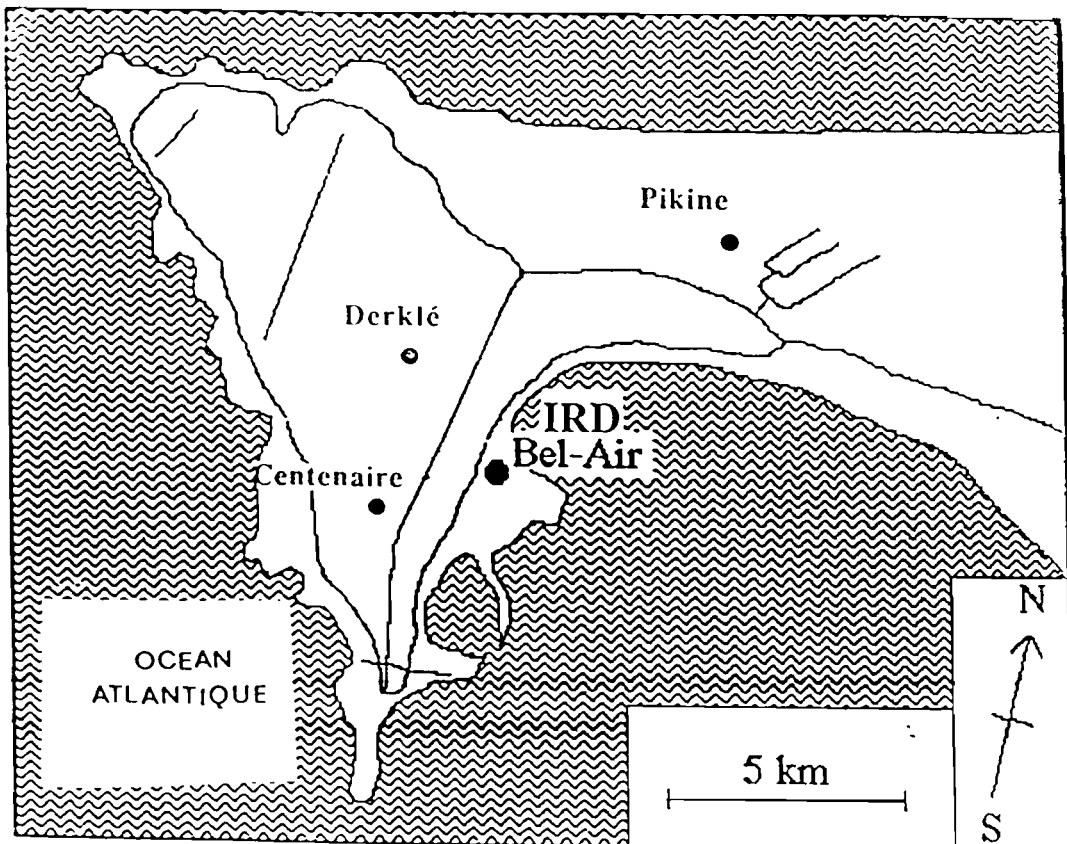


Figure 2.2. Région de Dakar et localisation des trois centres de santé (Centenaire, Derklé et Pikine) par rapport au laboratoire de Paludologie de l'Institut de Recherche pour le Développement.



## 2. 2. La région de Thiès

La région de Thiès est contiguë à celle de Dakar. Thiès est situé à 60 km de route à l'Est de Dakar. Cette région compte près d'un million d'habitants répartis dans 3 départements: Thiès, Mbour et Tivaouane (tableau 2. 2.). Sur le plan démographique, la région de Thiès est la deuxième du Sénégal après celle de Dakar. A l'exception de la commune de Thiès, plus de 60% de la population de la région vit en milieu rural. L'activité économique est basée autour du chemin de fer, des industries (minières, textiles, etc.) et du commerce. Au niveau du monde rural, la culture du mil et de l'arachide représente l'activité principale.

Le climat est de type sahélien et comporte deux saisons: une courte saison de pluies de Août à Octobre avec moins de 500 mm de pluies et une longue saison sèche de Novembre à Juillet. La prédominance des courants aériens continentaux (harmattans) se traduit par des températures élevées. De même les écarts journaliers de températures sont plus grands comparés à ceux des régions littorales du pays. Les températures moyennes mensuelles oscillent entre 27-30 °C en saison humide et 23-27 °C en saison sèche.

La précipitation annuelle a été respectivement de 389 mm, 414 mm et 336 mm en 1996, 1997 et 1998. Les moyennes mensuelles les plus élevées ont été enregistrées en Août-Septembre; le maximum a été observé en Septembre 1997 avec 186 mm de pluies (figure 2. 4.). Les températures moyennes les plus basses ont été enregistrées en Décembre-Janvier (23-24°C) et les plus élevées en Octobre (28-29°C). Les écarts de températures ont souvent dépassé +12°C particulièrement en saison sèche; ils ont parfois atteint +17°C entre Novembre et Février (figure 2. 6.). L'humidité relative a augmenté en moyenne de 15% en début de saison sèche à 75% en milieu de saison humide (figure 2. 8.).

La transmission du paludisme est saisonnière de Septembre à Décembre comme dans la plupart des régions septentrionales du Sénégal. Le vecteur du paludisme est *An. arabiensis*. Les gîtes larvaires sont généralement alimentés par les pluies qui surviennent de Août à Octobre. La couverture sanitaire est assurée par deux grands centres hospitaliers et par des centres de santé privés catholiques et laïcs. La prévalence du paludisme obtenue au niveau des centres de santé privés catholiques dans la région de Thiès a été de 23% en 1993 selon le rapport du programme national de lutte contre le paludisme. Peu d'études relatant l'évolution de la chloroquinorésistance dans la région urbaine de Thiès sont disponibles. Néanmoins la chloroquinorésistance dans les régions voisines avec un taux de médicalisation comparable à celui de Thiès avoisine 40% (Sokhna & al., 1997).

Notre étude a été réalisée de 1996 à 1998 au sein du Laboratoire de Paludologie de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD, ex-Orstom) et en collaboration avec l'Université de Dakar et le Service de Lutte Antipalustre (SLAP) de Thiès. L'étude menée de Septembre à Décembre a été centrée sur les infections expérimentales de moustiques avec du sang des porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* recrutés parmi les populations naturellement impaludées des régions de Dakar et Thiès. Le recrutement des patients a été effectué au niveau de centres de santé des agglomérations de Dakar et Pikine (région de Dakar) de 1996 à 1997 et au niveau du SLAP dans la région de Thiès en 1998.

	Communes	Nombre d'habitants estimés en 1998
<b>Région de Dakar</b>	Dakar	860 113
	Pikine	1 044 814
	Rufisque	259 879
Total		2 164 806

**Tableau 2. 1.** Répartition de la population de la région de Dakar en fonction des départements: estimations à partir des résultats du recensement général de la population et de l'Habitat du Sénégal de 1988.

	Communes	Nombre d'habitants estimés en 1998
<b>Région de Thiès</b>	Thiès	493 629
	Mbour	390 025
	Tivaouane	358 676
Total		1 242 329

**Tableau 2. 2.** Répartition de la population de la région de Thiès en fonction des départements: estimations à partir des résultats du recensement général de la population et de l'Habitat du Sénégal de 1988.

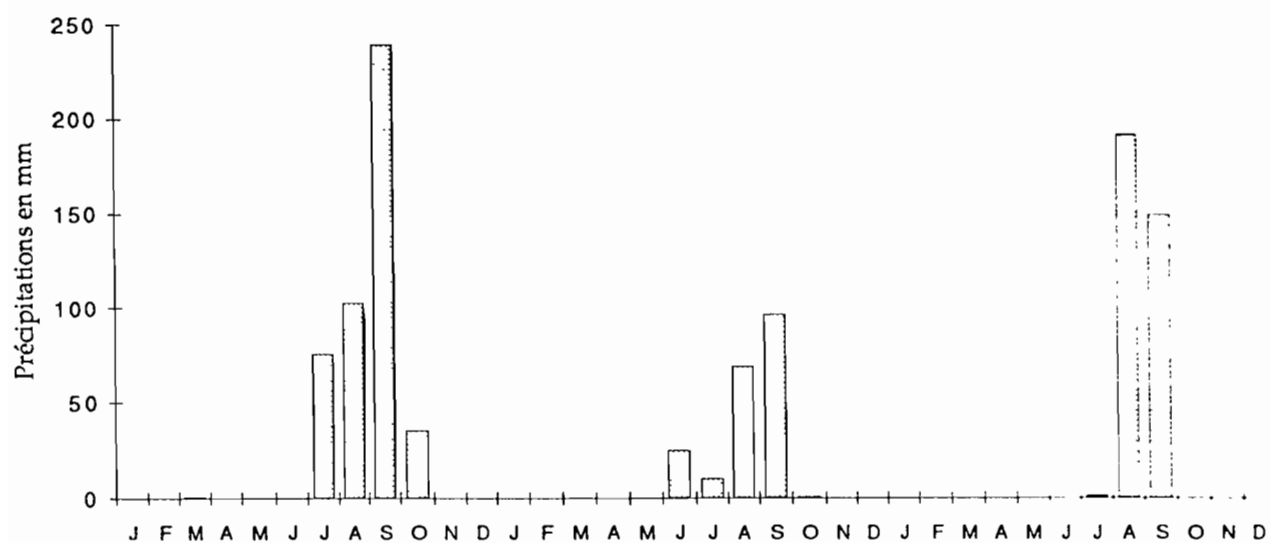


Figure 2. 3. Précipitations moyennes mensuelles à Dakar en 1996, 1997 et 1998 (Service de la Météorologie Nationale).

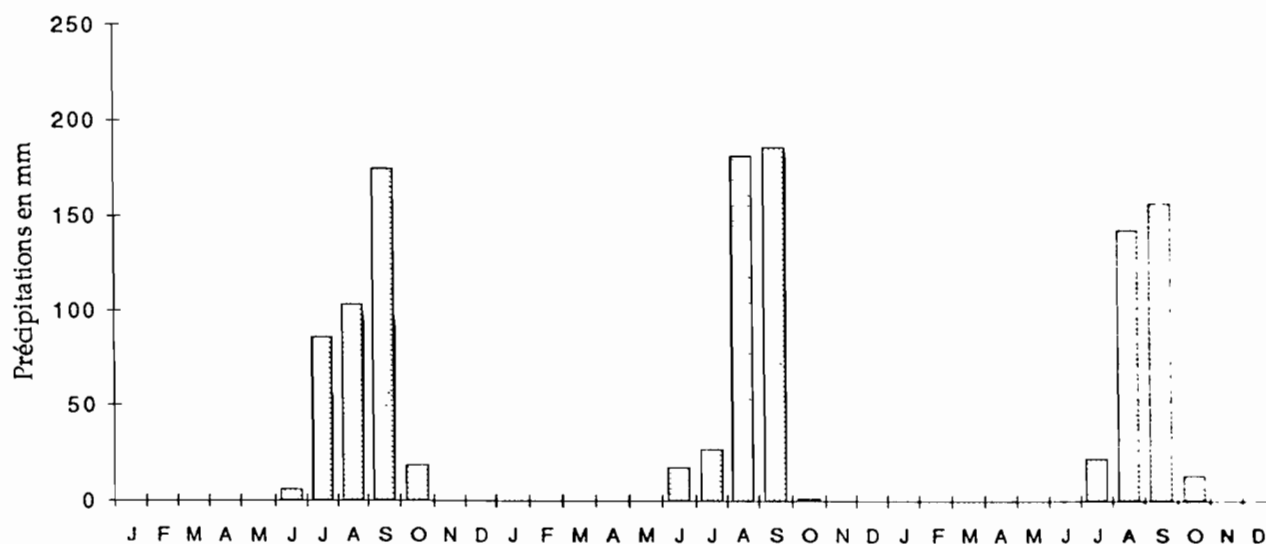


Figure 2. 4. Précipitations moyennes mensuelles à Thiès en 1996, 1997 et 1998 (Service de la Météorologie Nationale).

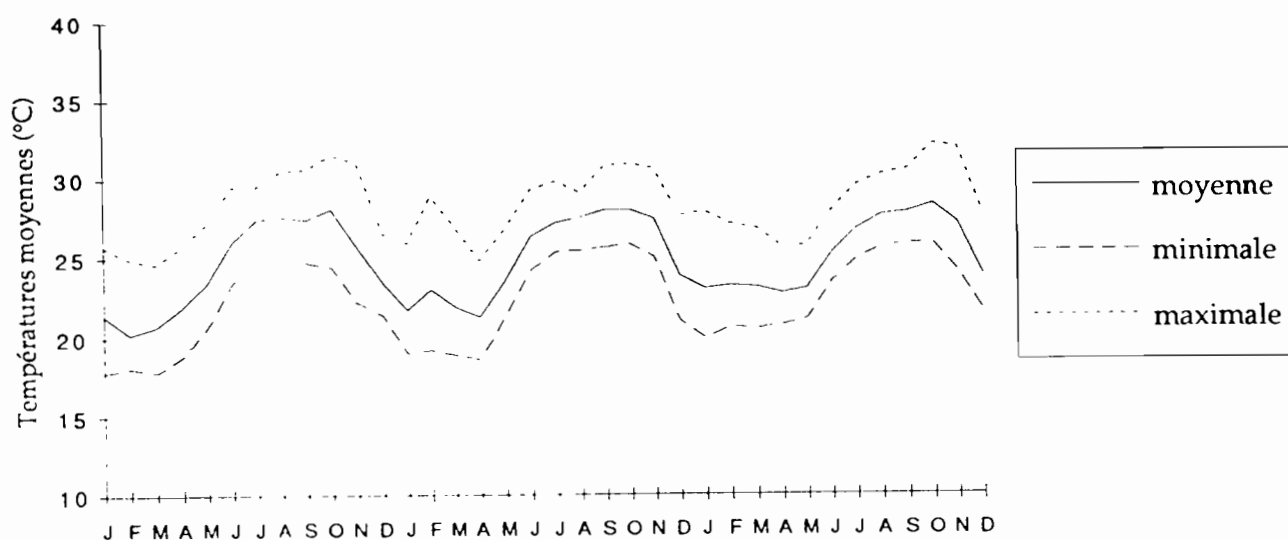


Figure 2. 5. Variations mensuelles de la température ambiante à Dakar en 1996, 1997 et 1998 (Service de la Météorologie Nationale).

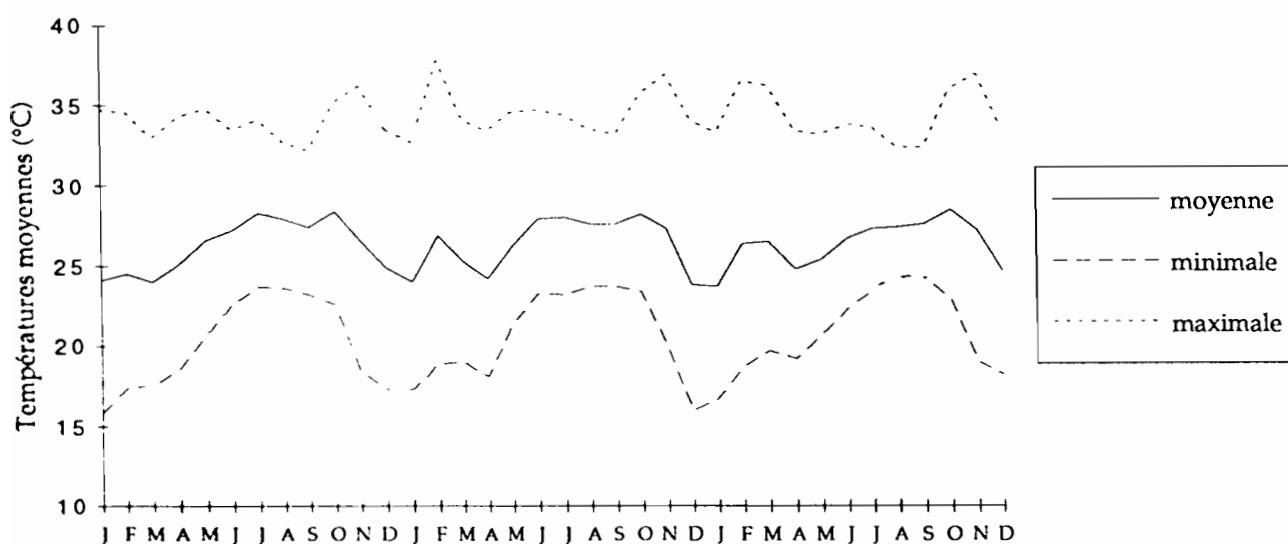


Figure 2. 6. Variations mensuelles de la température ambiante à Thiès en 1996, 1997 et 1998 (Service de la Météorologie Nationale).

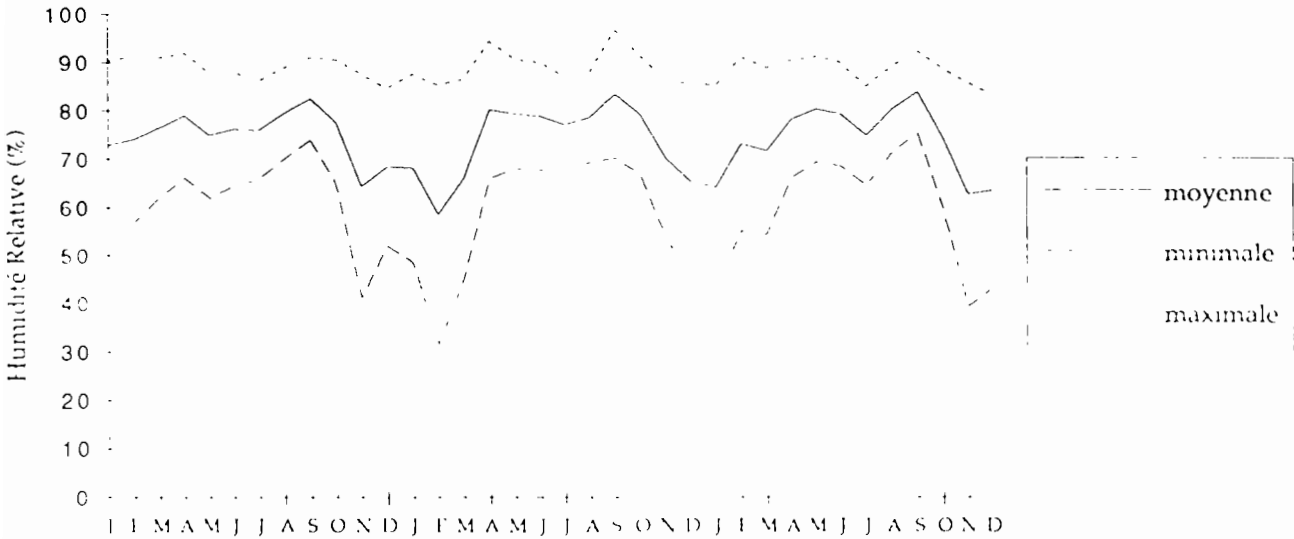


Figure 2. 7. Variations mensuelles de l'Humidité Relative à Dakar en 1996, 1997 et 1998 (Service de la Météorologie Nationale).

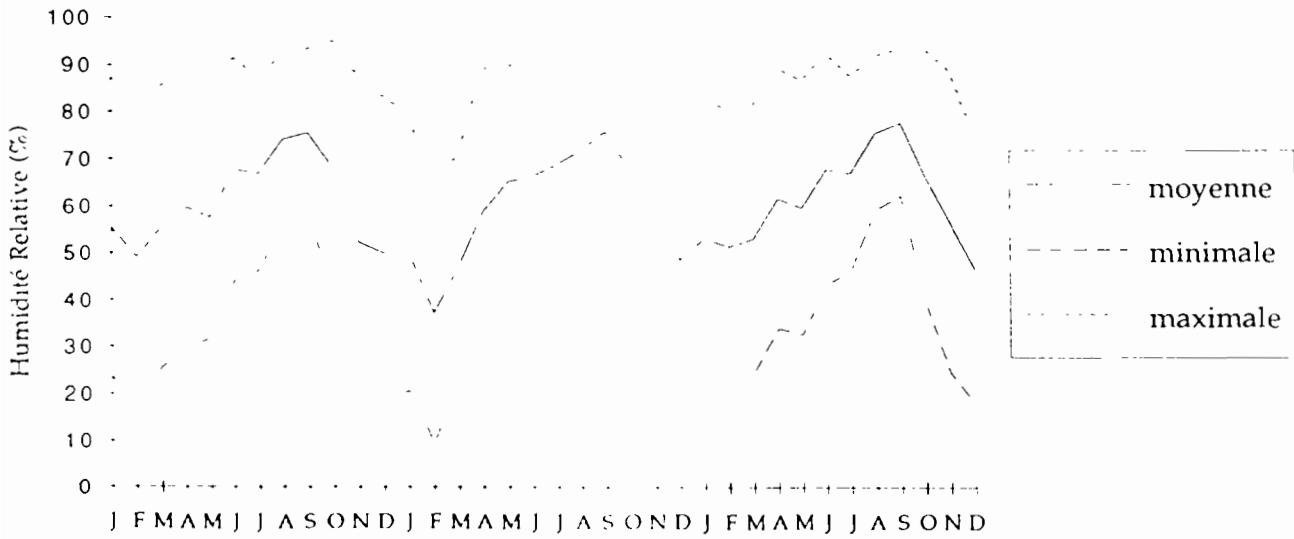
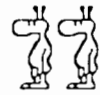


Figure 2. 8. Variations mensuelles de l'Humidité Relative à Thiès en 1996, 1997 et 1998 (Service de la Météorologie Nationale).



## Chapitre 3.

Gamétoctémie des patients en accès palustres à  
*Plasmodium falciparum* traités avec la  
chloroquine, la sulfadoxine-pyriméthamine ou  
la quinine, et infectivité de ces patients pour  
*Anopheles arabiensis*

### 3. 1. Introduction

En dépit de l'extension de la chloroquinorésistance de *Plasmodium falciparum* en Afrique, la plupart des programmes nationaux de lutte contre le paludisme maintiennent l'utilisation de la chloroquine pour le traitement des accès palustres simples.

Au Sénégal, les premiers cas de résistance ont été signalés au milieu des années 1980 (Brandicourt et *al.*, 1986; Druilhe et *al.*, 1986; Hellgren et *al.*, 1987). Depuis lors la prévalence de la chloroquinorésistance n'a cessé d'augmenter, notamment en milieu urbain passant de 7% à 47% entre 1988-1990 (Gaye et *al.*, 1991). Les études plus récentes ont montré qu'elle s'est étendue sur l'ensemble du territoire, variant entre 14 et 50% (Robert et *al.*, 1996; Sokhna et *al.*, 1997). Les régions les plus médicalisées telles Dakar et Pikine sont les plus touchées. Aucune alternative à court terme n'est actuellement proposée. Les médicaments de substitution les plus courants sont la sulfadoxine-pyriméthamine, l'amodiaquine, la quinine et l'halofantrine; mais leur efficacité n'est pas garantie à long terme d'autant plus que les premiers cités (sulfadoxine-pyriméthamine et amodiaquine) seraient associés à une augmentation de la gamétocytémie (Schapira & Schwalbach, 1988; Roche et *al.*, 1995; Robert et *al.*, 1996; Robert & Trape, 1998).

La présence des gamétocytes dans le sang et leur ingestion par l'anophèle femelle conditionne le déroulement du cycle sporogonique du parasite. Depuis la mise au point d'un procédé expérimental d'infection de moustiques (Rutledge et *al.*, 1964), il est possible d'étudier les mécanismes par lesquels les différentes souches de *P. falciparum* poursuivent leur développement chez le vecteur.

Notre étude a été menée de Septembre à Décembre (1996-1998) à Dakar et Thiès. Elle a eu pour but d'évaluer chez des patients en accès palustre simple, la gamétocytémie de *P. falciparum* après le traitement et l'infectivité de ces gamétocytes au cours des infections expérimentales de moustiques.



## 3. 2. Matériels et Méthodes

### 3. 2. 1. Recrutement des patients en accès palustre à Dakar

Le dépistage a été réalisé de 1996 à 1997 dans les dispensaires privés de trois quartiers de Dakar: Derklé, Centenaire et Pikine.

Les gouttes épaisses ont été prélevées au bout du doigt (majeur ou annulaire) chez les personnes consultant entre Septembre et Décembre au niveau de ces formations sanitaires, et présentant des signes cliniques d'un accès palustre simple (hyperthermie, céphalées). La température a été mesurée au niveau axillaire à l'aide d'un thermomètre électronique. La mesure obtenue a été chaque fois augmentée de 0,5 °C pour obtenir la température corporelle. La confirmation parasitologique de l'infection palustre a été effectuée par goutte épaisse après coloration avec une solution à 6% de Giemsa diluée avec de l'eau minérale (Pierval®). La confirmation parasitologique a été faite sur place une demi heure environ après le prélèvement et la densité parasitaire relative a été estimée sur la base d'un examen d'au moins 50 champs microscopiques successifs. Les malades avec une parasitémie positive (avec ou sans gamétocytes) ont été interrogés dans l'éventualité d'une inclusion pour les tests de chimiosensibilité *in vivo*. Seules les personnes présentant les critères suivants ont été incluses dans l'étude.

- (1) volontaires ou accord des parents pour les enfants;
- (2) âgées de 5 ans et plus;
- (3) résidant habituellement dans la région de Dakar ou depuis au moins 2 mois;
- (4) présentant un accès palustre simple ou porteur asymptomatique;
- (5) présentant une parasitémie supérieure à 100 trophozoïtes/ $\mu$ l de sang au moment de l'inclusion;
- (6) absence d'association avec une autre espèce plasmodiale;
- (7) ne déclarant aucune prise d'antipaludiques dans les 10 jours précédant la consultation; absence de chloroquine ou quinine dans les urines par le test de Haskins.

• Dosage de la chloroquine dans l'urine par la méthode de Haskins modifiée par Mount et al. (1987): ce test a été effectué comme préalable à l'inclusion du patient dans le protocole. Les urines des patients en accès palustre simple à *P. falciparum* ont été recueillies dans un récipient propre. Successivement, un ml de tampon phosphate ( $\text{PO}_4^{2-}$ ) préalablement conservé à 4 °C, 2 ml de chloroforme ( $\text{Cl}_3\text{CH}$ ) et 2 ml d'urine du patient ont été prélevés à l'aide de pipettes et placés dans un tube en verre propre de 10 ml. Une pipette différente a été utilisée pour chaque produit avant d'être systématiquement rincée à l'eau du robinet. Une fois fermé, le tube a été retourné 20 fois afin de bien homogénéiser les produits. Le tube a ensuite été placé verticalement sur un support pendant 1 à 2 minutes. Après la décantation, la partie aqueuse (supérieure) a été éliminée à l'aide d'une pipette et 1 ml d'Héliantine à 0,2% a été ajouté dans la phase organique restante. Le tube fermé a été retourné 20 fois encore puis laissé au repos pendant 1 à 2 minutes sur un support vertical. Comme précédemment, la phase aqueuse supérieure a été éliminée. A l'aide d'un coton tige, la phase organique a été clarifiée et comparée sur un fond blanc avec la gamme de référence. Les témoins positifs ont présenté une coloration jaune. En absence de chloroquine dans les urines, la phase organique doit être claire. Les détails pratiques de cette méthode sont exposés dans Cot et al. (1991).

### 3. 2. 2. Prélèvement sanguin et gorgement des moustiques avant le traitement

Les malades recrutés au niveau des dispensaires ont été emmenés en voiture au laboratoire de Paludologie de l'Institut de Recherche pour le Développement (I.R.D., ex-Orstom). Après identification et prise de divers renseignements sur une fiche<sup>1</sup>, un prélèvement sanguin a été effectué dans une veine du pli du coude avec un vacutainer<sup>®</sup> avant l'administration du traitement. Le sang prélevé, soit 15 ml de sang veineux, a été réparti dans 3 tubes:

- 7 ml de sang dans un tube stérile à héparinate de lithium pour le gorgement des moustiques;

- 5 ml de sang dans un tube stérile à oxalate pour le test de chimiosensibilité *in vitro* de *P. falciparum* au laboratoire d'immunologie de l'Institut Pasteur de Dakar;

- 3 ml ce sang dans un tube stérile à EDTA pour la détermination du génotype hémoglobinique, du groupe sanguin et du facteur Rhésus au laboratoire d'immunologie de l'Institut Pasteur de Dakar.

---

1 - voir fiche en annexe page 139.

Des gouttes épaisses ont été confectionnées avec du sang veineux recueilli dans la seringue. Elles ont été dé-hémoglobinisées dans de l'eau minérale (Pierval®) un jour après leur prélèvement. La coloration a été effectuée pendant 20 minutes avec une solution de Giemsa à 6%. Ces gouttes épaisses ont été lues au laboratoire de l'IRD à Dakar et la densité parasitaire a été déterminée en fonction du nombre de globules blancs (Trape, 1985). Le nombre total de parasites (trophozoïtes) a été obtenu après l'examen de 200 champs microscopiques au grossissement 1000, et le nombre moyen de leucocytes par l'examen de 20 champs.

Les femelles d'*An. arabiensis* récoltées à l'état larvaire et maintenues en insectarium (cf. chapitre 3. 2. 4.) ont été gorgées à travers une membrane (parafilm ou baudruche) pendant 10 minutes avec du sang prélevé chez les recrues en accès palustre. La sensibilité de la méthode de détermination de la gamétocytemie a été évaluée chez les malades sans gamétocytes au niveau de la goutte épaisse, en recherchant des oocystes de *P. falciparum* dans les estomacs des moustiques sept jours après le gorgement. L'infectivité des gamétocytes a été évaluée de la même façon avant l'administration du traitement antipaludique chez les malades avec une gamétocytemie à J0.

### 3. 2. 3. Tests de chimiosensibilité de *Plasmodium falciparum*

#### a. Test de chimiosensibilité *in vivo*

A la suite du prélèvement sanguin, un traitement antimalarique (chloroquine ou sulfadoxine-pyriméthamine) a été administré à chaque malade par voie orale suivant la posologie ci-après:

- La chloroquine (Nivaquine®) a été administrée en 3 prises étalées sur trois jours successifs; soit 10mg/kg, 10mg/kg et 5mg/kg respectivement au premier, au deuxième et au troisième jour de l'inclusion. La première dose a été administrée au laboratoire. Les doses complémentaires ont été administrées au domicile des malades.

- La sulfadoxine-pyriméthamine (Fansidar®) dont chaque comprimé dosé à 1500 mg de sulfadoxine + 75 mg de pyriméthamine a été administrée en prise unique au moment de l'inclusion du malade selon une dose totale de 25 mg/kg de sulfadoxine + 1,25 mg/kg de pyriméthamine.

Tous les malades recrutés en 1996 et de Septembre à Octobre 1997 ont été traités avec la chloroquine. Les patients recrutés en Novembre-Décembre 1997 ont été traités avec la sulfadoxine-pyriméthamine (Fansidar).

Le suivi des malades a été effectué au minimum pendant 28 jours au domicile de chaque malade. Il a été obligatoire tous les jours jusqu'à J4. Il a été par la suite conditionné par l'évolution parasitologique et clinique du malade. En effet l'état de santé des patients a primé sur l'étude. Ainsi les critères de sortie de l'étude ont été: (1) les accès palustres graves et pernicioeux, (2) les malades présentant des vomissements répétés après la prise du traitement et (3) ceux désirant sortir du protocole. Au delà de J4, le suivi a été poursuivi à J7, J14, J21 et J28 et a permis parallèlement de suivre l'évolution de la parasitémie et de la gamétoctémie à partir des gouttes épaisses.

En cas de résistances parasitaires constatées pendant le suivi par gouttes épaisses, l'halofantrine (Halfan<sup>®</sup>) a été proposée comme antipaludéen de substitution. L'Halfan a été administré par voie orale sous forme de comprimés de 250 mg à raison de 24 mg/kg en moyenne en 3 prises espacées de 6h. Quatre gouttes épaisses supplémentaires ont été prélevées 2, 4, 7 et 14 jours après la prise de l'Halfan.

Les antipaludiques utilisés ont été obtenus au niveau de la Pharmacie Nationale d'Approvisionnement (Nivaquine) et des pharmacies de la ville de Dakar (Fansidar et Halfan).

#### b. Tests de chimiosensibilité *in vitro*

La sensibilité de *P. falciparum* aux antipaludiques a été testée *in vitro* à partir des tests isotopiques (Le Bras & Deloron, 1983; Le Bras et al., 1984) au laboratoire d'immunologie de l'Institut Pasteur à Dakar. La chloroquine et l'halofantrine ont été testées sur les souches de *P. falciparum* prélevées au moment de l'inclusion des patients en accès palustres simples dans notre protocole. Ces tests ont permis d'évaluer la capacité du parasite à se développer en présence de doses croissantes d'un antipaludique donné. La méthode utilisée a consisté à quantifier le développement du parasite qui pour se multiplier incorpore un marqueur radioactif (l'hypoxanthine tritiée). La multiplication des parasites a été révélée par l'incorporation du radio-isotope dans les noyaux des parasites. La mesure de la radioactivité s'est effectuée à partir d'un compteur et les résultats ont été exprimés en nombre de coups par minute (cpm). Un graphique représentant les concentrations du médicament et les incorporations correspondantes du marqueur radioactif exprimées sous forme logarithmique

(log) a permis de déterminer la concentration inhibitrice 50% (CI<sub>50</sub>) de l'antipaludique testée.

On a pu apprécier la valeur seuil maximale de susceptibilité du parasite située entre deux concentrations (en nanomole/litre) où les incorporations chutent au moins de moitié (CI<sub>50</sub>). Le seuil minimal de sensibilité du parasite à l'antipaludique a été de 100 nM pour la chloroquine et 30 nM/ml pour l'halofantrine. Sur le plan pratique, l'expérimentation a été validée exclusivement en cas d'adaptation du parasite au milieu de culture *in vivo*; c'est à dire lorsque les valeurs (cpm) obtenues avec la culture mère initiale (concentration de l'antipaludique nulle) sont élevées. Lorsque ces valeurs ont été basses (multiplication atténuée) avec peu ou pas d'antipaludiques pour des raisons diverses (inadaptation du parasite au milieu de culture ou aux conditions de l'expérimentation, etc.), les résultats du test n'ont pas été pris en compte.

### 3. 2. 4. Tests d'infectivité des gamétocytes de *P. falciparum* après le traitement

- En 1996-1997, les tests ont été effectués chez les patients enrôlés dans le protocole de chimiorésistance, et dont l'examen parasitologique à J4 du traitement a révélé la présence dans la goutte épaisse des gamétocytes de *P. falciparum*. Leur sang a été prélevé sept jours après le traitement antipaludique (chloroquine ou Fansidar) et proposé pour le gorgement des moustiques. Pour les patients présentant une résistance parasitaire précoce, le prélèvement a toujours été effectué avant l'administration d'un autre traitement.

- En 1998, les tests ont été effectués chez les patients consultant pour un contrôle de la parasitémie après le traitement d'un accès palustre à *P. falciparum* au niveau du SLAP de Thiès.

Ces tests ont consisté à gorger les femelles d'*An. arabiensis* avec le sang des porteurs de gamétocytes dans le but d'évaluer les capacités des gamétocytes à poursuivre leur développement chez le vecteur.

#### a. Détermination de la gamétocythémie

La gamétocythémie a été évaluée par goutte épaisse au cours du suivi parasitologique. Les gouttes épaisses dé-hémoglobinisées et colorées au Giemsa à 6% ont été lues au laboratoire de l'IRD à Bel-Air. La dé-hémoglobinisation a consisté à tremper pendant 5 mn environ dans un bac contenant de l'eau

minérale (Pierval) les gouttes épaisses prélevées la veille. Les gamétocytes ont été dénombrés sur 200 champs microscopiques (g). Le nombre moyen de leucocytes (l) a été obtenu sur 20 champs microscopiques. La densité gamétocytaire (D) a été calculée sur la base de 8000 leucocytes par  $\mu\text{l}$  de sang, soit en utilisant la formule suivante:  $[D = (g / l) \times 40]$

#### b. Collection et élevage des moustiques

Les moustiques utilisés pour cette partie de l'étude ont été récoltés à l'état sauvage dans les gîtes de la région de Dakar. Les études entomologiques (Vercryusse & Jancloes, 1981; Faye & *al.*, 1992; Robert & *al.*, 1998) effectuées dans la région de Dakar ont montré qu'une seule espèce du complexe *An. gambiae* est retrouvée dans les gîtes de Dakar; il s'agit d'*An. arabiensis*. Par conséquent tous les moustiques récoltés à l'état larvaire dans les gîtes (céanes, mares, etc.) de la région de Dakar et présentant des caractères morphologiques d'*An. gambiae s. l.* ont donc été considérés comme appartenant à l'espèce *An. arabiensis*. Par ailleurs, 85 spécimens d'*An. gambiae s. l.* (larves et adultes) récoltés en 1995 dans les gîtes de cette région ont été tous identifiés par la PCR comme appartenant à l'espèce *An. arabiensis* (Robert et *al.*, 1998). Les gîtes larvaires ont été visitées pendant toute la durée de l'étude (Septembre-Décembre). Les larves récoltées par dipping ont été transportées dans des bouteilles en plastique jusqu'à l'insectarium de l'IRD à Bel-Air, avant d'être réparties dans des bacs de 30x20 cm en fonction de leur stade de développement. Leur développement en insectarium s'est effectué à 27-28 °C et 70-85% d'humidité relative et le nombre de larves par bac a varié entre 400 et 700. Elles ont été nourries quotidiennement avec 200 mg de Tetra Baby Fish Food L<sup>®</sup> dilués dans 3 ml d'eau. Les nymphes triées tous les matins et placées dans des bocaux de 120 cm<sup>3</sup> ont émergées à l'intérieur des cages de 20x20x20 cm entourées de toile moustiquaire. Les adultes ont été nourris avec une solution sucrée à 20% entre leur émergence et le gorgement. Le repas sucré a été quotidiennement renouvelé. Seules les femelles âgées de 3 jours ont été utilisées pour les essais d'infection.

#### c. Le gorgement des moustiques à travers la membrane de baudruche et conservation en insectarium

Le sang prélevé dans un tube vacutainer à héparinate de lithium de 10 ml au niveau du pli du coude a été bien mélangé à l'anticoagulant avant d'être immédiatement proposé aux moustiques à travers la membrane de baudruche.

- Le dispositif expérimental: il a été mis au point par Rutledge et *al.* (1964) et adapté pour nos gorgements expérimentaux de moustique (figure 3. 1.). Ce dispositif a été constitué de cellules de gorgement en verre fixées à l'aide de pinces sur une tige horizontale. Cette tige dont les extrémités ont été maintenues grâce à des noix de fixation sur des tiges portoirs (verticaux) permet d'ajuster la hauteur des cellules par rapport aux pots de moustiques. Un dispositif constitué d'un thermoplongeur Polystat<sup>®</sup>, de tubes en caoutchouc et d'une bassine remplie d'eau a assuré la circulation continue de l'eau entre les cellules. L'eau préalablement chauffée et thermostatée à 37°C à l'aide du thermoplongeur a permis de maintenir le sang à la température habituelle du corps humain. Le thermoplongeur a été mis en marche 15 à 20 mn avant le début de l'infection. Les membranes artificielles (Parafilm<sup>®</sup> ou baudruche) ont été placées sous les cellules de gorgement ( $\varnothing = 2,50$  cm). La surface de gorgement a été de 4,90 cm<sup>2</sup>. Entre deux gorgements, les membranes de baudruche ont été lavées à l'eau de robinet, traitées à l'alcool à 95°, séchées puis replacées sous la cellule. Lorsqu'elles n'ont pas été trouées accidentellement au cours des manipulations, les membranes de baudruche ont été réutilisées.

- Le gorgement des moustiques: le gorgement des moustiques s'est effectué dans une pièce obscure pendant 10 mn.

En 1996-1997, il a été effectué à l'insectarium de l'IRD à Bel-Air. Les moustiques adultes ont été répartis dans des pots en carton de 150 ml; chaque pot renfermant environ 60 femelles d'*An. arabiensis*. Elles ont été utilisées pour le gorgement expérimental après avoir été préalablement assoiffées 6 à 8 heures.

En 1998, le gorgement des moustiques a eu lieu dans les locaux du SLAP à Thiès. Les moustiques assoiffés ont été placés dans les pots en carton de 40 ml recouverts par une toile moustiquaire et rangés dans une caisse isolante en présence de serviettes mouillées afin de maintenir un taux d'hygrométrie élevé. Le nombre de moustiques par pot a été de 40. Le transport des moustiques entre Dakar et Thiès s'est effectué dans une cabine de voiture à air conditionné à environ 25 °C. La température à l'intérieur de la caisse a été enregistrée à l'aide d'un thermomètre à mercure à l'ouverture de la caisse à Thiès (aller) et à Dakar (retour).

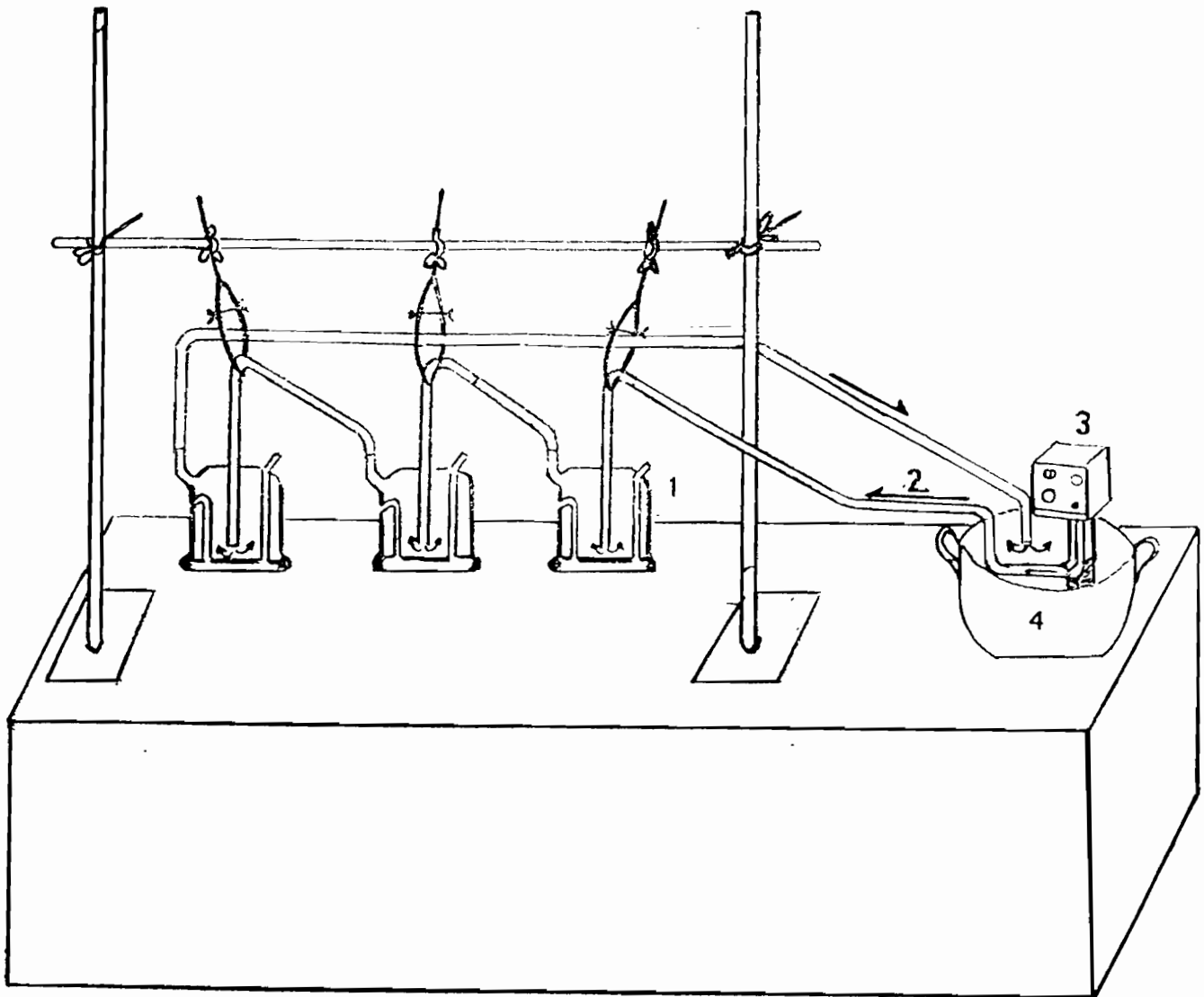


Figure 3. 1. Dispositif expérimental du gorgement des moustiques à travers une membrane artificielle (1- cellule de gorgement; 2- sens de circulation de l'eau; 3- thermoplongeur; 4- bassine contenant de l'eau thermostatée à 37°C)



- La conservation des moustiques gorgés: à la fin du gorgement, tous les moustiques contenus dans les pots ont été libérés dans une cage. Les femelles gorgées en 1996-1997 ont été conservées dans les cages moustiquaires de 20x20x20 cm à 27-28 °C et 70-80% d'humidité relative à l'insectarium de Bel-Air. Une solution sucrée à 20% quotidiennement renouvelée a été mise à leur disposition à travers un papier filtre jusqu'à la dissection.

Pour les gorgements effectués à Thiès, les pots de moustique ont été replacés dans la caisse de transport après le gorgement et les moustiques gorgés ont été triés à l'arrivée à l'insectarium de Dakar. Contrairement à 1996-1997, les moustiques gorgés en 1998 ont été conservés dans des pots en carton avec une densité de 10 à 15 moustiques par pot. Un coton imbibé d'eau sucrée à 20% a été quotidiennement mis à la disposition des moustiques jusqu'à la dissection.

Aucun repas de sang supplémentaire n'a été proposé aux femelles entre le gorgement et leur dissection.

#### d. Dissection et recherche des formes oocystes

Les moustiques survivants ont souvent été disséqués 7 jours après le gorgement avec du sang renfermant des gamétocytes *P. falciparum*. Cependant, une dissection a été instituée à J3 du gorgement en 1997 pour la détection des jeunes oocystes de *P. falciparum*.

Les femelles ont été préalablement endormies au chloroforme avant d'être disséquées sous une loupe binoculaire (grossissement 120). L'extraction de l'estomac et des organes annexes a été effectuée à l'aide d'une aiguille au niveau des segments terminaux VII et VIII de l'abdomen du moustique (figures 3. 2. A et B). Après son isolement des autres éléments, l'estomac a été traité différemment suivant les cas pour la recherche des oocystes.

- Détection des jeunes oocystes par immunofluorescence: elle a été effectuée 3 jours après le gorgement des moustiques avec le sang des porteurs recrutés en 1997 à Dakar. Un tiers des femelles survivantes de chaque lot a été prélevé des cages à l'aide d'un aspirateur à bouche et endormi avec la vapeur du chloroforme. Les moustiques ont été disséqués dans une goutte d'eau du robinet. Chaque estomac a ensuite été placé pendant 1 à 2 minutes dans 10 µl d'eau distillée pour permettre la lyse du contenu stomacal. Une fois retiré de l'eau distillée, l'estomac a été recouvert avec 10 µl d'anticorps FITC-25 à l'aide d'une pipette Gilson® avant d'être incubé pendant 20 minutes à température ambiante dans un environnement humide et obscur.

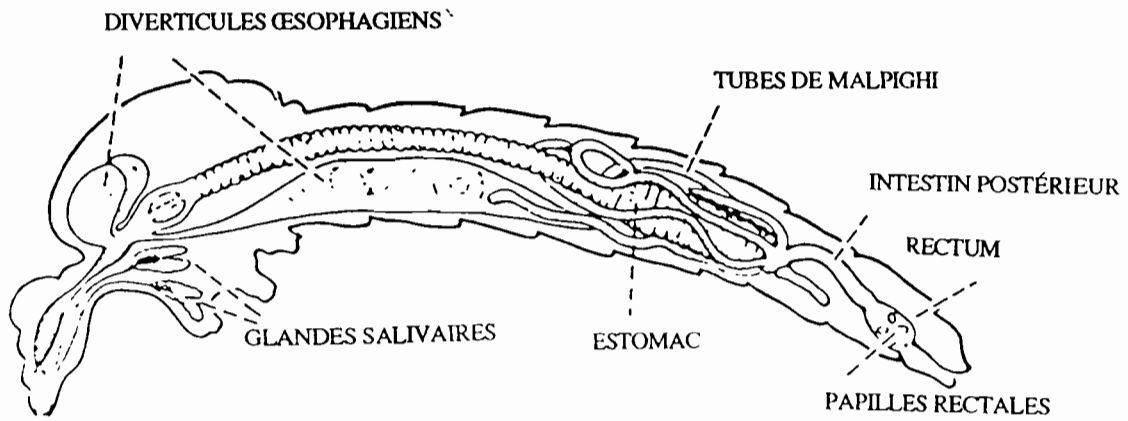


Figure 3. 2. A- Schéma d'une coupe latérale de moustique montrant l'emplacement de l'estomac avec les organes annexes à l'exclusion des ovaires.

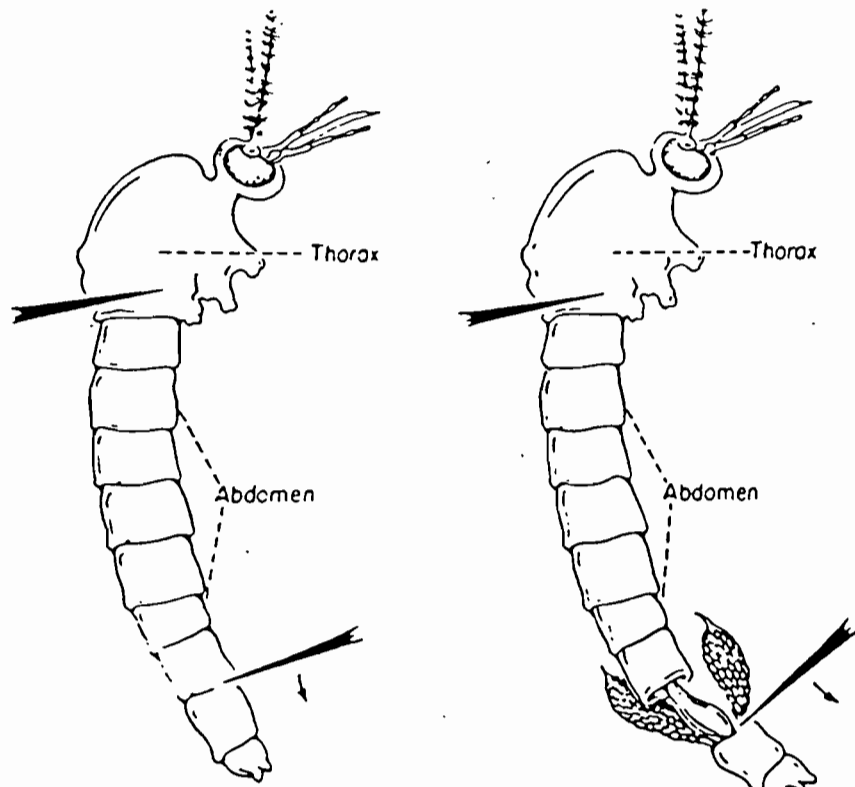


Figure 3. 2. B- Procédé de dissection pour l'isolement de l'estomac, étape préliminaire pour la recherche des oocystes.

Après l'incubation, chaque estomac a été lavé avec précaution dans 10  $\mu$ l de tampon PBS avant d'être monté dans une goutte de tampon PBS entre lame et lamelle. Une couche de vaseline a été préalablement appliquée sur les bords de la lamelle pour éviter le séchage rapide de la préparation. Avant la lecture, les préparations ont été placées à l'abri de la lumière dans une boîte fermée. Les estomacs ont ensuite été examinés au microscope optique (grossissement 500) sous une lumière fluorescence obtenue à partir d'un Kit (Becton Dickinson®). La détection de l'antigène Pfs25 à la surface des jeunes oocystes par l'anticorps se traduit au microscope par une fluorescence de couleur verdâtre. Le nombre d'oocystes dans chaque estomac a ainsi été dénombré (voir fiche<sup>2</sup>).

- Recherche des oocystes prématures: les oocystes prématures de *P. falciparum* ont été recherchés chaque fois de 1996 à 1998 dans les estomacs 7 jours après le gorgement des moustiques avec du sang renfermant des gamétocytes de *P. falciparum* (1996 à 1998). Tous les moustiques survivants ont été disséqués et les estomacs ont été placés dans une goutte de mercurochrome à 1%. Le nombre d'oocystes a été dénombré au microscope optique au grossissement 400.

### 3. 2. 5. Traitement et analyse statistique des données

Les résultats globaux ont été présentés sous forme d'effectif, de pourcentage ou de moyennes arithmétique et géométrique. Dans certains cas la moyenne arithmétique a été exprimée avec un écartype:  $m \pm$  écartype. L'analyse des données a été effectuée avec le logiciel EXCEL 4.0.

Le test du  $\chi^2$  (standard, apparié ou corrigé de Yates) a été utilisé au risque de 5% pour comparer les effectifs de deux distributions (taille de l'échantillon  $\geq 30$ ); et le test exact de Fisher pour les petits échantillons.

Le test t de Student a été utilisé pour comparer les moyennes de deux échantillons de taille  $N \geq 20$  individus, et le test de l'écart réduit  $\epsilon$  pour les échantillons de très grande taille ( $\geq 30$ ).

Les tests non paramétriques U de Mann & Whitney et de Wilcoxon ont été utilisés pour comparer les moyennes entre deux échantillons de petite taille ( $N < 20$ ); le test U a été utilisé pour les comparaisons non appariées et le test de Wilcoxon pour les cas appariés.

Les relations entre deux variables ont été calculées à partir du coefficient de corrélation r de Spearman.

---

2 - voir fiche en annexe page 140.

### 3. 3. Résultats

#### 3. 3. 1. Les accès palustres à *Plasmodium falciparum* à Dakar

De 1996 à 1997, au total 1583 gouttes épaisses ont été examinées entre Septembre et Décembre au niveau des dispensaires des soeurs de Derklé, Centenaire et Pikine.

La morbidité palustre a été évaluée par goutte épaisse à partir de 888 patients de la région de Dakar, dont 441 hommes et 447 femmes. La répartition des patients examinés a été de 249 (28,0%) patients recrutés au niveau de la commune de Dakar et 639 (72,0%) à Pikine.

L'indice plasmodique a été de 24,1% et 60,7% respectivement à Dakar (Derklé + centenaire) et Pikine. *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium malariae* ont été les seules espèces rencontrées avec une prévalence de 99,0% et 1,0%. L'âge des porteurs de *P. falciparum* a varié entre 2 semaines et 83 ans.

*P. falciparum* a été responsable de 50% (444/884) des accès fébriles parmi les malades consultant entre Septembre et Décembre au niveau des dispensaires de la région de Dakar. La prévalence de *P. falciparum* a été significativement plus élevée à Pikine qu'à Dakar (tableau 3. 1.: 60% vs. 24%,  $p < 0,001$  par le test de  $\chi^2$ ). La prévalence a significativement augmenté de 19% chez les moins de 5 ans à 45%, 65% et 55% respectivement chez les 5-9 ans, les 10-15 ans et les plus de 15 ans (tableau 3. 2.:  $p < 10^{-3}$  par le test du  $\chi^2$ ); la prévalence en fonction de l'âge a varié de la même façon chez les consultants à Dakar et chez ceux de Pikine (figure 3. 3.).

Les fortes densités parasitaires ont été rares chez les moins de 5 ans (figure 3. 4.), même si l'âge des patients n'a pas influencé de manière significative la parasitémie ( $p > 0,05$  par le test du  $\chi^2$ ). Environ 30% des porteurs de *P. falciparum* ont présenté une densité parasitaire supérieure à 10 parasites/champ microscopique, surtout chez les 5-9 ans (42,4%), 10-15 ans (41,9%) et plus de 15 ans (26,3%).

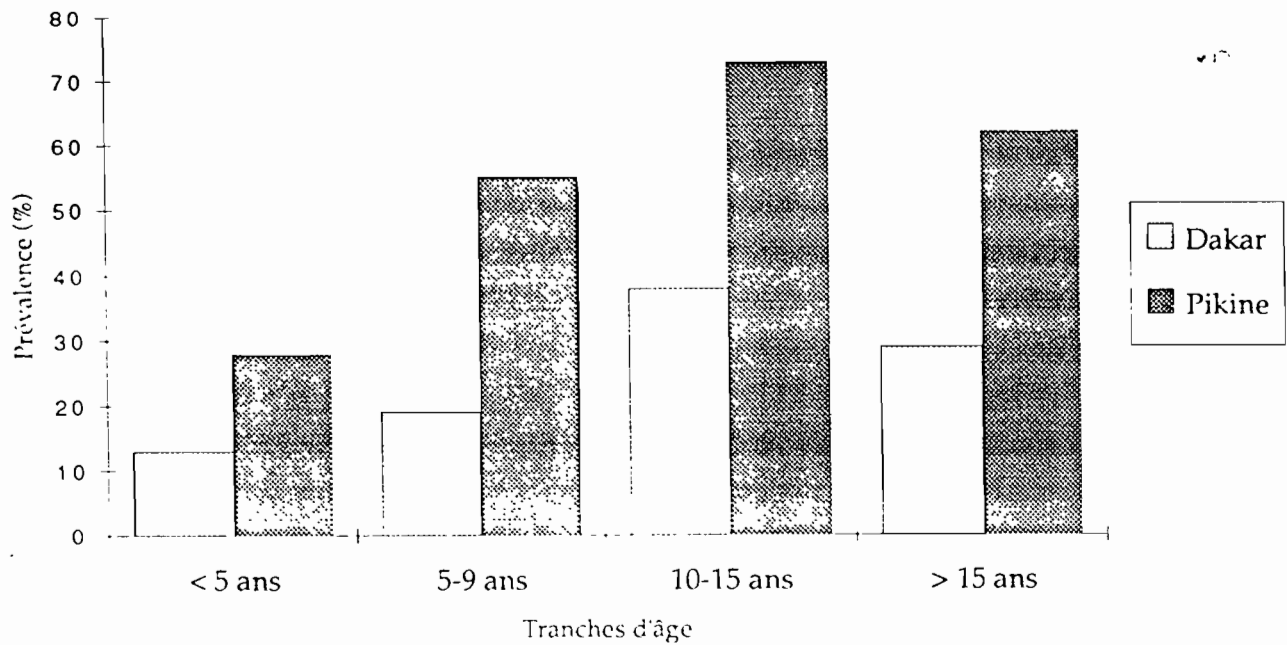
C'est parmi les patients regroupés selon ces tranches d'âge que les accès palustres simples à *P. falciparum* ont été recrutés pour les tests de chimiosensibilité.

	nombre de gouttes épaisses examinées	nombre de gouttes épaisses positives	Prévalence
Dispensaires de Dakar	248	60	24,2%
Dispensaire de Pikine	636	384	60,3%

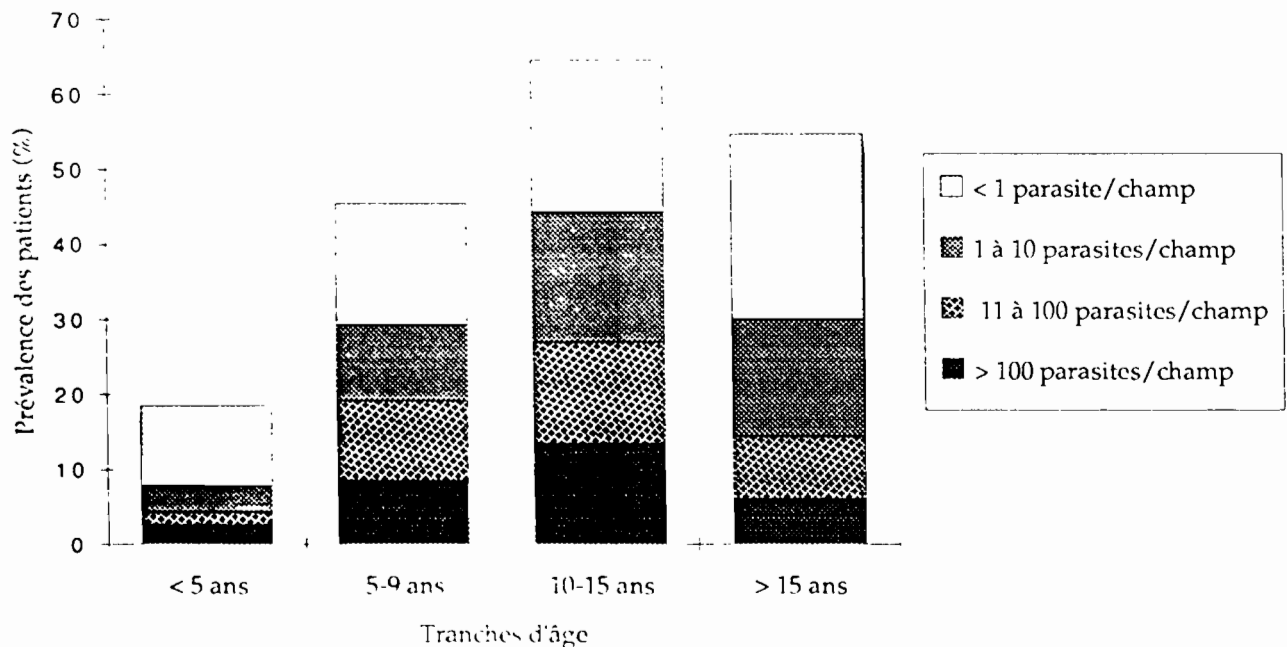
**Tableau 3. 1.** Prévalence des accès palustres simples à *Plasmodium falciparum* recensés en Décembre 1996 et Septembre 1997 à Dakar (Derklé et centenaire) et de Octobre à Décembre 1997 à Pikine.

	< 5 ans	5-9 ans	10-15 ans	> 15 ans	Total
nombre de gouttes épaisses examinées	113	131	132	508	884
nombre de gouttes épaisses positives	21	59	86	278	444
Prévalence	18,6%	45,4%	64,7%	54,7%	50,2%

**Tableau 3. 2.** Répartition des accès simples à *Plasmodium falciparum* en fonction de l'âge recensés entre Septembre et Décembre (1996-1997) dans les centres de santé privés de la région de Dakar.



**Figure 3. 3.** Prévalence des accès palustres simples à *Plasmodium falciparum* en fonction de l'âge des consultants dans les centres de santé de la région de Dakar en 1996-1997 (Septembre-Décembre).



**Figure 3. 4.** Prévalences relatives des densités parasitaires de *Plasmodium falciparum* en fonction de l'âge des patients dépistés par goutte épaisse dans les centres de santé de la région de Dakar en 1996-1997 (Septembre-Décembre)

### 3. 3. 2. Chimiosensibilité de *Plasmodium falciparum* à Dakar

#### a. Sensibilité *in vivo*

Au total 129 patients présentant un accès palustre simple à *P. falciparum* ont reçu à J0 un traitement antipaludique. La chloroquine a été administrée à la dose totale de 25 mg/kg chez 95 patients recrutés en Septembre-Décembre 1996 et Septembre-Octobre 1997; et le Fansidar en prise unique (25 mg/kg de sulfadoxine+1,25 mg/kg de pyriméthamine) chez 34 patients recrutés de Novembre à Décembre 1997.

Parmi les patients recrutés, 120 ont été régulièrement suivis pendant au moins 28 jours après la prise du traitement, neuf personnes (7,0%) ayant quitté précocement l'étude. Le voyage, la prise d'autres antipaludiques pendant la période du suivi et la réticence à poursuivre le suivi ont constitué l'essentiel des raisons d'exclusion de l'étude.

Au cours du suivi parasitoclinique des accès palustres traités, le critère de sensibilité a été constitué par l'absence prolongée de stades asexués (trophozoïtes) de *P. falciparum* dans les prélèvements sanguins (G.E.). En effet lorsque la disparition des stades asexués de *P. falciparum* a été effective jusqu'au 28ème jour, la souche de *P. falciparum* a été considérée comme sensible à l'antipaludique. Par contre, la résurgence ou la persistance de la parasitémie au niveau de la goutte épaisse ont été considérées comme dues à une résistance du parasite vis à vis de l'antipaludique. Les différents niveaux de résistance ont été définis selon la nomenclature classique R1, R2, et R3.

- Avec la chloroquine (= CQ): la CQ a été testée *in vivo* chez 86 cas d'accès palustres simples à *P. falciparum* après un suivi parasitologique et clinique d'au moins 28 jours après la prise du traitement. L'âge moyen ( $\pm$ écartype) des volontaires a été de 19,5 $\pm$ 8,9 ans (entre 5 et 45 ans), et la parasitémie moyenne a été de 53840 parasites / $\mu$ l de sang (extrêmes: 1280 et 308 800).

La prévalence des patients présentant une résistance parasitaire après le traitement par la CQ a été de 54,7% (47/86). Les prévalences de niveaux R1, R2 et R3 ont été respectivement de 39,5% (34/86), 12,8% (11/86) et 2,3% (2/86).

La prévalence des infections résistantes à la CQ a été significativement plus élevée chez les 10-15 ans (76,2%) et les 5-9 ans (63,6%) que chez les adultes (> 15 ans: 44,4%;  $p < 0,05$  par le test du  $\chi^2$ : tableau 3. 3.).

	Sensibles	Résistants				
		R1	R2	R3	total	
<b>Age</b>						
5-9 ans	4 (4,7%)	4	3	0	7 (8,1%)	
10-15 ans	5 (5,8%)	11	4	1	16 (18,6%)	
> 15 ans	30 (34,9%)	19	4	1	24 (27,9%)	
<b>Parasitémie</b> (nbre de parasites par µl de sang)						
500-5 000	2 (2,3%)	4	0	0	4 (4,7%)	
5 001-50 000	23 (26,7%)	18	8	2	28 (32,6%)	
> 50 000	14 (16,3%)	12	3	0	15 (17,4%)	
<b>Groupe sanguin</b> [six (6) non déterminés]						
A	7 (8,7%)	11	3	0	14 (17,5%)	
B	8 (10,0%)	7	2	0	9 (11,3%)	
AB	1 (1,2%)	1	0	1	2 (2,5%)	
O	22 (27,2%)	13	3	1	17 (21,3%)	
<b>Domicile</b>						
Dakar-ville	18 (20,9%)	12	6	1	19 (22,1%)	
Pikine & autres	21 (24,4%)	22	5	1	28 (32,6%)	
<b>Sexe</b>						
hommes	21 (24,4%)	19	5	1	25 (29,1%)	
femmes	18 (20,9%)	15	6	1	22 (25,6%)	
<b>Total</b>	<b>39 (45,3%)</b>	<b>34</b>	<b>11</b>	<b>2</b>	<b>47 (54,7%)</b>	

**Tableau 3. 3.** Répartition des accès palustres simples à *P. falciparum* traités à la chloroquine (= CQ: 25 mg/kg en 3 prises) en Septembre-Décembre 1996 et Septembre-Octobre 1997.



La parasitémie, le groupe sanguin et le sexe des malades n'ont pas influé de manière significative la distribution des souches résistantes ou sensibles de *P. falciparum*. La prévalence des infections CQ-résistantes a été de 51,3% chez les résidents de Dakar et 57,1% chez les résidents de Pikine et autres banlieues de Dakar ( $p=0,66$  par le test exact de Fisher); par conséquent la résistance parasitaire n'a pas varié de façon significative en fonction du lieu probable de l'infection (domicile) du patient par une piqûre infectante d'anophèle.

Tous les cas chloroquinorésistants ( $n=47$ ) ont reçu un traitement supplémentaire à l'halofantrine dès que la résistance parasitaire a été constatée. Tous les résistants *in vivo* à la CQ ont été guéris par l'halofantrine avec disparition totale de la parasitémie au niveau de la goutte épaisse 7 jours après le traitement, et persistance de cette négativation 14 jours après.

- Avec la sulfadoxine-pyriméthamine (= SP): la SP (Fansidar®) a été testée *in vivo* chez 34 patients en accès palustre simple à *P. falciparum*, recrutés à Pikine. L'âge moyen ( $\pm$ écartype) des malades a été de  $20,8 \pm 7,0$  ans (extrêmes: 13 et 38 ans). La parasitémie au moment du traitement a été en moyenne de 39680 trophozoïtes/ $\mu$ l de sang (extrêmes: 400 et 222 000).

La sensibilité à la SP a été de 100 %. Tous les patients ont ainsi été guéris avec la dose administrée et aucune résurgence parasitaire n'a été observée au niveau des gouttes épaisses entre le 4ème et le 28ème jour suivant le traitement.

#### b. Tests de sensibilité *in vitro*

La chloroquine (= CQ) et l'halofantrine (= HF) ont été testées *in vitro* sur les souches de *P. falciparum* prélevées avant le traitement chez les patients en accès palustre. Ces isolats ont été mis en présence de doses croissantes de ces trois antipaludiques. Le rapport de concentration entre deux dilutions a été de 1/2. La sensibilité du parasite a été quantifiée sur la base du nombre d'incorporations du marqueur radioactif (hypoxantine tritiée) exprimé par le compteur de l'activité radioactive en nombre de coups par minute (cpm). Les incorporations ont été exprimées par une moyenne obtenues à partir de deux mesures faites pour chaque concentration. Les isolats (5/30) révélant un nombre d'incorporations anormalement bas ( $< 1000$  cpm) pour une concentration en antipaludique nulle n'ont pas été prises en compte dans l'analyse des résultats.

Au total 25 isolats de *P. falciparum* ont été testés *in vitro* sur la base des concentrations-seuil ( $CI_{50}$ ) inférieures à 100 nM/l et 30 nM/l respectivement avec CQ et HF.

La résistance *in vitro* des souches de *P. falciparum* de Dakar a été de 16% avec HF et 40% avec CQ (tableau 3. 4.). *P. falciparum* a été sensible aux concentrations (CI<sub>50</sub>) moyennes ( $\pm$ écartype) de  $24\pm 29$  nmoles/l et  $65\pm 34$  nmoles/l respectivement avec HF et CQ. La sensibilité de *P. falciparum in vitro* a été comparable entre CQ et HF (tableau 3. 5.:  $p=0,11$  par le test exact de Fisher).

Les deux méthodes de détermination de la sensibilité ont été comparées avec la CQ chez 18 malades (tableau 3. 6.). La prévalence de la chloroquinorésistance de *P. falciparum* à Dakar a été comparable *in vivo* et *in vitro* (56% vs. 39%:  $p=0,34$  par le test exact de Fisher).

### 3. 3. 3. Résistance parasitaire et échec thérapeutique

A l'inclusion (J0), les températures corporelles  $>$  à  $39,5$  °C ont concerné 10% (9/86) des malades. Elles ont été plus fréquemment observées avec les infections sensibles qu'avec les résistantes ( $p\approx 0,01$  par le test de Fisher). Les parasitémies  $>$  à  $100\ 000/\mu\text{l}$  ont concerné 17% (15/86) des patients. Elles n'ont pas varié entre les sensibles et résistants ( $p\approx 0,78$  par le test de Fisher). Par ailleurs, la température corporelle a inversement varié suivant une relation linéaire en fonction de la parasitémie chez les patients résistants à la CQ ( $r=0,76$ ;  $p\approx 0,001$ ). Mais cette relation n'a pas été significative chez les patients sensibles ( $r=0,64$ ;  $p\approx 0,06$ ).

La notion d'échec thérapeutique pour le paludisme est définie comme la persistance ou la réapparition des signes cliniques (fièvre, céphalées, etc.) en présence d'une parasitémie 48 à 72 heures au moins après le traitement. L'hyperthermie et la présence des céphalées ont été enregistrés chez les patients en accès palustre sensibles ou résistants à la chloroquine. Les patients avec des stades asexués dans la goutte épaisse et une température corporelle  $\geq 37,5$ °C associée ou non à des céphalées entre J4 et J28, ont été considérés comme présentant un échec clinique (tardif) à la CQ.

La prévalence des patients avec une persistance parasitaire et une hyperthermie après le traitement par la CQ a été de 65% (30/46). Le pourcentage des patients résistants avec céphalées a été de 48% (22/46), dont 77% associés à une hyperthermie. La température corporelle à J0 a été en moyenne ( $\pm$ écartype) de  $37,8\pm 1,1$ °C (extrêmes: 36,3 et 40,4 °C). Elle n'a pas significativement varié entre les patients présentant un échec parasitoclinique et ceux qui ont été complètement guéris entre J4 et J28 ( $p=0,23$  par le test t).

L'hyperthermie a été associée à la résurgence parasitaire dans 54% (25/46) des cas; avec une augmentation de la température corporelle de  $+1,7$  °C par rapport aux résistants asymptomatiques. Elle a été aussi plus fréquemment rencontrée chez les R2+R3 que chez les R1 (86% vs. 56%).

	chloroquine	halofantrine
Sensibles	15 (60%)	21 (84%)
Résistants	10 (40%)	4 (16%)

Tableau 3. 4. Chimiosensibilité *in vitro* des souches de *P. falciparum* isolées chez les malades en accès palustres en Septembre-Décembre 1997 dans la région de Dakar.

*in vitro*  
(CQ vs Halofantrine)

		halofantrine		
		S	R	total
CQ	S	12	3	15
	R	9	1	10
total		21	4	25

Tableau 3. 5. Comparaison de la sensibilité *in vitro* des isolats de *P. falciparum* de la région de Dakar entre la chloroquine et l'halofantrine en 1997 (sensibles: S; résistants: R).

(CQ *in vitro* vs CQ *in vivo*)

		<i>in vitro</i>		
		S	R	total
<i>in vivo</i>	S	7	1	8
	R	4	6	10
total		11	7	18

Tableau 3. 6. Comparaison de la sensibilité de *P. falciparum* à la chloroquine chez les patients de la région de Dakar en 1997 (sensibles: S; résistants: R).

	CQ	Q	SP	total
Effectif	9	28	3	40
Nombre de cas avec une résistance parasitaire post- traitement	3 (33,3%)	6 (21,4%)	0 (0%)	9 (22,5%)

**Tableau 3. 7.** Echecs thérapeutiques observés entre J7 et J30 après un traitement antipaludique chez des porteurs de gamétocytes de *Plasmodium falciparum* recrutés en Septembre-Décembre 1998 à Thiès.

La température corporelle a varié entre 36,2 et 40,3 °C. Elle a montré une évolution comparable aussi bien en présence d'une parasitémie qu'en absence de celle-ci ( $r=0,81$ ,  $p\approx 0,02$ ). Cependant une diminution de  $-0,8$  °C a en moyenne été observée 48 heures après la prise du traitement.

### 3. 3. 4. Echecs thérapeutiques et parasitémie après le traitement à Thiès

Au total 68% (41/60) des volontaires recrutés à Thiès ont déclaré un accès palustre traité au moins 7 jours avant leur inclusion dans le protocole; dont 3 à base de SP (3 comprimés en prise unique), 9 à base de CQ (25 mg/kg/ jour en 3 jours ) et 28 à base de Q (Paluject<sup>®</sup> sous la forme d'ampoules de 2 ml ou 4 ml dosées respectivement à 200 et 400 mg de sels de quinine). Le Paluject a été administré pendant 3 jours consécutifs sur la base de 2 ampoules de 2 ml par jour (matin et soir) pour les enfants (< 15 ans) et 2 ampoules de 4 ml par jour (matin et soir) pour les adultes, soit à une dose totale respective de 1200 mg et 2400 mg.

Le délai maximum entre le traitement et l'inclusion des patients dans le protocole a été de 30 jours. Un seul patient ayant déclaré avoir pris de l'amodiaquine deux jours avant son inclusion dans le protocole n'a pas été pris en compte dans cette analyse. Les patients avec une parasitémie à plus de 100 parasites par  $\mu$ l persistant dans un délai d'au moins 7 jours après le traitement ont été considérés comme présentant une résistance parasitaire au traitement.

L'analyse a porté sur un total de 39 patients dont respectivement 3, 8 et 28 ont été traités avec la SP, la CQ et la Q. Le délai entre le traitement et le prélèvement de la goutte épaisse a varié entre 8 et 30 jours. L'âge moyen des patients traités a été de 19,3 ans (entre 7 et 48 ans).

La prévalence des porteurs de parasites asexués a été de 21,4% entre J7 et J30 après le traitement par la Q et de 33,3% entre J7 et J15 après le traitement par la CQ (tableau 3. 7.:  $p=0,67$  par le test exact de Fisher); avec respectivement une parasitémie moyenne de 5226 (extrêmes: 320 et 13040) et 7440 parasites par  $\mu$ l de sang (extrêmes: 4800 et 12080). Toutes les gouttes épaisses prélevées chez les patients traités par la SP ont été négatives entre J7 et J30 après le traitement.

Par ailleurs le délai moyen ( $\pm$ écartype) entre le traitement et l'inclusion des patients avec une parasitémie a été de  $27,5\pm 6,1$  jours avec la Q et  $18,3\pm 10,4$  jours avec la CQ ( $p>0,05$  par le test U de Mann & Whitney).

### 3. 3. 5. Evolution de la gamétocytémie après le traitement

#### a. Chez les résidents de Dakar

La prévalence des porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* entre J2 et J28 après le traitement a été de 77% et 100% respectivement avec CQ et SP (tableau 3. 8.). Elle a varié de 54% chez les personnes CQ sensibles à 96% chez les CQ résistants ( $p < 10^{-3}$  par le test du  $\chi^2$ ).

L'évolution de la gamétocytémie après le traitement a varié suivant un mode unimodal quelque soit l'antipaludique utilisé (CQ ou SP, figure 3. 5.). La densité gamétocytaire maximale a été observée 7 jours après la prise du traitement; avec une moyenne de 100 avec la CQ et de 200 gamétocytes par  $\mu\text{l}$  de sang avec la SP. Elle a varié proportionnellement en fonction de la sensibilité du parasite au traitement. La gamétocytémie a été respectivement plus élevée chez les sujets sensibles à SP et CQ résistants R2+R3 que chez les R1 et les sujets sensibles à la chloroquine.

Nous avons distingué parmi les porteurs de gamétocytes après le traitement: (1) ceux qui avaient déjà des gamétocytes avant le traitement et (2) ceux qui ne présentaient aucune gamétocytémie avant le traitement. La gamétocytémie survenue après le traitement avec la CQ a été significativement plus élevée chez les premiers que chez les seconds ( $r=0,47$ ,  $p=0,31$ ). Avec la SP, l'évolution de la gamétocytémie entre J2 et J28 a été comparable entre les deux groupes ( $r=0,93$ ,  $p < 10^{-3}$ ).

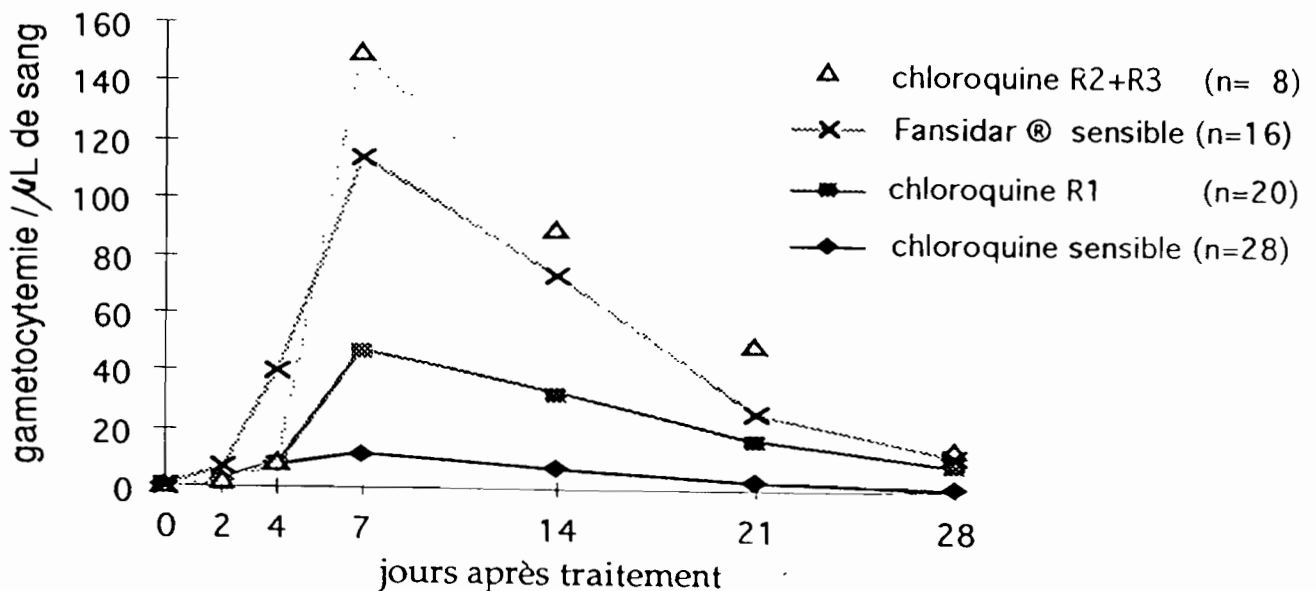
#### b. Chez les résidents de Thiès

Le nombre moyen de gamétocytes par  $\mu\text{l}$  de sang a été de 628 (extrêmes: 6 et 5800) chez 40 patients en accès palustres à *P. falciparum* traités à Thiès avec la CQ, la SP ou la quinine (=Q); au maximum dans un délai de 15 jours avant la consultation.

La gamétocytémie moyenne des patients a significativement varié en fonction du traitement de 51 gamétocytes par  $\mu\text{l}$  de sang avec la CQ à 476 et 827 gamétocytes par  $\mu\text{l}$  de sang respectivement avec la SP (figure 3. 6.; SP vs. CQ:  $p < 0,01$  par le test U de Mann & Whitney) et la quinine (Q vs. CQ: par le test U de Mann & Whitney). La gamétocytémie après le traitement a été statistiquement comparable entre la SP et la Q (SP vs. Q:  $p=0,30$  par le test t).

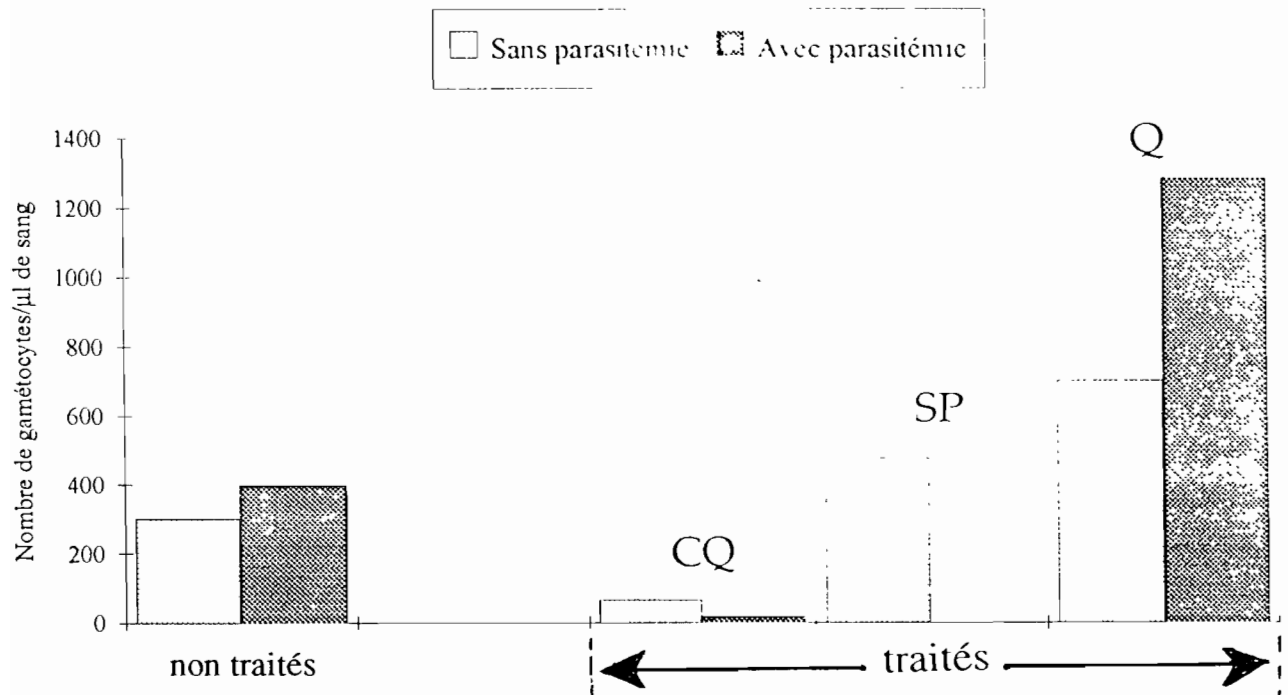
		effectif	moyenne du nombre de trophozoïtes/100 leucocytes à J0 (min-max)	Prévalence gamétocytaire post-traitement (entre J2 et J28)	
chloroquine	Sensibles	39 (45,3%)	694 (43-3860)	53,8%	
	Résistants	R1	34 (39,6%)	705 (16-2231)	93,9%
		R2+R3	13 (15,1%)	535 (120-1023)	100%
sulfadoxine- pyriméthamine (Fansidar®)	Sensibles	34 (100%)	496 (10-2773)	100%	

**Tableau 3.8** . Prévalence des porteurs de gamétocytes de *Plasmodium falciparum* chez les patients en accès palustre simple traités avec un antipaludique à Dakar en Septembre-Décembre (1996-1997).



**Figure 3.5.** Evolution de la gamétocytémie moyenne de *Plasmodium falciparum* chez les patients en accès palustre simple (sans gamétocytes à J0) traités par la chloroquine ou la sulfadoxine-pyriméthamine (Fansidar).





**Figures 3. 6.** Gamétoctémie de *Plasmodium falciparum* en présence ou non de parasitémie chez les sujets non traités (n=12+7) et après le traitement par la chloroquine (CQ: n=4+2), la sulfadoxine-pyriméthamine (SP: n=3+0) et la quinine (Q: n=22+6) des patients en accès palustres à Thiès.

Chez les patients non traités (n=19), la gamétocytémie moyenne a été de 339.

La gamétocytémie a significativement diminué entre les personnes non traitées et les personnes traitées avec la CQ ( $p < 0,01$  par le test U de Mann & Whitney). Par contre, la gamétocytémie a été plus élevée chez les personnes traitées que chez les non traitées, aussi bien avec la SP ( $p < 0,05$  par le test U de Mann & Whitney) que la quinine ( $p < 0,01$  par le test U de Mann & Whitney).

Par ailleurs, la gamétocytémie a été significativement plus élevée en présence de parasitémie qu'en l'absence de celle-ci chez les volontaires non traités (397 vs. 304:  $p < 0,01$  par le test U de Mann & Whitney); alors qu'elle a été comparable entre ces deux groupes après le traitement (968 vs. 934:  $p \approx 0,96$  par le test t).

### 3. 3. 6. Xénodiagnostic et infections de moustique avant le traitement

Les infections de moustiques ont été tentées avant le traitement chez les personnes recrutées à Dakar (n=43) pour les tests de chimiosensibilité; et à Thiès avec les porteurs de gamétocytes (n=19) n'ayant reçu aucun traitement antipaludique dans un délai de 15 jours au moins précédant le gorgement de moustiques.

Le nombre de gamétocytes de *P. falciparum* par  $\mu\text{l}$  de sang a été en moyenne de 54 (extrêmes: 1 et 492) chez les recrues de Dakar et 339 (extrêmes: 16 et 1183) chez ceux de Thiès. Avec les patients de Dakar, le délai entre les premiers signes cliniques et la consultation (prise du traitement) a été en moyenne plus long chez les malades avec des gamétocytes à J0 que chez les malades sans gamétocytes à J0 ( $p < 0,02$  par le test t), respectivement 8,1 jours (extrêmes: 2 et 38 jours) et 3,7 jours (extrêmes: 1 et 15 jours). Ce délai a été déduit à partir du questionnaire<sup>3</sup> sur lequel les informations relatives à l'histoire de la maladie et indiquées par les malades ont été inscrites.

L'évaluation de l'infection des moustiques à partir des porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* a été effectuée sur la base de l'examen d'au moins neuf estomacs de moustiques survivants.

---

3 - voir fiche en annexe page 139.

### a. Le xénodiagnostic

Il a consisté à évaluer la sensibilité de la méthode de détermination de la gamétocytémie sur la goutte épaisse, en gorgeant les moustiques avec le sang des patients présentant une gamétocytémie nulle par la goutte épaisse (n=55).

Un seul moustique (sur 11 examinés) a été trouvé positif avec un oocyste sept jours après le gorgement à partir d'un patient. En d'autres termes, le xénodiagnostic pratiqué en gorgeant les moustiques a été plus sensible que la goutte épaisse pour évaluer la gamétocytémie dans 2% des cas négatifs en goutte épaisse; mais la différence n'a pas été significative ( $p=0,25$  par le test apparié du  $\chi^2$ ).

### b. Rendement au stade oocyste des infections d'*Anopheles arabiensis*

- Avec les porteurs recrutés à Dakar: l'infectivité des gamétocytes de *P. falciparum* a été testée à partir des infections de moustiques effectuées avec le sang des porteurs de gamétocytes en accès palustre prélevé avant le traitement. Les oocystes ont été recherchés dans les estomacs de moustique sept jours après le gorgement (oocystes prématures) et cette recherche a concerné 26 porteurs de gamétocytes avec une gamétocytémie moyenne de 53 gamétocytes par  $\mu\text{l}$  de sang (extrêmes: 1 et 492).

La prévalence des gorgements avec au moins une femelle d'*An. arabiensis* infectée à J7 après le gorgement a été de 23% (6/26).

Le pourcentage de moustiques trouvés positifs sept jours après un gorgement infectant a été de 18,5%. Le nombre de moustiques positifs n'a pas varié suivant une relation linéaire en fonction de la gamétocytémie du porteur ( $r=0,13$ ,  $p=0,53$ ).

Le nombre moyen d'oocystes par moustique et par infection a été de 0,5 (entre 0 et 20). La moyenne géométrique du nombre d'oocystes par moustique positif a été de 2,0. La densité en oocystes par moustique n'a pas varié suivant une relation linéaire en fonction de la gamétocytémie du porteur ( $r=0,59$ ,  $p=0,18$ ).

- Avec les porteurs recrutés à Thiès: l'analyse porte sur des gorgements de moustique effectués à partir de 3 porteurs de gamétocytes n'ayant reçu aucun traitement antipalustre au cours des 30 jours qui ont précédés le prélèvement (critère d'inclusion= plus de 9 estomacs examinés / gorgement).

Deux des trois gorgements (67%) ont permis de trouver au moins un moustique positif à J7 du gorgement.

Le pourcentage de moustiques trouvés positifs sept jours après l'infection a été de 10%. Le nombre moyen d'oocystes par moustique et par infection a été de 0,5; et la moyenne géométrique du nombre d'oocystes par moustique positif a été de 4,0.

Le nombre moyen de moustiques positifs et le rendement parasitaire au stade oocyste à partir des porteurs non traités ont été comparables entre les infections de Dakar et celles de Thiès (tableau 3. 9.:  $p > 0,05$  par le test U de Mann & Whitney).

### 3. 3. 7. Infections des moustiques après le traitement

Les analyses concernent dans ce cas des infections de moustiques réalisées: (1) à Dakar avec les porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* sept jours après le traitement d'un accès palustre simple avec la CQ (n= 66) ou la SP (n=34); et (2) à Thiès à partir des porteurs ayant reçu un traitement à base de CQ ou de quinine (= Q; Paluject®) avant le gorgement (n=41).

Le critère d'inclusion dans l'analyse a été comme précédemment un nombre minimum d'estomacs examinés par gorgement égal à 9. Les oocystes ont été recherchés dans les estomacs de femelles d'*An. arabiensis* à deux stades de leur développement, aux 3ème (pour les jeunes oocystes) et 7ème jours (pour les oocystes prématures) après le gorgement.

#### a. Rendement de l'infection au stade de jeune oocyste

La recherche par immunofluorescence des jeunes oocystes a concerné les gorgements effectués à partir de 27 porteurs de gamétocytes dont 10 traités avec CQ et 17 avec SP, tous prélevés parmi les patients de Dakar entre Septembre et Décembre 1997.

La prévalence des gorgements avec présence d'oocystes à J3 a été de 100% après le traitement avec CQ et 82% après le traitement SP (tableau 3. 10.:  $p > 0,3$  par le test du  $\chi^2$  corrigé).

Le pourcentage de moustiques positifs a varié significativement de 38% après le traitement CQ à 24% après le traitement SP ( $p < 0,01$ ; par le test du  $\chi^2$ ); Ce pourcentage a été comparable entre les CQ sensibles et les CQ résistants.

Le nombre moyen d'oocystes par moustique et par infection a été de 1,1 (entre 0 et 20) avec le traitement CQ et de 0,7 (entre 0 et 18) avec le traitement SP ( $p < 0,01$  par le test U de Mann & Whitney).

	Effectif total	Nombre de porteurs infectant à J7 du gorgement	Pourcentage de moustiques positifs	Moyenne arithmétique du nombre d'oocystes par moustique	Moyenne géométrique du nombre d'oocystes par moustique positif à J7
Dakar	26	6 (23%)	18,5%	0,5	2,0
Thiès	3	2 (67%)	10%	0,5	4,0

**Tableau 3. 9.** Rendement de l'infection d'*An. arabiensis* au stade oocyste précoce par des porteurs de gamétocytes en accès palustre simple à *P. falciparum* prélevés avant le traitement antipalustre.  
(Seuls gorgements infectant au moins 1 moustique sur 9 examinés ont été pris en compte)

		Effectif total (n)	Prévalence des porteurs infectants à J3	Pourcentage de moustiques positifs	Moyenne arithmétique du nombre d'oocystes par moustique	Moyenne géométrique du nombre d'oocystes par moustique positif à J3
CQ	Sensibles	2	100%	39%	0,8	2,0
	Résistants	8	100%	38%	1,2	3,4
SP (Fansidar®)	Sensibles	17	82%	24%	0,7	1,6

**Tableau 3. 10.** Rendement de l'infection d'*An. arabiensis* au stade jeune oocyste (à J3 du gorgement) par des porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* prélevés 7 jours après un traitement à la chloroquine (= CQ) ou à la sulfadoxine-pyriméthamine (= SP).  
(Seuls gorgements infectant au moins 1 moustique sur 9 examinés ont été pris en compte)

La moyenne géométrique du nombre d'oocystes par moustique positif a significativement varié en fonction du traitement (3,4 avec CQ vs. 1,6 avec SP:  $p < 0,01$  par le test U de Mann & Whitney); cependant elle n'a pas varié en fonction de la réponse thérapeutique (2,0 pour CQ-sensibles vs. 3,4 pour CQ-résistants:  $p > 0,05$  par le test U de Mann & Whitney).

La densité gamétocytaire du porteur n'a pas influé sur l'infection des femelles d'*An. arabiensis* au stade de jeunes oocystes aussi bien avec le traitement par la CQ ( $p=0,8$ ;  $r=0,15$ ) qu'avec la SP ( $p=0,9$ ;  $r=0,03$ ).

#### b. Rendement de l'infection au stade oocyste prémature

Il a été évalué à 7 jours après le gorgement des moustiques à partir des porteurs de gamétocytes de Dakar inclus dans le protocole de chimiosensibilité *in vivo* et ceux de Thiès consultant pour un contrôle parasitologique consécutif à un accès palustre traité.

- Avec les infections réalisées à Dakar: les moustiques ont été gorgés à travers la membrane 7 jours après le traitement à partir de 54 porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* traités avec CQ ou SP; dont 33 traités par la CQ (9 sensibles et 24 résistants) et 21 traités par la SP (tous sensibles).

La prévalence des infections à J7 du gorgement des femelles d'*An. arabiensis* a été respectivement de 52% et 38% après le traitement par la CQ et la SP (tableau 3. 11.:  $p > 0,3$  par le test du  $\chi^2$ ). Elle a été comparable entre les CQ sensibles et les CQ résistants ( $p=0,06$  par le test de Fisher).

Le pourcentage de moustiques positifs a varié significativement de 33% après le traitement CQ et 16% après le traitement SP ( $p < 10^{-3}$  par le test du  $\chi^2$ ); la différence n'a pas été significative entre les CQ sensibles et les CQ résistants (30% vs. 33%:  $p > 0,5$  par le test du  $\chi^2$ ).

Le nombre moyen d'oocystes par moustique et par infection a été de 1,7 (entre 0 et 73) pour les infections CQ et 0,4 (entre 0 et 9) pour les infections SP. La moyenne géométrique du nombre d'oocystes par moustique positif a été de 3,5 après le traitement CQ et 1,6 après le traitement SP ( $p < 0,01$  par le test U de Mann & Whitney); elle a été plus élevée pour les infections CQ résistants que pour les CQ sensibles (3,1 vs. 2,5:  $p < 0,05$  par le test U de Mann & Whitney).

		Effectif total (n)	Prévalence des porteurs infectants à J7	Pourcentage de moustiques positifs	Moyenne arithmétique du nbre d'oocystes par moustique	Moyenne géométrique du nbre d'oocystes par moustique positif à J7
CQ	Sensibles	9	22%	30%	0,8	2,5
	Résistants	24	63%	33%	1,9	3,1
SP (Fansidar <sup>®</sup> )	Sensibles	21	38%	16%	0,4	1,6

**Tableau 3. 11.** Rendement de l'infection d'*An. arabiensis* au stade oocyste prématuro (à J7 du gorgement) par des porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* prélevés 7 jours après un traitement à la chloroquine (= CQ) ou à la sulfadoxine-pyriméthamine (= SP).  
(Seuls les gorgements infectant au moins 1 moustique sur 9 examinés ont été pris en compte)

	Effectif total	Prévalence des porteurs infectants à J7	Pourcentage de moustiques positifs	Moyenne arithmétique du nbre d'oocystes par moustique	Moyenne géométrique du nbre d'oocystes par moustique positif à J7
Q (Paluject <sup>®</sup> )	13	53,8%	25,1%	7,3	8,3
CQ	6	50%	12,8%	0,2	1,3

**Tableau 3. 12.** Rendement de l'infection d'*An. arabiensis* au stade oocyste prématuro (à J7 du gorgement) par des porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* recrutés à Thiès en 1998 et ayant déclaré un traitement par la quinine (Paluject<sup>®</sup>=Q) ou à la chloroquine (= CQ) au moins 7 jours avant le gorgement.  
(Seuls les gorgements infectant au moins 1 moustique sur 9 examinés ont été pris en compte)

- Avec les infections effectuées à Thiès: l'analyse porte sur 19 porteurs de gamétocytes de *P. falciparum*; dont 6 traités par la CQ et 13 par la Q.

La prévalence des gorgements infectant au moins un moustique à travers la membrane a été de 53,8% (7/13) et 50% (3/6) respectivement après les traitements Q et CQ ( $p=0,64$  par le test exact de Fisher).

Le pourcentage de moustiques trouvés positifs à J7 du gorgement a été de 25,1% avec les infections Q ( $n=7$ ) et 12,8% avec les infections CQ ( $n=3$ ); mais la différence n'a pas été statistiquement significative (tableau 3. 12.:  $p>0,05$  par le test U de Mann et Withney).

Le nombre moyen d'oocystes par moustique et par infection a été de 7,3 (entre 0 et 252) pour les infections Q et 0,2 (entre 0 et 2) pour les infections CQ. La moyenne géométrique du nombre d'oocystes par moustique positif a été de 8,3 pour les infections Q et de 1,3 pour les infections CQ.

La comparaison entre les sujets résistants et sensibles au traitement n'a pas pu être faite, car toutes les infections sur lesquelles l'analyse a porté ont été résistantes avec la CQ. Une seule infection résistante à la Q a révélé un nombre moyen d'oocystes par moustique positif à J7 du gorgement égal à 2,8.

### 3. 3. 8. Rendement de l'infection des moustiques entre J3 et J7

Le rendement parasitaire du cycle sporogonique entre le jeune oocyste (à J3 du gorgement) et l'oocyste prémature (à J7 du gorgement) a été évalué sur la base d'un minimum de 9 estomacs examinés par porteur. Seuls les gorgements avec des moustiques trouvés positifs au moins à une des deux étapes de la recherche des formes oocystes ont été pris en compte. Les résultats ont ainsi concerné 17 porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* consécutifs à un accès palustre simple traité avec la CQ ( $n=5$ ) et la SP ( $n=12$ ).

- Parmi les souches traitées avec la CQ, une (20%) a été sensible et 4 (80%) ont montré une résistance *in vivo* au traitement. Le nombre de gamétocytes par  $\mu$ l de sang a été en moyenne de 94.

Le pourcentage de moustiques positifs a été de 33,5% à J3 et 20% à J7 ( $p=0,3$  par le test de Wilcoxon). Pour les 5 gorgements infectants, la moyenne arithmétique du nombre d'oocystes par moustique a diminué de 1,0 à J3 à 0,5 à J7 du gorgement ( $p=0,35$  par le test de Wilcoxon). De même, le nombre moyen d'oocystes par moustique positif a diminué de 2,9 à 1,7 entre J3 et J7.



- Chez les porteurs traités avec la SP (tous sensibles), le nombre de gamétocytes par  $\mu\text{l}$  de sang a été en moyenne de 216.

Le pourcentage de moustiques positifs a significativement diminué de 24,4% à J3 à 5,3% à J7 ( $p=0,006$  par le test de Wilcoxon). La moyenne arithmétique du nombre d'oocystes par moustique a varié de 0,5 à J3 à 0,14 à J7 ( $p=0,03$  par le test de Wilcoxon); et le nombre moyen d'oocystes par moustique positif a également diminué de 1,6 à 0,8 entre J3 et J7.

Le calcul rendement de l'infection a permis d'évaluer entre J3 et J7 la survie des oocystes chez les femelles survivantes d'*An. arabiensis* infectées. Le rendement a été calculé suivant le rapport: [(nombre moyen d'oocystes par moustique positif à J7 x proportion de moustiques positifs à J7) / (nombre moyen d'oocystes par moustique positif à J3 x proportion de moustiques positifs à J3)]

Le rendement a été de 0,4 avec les moustiques infectés après traitement CQ et de 0,1 avec ceux infectés après traitement SP; en d'autres termes, 4 oocystes de *P. falciparum* sur 10 présents à J3 ont survécu à J7 chez *An. arabiensis* infecté après traitement CQ contre 1 seul oocyste survivant à J7 après traitement SP. Le rendement de 0,4 obtenu pour le traitement CQ concerne en majorité (83 %) *P. falciparum* résistant à la CQ. Ce rendement ne peut donc pas être rapporté aux souches CQ sensibles.

Par ailleurs la densité gamétocytaire n'a pas significativement influé sur le rendement de l'infection des moustiques aussi bien après le traitement CQ (coefficient de corrélation  $r=0,11$ ) qu'après le traitement SP (coefficient de corrélation  $r=0,09$ ).

### 3. 3. 9. Comparaison de l'infection avant et après le traitement

Les résultats portent sur 14 porteurs de gamétocytes (13 traités par CQ et 1 traité par SP) en accès palustre à *P. falciparum* dont les gorgements de moustique avant (J0) et après (J7) le traitement ont permis d'évaluer l'infektivité des gamétocytes de *P. falciparum* (tableau 3. 13).

La prévalence des porteurs avec au moins une femelle d'*An. arabiensis* infectée à J7 du gorgement a été de 29% (4/14) avant le traitement contre 64% (9/14) après le traitement.

Le pourcentage de moustiques positifs à J7 du gorgement a varié de façon significative de 27% avant le traitement antipalustre à 41% après le traitement CQ ( $p=0,03$  par le test de Wilcoxon); et respectivement de 0 à 6% après le traitement SP.

	Avant traitement		Après traitement	
	CQ	SP	CQ	SP
Nombre d'estomacs examinés	335	20	356	29
Moyenne arithmétique du nombre de gamétocytes par µl de sang (min-max)	53 (3-193)	8 -	163 (3-1043)	16 -
Pourcentage de femelles positives	27%	0%	41%	6%
Moyenne arithmétique du nombre d'oocystes par moustique	0,8	0	2,5	0,06
Moyenne géométrique du nombre d'oocystes par moustique positif	2,4	0	4,1	1,0

**Tableau 3. 13.** Comparaison du rendement de l'infection d'*Anopheles arabiensis* par des porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* avant et après le traitement à la chloroquine (CQ, n=13 porteurs) ou à la sultadoxine-pyriméthamine (SP, n=1 porteur). (Seuls les gorgements infectant au moins 1 moustique sur 9 examinés ont été pris en compte)

Le calcul du coefficient K (Graves et *al.*, 1987) a été effectué selon la formule: [prévalence moyenne des porteurs de gamétocytes] x [pourcentage moyen de moustiques positifs par infection]. Ce coefficient représente la probabilité que possède un moustique de s'infester en prenant un repas de sang sur un membre d'une population donnée. Ainsi le coefficient K calculé sur la base de la formule ci-dessus a varié respectivement de 0,08 à 0,26 avant et après le traitement, soit une augmentation de la probabilité d'infection de moustique de facteur 3 après le traitement par la CQ.

Le nombre moyen d'oocystes à J7 du gorgement par moustique et par infection a été de 0,8 avant le traitement et 2,5 après le traitement CQ ( $p=0,04$  par le test de Wilcoxon); et respectivement de 0 et 0,06 avant et après le seul traitement SP analysé dans ce chapitre. La moyenne géométrique du nombre d'oocystes par moustique positif a significativement augmenté de 2,4 avant le traitement à 4,1 après le traitement par la CQ ( $p<0,05$  par le test U de Mann & Whitney).

### 3. 4. Discussion

La prévalence des accès simples à *Plasmodium falciparum* enregistrés entre Septembre-Décembre a été plus élevée à Pikine qu'à Dakar chez les personnes consultant dans les dispensaires privés.

Notre étude a révélé: (1) une persistance de la chloroquinorésistance de *P. falciparum* à Dakar, (2) une efficacité de la sulfadoxine-pyriméthamine sur les souches de la région de Dakar, (3) une gamétoctémie chez les malades et une infectivité pour le vecteur élevées après le traitement, en particulier avec les infections chimiorésistantes.

De nombreuses études ont aussi rapporté une augmentation de la gamétoctémie de *P. falciparum* après un traitement par la chloroquine (Shapira & Schwalbach, 1988; Hogh et al., 1995 et 1998; Boudin et al., 1996; Robert et al., 1996; Robert & Trape, 1998; Buckling et al., 1999), la sulfadoxine-pyriméthamine (Shute & Maryon, 1954; Hogh et al., 1998) et la quinine (Mackerras & Ercole, 1949). Les prévalences gamétoctaires n'ont pas varié en fonction de l'âge; ceci pourrait être une conséquence du faible niveau de prémunition des populations de Dakar et de Thiès où la période de transmission du paludisme excède rarement 4 mois. D'ailleurs Githeko et al. (1992) ont montré qu'en zone endémique, les plus fortes prévalences sont généralement observées dans la tranche d'âge la moins prémunie (enfants de moins de 10 ans); et que cette tranche d'âge constitue le principal réservoir potentiel de parasites pour les vecteurs du paludisme.

Les antimalariques tels que la pyriméthamine peuvent avoir une action négative de courte durée (1 à 2 heures) sur la gamétoctémie; et que l'infectivité des gamétoctes est rétablie entre un et dix jours après le traitement (Fairley, 1946; Mackerras & Ercole, 1947). Ainsi, les résultats des infections de moustiques au stade oocyste ont montré que les gamétoctes de *P. falciparum* sont infectants pour le moustique sept jours après le traitement. Des observations comparables ont été effectuées par Njokou et al. (1999) au Cameroun. De plus le risque d'infection des moustiques augmente après le traitement; même si Klein et al. (1991) ont observé que le rendement de l'infection des moustiques par les gamétoctes de *P. falciparum* était comparable avant le traitement et vingt et un jours après le traitement. Cette différence avec nos observations est probablement à mettre à l'actif de la densité gamétoctaire. Selon Boudin et al. (1989) la densité gamétoctaire du donneur est un facteur déterminant l'infection des moustiques. En effet la gamétoctémie a été maximale au moment de l'infection des moustiques (sept jours après le traitement) alors qu'elle a

diminué au moins de moitié après le 14<sup>ème</sup> jour, période au cours de laquelle les observations de Klein et *al.* ont été faites.

L'infectivité des porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* pour les moustiques a été plus élevée avec la quinine et la chloroquine qu'avec la sulfadoxine-pyriméthamine. Nos observations sont en accord avec celles de Hogg et *al.* (1998) en laboratoire. Ces auteurs ont enregistré une augmentation de l'infectivité des gamétocytes de *P. falciparum* et *P. berghei* pour les moustiques après le traitement par la chloroquine et, par contre une réduction de cette infectivité après le traitement par la sulfadoxine-pyriméthamine. Par ailleurs, l'infectivité des porteurs de gamétocytes pour les moustiques a augmenté pour les infections chloroquinorésistantes. Elle a été proportionnelle à la gamétocytemie après le traitement par la chloroquine. Hogg et *al.* (1998) ont montré que contrairement aux infections chloroquinorésistantes, les infections résistantes à la sulfadoxine-pyriméthamine développaient moins de gamétocytes. Ces observations suggèrent un effet inhibiteur de la sulfadoxine-pyriméthamine sur l'infection des moustiques par les porteurs de gamétocytes de *P. falciparum*, et à l'inverse une plus grande capacité des souches résistantes à la chloroquine à poursuivre leur développement chez le vecteur; ce qui pourrait expliquer le maintien à un niveau élevé de la chloroquinorésistance de *P. falciparum* dans la région de Dakar. Les premières infections chloroquinorésistantes ont été observées pour la première fois à Dakar en 1984 (Brandicourt et *al.*, 1986) et ont rapidement augmenté pour atteindre à la fin des années 1990 des prévalences de l'ordre de 47% (Trape et *al.*, 1989; Gaye et *al.*, 1991). Sokhna et *al.* (1997) ont enregistré à Pikine une prévalence de la chloroquinorésistance de 45% en 1994. Par conséquent nos observations sont en faveur d'une augmentation de la chloroquinorésistance dans la région de Dakar (55%: comparable entre les résidents de Dakar et ceux de Pikine+autres banlieues); mais une telle conclusion ne saurait être déduite directement car Sokhna et *al.* ont effectué des tests de 14 jours (contre 28 jours pour notre étude). Toutefois, si on ne considère que les résistances parasitologiques observées dans un même délai (14 jours), la prévalence est ramenée à environ 43%, donc voisine de celle observée par Sokhna et *al.* (1997). Les résistances parasitaires à la chloroquine (33%) et à la quinine (21%) relevées à Thiès ont été respectivement déduites sur un délai de 15 jours et 30 jours. Ainsi le taux élevé enregistré avec la quinine pourrait être attribué à des réinfections car 5 des 6 infections (soit 83%) **considérées comme résistantes ont déclaré avoir reçu leur traitement 30 jours** avant la nouvelle consultation. En tenant compte de son élimination rapide dans le plasma (demi-vie= 15 à 18 h) et de l'incertitude des informations recueillies chez les patients, la prévalence des infections résistantes à la quinine

pourrait ainsi concerner qu'un seul patient (4%) traité 15 jours auparavant. Ce taux est comparable à celui obtenu sur un seul mois par Gaye *et al.* (1997) à Dakar. D'une manière générale les résistances parasitaires enregistrées *in vivo* et *in vitro* au traitement par la chloroquine concordent avec les observations faites par Sokhna *et al.* (1997) à Dakar et dans les régions avoisinant Thiès (cas de Niakhar à environ 70 km par route de Thiès).

Selon Trape *et al.* (1998), la diffusion de la résistance aux antipaludiques aurait un impact sur le niveau de la mortalité palustre dans la plupart des contextes épidémiologiques rencontrés en Afrique subsaharienne. Cette situation ne serait donc pas seulement imputable à la stratégie thérapeutique comme l'ont suggéré Druilhe & Brasseur (1994), mais également à une plus grande capacité qu'ont les souches résistantes à être transmises par les vecteurs (Robert & Trape, 1998). Cette hypothèse est en accord avec nos observations relatives aux infections de moustiques obtenues à partir des porteurs de gamétocytes résistants ou sensibles au traitement antipalustre. En effet le rendement au stade oocyste des infections de moustique par *P. falciparum* a été plus élevé chez les chloroquinorésistants que chez les sensibles.

Le rendement des infections de moustique par les souches de *P. falciparum* sensibles à la quinine a été aussi élevé que celui des souches chloroquinorésistantes. Ces observations concordent avec les études antérieures (MacKerras & Ercole, 1949; Wilkinson *et al.*, 1976; Smalley, 1977; Tchuinkam *et al.*, 1993) qui ont montré que la quinine comme la chloroquine avaient peu d'effet sur l'infectivité des gamétocytes, de même que sur la sporogonie (Chutmongkonkul *et al.*, 1992). Contrairement à la pyriméthanine dont l'effet sporonticide décrit par Terzian *et al.* (1968) pourrait expliquer le faible rendement à l'infection des moustiques enregistré avec les souches de *P. falciparum* sensibles. Selon Laing (1956) et Burgess & Young (1959), cet effet sporonticide serait limité aux souches sensibles. Toutes ces observations suggèrent une efficacité des souches plasmodiales résistantes à se propager dans les régions d'endémies palustres où elles sont transmises préférentiellement par les vecteurs.

L'étude cinétique de la sporogonie de *P. falciparum* a permis d'évaluer le rendement parasite à différents stades de développement (Rosenberg & Rungsiwongse, 1991; Vaughan *et al.*, 1992 et 1994; Awono-Ambene & Robert, 1998; Robert *et al.* 1998). Le rendement parasite enregistré au stade oocyte (entre J3 et J7 du gorgement) a été plus élevé après le traitement par la chloroquine que celui observé après le traitement par la sulfadoxine-pyriméthamine; ceci confirme les observations faites précédemment sur le pouvoir sporonticide de la pyriméthamine bien que ce rendement ait été obtenu

à partir de *P. falciparum* résistant à la chloroquine et sensible à la sulfadoxine-pyriméthamine. Ces observations ont été publiées (Awono-Ambene & Robert, 1998) et les rendements obtenus ont été plus faibles que ceux de Gouagna et *al.* (1998). Cette différence réside probablement dans le fait que le contexte épidémiologique de ces deux régions n'est pas identique. Le niveau endémique plus élevé dans le cadre de l'étude de Gouagna et *al.* qu'à Dakar pourrait contribuer à augmenter la susceptibilité du vecteur à l'infection par le parasite. Par ailleurs, les infections de Gouagna et *al.* ont été réalisées avec *An. gambiae* s.s., généralement considéré comme plus susceptible à l'infection qu'*An. arabiensis* (Coluzzi, 1984).

En récapitulatif, les gamétocytes de *P. falciparum* sont fréquemment observés dans le sang des patients après le traitement d'un accès palustre simples à *P. falciparum* par la chloroquine, la sulfadoxine-pyriméthamine et la quinine. Leur capacité à poursuivre leur développement chez le moustique semble plus élevée pour les infections résistantes que pour les infections sensibles à la chloroquine. Par ailleurs l'action inhibitrice de la sulfadoxine-pyriméthamine pourrait limiter la transmission du paludisme.



## Chapitre 4.

Infections expérimentales d'*An. arabiensis* et  
comparaison entre le gorgement direct et le  
gorgement à travers une membrane



## 4. 1. Introduction

L'étude des vecteurs du paludisme en insectarium a été d'un apport non négligeable dans la connaissance de leur bioécologie (Holstein, 1952; Armstrong & Bransby-William, 1961; Gillies & DeMeillon, 1968; Foster, 1980; Desfontaines et al., 1991).

Par ailleurs l'étude des relations hôte-vecteur a originellement été basée sur des infections expérimentales directement à travers la peau des porteurs de gamétocytes (Muirhead-Thomson & Mercier, 1952; Muirhead-Thomson, 1954 et 1957). Mais depuis la mise au point d'un procédé expérimental de gorgement des moustiques par Rutledge et al. (1964), cette étude s'est beaucoup développée vers la recherche des facteurs susceptibles de bloquer la transmission du paludisme (Carter & Chen, 1976; Vermeulen et al., 1985; Kaslow et al., 1992 et 1993; Lensen et al., 1996).

Il a été démontré que les gamétocytes de *Plasmodium falciparum* atteignent leur maturité au bout de 8 à 10 jours; ils sont alors retrouvés dans la circulation sanguine périphérique (Smalley, 1976; Jensen, 1979). Mais la localisation des gamétocytes en cours de formation s'effectue dans la moelle osseuse et dans la rate. Landau et al. (1979) et Dei-Cas et al. (1980) ont observé un nombre de gamétocytes matures et infectants généralement plus élevé dans un repas de sang de moustique que dans un prélèvement sanguin de volume équivalent. Ces observations suscitent quelques interrogations sur la sensibilité des méthodes de gorgement de moustique utilisées expérimentalement pour évaluer la transmission de *P. falciparum* par son vecteur. Une étude préliminaire montrant que les anophèles se gorgent mieux sur membrane de baudruche que sur Parafilm® a guidé notre choix sur la membrane de baudruche.

Des infections expérimentales d'*An. arabiensis* ont été réalisées de Septembre à Décembre 1998 avec les porteurs de gamétocytes recrutés parmi les populations urbaine et rurale de Thiès. Elles ont permis d'évaluer l'infectivité des gamétocytes de *P. falciparum* chez le moustique selon qu'ils aient été ingérés à travers la peau ou à travers une membrane de baudruche.

## 4. 2. Matériels et Méthodes

### 4. 2. 1. Recrutement des porteurs de gamétocytes de *P. falciparum*

Les porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* ont été recrutés de Septembre à Décembre 1998, sur la base de gouttes épaisses parmi les patients consultant à Thiès pour un contrôle parasitologique consécutif à un accès palustre traité ou non traité avec un antimalarique.

Les gouttes épaisses prélevées au niveau du doigt de chaque patient ont été colorées sur place avec une solution à 6% de Giemsa diluée avec de l'eau minérale (Pierval®). La lecture a été faite au microscope optique et l'objectif à immersion (grossissement 1000). La recherche des gamétocytes de *P. falciparum* a été effectuée sur la base de l'examen d'au moins 50 champs microscopiques successifs. Seuls les porteurs âgés de plus de 5 ans ont été inclus dans le protocole, avec leur accord ou celui des parents pour les mineurs après qu'ils aient été informés du déroulement et de la finalité de l'expérimentation (cf. fiche<sup>4</sup>).

Tous les porteurs volontaires, d'une part ont été prélevés au niveau de la veine du pli du coude pour permettre le gorgement des moustiques sur membrane, d'autre part ont été utilisés pour gorger les moustiques directement à travers la peau, immédiatement après le prélèvement.

### 4. 2. 2. Collecte et préparation des moustiques avant le gorgement

Les moustiques appartenant à l'espèce *Anopheles arabiensis* ont été récoltés à l'état larvaire dans les gîtes de la région de Dakar. Les larves ont été élevées en insectarium et les conditions d'élevage ont été identiques à celles que nous avons relevés dans le chapitre 3. 2. 4.

Les femelles adultes émergées 3 jours auparavant ont été placées dans des pots en carton de 40 ml contenant chacun environ 35-40 moustiques. Le gorgement a été effectué à Thiès où les porteurs ont été recrutés. Le transport des moustiques entre Dakar et Thiès a été effectué en cabine de voiture à air conditionné à environ 25 °C. Les pots de moustiques ont été au préalable rangés dans une caisse isolante en présence de serviettes mouillées afin de maintenir un taux d'hygrométrie élevé. La température à l'intérieur de la caisse a été enregistrée (voir fiche<sup>5</sup>) à l'aide d'un thermomètre à mercure à l'ouverture de la caisse à Thiès (aller) et à Dakar (retour). Chaque porteur volontaire a successivement accepté (1) d'être prélevé pour le gorgement des moustiques à

---

4 -voir fiche en annexe page 141

5 - voir fiches en annexe page 142.

travers la membrane de baudruche et (2) de gorger directement les moustiques placés au contact de sa peau (mollets).

#### 4. 2. 3. Le gorgement expérimental des moustiques

Deux procédés de gorgement ont été testés à partir des mêmes porteurs pour le gorgement des femelles d'*An. arabiensis*: le gorgement indirect à travers la membrane de baudruche avec du sang veineux et le gorgement direct à travers la peau du volontaire.

##### a. Le gorgement à travers la membrane

Le dispositif expérimental a été présenté dans le chapitre 3. 2. 4. Le sang prélevé au niveau de la veine du pli du coude de chaque porteur a immédiatement été mélangé à un anticoagulant (héparinate de lithium) avant d'être placé dans les cellules de gorgement de 1,5 ml. Les moustiques assoiffés 6 à 8 heures avant le début du gorgement ont été ensuite mis au contact de ce sang par l'intermédiaire de la membrane et le gorgement a duré 10 minutes. Le délai entre le prélèvement de sang du porteur de gamétocytes et le début du gorgement n'a pas excédé 5 minutes. Entre deux gorgements, les membranes de baudruche ont été lavées à l'eau de robinet, traitées à l'alcool à 95°, séchées puis replacées sous la cellule. Lorsqu'elles n'ont pas été trouées accidentellement au cours des manipulations, les membranes de baudruche ont été réutilisées.

Les gorgements de moustiques ont été effectués en deux temps au cours desquels les premiers pots de moustique gorgés pendant 10 mn ont été remplacés par d'autres pots pour la même durée de gorgement; au cours de cette opération le sang contenu dans la cellule ainsi que la membrane ont été laissés tel quel.

##### b. Le gorgement direct à travers la peau

Le gorgement direct à travers la peau a été effectué immédiatement après le prélèvement de sang, en même temps que se déroulait le gorgement sur membrane. Le porteur a été installé sur un banc en face de l'enquêteur chargé de maintenir les pots de moustiques sur les deux mollets. Les moustiques ont été placés au contact des mollets droit et gauche du porteur pendant 15 minutes dans **une pièce obscure. Aucun produit (alcool, savons, etc.) susceptible de modifier l'agressivité des anophèles et/ou l'infectivité des gamétocytes n'a été appliqué sur les mollets du volontaire avant le gorgement des moustiques. A la fin du gorgement, les pots de moustiques ont été rangés dans la caisse de transport. Les**

mollets ont ensuite été lavés à l'eau et au savon. Une pommade décongestionnante (Eurax<sup>®</sup> ou Phenergan<sup>®</sup>) a été appliquée sur les mollets à la fin du gorgement. Le confort du porteur de gamétocytes a primé sur l'expérimentation et il a été décidé que cette dernière devait immédiatement être interrompue à la demande du patient.

Les patients ont été interrogés sur leur préférence par rapport à la méthode de gorgement des moustiques: directe à travers la peau ou par prélèvement sanguin à travers la membrane.

#### 4. 2. 4. Traitement des moustiques après le gorgement

##### a. Conservation des moustiques gorgés

A la fin du gorgement, tous les pots de moustique ont été placés dans la caisse de transport dans les mêmes conditions qu'au départ de Dakar. De retour à l'insectarium de Dakar (27-28 °C et 70-85% d'humidité relative), les moustiques gorgés ont été triés à l'aide d'un aspirateur à bouche et placés dans des pots en cartons de 150 ml avec une densité de 10 à 15 moustiques par pot. Un tampon imbibé de solution sucrée à 20% a été placé au dessus de chaque pot et renouvelé quotidiennement jusqu'à la dissection. Le nombre de moustiques gorgés morts a été dénombré quotidiennement. Aucun repas de sang supplémentaire n'a été proposé aux moustiques entre le gorgement et leur dissection.

##### b. Dissection et recherche des formes oocystes

La dissection des moustiques survivants a été effectuée 7 jours après le gorgement pour la recherche sur les estomacs de moustiques des formes oocystes prématures de *P. falciparum*, traduisant une infection du moustique par le porteur de gamétocytes.

Les moustiques préalablement endormis au chloroforme ont été disséqués sous une loupe binoculaire (grossissement x120). Les estomacs ont été placés dans une goutte de mercurochrome et les oocystes ont été recherchés au microscope optique et au grossissement 400. Les oocystes ont été dénombrés pour chaque lot en fonction du type de gorgement, de l'origine des moustiques, ...; et le nombre d'oocystes par moustique a été porté sur une fiche<sup>6</sup>.

---

6 - voir fiche en annexe page 143.

### 4. 3. Résultats

Les résultats présentés dans cette partie de l'étude ont été enregistrés à partir des gorgements expérimentaux de moustique effectués au niveau du Service de Lutte Anti-Parasitaire (SLAP) de Thiès. Les données ont été recueillies entre Septembre et Décembre 1998 chez 60 volontaires, porteurs de gamétocytes de *Plasmodium falciparum* résidant à Thiès.

#### 4. 3. 1. Le taux de gorgement des moustiques

Les taux de gorgement ont été enregistrés à partir de 43 tests avec des porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* effectués simultanément à travers une membrane et à travers la peau du porteur.

Le taux moyen de gorgement des femelles sauvages d'*An. arabiensis* a respectivement été de 65% et 33% (figure 4. 1.) à travers la peau et à travers la membrane de baudruche ( $p < 0,001$  par le test du  $\chi^2$ ). Ce taux a été comparable entre les mollets droit et gauche (65% vs. 66%,  $p > 0,5$  par le test du  $\chi^2$ ) avec le gorgement direct, et entre la première et la seconde tranche de 10 minutes (34% vs. 32%,  $p > 0,1$  par le test du  $\chi^2$ ) avec le gorgement sur membrane.

#### 4. 3. 2. Conditionnement et survie des femelles gorgées

Au total 4335 femelles d'*An. arabiensis* gorgées ont été transportées entre Dakar et Thiès. La durée du transport des moustiques a été en moyenne ( $\pm$ écartype) de  $1,4 \pm 0,2$  heure avant le gorgement (aller) et  $1,6 \pm 0,3$  heure après le gorgement des moustiques (retour), soit une durée totale de 3,0 heures de transport pour les moustiques. Les minima et maxima de température à l'intérieur de la caisse de transport ont été de 25,5 °C et 30,5 °C; l'écart de température dans la caisse où ont été rangés les moustiques a été en moyenne de +1,3 °C avant et après le gorgement des moustiques.

Dans ces conditions de transport, le pourcentage de moustiques morts à l'ouverture de la caisse à Dakar (après le gorgement) a été de 0,6% (26/4335).

La survie des moustiques en insectarium à 27-28 °C et 70-85% d'humidité relative a été évaluée quotidiennement au cours des 7 jours qui ont suivi le gorgement; dans le lot de moustiques gorgés directement (= GD) et dans le lot de ceux gorgés à travers la membrane (= GM).

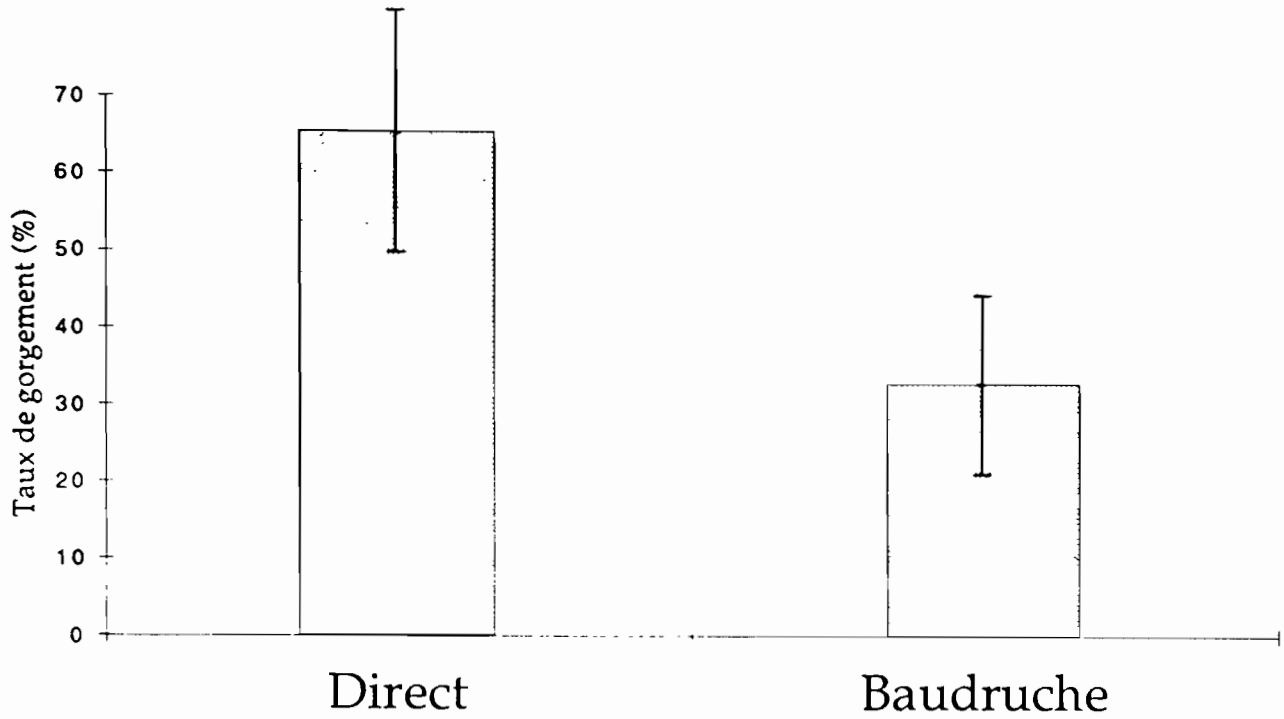


Figure 4. 1. Taux moyen de gorgement ( $\pm$ écartype) des femelles d'*Anopheles arabiensis* enregistrés à travers la peau et à travers une membrane de baudruche à partir des porteurs de gamétocytes de *Plasmodium falciparum*.

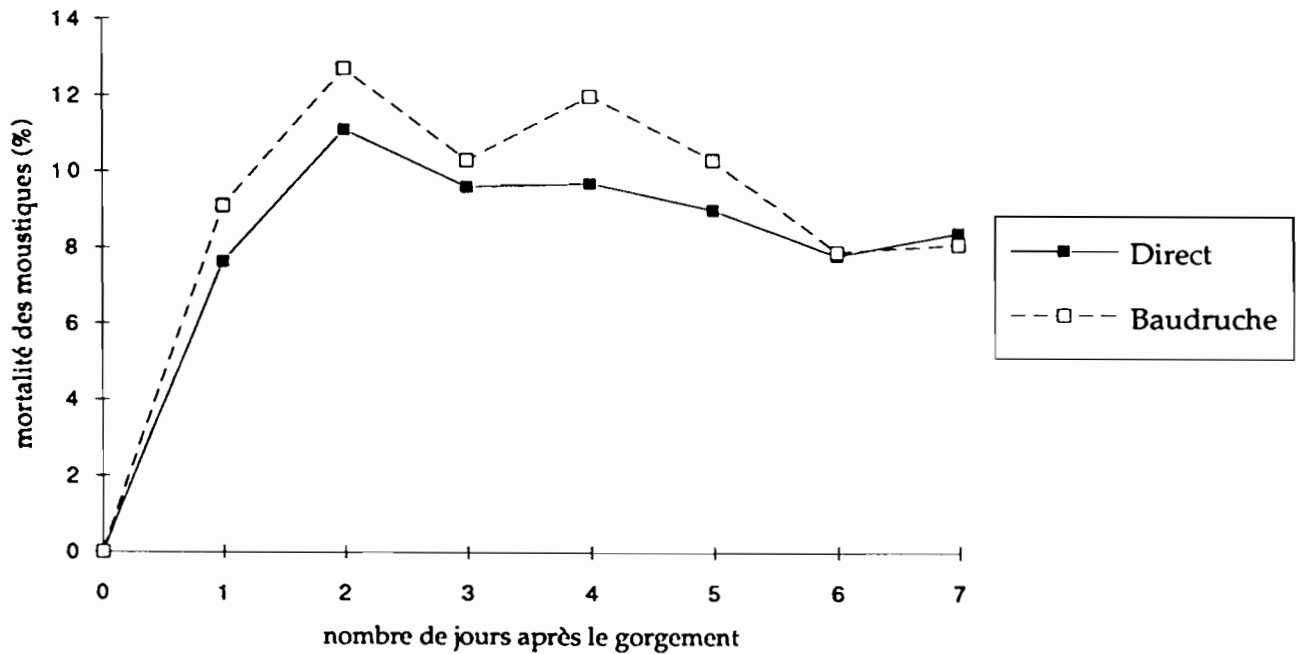


Figure 4. 2. Mortalité des femelles d'*Anopheles arabiensis* enregistrées par jour à 27-28°C et 70-85% d'humidité relative entre J1 et J7 après leur gorgement avec du sang des porteurs de gamétocytes de *Plasmodium falciparum*.

Le taux global de survie a été en moyenne de 34% pour les GD et 27% pour les GM, équivalent à une mortalité globale respective de 66% et 73% après sept jours en insectarium ( $p=0,09$  par le test t).

Le pourcentage moyen de moustiques morts quotidiennement a été comparable entre les GD et les GM (9% vs. 10%:  $p>0,5$  par le test t; figure 4. 2.).

#### 4. 3. 3. Infectivité des porteurs de gamétocytes de *P. falciparum*

##### a. Gamétocytémie des porteurs

Au total 60 porteurs de gamétocytes de *P. falciparum*, dont 44 hommes et 16 femmes ont permis de gorger des moustiques dans le but d'évaluer le rendement de l'infection de ces moustiques au stade oocyste entre le gorgement direct et à travers la membrane. L'âge moyen ( $\pm$ écartype) a été de  $19,7\pm 9,8$  ans (extrêmes: 6 et 48 ans).

Le nombre moyen de gamétocytes par  $\mu$ l de sang a été de 537 (extrêmes: 6 et 5800) à partir des gouttes épaisses confectionnées avec le sang prélevé au niveau de la veine du porteur.

La méthode de gorgement sur membrane avec prélèvement a été préférée par les patients au gorgement direct à travers la peau, car moins douloureuse et mieux tolérée. Un seul patient sur 50 (0,5%) a déclaré préférer le gorgement direct après plusieurs essais de prélèvements ratés.

##### b. Infectivité des porteurs

Les infections de moustiques ont été obtenues sur la base de la présence dans les estomacs de moustique, des oocystes de *P. falciparum* après examen à J7 du gorgement d'au moins 9 estomacs par porteur. Les résultats suivants concernent 21 porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* recrutés à Thiès.

La prévalence des gorgements avec infection de moustiques à J7 du gorgement a été comparable entre le gorgement direct et le gorgement sur baudruche (52% vs. 57%,  $p=0,2$  par le test exact de Fisher).

Le nombre de porteurs infectants les moustiques n'a pas significativement varié selon une relation linéaire en fonction de la gamétocytémie aussi bien avec le gorgement direct ( $r=0,3$ ;  $p=0,23$ ) qu'à travers la membrane ( $r=0,3$ ;  $p=0,21$ ).

#### 4. 3. 4. Rendement au stade oocyste des infections de moustiques par *Plasmodium falciparum*

L'analyse porte dans un premier temps sur le rendement de l'infection de moustique obtenu à J7 du gorgement pour chaque méthode de gorgement; et par la suite sur la comparaison de ce rendement entre les deux méthodes. Le critère de prise en compte des données recueillies pour cette analyse a été d'examiner au moins 9 estomacs par gorgement.

##### a. Rendement de l'infection des moustiques à travers la peau

Les résultats concernent 47 porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* sur lesquels les gorgements directs de moustiques ont été effectués (tableau 4. 1.).

Le pourcentage de moustiques positifs à J7 d'un gorgement infectant a été en moyenne de 15,3%. La proportion de moustiques trouvés positifs à J7 du gorgement direct n'a pas varié significativement suivant une relation linéaire en fonction de la gamétocytemie des porteurs ( $r=0,30$ ;  $p\approx 0,07$ ).

Le nombre d'oocyste par moustique a varié de 1 à 60. La moyenne arithmétique du nombre d'oocystes par moustique et par infection a été de 0,95. La moyenne géométrique du nombre d'oocystes par moustique positif a été de 3,0. Le nombre moyen d'oocystes trouvés à J7 du gorgement par femelle d'*An. arabiensis* et par infection à travers la peau a varié relativement peu, mais significativement suivant une relation linéaire en fonction de la gamétocytemie des porteurs ( $r=0,40$ ;  $p\approx 0,01$ ).

##### b. Rendement de l'infection des moustiques à travers la membrane

Les résultats portent sur 21 porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* dont le sang prélevé au niveau de la veine a permis de tester l'infectivité des gamétocytes à partir des gorgements à travers la membrane des femelles d'*An. arabiensis*.

Le pourcentage de moustiques positifs à J7 du gorgement a été de 19,7%. La proportion de moustiques trouvés positifs à J7 du gorgement direct n'a pas varié significativement suivant une relation linéaire en fonction de la gamétocytemie des porteurs ( $r=0,56$ ;  $p\approx 0,008$ ).

Le nombre d'oocystes par moustique a varié de 0 à 252 et la moyenne arithmétique du nombre d'oocystes par moustique et par infection a été de 4,4. La moyenne géométrique du nombre d'oocystes par moustique positif a été de 4,6. Le nombre d'oocystes trouvés à J7 du gorgement a fortement varié suivant une relation linéaire en fonction de la gamétocytemie des porteurs ( $r=0,59$ ;  $p\approx 0,004$ ).



	Direct	Baudruche
Nombre de gorgements avec au moins 9 moustiques examinés	47	21
Moyenne arithmétique du nombre de gamétocytes/ $\mu$ l de sang	596	387
Pourcentage de moustiques positifs	15,3%	19,7%
Moyenne arithmétique du nombre d'oocystes par moustique	0,95	4,4
Moyenne géométrique du nombre d'oocystes par moustique positif	3,0	4,6

**Tableau 4. 1.** Infections directes (= Direct) et à travers la membrane (= Baudruche) de femelles d'*An. arabiensis* à partir des porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* recrutés à Thiès entre Septembre et Décembre 1998.  
(Seuls les gorgements infectant au moins 1 moustique sur 9 examinés ont été pris en compte)

	Direct	Baudruche
Prévalence des gorgements infectants	52%	57%
Pourcentage de moustiques positifs	19%	20%
Moyenne arithmétique du nombre oocystes par moustique	4,6	12,9
Moyenne géométrique du nombre oocystes par moustique positif	3,5	5,5

**Tableau 4. 2.** Comparaison du rendement des infections de femelles d'*An. arabiensis* par *P. falciparum* entre le gorgement direct et le gorgement sur membrane de baudruche chez 21 porteurs de gamétocytes (avec 387 gamétocytes/ $\mu$ l de sang en moyenne).  
(Seuls les gorgements infectant au moins 1 moustique sur 9 examinés ont été pris en compte)

#### 4. 3. 5. Comparaison de l'infection des moustiques entre le gorgement direct et le gorgement à travers la membrane

Dans ce chapitre, l'analyse porte sur les gorgements simultanés à travers la peau et la membrane effectués à partir de 21 porteurs de gamétocytes (tableau 4. 2.).

La prévalence des infections réussies avec présence d'oocystes à J7 du gorgement a été comparable entre le gorgement direct et le gorgement sur membrane (52% vs. 57%,  $p=0,2$  par le test exact de Fisher).

De même le pourcentage de moustique positif n'a pas significativement varié entre la peau et la baudruche (19% vs. 20%,  $p=0,6$  par le test de Wilcoxon). La proportion de moustiques trouvés positifs à J7 du gorgement direct n'a pas varié significativement suivant une relation linéaire en fonction de la gamétocytémie des porteurs ( $r=0,13$ ;  $p=0,72$ ); par contre la relation linéaire entre la proportion de moustiques positifs et la gamétocytémie des porteurs a été significative à travers la membrane ( $r=0,56$ ;  $p=0,008$ ).

Le nombre moyen d'oocystes par moustique et par infection réussie au moins dans un des deux cas a varié de 4,6 avec le gorgement direct à 12,9 avec le gorgement sur membrane ( $p=0,03$  par le test de Wilcoxon); il a varié suivant une relation linéaire en fonction de la gamétocytémie aussi bien avec le gorgement direct ( $r=0,64$ ;  $p=0,01$ ) qu'à travers la membrane ( $r=0,64$ ;  $p=0,009$ ). Par ailleurs le nombre moyen d'oocystes par moustique a varié suivant une relation linéaire en fonction du nombre de moustiques positifs avec le gorgement direct ( $r=0,70$ ;  $p=0,01$ ); par contre cette relation n'a pas été observée avec le gorgement à travers la membrane ( $r=0,06$ ;  $p=0,86$ ).

La moyenne géométrique du nombre d'oocystes par moustique positif a été de 3,5 avec le gorgement direct et 5,5 avec le gorgement à travers la membrane ( $p<0,01$  par le test U de Mann & Whitney).

#### 4. 4. Discussion

Les infections de moustique par les gamétocytes de *P. falciparum* ont été obtenues à partir des gorgements naturels à travers la peau des porteurs (Muirhead-Thomson, 1954; Githeko et al., 1992) ou à travers une membrane artificielle selon le procédé de Rutledge et al. (1964).

Les taux de gorgement des moustiques ont été plus élevés avec les infections naturelles (gorgement direct) qu'à travers la membrane. Des taux comparables (39%) ont été enregistrés par Robert (1998) à travers cette même membrane avec les mêmes souches de moustiques (souches sauvages).

L'étude de la survie en insectarium des moustiques gorgés a révélé une mortalité moyenne journalière de 10%. Par ailleurs Robert et al. (1990) ont montré que l'infection n'entraîne pas une mortalité précoce des moustiques. Nos résultats obtenus 7 jours après le gorgement peuvent être comparés avec ceux de Robert (1998) qui a observé avec la même souche un taux moyen de survie de 28,8%, six jours après l'émergence des moustiques. Cependant d'autres auteurs ont observé une augmentation de la mortalité des femelles infectés (Gad et al., 1979; Klein et al., 1982); en particulier dans le cas des densités de plus de 10 oocystes par moustique (Klein et al., 1986). Le pourcentage de moustiques survivants n'a pas varié entre le gorgement direct et le gorgement à travers la membrane.

La proportion des porteurs infectants et le nombre de moustiques positifs ont été comparables entre le gorgement direct et le gorgement à travers la peau. Le nombre de porteurs infectants les moustiques a été plus élevé (de l'ordre de 50%) comparé à celui obtenu par Muirhead-Thomson (1957) ou Githeko et al. (1992), soit respectivement 9 et 10% des porteurs infectant naturellement les moustiques. Les faibles gamétoctémies (30-50 gamétocytes par  $\mu\text{l}$  de sang) obtenues par ces auteurs pourraient expliquer cette différence. Nos observations concordent avec celles de Boudin et al. (1993) à travers la membrane (environ 48%). Par ailleurs les proportions de moustiques positifs enregistrées par Muirhead-Thomson (21%) et Githeko et al. (17%) à travers la peau, et Boudin et al. (11,5%) à travers la membrane varient dans le sens de nos observations.

Les rendements parasitaires obtenus chez le moustique au stade oocyste à travers la peau des porteurs de gamétocytes sont comparables à ceux enregistrés par Muirhead-Thomson (1957) et Githeko et al. (1992) chez *An. gambiae* s.s.; soit des moyennes de l'ordre de 1 à 12 oocystes par moustique positif. Le rendement des infections au stade oocyste obtenu par Boudin et al. (1993) à travers la membrane (1,8 oocystes/moustique positif) a été très faible comparé à celui que nous avons enregistré avec la membrane de baudruche (5,5 oocystes/moustique

positif). Cette différence entre nos observations et celles de Boudin et *al.* pourrait provenir des caractéristiques de l'échantillon, et particulièrement à la densité gaméocytaire des volontaires; nos observations ont en majorité été effectuées après un traitement antipalustre (souvent associé à une gaméocytemie élevée), ce qui n'a pas été le cas pour les observations de Boudin et *al.* (1993).

Le rendement parasitaire de *P. falciparum* a été plus élevé à travers la membrane qu'à travers la peau, avec un nombre de moustiques positifs comparable. Les mêmes résultats ont été obtenus par Collins et *al.* (1964). Par contre d'autres auteurs ont enregistré des rendements parasitaires comparables entre les deux méthodes de gorgement (Graves, 1980) ou parfois favorables au gorgement direct (Vanderberg & Gwadz, 1980).

Le rendement de l'infection des moustiques a été plus élevé avec des gaméocytes issus du prélèvement (membrane) qu'avec ceux ingérés directement par le moustique à travers la peau. Ceci est en accord avec les études de Muirhead-Thomson (1954); celui-ci a montré que la majorité des moustiques qui s'infectent directement sur l'hôte présentent un faible rendement parasitaire. Par ailleurs, les corrélations entre la gaméocytemie et le rendement parasitaire ont montré une très grande variabilité entre la peau et la membrane. Ces observations suggèrent l'hypothèse selon laquelle les gaméocytes de *P. falciparum* sont différemment distribués entre la peau et la cellule de gorgement sur membrane. Par ailleurs nos observations s'opposent à celles de Landau et *al.* (1979) et de Dei-Cas et *al.* (1980), qui ont montré que le nombre de gaméocytes infectants ingérés par le moustique est plus élevée que dans un prélèvement de sang de volume équivalent.

Bien que certains auteurs (Graves, 1980; Carter & Graves, 1988; Boudin et *al.* 1993) admettent que la gaméocytemie du porteur est un facteur favorisant l'infection des moustiques, nos observations montrent que la densité gaméocytaire ne constitue pas un indicateur de succès de l'infection du moustique. D'autres facteurs notamment les facteurs spécifiques au moustique interviennent sûrement dans les mécanismes de l'infection du moustique à partir des gaméocytes.

Nos observations suggèrent une surestimation du rendement des infections de moustiques à travers la membrane. Ces résultats doivent donc être rapportés aux conditions de transmission naturelle avec beaucoup de prudence. Cependant, l'utilisation de la membrane comme un modèle expérimental des infections de moustiques reste valable, en particulier dans l'étude des facteurs bloquant la transmission.



## Chapitre 5.

Susceptibilité comparée à l'infection par entre  
*Anopheles arabiensis* et *Anopheles gambiae* s.s.

## 5. 1. Introduction

Les *Plasmodium* sont transmis à l'homme par les moustiques du genre *Anopheles*. En Afrique subsaharienne, les anophèles du complexe *An. gambiae* sont largement distribués dans le faciès épidémiologique du paludisme. On y dénombre sept espèces jumelles toutes vectrices (Hunt & *al.*, 1998), dont *An. gambiae s.s.* et *An. arabiensis* qui sont les vecteurs majeurs du paludisme. Avec *An. funestus*, ils assurent la majorité de la transmission du paludisme au Sénégal. Ces deux espèces sont généralement sympatriques. Même si *An. gambiae s.s.* est souvent considéré comme classiquement plus anthropophile que *An. arabiensis*, ces deux espèces peuvent présenter des taux d'anthropophilie comparables (Lemasson & *al.*, 1997; Diatta & *al.*, 1998).

La susceptibilité des anophèles à l'infection varie en fonction des espèces (Collins et *al.*, 1979; Warren et *al.*, 1979) et des souches d'anophèles (MacDonald, 1967; Curtis, 1979; Collins & Roberts, 1991). Ainsi Collins et *al.* (1993) ont montré que la susceptibilité à l'infection par *P. malariae* était plus élevée avec une souche d'*An. gambiae s.s.* d'Ouganda qu'avec celle de Gambie. Cette susceptibilité des moustiques à l'infection peut être évaluée *in vitro* au stade oocyste. En effet les premiers oocystes sont formés 18 à 24 heures après le repas infectant à 25°C. La taille de l'oocyste augmente progressivement au cours de sa maturation et varie en fonction de la température et de l'espèce plasmodiale (Shute & Maryon, 1952). Selon Rosenberg & Rungsiwongse (1991), l'âge de l'oocyste n'influence pas significativement le rendement final du cycle sporogonique du moustique. Toutefois, il n'est pas exclu que la taille de l'oocyste influence sa répartition dans l'estomac du moustique. Par ailleurs, des avis divergents relatifs à une éventuelle influence de la taille des moustiques sur la susceptibilité à l'infection par le *Plasmodium* ont été émis par Ichimori (1989), Kitthawee et *al.* (1990) et Lyimo & Koella (1992). Par conséquent, le rôle de la taille du moustique comme facteur favorisant le déroulement de la sporogonie reste très discutable.

Dans ce chapitre, nous allons comparer la susceptibilité à l'infection par *P. falciparum* entre deux vecteurs majeurs du paludisme au Sénégal, *An. gambiae s.s.* et *An. arabiensis* et secondairement déduire la taille du moustique et de l'oocyste en fonction du rendement de l'infection de moustiques.

## 5. 2. Matériels et Méthodes

### 5. 2. 1. Collection et élevage des moustiques

Deux espèces d'anophèle ont été utilisées pour la réalisation de cette étude. Il s'agit d'*An. arabiensis* et d'*An. gambiae s.s.* répartis en 3 lots: un lot de femelles d'*An. arabiensis* de Dakar (= lot 1), un lot de femelles d'*An. arabiensis* de Dielmo (= lot 2) et un lot de femelles d'*An. gambiae s.s.* de Dielmo (= lot 3).

Les moustiques du lot 1 ont été récoltés à l'état larvaire dans les gîtes de la région de Dakar entre Septembre et Décembre et élevés en insectarium (cf. chapitre 3. 2. 4.). Les moustiques adultes ont été utilisés pour le gorgement 3 jours après leur émergence.

Les moustiques des lots 2 et 3 ont été constitués par *An. arabiensis* et *An. gambiae s.s.*, originaires de Dielmo, village situé à 280 Km de route au SSE de Dakar. Ces souches ont été obtenues à partir des pontes de femelles gravides capturées à Dielmo en 1996 et dont les générations successives ont été maintenues en élevage à l'insectarium de l'Institut Pasteur de Dakar à 28-30 °C et 75-80 °C d'humidité relative. Le maintien en élevage de cette souche d'anophèle depuis près de 3 ans a été assuré grâce à l'adaptation des générations successives des femelles au gorgement direct sur cobaye. Les œufs récoltés sur papier filtre imbibé d'eau ont été déposés dans les bacs de 30x20 cm remplis d'eau où le développement larvaire s'est effectué. Au fur et à mesure de leur croissance, les larves ont été réparties dans les bacs à raison de 400 à 500 larves par bac. Les bacs ont été recouverts par une toile maillée pendant le développement larvaire. Les larves ont été nourries avec Tetra Baby Fish Food L<sup>®</sup> jusqu'à la nymphose. Les nymphes ont été placées dans les cages à moustiquaire jusqu'à l'émergence des adultes. Les cages renfermant les femelles de 3 jours ont été transportées à l'insectarium de Bel-Air pour le gorgement.

Avant le gorgement, les femelles de chaque lot de moustiques ont été sélectionnées dans les cages à l'aide d'un aspirateur à bouche et placées dans des pots en carton de 40 ml recouverts par une toile moustiquaire. Les repas sucrés ont été enlevés 6 à 8 heures avant le gorgement. Les pots de moustiques ont été identifiés à l'aide des étiquettes portant des indications suivantes: code du porteur, espèce anophélienne et origine, type de gorgement, etc. Chaque lot a été constitué par deux pots de 40 moustiques chacun.

Tous les pots de moustiques ont été rangés dans une caisse isolante en présence de serviettes mouillées afin de maintenir un taux d'hygrométrie élevé. Le transport des moustiques a été effectué entre Dakar et Thiès en cabine de voiture conditionné à environ 25 °C. La température à l'intérieur de la caisse a

été enregistrée à l'aide d'un thermomètre à mercure à l'ouverture de la caisse à Thiès (aller) et à Dakar (retour).

### 5. 2. 2. Recherche des porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* et gorgement de moustiques

Les gorgements de moustique ont été effectués à Thiès à partir des prélèvements sanguins des porteurs de gamétocytes recrutés pour la comparaison de l'infection entre le gorgement direct et la membrane (cf. chapitre 4).

Le sang prélevé au niveau de la veine du pli du coude avec un microperfuseur de 2 mm de Ø prolongé par une seringue de 20 ml a été mélangé à un anticoagulant et proposé aux 3 lots de moustiques à travers la membrane de baudruche. Les premiers pots de moustiques de chaque lot ont ainsi été placés sous la cellule de gorgement pendant 10 minutes au terme desquelles ils ont été remplacés par les seconds pots pour 10 mn également. A la fin du gorgement des 2 pots de chaque lot de moustiques, les cellules et les membranes ont été lavées puis stérilisées à l'alcool avant d'être utilisées pour un nouveau porteur de gamétocytes.

### 5. 2. 3. Maintien en insectarium des moustiques gorgés et recherche des oocystes de *P. falciparum*

De retour à Dakar, les pots de moustiques identifiés en fonction des lots ont été ouverts dans les cages à moustiquaire. Les moustiques gorgées ont été triées et maintenues en insectarium dans des pots en carton de 150 ml avec une densité de 10 à 15 moustiques par pot (cf. chapitre 4. 2. 4.). La date, le numéro du lot et le code du porteur de gamétocytes ont permis d'identifier les différents pots. Les moustiques non gorgés ont été tués. Des morceaux de coton imbibé d'une solution sucrée à 20% ont été mis à la disposition des moustiques et renouvelés jusqu'à la dissection sept jours après le gorgement, pour la recherche des oocystes de *P. falciparum*.

La recherche des oocystes prématures a été effectuée au grossissement 400 dans une goutte de mercurochrome à 1% dans les estomacs des moustiques survivants.



#### 5. 2. 4. Mesure de la longueur des ailes de moustique et du diamètre des oocystes prématures

La taille des ailes et des oocystes a été mesurée au microscope à l'aide d'un objectif micrométrique à 0,01 mm d'incertitude. Le micromètre a été constitué de 10 macrograduations. Chaque macro graduation était subdivisée en 10 micrograduations. La longueur de chaque macro graduation (soit 10 micrograduations) a varié de 0,25 mm, 0,10 mm et 0,025 mm respectivement en fonction du grossissement 40, 100 et 400. La mesure a été estimée en mm en multipliant le nombre de micrograduations par l'indice de taille du grossissement utilisé.

Le diamètre de chaque oocyste a ainsi été mesuré au grossissement 400 (indice de taille=0,025) et la longueur des ailes des moustiques au 40 (indice de taille=0,25). Au moment de la dissection, une aile (gauche ou droite) a été sectionnée à la base du thorax de chaque anophèle avec un ciseau et déposée avec précaution sur une bande adhésive. La bande portant les ailes a été fixée sur une lame porte-objet pour la mesure des ailes. La mesure de l'aile a été effectuée d'une extrémité à l'autre incluant l'articulation de l'aile et les soies de la frange d'écailles apicale.

## 5. 3. Résultats

### 5. 3.1. Le taux de gorgement

Les taux de gorgement ont été enregistrés à partir de 43 tests avec des porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* à travers la membrane de baudruche avec le sang veineux prélevé chez les porteurs de gamétocytes (figure 5. 1.).

Les gorgements relatifs aux trois lots de moustiques ont été désignés par:

- lot 1: avec *An. arabiensis* de Dakar gorgé à travers la baudruche en deux tranches de 10 mn (1A) et 10 mn (1B);

- lot 2: constitué par *An. arabiensis* de Dielmo gorgées à travers la baudruche en deux tranches de 10 mn (2A) et 10 mn (3B);

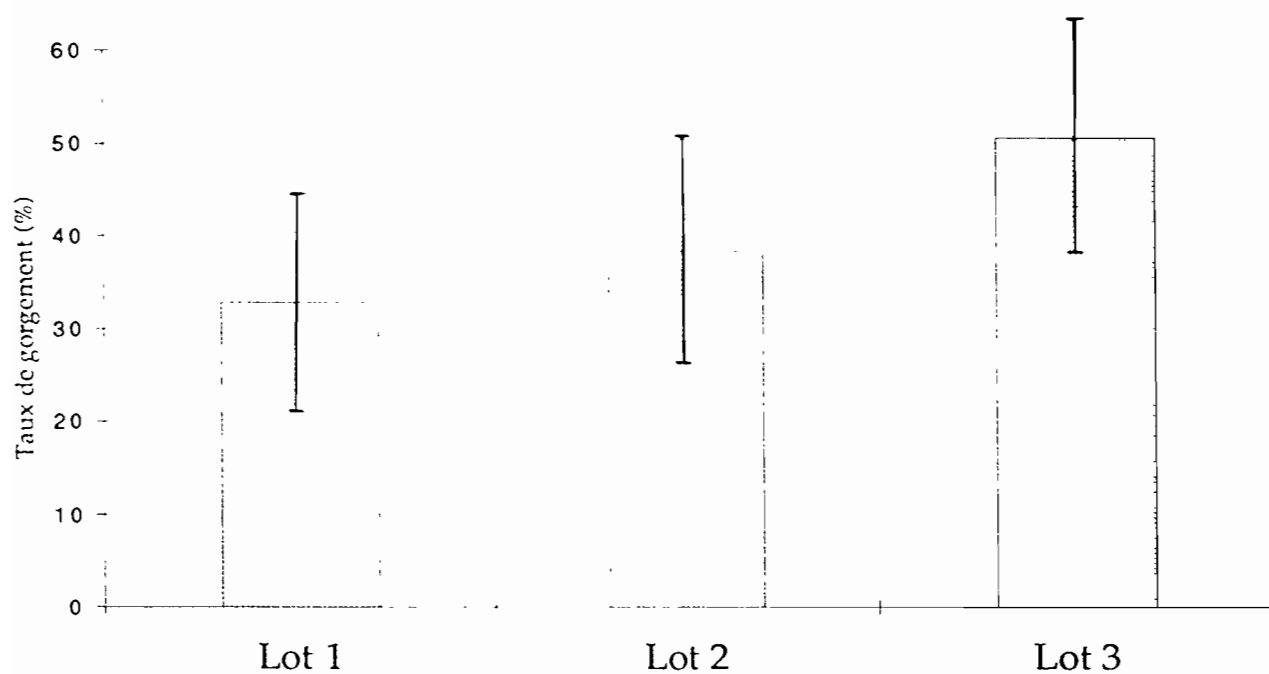
- lot 3: constitué par *An. gambiae s.s.* de Dielmo gorgées à travers la baudruche en deux tranches de 10 mn (4A) et 10 mn (4B).

Le taux moyen de gorgement a été de 33% pour *An. arabiensis* (lot 1), 38% pour *An. arabiensis* (lot 2) et 51% pour *An. gambiae s.s.* (lot 3).

Le taux moyen de gorgement à travers la membrane a été significativement plus élevé avec *An. arabiensis* de Dielmo qu'avec *An. arabiensis* de Dakar (lot 2 vs. lot 1:  $p < 0,05$  par le test du  $\chi^2$ ).

De même le taux moyen de gorgement à travers la membrane a significativement diminué entre *An. gambiae s.s.* et *An. arabiensis* de Dielmo ( $p < 0,001$  par le test du  $\chi^2$ ).

Par ailleurs, le taux de gorgement entre le gorgement A et le gorgement B a été comparable pour *An. arabiensis* de Dakar (34% vs. 32%:  $p > 0,5$  par le test du  $\chi^2$ ); alors qu'il a significativement diminué entre A et B pour les anophèles de Dielmo, respectivement de 42% à 35% pour *An. arabiensis* ( $p < 10^{-3}$  par le test du  $\chi^2$ ) et de 53% à 46% pour *An. gambiae s.s.* ( $p < 0,001$  par le test du  $\chi^2$ ).



**Figures 5. 1.** Taux de gorgement moyens ( $\pm$ écartype) enregistrés à travers une membrane de baudruche chez *Anopheles arabiensis* de Dakar (= lot 1), *Anopheles arabiensis* de Dielmo (= lot 2) et *Anopheles gambiae* s.s. de Dielmo (= lot 3).

### 5. 3. 2. Rendement au stade oocyste des infections de moustiques

Il a été évalué sur la base d'au moins un moustique positif (avec oocyste) sur un nombre minimum d'estomacs examinés à J7 du gorgement égal à 9 (tableau 5. 1.). Les résultats concernent les lots de moustiques 1 (n=21 porteurs), 2 (n=18 porteurs) et 3 (n=34 porteurs) gorgés à travers la membrane à partir des porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* de la région de Thiès. Le nombre moyen de gamétocytes par  $\mu\text{l}$  de sang des porteurs volontaires pour le gorgement des lots 1, 2 et 3 a été respectivement de 337, 612 et 610.

La prévalence des gorgements avec au moins un moustique trouvé positif à J7 du gorgement a été de 56% avec le lot 1, 67% avec le lot 2 et 53% avec le lot 3. Cette prévalence a été comparable entre *An. arabiensis* de Dakar et *An. arabiensis* de Dielmo (lot 1 vs. lot 2:  $p > 0,5$  par le test exact de Fisher); et entre *An. arabiensis* et *An. gambiae* s.s. de Dielmo (lot 2 vs. lot 3:  $p > 0,5$  par le test exact de Fisher).

Le pourcentage de moustiques positifs à J7 du gorgement a été de 19,7% avec le lot 1, 19,8% avec le lot 2 et 27,4% avec le lot 3. La proportion de moustiques positifs a été comparable entre *An. arabiensis* de Dakar et *An. arabiensis* de Dielmo (lot 1 vs. lot 2:  $p > 0,9$  par le test t) et entre *An. gambiae* s.s. et *An. arabiensis* de Dielmo (lot 3 vs. lot 2:  $p > 0,3$  par le test t).

La moyenne arithmétique du nombre d'oocystes par moustique et par infection a été de 4,4 avec *An. arabiensis* (lot 1: entre 0 et 252); et la moyenne géométrique du nombre d'oocystes par moustique positif a été de 4,6.

La moyenne arithmétique du nombre d'oocystes par moustique et par infection a été de 5,8 avec *An. arabiensis* (lot 2: entre 0 et 331); et la moyenne géométrique du nombre d'oocystes par moustique positif a été de 5,0.

La moyenne arithmétique du nombre d'oocystes par moustique et par infection a été de 6,5 avec *An. gambiae* s.s. (lot 3: entre 0 et 294); et la moyenne géométrique du nombre d'oocystes par moustique positif a été de 5,4.

Le nombre moyen d'oocystes par moustique et par infection a varié significativement suivant une relation linéaire en fonction de la gamétocytémie du porteur chez *An. arabiensis* de Dakar ( $r=0,59$ :  $p=0,004$ ) et chez *An. arabiensis* ( $r=0,98$ :  $p < 10^{-4}$ ) et *An. gambiae* s.s. ( $r=0,97$ :  $p < 10^{-4}$ ) de Dielmo.

	<i>An. arabiensis</i> (lot 1)	<i>An. arabiensis</i> (lot 2)	<i>An. gambiae s.s.</i> (lot 3)
Nbre de gorgements avec au moins 9 moustiques examinés	21	18	34
Moyenne arithmétique du nbre de gamétocytes/ $\mu$ l de sang	387	612	610
Pourcentage de moustiques positifs	19,7%	19,8%	27,4%
Moyenne arithmétique du nombre oocystes par moustique	4,4	5,8	6,5
Moyenne géométrique du nombre oocystes par moustique positif	4,6	5,0	5,4

**Tableau 5. 1.** Rendement des infections à travers la membrane de boudruche de femelles d'*An. arabiensis* de Dakar (= lot 1), d'*An. arabiensis* (= lot 2) et *An. gambiae s.s.* (= lot 3) à partir des porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* recrutés à Thiès entre Septembre et Décembre 1998. (Seuls les gorgements infectant au moins 1 moustique sur 9 examinés ont été pris en compte)

	<i>An. arabiensis</i>	<i>An. gambiae s.s.</i>
Prévalence des gorgements infectants	59%	47%
Pourcentage de moustiques positifs	21%	28%
Moyenne arithmétique du nombre oocystes par moustique	6,3	6,7
Moyenne géométrique du nombre oocystes par moustique positif	5,6	7,3

**Tableau 5. 2.** Comparaison du rendement de l'infection à travers la membrane de boudruche entre *An. arabiensis* et *An. gambiae s.s.* sept jours après le gorgement à partir des porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* (n=17 porteurs avec en moyenne 648 gamétocytes/ $\mu$ l de sang) (Seuls les gorgements infectant au moins 1 moustique sur 9 examinés ont été pris en compte).

### 5. 3. 3. Infections comparées entre *An. arabiensis* et *An. gambiae s.s.*

L'analyse concerne exclusivement les moustiques originaires de Dielmo; *An. arabiensis* et *An. gambiae s.s.*. Elle porte donc sur 17 gorgements à travers la membrane avec examen d'au moins neuf moustiques survivants sept jours après le gorgement (tableau 5. 2.).

La prévalence des gorgements avec au moins un moustique trouvé positif à J7 du gorgement a été significativement plus élevée chez *An. arabiensis* que chez *An. gambiae s.s.* (59% vs. 47%:  $p \approx 0,002$  par le test exact de Fisher).

Le pourcentage de moustiques positifs sept jours après le gorgement a été comparable entre *An. arabiensis* et *An. gambiae s.s.* (21% vs. 28%:  $p = 0,37$  par le test de Wilcoxon).

De même le nombre moyen d'oocystes par moustique et par infection examiné a été comparable entre *An. arabiensis* et *An. gambiae s.s.* (6,3 vs. 6,7:  $p = 0,4$  par le test de Wilcoxon).

### 5. 3. 4. Influence de la taille des moustiques sur le rendement de l'infection

Au total 976 femelles d'*An. arabiensis* de Dakar (lot 1), 226 femelles d'*An. arabiensis* et 388 femelles d'*An. gambiae s.s.* de Dielmo (lots 2 et 3) ont concerné cette mesure.

La moyenne arithmétique ( $\pm$ écartype) de la longueur des ailes des femelles du lot 1 (*An. arabiensis*) a été de  $3,14 \pm 0,13$  mm (minimum=2,82 et maximum=3,75). La longueur moyenne des ailes de femelles positives d'*An. arabiensis* (n= 63 moustiques avec une densité moyenne d'oocystes par moustique = 2,6) a été comparable à celle enregistrée avec les femelles négatives (3,15 mm vs. 3,16 mm:  $p \approx 0,25$  par le test t; tableau 5. 3.). De même la taille de l'aile n'a pas varié suivant une relation linéaire en fonction du nombre d'oocystes trouvés par moustique ( $r=0,06$ ;  $p=0,63$ ).

Au niveau des anophèles du lot 2 (*An. arabiensis*), la moyenne arithmétique ( $\pm$ écartype) de la longueur des ailes été de  $3,14 \pm 0,12$  mm (minimum=2,80 et maximum=3,47). La longueur moyenne des ailes de femelles positives (n= 24 moustiques avec une densité moyenne d'oocystes par moustique = 4,1) a été comparable à celle enregistrée avec les femelles négatives (3,17 mm vs. 3,14 mm:  $p \approx 0,30$  par le test t). La taille de l'aile n'a pas varié suivant une relation linéaire en fonction du nombre d'oocystes par moustique positif ( $r=0,18$ ;  $p=0,4$ ).

	<i>An. arabiensis</i> (Dakar = lot 1)		<i>An. arabiensis</i> (Dielmo = lot 2)		<i>An. gambiae s.s.</i> (Dielmo = lot 3)	
	négatifs	positifs	négatifs	positifs	négatifs	positifs
Nombre total de moustiques avec une aile mesurée	913	63	202	24	336	52
Moyenne arithmétique (±écartype) de la longueur de l'aile en mm	3,16 ± 0,13	3,15 ± 0,13	3,14 ± 0,13	3,17 ± 0,13	3,02 ± 0,15	3,08 ± 0,14

**Tableau 5. 3.** Longueurs moyennes des ailes de femelles d'*An. arabiensis* de Dakar (= lot 1), d'*An. arabiensis* de Diemo (= lot 2) et *An. gambiae s.s.* de Dielmo (= lot 3) en fonction de leur infection après un gorgement avec le sang des porteurs de gamétocytes de *P. falciparum*.

	<i>An. arabiensis</i> (Dakar = lot 1)	<i>An. arabiensis</i> (Dielmo = lot 2)	<i>An. gambiae s.s.</i> (Dielmo = lot 3)
Nombre total d'oocystes mesurés à J7 du gorgement	821	1089	889
Moyenne arithmétique (±écartype) du diamètre de l'oocyste en µm	35,1 ± 17,9 µ	32,1 ± 16,3 µ	35,2 ± 16,9 µ

**Tableau 5. 4.** Diamètre moyen des oocystes prématures de *Plasmodium falciparum* dénombrés à J7 du gorgement à travers la membrane de baudruche de femelles d'*An. arabiensis* de Dakar (= lot 1), d'*An. arabiensis* (= lot 2) et *An. gambiae s.s.* (= lot 3) de Dielmo.

La longueur moyenne ( $\pm$ écartype) des ailes des femelles du lot 3 (*An. gambiae* s.s.) a été de  $3,03 \pm 0,12$  mm (minimum=2,75 et maximum=3,75). Contrairement à *An. arabiensis* la longueur moyenne des ailes de femelles positives (n= 52 moustiques avec une densité moyenne d'oocystes par moustique = 3,3) a été plus grande que celle enregistrée chez les femelles négatives (3,08 mm vs. 3,02 mm:  $p \approx 10^{-3}$  par le test t). Par ailleurs, la taille de l'aile a faiblement varié suivant une relation linéaire en fonction du nombre d'oocystes par moustique positif ( $r=0,40$ ;  $p=0,04$ ).

Nos observations montrent que les ailes des femelles d'*An. arabiensis* sont généralement plus grandes que celles des femelles d'*An. gambiae* s.s. ( $p < 10^{-4}$  par le test t); et que la taille du moustique déduit sur la taille de l'aile ne constitue pas un facteur limitant l'infection du moustique par *P. falciparum*.

### 5. 3. 5. Relation entre la taille des oocystes et leur densité dans l'estomac du moustique

Le diamètre des oocystes prématures a été mesuré en micromètre à partir des moustiques positifs à J7 du gorgement. Les mesures portent sur 821, 1089 et 889 oocystes dénombrés respectivement chez *An. arabiensis* (lot 1), *An. arabiensis* (lot 2) et *An. gambiae* s.s. (lot 3); soit un total de 2799 oocystes mesurés avec le gorgement des moustiques à travers une membrane (tableau 5. 4.)

La moyenne arithmétique ( $\pm$ écartype) du diamètre des oocystes a été de  $35,1 \pm 17,9$   $\mu$  (min=10,0 et max=80,0),  $32,1 \pm 16,3$   $\mu$  (min=8,0 et max=82,5) et  $35,2 \pm 16,9$   $\mu$  (min=4,0 et max=85,0) respectivement chez *An. arabiensis* (lot 1), *An. arabiensis* (lot 2) et *An. gambiae* s.s. (lot 3).

Le diamètre moyen des oocystes enregistré chez *An. arabiensis* du lot 1 a été plus grand que chez *An. arabiensis* du lot 2 ( $p < 10^{-3}$  par le test t). De même les oocystes ont été plus gros chez *An. gambiae* s.s. que chez *An. arabiensis* ( $p < 10^{-3}$  par le test t).

Nous avons distingué trois groupes de moustiques en fonction de leur densité en oocystes: les moustiques de faible portage (=A avec moins de 20 oocystes/moustique), les moustiques de moyen portage (=B: de 21 à 50 oocystes/moustique) et les moustiques de portage élevé (=C avec plus de 50 oocystes/moustique).

Chez *An. arabiensis* du lot 1 (n= 38 moustiques), le pourcentage de moustiques dénombrés en fonction du portage a été respectivement de 76,3%, 13,2% et 10,5% pour A, B et C. La proportion d'oocystes mesurés à J7 du gorgement et avec un diamètre moyen de 10-25  $\mu$ m, 26-50  $\mu$ m et plus de 50  $\mu$ m a été respectivement de 36%, 50% et 14%. Le diamètre des oocystes n'a pas



significativement varié en fonction de leur densité dans l'estomac du moustique (figure 5. 2.:  $p > 0,5$  par le test du  $\chi^2$ ).

Chez *An. arabiensis* du lot 2 (n= 38 moustiques), le pourcentage de moustiques dénombrés en fonction du portage a été respectivement de 68,4%, 18,4% et 13,2% pour A, B et C. La proportion d'oocystes mesurés à J7 du gorgement et avec un diamètre moyen de 10-25  $\mu\text{m}$ , 26-50  $\mu\text{m}$  et plus de 50  $\mu\text{m}$  a été respectivement de 42%, 50% et 8%. Le diamètre moyen des oocystes a significativement été plus élevé chez les moustiques avec les portages de moins de 50 oocystes par moustique (figure 5. 3.:  $p < 0,01$  par le test du  $\chi^2$ ).

Chez *An. gambiae s.s.* du lot 3 (n=71 moustiques), le pourcentage de moustiques dénombrés en fonction du portage a été respectivement de 83,6%, 9% et 7,4% pour A, B et C. La proportion d'oocystes mesurés à J7 du gorgement et avec un diamètre moyen de 10-25  $\mu\text{m}$ , 26-50  $\mu\text{m}$  et plus de 50  $\mu\text{m}$  a été respectivement de 34%, 53% et 13%. Le diamètre moyen des oocystes a significativement diminué chez les moustiques avec les portages de plus de 50 oocystes par moustique (figure 5. 4.:  $p < 10^{-3}$  par le test du  $\chi^2$ ).

Le diamètre moyen des oocystes à J7 du gorgement à travers une membrane a été en moyenne plus grand chez *An. gambiae s.s.* que chez *An. arabiensis* dans le groupe A (lot 3 vs. lot 2:  $p < 0,01$  par le test t); et inversement dans le groupe C (lot 2 vs. lot 3:  $p < 0,01$  par les test t). Ce diamètre a été comparable entre ces deux espèces dans le groupe B ( $p \approx 0,34$  par le test t).

En résumé, le diamètre moyen de la majorité des oocystes formés à J7 du gorgement (plus de 80%) a été compris entre 10 et 50  $\mu\text{m}$ . Le diamètre des oocystes n'a pas varié en fonction de leur nombre dans l'estomac des femelles sauvages d'*An. arabiensis* (lot 1); alors qu'on a enregistré chez les moustiques d'élevage (lots 2 et 3) une tendance à la diminution de la taille des oocystes avec les portages de plus de 50 oocystes par moustique.

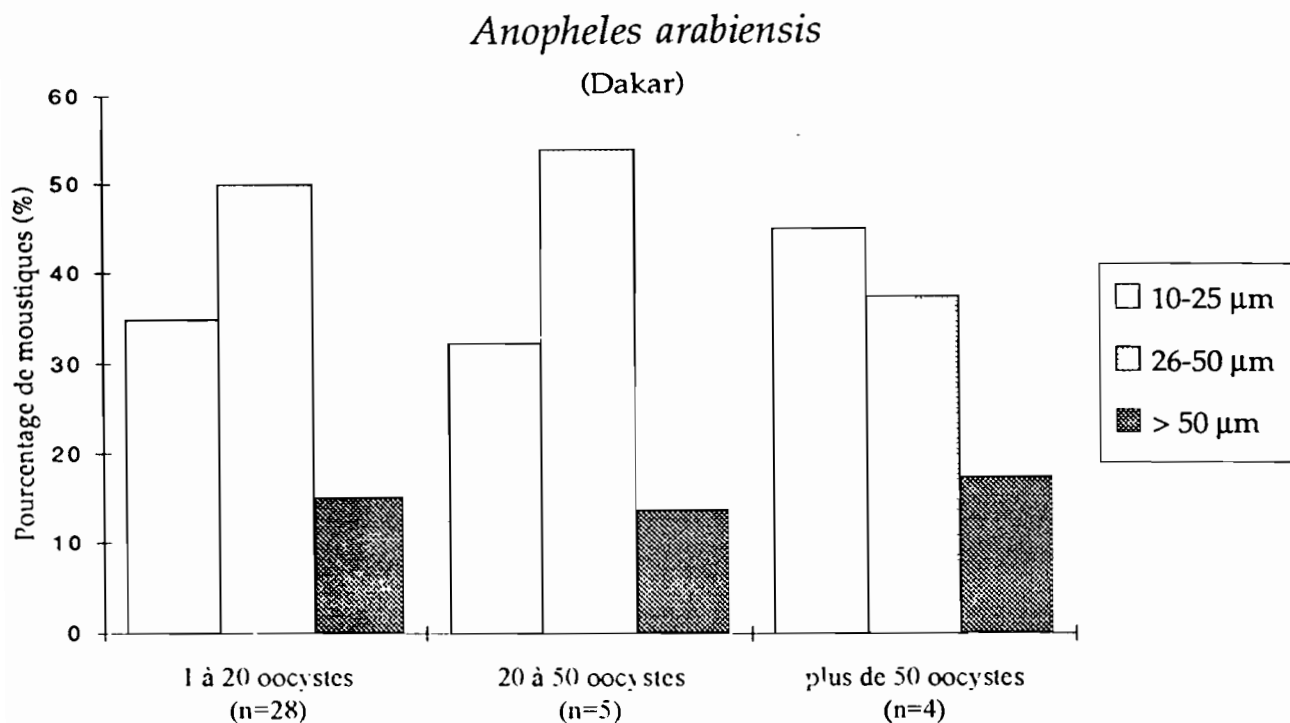


Figure 5. 2. Fréquence des oocystes prématures de *Plasmodium falciparum* en fonction du portage (nombre d'oocystes par moustique) chez *An. arabiensis* de Dakar (lot 1).

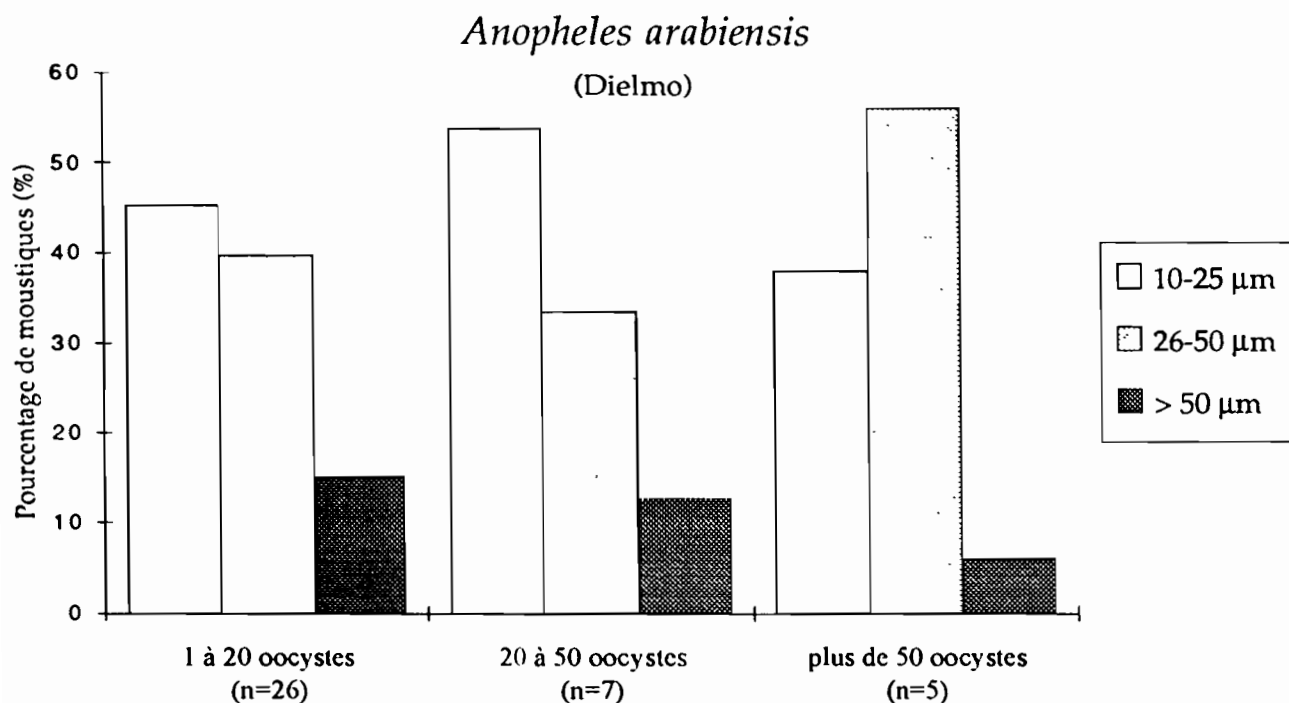
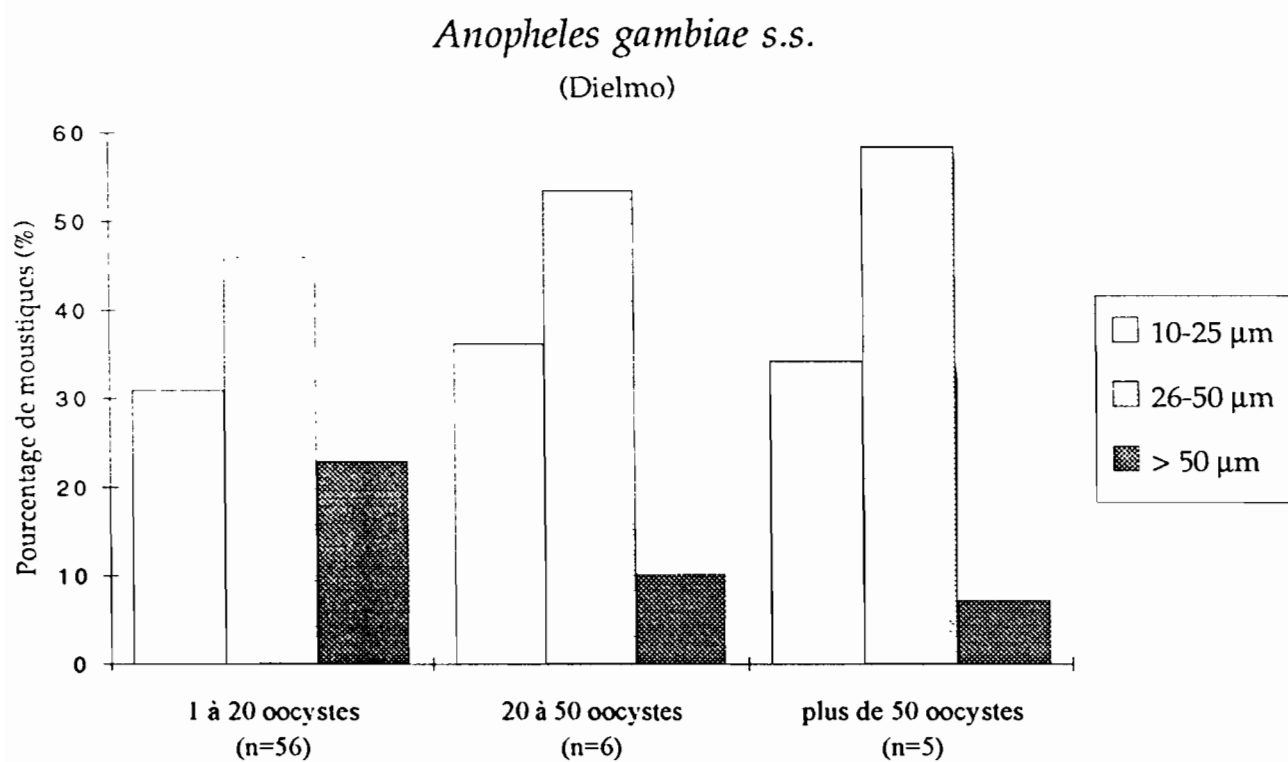


Figure 5. 3. Fréquence des oocystes prématures de *Plasmodium falciparum* en fonction du portage (nombre d'oocystes par moustique) chez *An. arabiensis* de Dielmo (lot 2).



**Figure 5. 4.** Fréquence des oocystes prématures de *Plasmodium falciparum* en fonction du portage (nombre d'oocystes par moustique) chez *An. gambiae* s.s. de Dielmo (lot 3).

## 5. 4. Discussion

*An. arabiensis* et *An. gambiae* s.s. sont deux des trois membres du complexe *An. gambiae* qui sont retrouvés au Sénégal. Avec *An. funestus*, ils assurent la transmission du paludisme. Ces deux espèces sont largement répandues sur toute l'étendue du territoire. Leur adaptation en milieu artificiel (Armstrong & Bransby-William, 1961; Coluzzi, 1964; Diop et al., 1998) a facilité l'étude des relations entre le vecteur et le parasite, notamment avec la découverte d'un procédé expérimental d'infection des moustiques (Rutledge et al., 1964).

Le taux de gorgement et le rendement parasitaire au stade oocyste à l'infection par les gamétocytes de *P. falciparum* ont été comparables entre *An. arabiensis* et *An. gambiae* s.s.. Nos observations montrent que *An. arabiensis* et *An. gambiae* s.s. présentent une susceptibilité à l'infection par *P. falciparum* comparable dans les conditions épidémiologiques identiques. Ces observations concordent avec les études de Lemasson et al. (1997) et Diatta et al. (1998), qui ont montré que dans les régions où ces deux espèces sont sympatriques, leurs taux d'anthropophilie sont comparables à un moment donné. Cependant certaines études ont permis d'observer des taux d'infection plus importants chez *An. gambiae* s.s. que chez *An. arabiensis* (Coluzzi, 1984; Robert et al., 1989). Toutefois Fontenille et al., (1997) admettent que les taux d'infection d'*An. arabiensis* et *An. gambiae* s.s. peuvent varier en fonction des facteurs écologiques et épidémiologiques. Les taux d'infection enregistrés chez *An. funestus*, autre vecteur majeur sont généralement supérieurs à ceux d'*An. gambiae* s.s. et *An. arabiensis* (Taylor et al., 1990; Fontenille et al., 1997).

La longueur des ailes a été en moyenne plus grande chez *An. arabiensis* que chez *An. gambiae* s.s.. Nos résultats sont comparables à ceux observés par Lyimo & Koella (1992) chez les femelles d'*An. gambiae* s.l. infectées par *P. falciparum*. En ce qui concerne l'influence de la taille du moustique déduit à partir de la longueur de l'aile, nous n'avons pas établi une relation significative comme Ichimori (1989), entre la taille et l'infection des moustiques. D'autres études effectuées sur d'autres moustiques sont en accord avec nos observations (Hovanitz, 1947). Par contre, Lyimo & Koella (1992) pensent que la taille des moustiques influence positivement leur infection; selon Carter & Graves (1988), la taille des moustiques serait proportionnelle au volume de sang ingéré et indirectement à la quantité de gamétocytes potentiellement infectants. Les densités gamétocytaires élevées (> 300 par  $\mu\text{l}$  de sang) plus élevées que celles enregistrées par Carter & Graves (1988) et Lyimo & Koella (1992) pourraient expliquer cette discordance.

En ce qui concerne la taille de l'oocyste prémature à J7 du gorgement, nos observations relatives au diamètre de l'oocyste de *P. falciparum* ont été comparables aux mesures faites par Shute & Maryon (1952). Nous avons observé une densité parasitaire inférieure à 50 oocystes par moustique chez plus de 80% des moustiques. Ces observations concordent avec celles de Muirhead-Thomson (1954) enregistrées avec les gorgements directs de moustique. Par ailleurs, nous n'avons pas enregistré une variation significative de la taille de l'oocyste en fonction de la densité par moustique, surtout chez les anophèles sauvages.

En définitive, nos observations suggèrent une susceptibilité à l'infection par *P. falciparum* comparable entre *An. arabiensis* et *An. gambiae s.s.* après l'infection à travers une membrane. Le rendement de l'infection des moustiques n'a pas varié en fonction de la taille des moustiques, ni en fonction de celle des oocystes.



## Chapitre 6

Distribution des gamétocytes de  
*Plasmodium falciparum* chez *Anopheles arabiensis*

## 6. 1. Introduction

Le déroulement du cycle sporogonique chez le moustique débute au stade de gamétocyte. Chez *Plasmodium falciparum*, les gamétocytes apparaissent au niveau du sang périphérique environ 10 jours après les premiers stades asexués. Les mécanismes de déclenchement de la gamétoctémie restent encore peu élucidés. Toutefois Carter & Miller (1979) ont montré en culture que la conversion des stades asexués en gamétocytes tend à augmenter lorsque la multiplication des parasites asexués est ralentie. Par conséquent certains facteurs limitant la multiplication du parasite sont favorables à l'apparition des gamétocytes; particulièrement l'immunité du patient (Smalley & Brown, 1981) et certains antipaludiques (Mackerras & Ercole, 1949; Shute & Maryon, 1954; Robert et al., 1996 et 1998; Buckling et al., 1999).

Le passage des gamétocytes de l'hôte au moustique a été étudié par certains auteurs tels que Rutledge et al. (1973), Landau et al. (1979) et Dei-Cas et al. (1980). Ces études ont permis de noter une variabilité dans la répartition des gamétocytes chez le moustique et dans un prélèvement de sang (goutte épaisse, etc.). Cependant aucune étude n'a été effectuée sur la distribution des gamétocytes dans le sang ingéré par le moustique.

Les gorgements de moustiques ont été réalisés à partir des porteurs de gamétocytes de *P. falciparum*, dans le but d'étudier la distribution des gamétocytes ingérés par des femelles sauvages d'*An. arabiensis*.

## 6. 2. Matériels et Méthodes

### 6. 2. 1. Recrutement des porteurs de gamétocytes et collecte des moustiques

Les porteurs de gamétocytes ont été recrutés au laboratoire de Dakar, parmi les personnes guéries d'un accès palustre à *P. falciparum* et volontaires pour participer à l'expérimentation. Leur sang a été proposé aux femelles d'*An. arabiensis* directement à travers la peau (jambe et bras) et (ou) à travers une membrane de baudruche.

Les moustiques ont été récoltés dans les gîtes larvaires de la région de Dakar et élevés à l'insectarium de l'IRD de Dakar jusqu'à l'émergence des adultes. Les conditions d'élevage sont présentées au chapitre 3. 2. 4. Les moustiques âgés de 3 jours ont été répartis dans les pots en carton de 40 ml et assoiffés 6 à 8 heures avant le gorgement. Chaque pot contenait 35 à 40 moustiques.

### 6. 2. 2. Gorgement des moustiques et confection des frottis avec du sang contenu dans l'estomac

Le gorgement des moustiques a été effectué à l'insectarium à 27-28°C et 70-85% d'humidité relative. Les pots de moustiques ont été placés soit directement sur la peau du porteur (cf. chapitre 4. 2. 3. b), soit au contact d'une membrane placée sous une cellule de gorgement (cf. chapitre 3. 2. 4.). La durée du gorgement a été de 15 minutes, et l'expérimentation s'est déroulée dans une pièce obscure. L'opération a été répétée plusieurs fois à raison de deux pots pour chaque opération. Une pause de 10 mn environ a été effectuée par le patient entre deux opérations.

A la fin du gorgement, les moustiques ont été immédiatement endormis à la vapeur de chloroforme, et chaque moustique gorgé a été placé sur une lame porte-objet propre numérotée. Tous les moustiques non gorgés ou incomplètement gorgés ont été enlevés.

Chaque estomac de moustique a été disséqué au sec, et son contenu a été étalé sur la lame porte-objet avec la pointe d'une aiguille. La taille de l'étalement a été en général de 2-3 mm de largeur sur 10-15 mm de longueur afin de faciliter la lecture. Une fois séchés à température ambiante, les frottis ont été rangés dans une boîte. Le lendemain, ils ont été colorés à plat avec une solution de Giemsa à 6% (94% eau minérale Pierval®) pendant 20 minutes, rincés sans agitation et séchés ensuite à température ambiante. Toutes ces précautions ont eu pour but



d'éviter le décollement des étalements, habituellement observé avec du sang mélangé à un anticoagulant (ici, la salive du moustique).

### 6. 2. 3. Comptage des gamétocytes dans le repas de sang ingéré par un moustique

Le comptage des gamétocytes de *P. falciparum* dans un repas de sang a été effectué à l'objectif 100 à immersion. L'examen par traversées de la totalité de l'étalement a permis de dénombrer un par un tous les gamétocytes présents dans le sang ingéré par chaque moustique. Dans certains cas, le nombre de globules blancs a aussi été compté de la même façon.

La gamétocytémie du porteur a été déterminée à partir de la goutte épaisse prélevée au bout du doigt, et calculée sur la base de 8000 leucocytes par  $\mu\text{l}$  de sang (cf. chapitre 3. 2. 4.).

### 6. 2. 4. Traitement et analyse statistique des données

L'adéquation de la loi binomiale négative (BN), souvent appliquée à l'étude des couples hôte-parasite (Ascombe, 1950; Bliss & Fisher, 1953) a été mise à l'épreuve dans l'étude de la distribution des gamétocytes chez le moustique. La surdispersion a été évaluée par le coefficient  $k$ . La qualité de l'adéquation (probabilité) entre les effectifs observés et les effectifs calculés du nombre de moustiques avec  $n$  gamétocytes a été évaluée à partir du test du  $\chi^2$  classique complété par un test  $t$  (pour la queue de la distribution). Ces calculs ont été effectués à partir du logiciel Paradis (Pichon & Mullon, 1992).

## 6. 3. Résultats

### 6. 3. 1. Les porteurs de gamétocytes

Les gamétocytes de *P. falciparum* ont été dénombrés dans les estomacs immédiatement après le gorgement des femelles d'*An. arabiensis* avec le sang de trois porteurs volontaires. Les porteurs de gamétocytes ont été désignés par les lettres A, B et C respectivement suivant une gamétocytemie croissante.

a. Porteur A (âgé de 45 ans): la gamétocytemie déterminée par  $\mu\text{l}$  de sang a été de 0,6 (soit 2 gamétocytes femelles /28450 leucocytes). Ce patient a été utilisé pour le gorgement direct des moustiques à travers la peau (mollets, avant-bras, mains, coups de pied) et pour le gorgement des moustiques à travers la membrane de baudruche avec du sang veineux.

b. Porteur B (âgé de 29 ans): la gamétocytemie a été de 2,9 avec la goutte épaisse, avec un sex-ratio égal à 0,5. Tous les gorgements de moustiques ont été effectués directement sur la peau (mollets et avant bras).

- Porteur C (âgé de 17 ans): la densité gamétocytaire a été de 46 gamétocytes par  $\mu\text{l}$  de sang avec la goutte épaisse (sex-ratio = 0,04). Comme pour le porteur précédent, tous les gorgements de moustiques ont été effectués directement à travers la peau (mollets) du patient.

### 6. 3. 2. Distribution des gamétocytes ingérés par le moustique dans un repas de sang

Au total 463 frottis ont été confectionnés à partir des femelles gorgées à travers la peau (porteurs A, B et C) ou à travers la membrane de baudruche (porteur A seul).

- Avec le porteur A, le pourcentage de moustiques avec au moins un gamétocyte de *P. falciparum* ingéré dans le repas de sang a été de 16% à travers la membrane et 9% à travers la peau ( $p > 0,1$  par le test du  $\chi^2$ : tableau 6. 1.).

La moyenne arithmétique du nombre de gamétocytes ingérés par moustique a été de 0,2 (entre 0 et 3) à travers la membrane et de 0,1 (entre 0 et 2) à travers la peau ( $p > 0,5$  par le test t).

En regroupant les données obtenues sur membrane et celles obtenues sur gorgement direct, le sex-ratio des gamétocytes (mâles/femelles) a été de 0,3.

La dispersion des gamétocytes de *P. falciparum* ingérés par les anophèles à partir du porteur A (figure 6. 1. A.) a été ajustable à une loi binomiale négative ( $p=0,99$ ; avec  $k_C=0,4$ ); ceci malgré le faible nombre de gamétocytes ingérés par les moustiques. Cette surdispersion a été comparable entre le gorgement à travers la membrane de baudruche ( $p=0,6$  avec  $k_C=0,4$ ) et le gorgement direct ( $p=0,7$ ; avec  $k_C=0,4$ ).

- Avec le porteur B, le pourcentage de moustiques avec au moins un gamétocyte de *P. falciparum* ingéré à travers la peau a été de 94%.

Le nombre moyen de gamétocytes ingérés par moustique a été de 3,8 (entre 0 et 15). Le sex-ratio des gamétocytes a été de 0,5; il a été comparable à celui obtenu par la goutte épaisse ( $p=0,07$  par le test de Wilcoxon). De même le nombre moyen de gamétocytes ingérés par moustique a été comparable à la densité gamétocytaire déterminée par goutte épaisse ( $p < 0,01$  par le test de Wilcoxon).

L'ajustement de la distribution des gamétocytes à une loi binomiale négative a révélé une surdispersion des gamétocytes de *P. falciparum* ( $p=0,8$ ; avec  $k_C=3,8$ ) lors de leur ingestion à partir du porteur B (figure 6. 1. B.).

- Avec le porteur C, au total 98% des moustiques ont ingéré au moins un gamétocyte de *P. falciparum* à travers la peau du porteur.

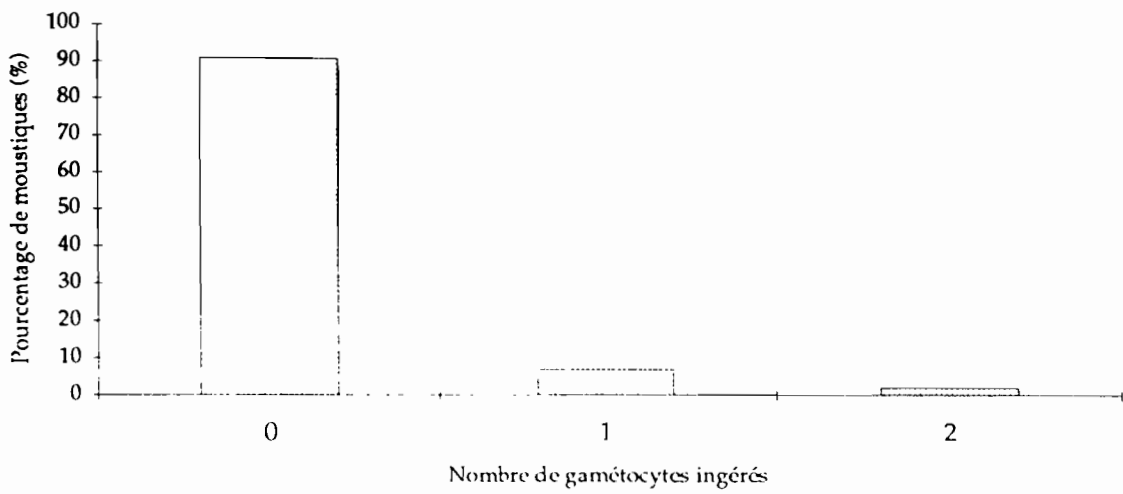
Le nombre moyen de gamétocytes ingérés par moustique a été de 15,5 (entre 1 et 63). Le sex-ratio des gamétocytes a été en moyenne de 0,4 chez les moustiques. Le nombre de gamétocytes mâles ingérés par les moustiques a été significativement plus élevé que celui estimé au niveau de la goutte épaisse ( $p < 0,01$  par le test de Wilcoxon). Le nombre moyen de gamétocytes ingérés par le moustique a été comparable à la densité gamétocytaire estimée à partir de la goutte épaisse ( $p > 0,05$  par le test de Wilcoxon).

La distribution des gamétocytes ingérés par les anophèles à partir du porteur C (figure 6. 1. C.) a été également ajustable à une loi binomiale négative ( $p=0,9$ ; avec  $k_C=2,9$ ).

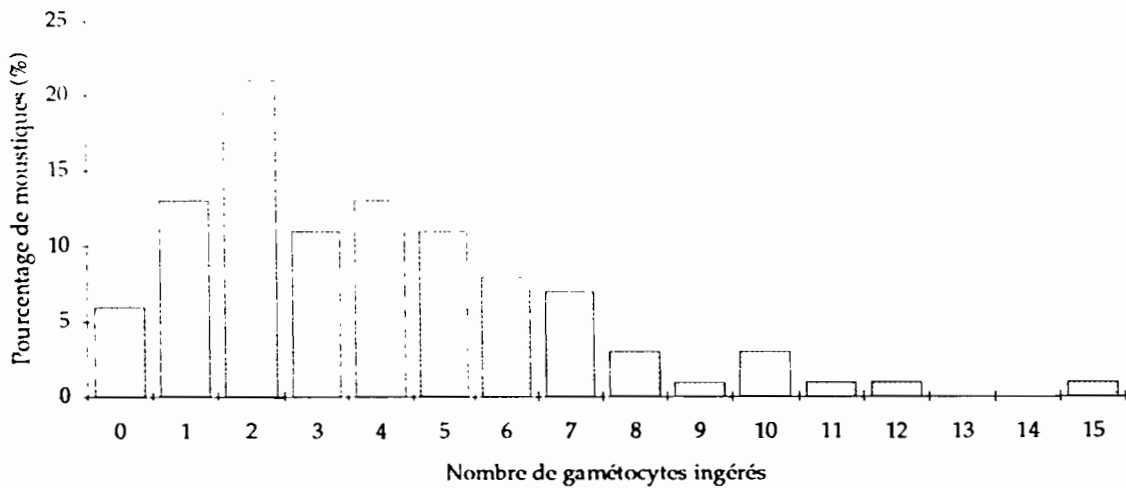
	porteur A	porteur B	porteur C
Gamétoctémie estimée par $\mu\text{l}$ de sang (goutte épaisse)	0,6	2,9	45,7
Nombre total de frottis (moustiques) examinés	152	142	114
Pourcentage de moustiques avec gamétoctes	9%	94%	100%
Moyenne arithmétique ( $\pm$ écartype) du nombre de gamétoctes par repas de sang (min-max)	0,11 $\pm$ 0,03 (0-2)	3,87 $\pm$ 2,82 (0-15)	15,48 $\pm$ 10,51 (1-63)
khi-2 ( $\chi^2$ ) (probabilité: p)	2 $\times$ 10 <sup>-4</sup> (p=0,98) ns	5,2 (p=0,81) ns	9,9 (p=0,87) ns
test T (probabilité: p)	0,03 (p=0,66) ns	- 0,4 (p=0,53) ns	312,6 (p=0,21) ns
coefficient k ( $k_c \pm$ écartype)	0,4 $\pm$ 0,3	3,8 $\pm$ 0,9	2,9 $\pm$ 0,4

**Tableau 6. 1.** Analyse suivant le modèle de la loi Binomiale Négative (BN) de la distribution des gamétoctes de *Plasmodium falciparum* dans un repas sanguin chez les femelles d'*An. arabiensis* gorgées directement à travers la peau du porteur de gamétoctes.

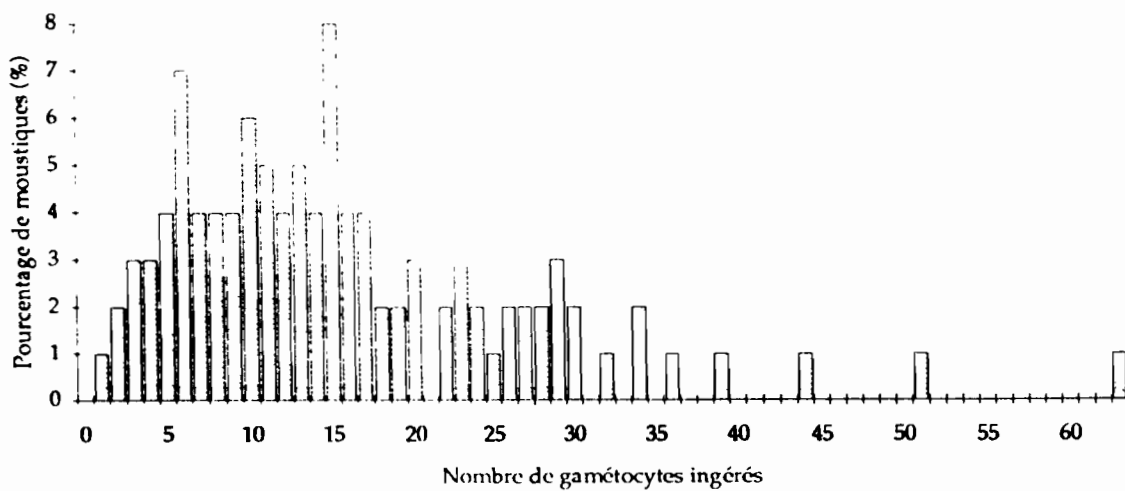
- Le test du  $\chi^2$  évalue l'adéquation de la distribution observée à une Binomiale Négative (BN). Le test T évalue l'adéquation de la "queue" de distribution avec celle d'une BN.
- La valeur de  $k_c$  indique la surdispersion de la loi BN calculée (plus  $k_c$  est proche de zéro, plus cette surdispersion est importante; une valeur infinie de k correspond à une loi normale).



porteur B



porteur C



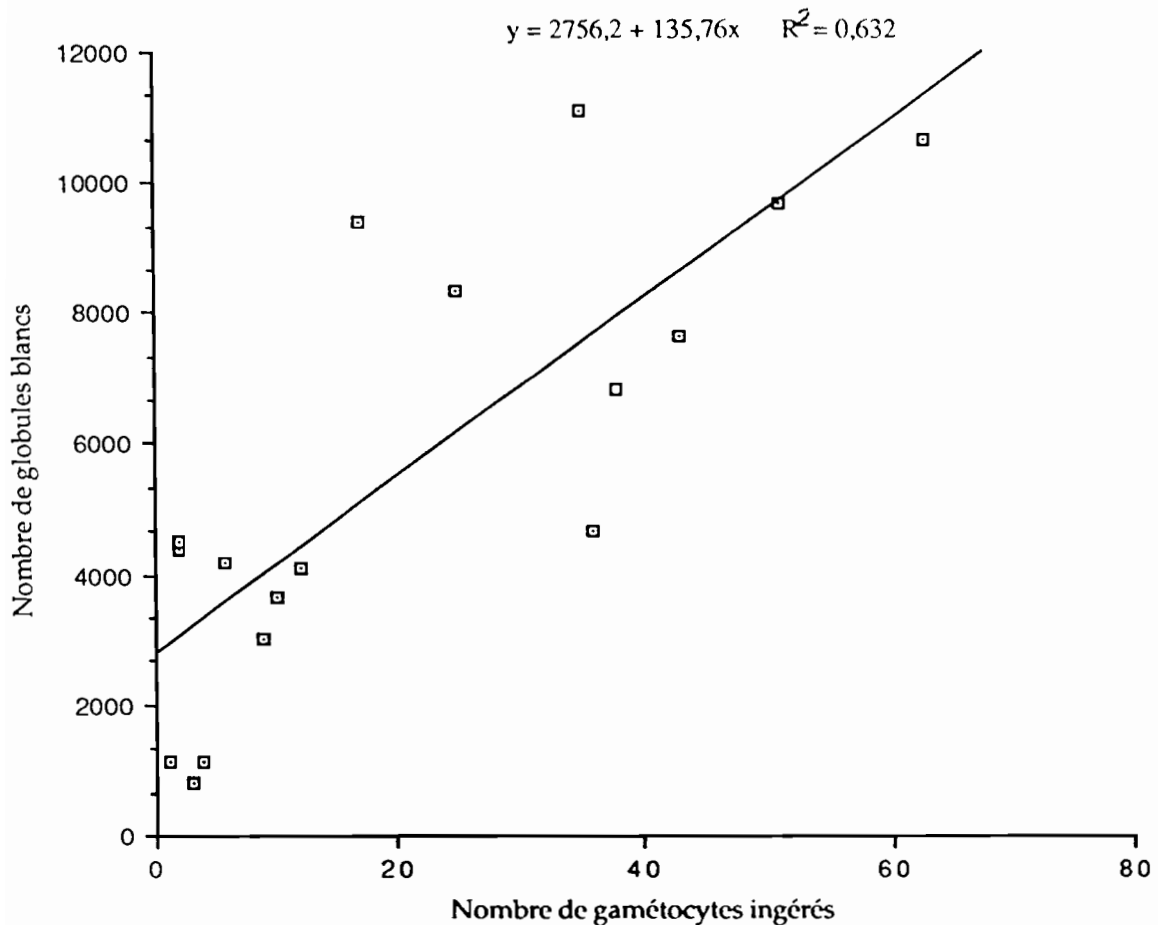
Figures 6. 1. Distribution du nombre de moustiques en fonction du nombre de gamétocytes de *Plasmodium falciparum* dans un repas de sang pris directement sur 3 volontaires: porteur A (0,6 gaméto./ $\mu$ l), porteur B (2,9 gaméto./ $\mu$ l) et porteur C (45,7 gaméto./ $\mu$ l).

### 6. 3. 3. Relation entre le nombre de gamétocytes et le nombres de globules blancs ingérés

Cette relation a été étudiée à partir des repas sanguins de 17 moustiques gorgés sur le porteur C, en dénombrant simultanément dans chaque frottis le nombre de gamétocytes et le nombre de globules blancs ingérés. Cette analyse s'est effectuée sur la base d'un premier comptage de gamétocytes, à partir duquel les repas sanguins les moins riches (<10 gamétocytes: n=6 moustiques), les moyennement riches (10-25 gamétocytes: n=5 moustiques) et les plus riches en gamétocytes (>30 gamétocytes: n=6 moustiques) ont fait l'objet d'un comptage de globules blancs.

Le nombre de globules blancs comptés dans un repas sanguin de moustique a varié de 830 à 11 100. Si on raisonne sur la base d'une moyenne de 8000 globules blancs par  $\mu\text{l}$  de sang total, le volume de sang total ingéré par moustique pourrait varier de 0,1 à 1,4  $\mu\text{l}$ .

Par ailleurs, le nombre de gamétocytes ingérés par repas de sang a significativement varié en fonction de la quantité de sang total, estimée à partir du nombre de globules blancs ( $R^2=0,63$ ;  $p<10^{-4}$ ) comme le montre la courbe d'ajustement linéaire d'équation:  $y=2756 +135,7x$  (figure 6. 2.).



**Figure 6. 2.** Courbe montrant l'ajustement suivant une relation linéaire de la distribution des gamétocytes ingérés par moustique en fonction du nombre de globules blancs, obtenu à partir des moustiques moins riches (< 10 gamétocytes: n=6), moyennement riches (10-25 gamétocytes: n=5) et plus riches (> 30 gamétocytes: n=6) gorgés directement sur le porteur C (nombre de gamétocytes/moustique: entre 1 et 63) ,

## 6. 4. Discussion

Nos observations sur la densité des gamétocytes ingérés par un moustique au cours d'un repas de sang suggèrent une distribution des gamétocytes suivant une loi binomiale négative. En d'autres termes, le nombre de gamétocytes prélevés par moustique dans un repas varie significativement d'un moustique à un autre.

Par ailleurs le même type de distribution a été enregistré au stade oocyste de *P. falciparum* chez les anophèles par Rutledge et *al.* (1973) et Vaughan et *al.* (1994). Aucune autre étude n'a été effectuée dans ce domaine, pour nous permettre de comparer nos observations. Toutefois, les raisons de cette surdispersion des gamétocytes chez le vecteur pourraient provenir du volume de sang ingéré par chaque moustique proportionnellement à sa taille (Carter & Graves, 1988), ou de la distribution différentielle des gamétocytes circulants dans les capillaires sanguins, ou d'un facteur spécifique au moustique favorisant l'ingestion d'une grande quantité de gamétocytes matures, donc infectants. Cette dernière hypothèse s'accorde avec les observations de Landau et *al.* (1979) et Dei-Cas et *al.* (1980) qui ont montré que le nombre de gamétocytes matures était généralement plus élevé dans un repas de sang de moustique que dans une goutte de sang de volume équivalent prélevé sur le porteur de gamétocytes.

Ces observations traduisent une hétérogénéité du bol alimentaire du moustique aussi bien dans la distribution des gamétocytes que dans le volume de sang ingéré.





## Conclusion

De 1996 à 1998, *Plasmodium falciparum* a représenté l'essentiel des cas de paludisme recensés dans les régions de Dakar et de Thiès. Le traitement des accès palustres avec des antimalariques tels que la chloroquine, la sulfadoxine-pyriméthamine et la quinine a donné des résultats variables.

Dans la région de Dakar, les souches de *P. falciparum* ont montré une résistance parasitologique à la chloroquine élevée. Ces observations traduisent une persistance de la chloroquinorésistance à un niveau élevé (40-50%) dans la région de Dakar depuis 1990. Dans la région de Thiès, la prévalence des cas de paludisme à *P. falciparum* chloroquinorésistants pourrait être estimée à 33% en 1998. Par contre la sulfadoxine-pyriméthamine (Fansidar®) a été efficace dans le traitement des accès palustres simples à *P. falciparum* chez les patients de la région de Dakar. La substitution de l'halofantrine pour le traitement des accès palustres résistants à la chloroquine a montré une efficacité excellente *in vivo* ; même si les tests effectués *in vitro* ont révélé une résistance (16%) des souches de *P. falciparum* chez les mêmes patients.

L'étude de la dynamique parasitaire a révélé une gamétocytémie élevée après le traitement, particulièrement pour les infections résistantes au traitement. Nos observations relatives à l'influence que cette gamétocytémie peut avoir sur le développement du parasite chez le vecteur relèvent plusieurs faits:

- le risque d'infection des moustiques par les porteurs de gamétocytes est augmenté après le traitement antipalustre;

- la chloroquine et la quinine ont peu d'impact sur le déroulement du cycle sporogonique de *P. falciparum* chez le vecteur. L'infectivité des gamétocytes de *P. falciparum* pour le vecteur augmente avec les infections résistantes au traitement antipalustre. Ces observations pourraient en effet expliquer la dispersion rapide des souches chloroquinorésistantes par le vecteur;

- la sulfadoxine-pyriméthamine pourtant reconnue comme gamétocytogène, a un effet négatif sur la sporogonie de *P. falciparum* chez le vecteur. Son action sporonticide pourrait inhiber l'infectivité des gamétocytes néoformés. Ces observations sont favorables à l'utilisation de cet antimalarique dans les régions où il est encore efficace pour limiter, au moins à court terme la transmission du paludisme.

Les observations relatives à la comparaison des deux méthodes classiques de l'infection des moustiques (directe vs. membrane) relèvent quelques variabilités qui doivent être prises en compte pour l'évaluation de la transmission. Cependant, l'infection des moustiques à travers la membrane reste plus opérationnelle, notamment dans la recherche des facteurs susceptibles de limiter le passage du parasite de l'hôte vers le vecteur, ou du vecteur vers l'hôte.

*An. arabiensis* et *An. gambiae s.s.*, deux des trois vecteurs du paludisme au Sénégal ont montré une susceptibilité comparable à l'infection par *P. falciparum* et confortent ainsi leur rôle majeur dans le faciès épidémiologique du paludisme au Sénégal.

Le nombre de gamétocytes ingérés par un moustique est très variable. Une tendance à l'aggrégation des gamétocytes ou un mécanisme d'enrichissement du bol alimentaire du moustique sont envisageables. Le point important est que la distribution des gamétocytes ingérés par les moustiques ne suit pas une loi de hasard (loi normale ou loi de Poisson), mais favorise la proximité des gamétocytes dans un même estomac probablement pour faciliter la fécondation entre les gamètes du parasite.

En définitive, la réponse du parasite aux antipaludéens, tout comme son développement chez le vecteur présentent une très grande hétérogénéité. Les mécanismes mis en cause pour expliquer cette variabilité ne sont pas élucidés. Cependant, ces observations pourraient être prises en compte pour la recherche des facteurs bloquant la transmission du paludisme. En effet, à côté de l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides, la découverte des facteurs susceptibles de limiter le développement du parasite chez le vecteur entre dans le cadre des perspectives envisageables au moins dans le moyen terme, pour limiter la transmission du paludisme.



## Bibliographie

- ALANO (P.). - *Plasmodium* sexual stage Antigens. *Parasitol. Today*, 1991, 7, 199-203.
- ANONYME - Artemisinin. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1994, 88, 1-65.
- ANSCOMBE (F.J.). - Sampling theory of negative binomial and logarithmic series distributions. *Biometrika*, 1950, 37, 358-382.
- ARMSTRONG (J.) & BRANSBY-WILLIAM (W.R.). - The maintenance of colony of *An. gambiae*, with observations on the effects of changes in temperature. *Bull. WHO*, 1961, 24, 427-435.
- AWONO-AMBENE (H.P.) & ROBERT (V.). - Estimation of *Plasmodium falciparum* oocyst survival in *Anopheles arabiensis*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 1998, 92 (8), 889-890. □
- BARR (P.J.), GREEN (K.M.), GIBSON (H.L.), BATHURST (I.C.), QUAKYI (I.A.) & KASLOW (D.C.). - Recombinant Pfs25 protein of *Plasmodium falciparum* elicits malaria transmission-blocking immunity. *J. Exp. Med.*, 1991, 174, 1203-1208.
- BASCO (L.K.), LE BRAS (J.), GILLOTIN (C.), RINGWALD (P.), RABENJARSON (E.), GIMENEZ (F.), BOUCHAUD (O.), FARINOTTI (R.) & COULAUD (J.P.). - Type RI resistance to halofantrine in West Africa. *Trop. Med. Parasitol.*, 1991, 42, 413-414.
- BEAUDOIN (R.L.), STROME (C.P.A.) & TUBERGEN (T.A.). - *Plasmodium berghei berghei*: ectopic development of the ANKA Strain in *Anopheles stephensi*. *Exp. Parasitol.*, 1974, 36, 189-201.
- BEIER (J.C.) & VANDERBERG (J.P.). - Sporogonic development in the mosquito. In: Sherman (I.W.) Eds. *Malaria: Paras. Biol. Pathogen. Protection*, 1998, 49-61.
- BEIER (J.C.), DAVIS (J.R.), VAUGHAN (J.A.), NODEN (B.H.) & BEIER (M.S.). - Quantification of *Plasmodium falciparum* sporozoites transmitted in vitro by experimentally infected *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1991, 44, 233-243.
- BINKA (F.N.), KUBAJE (A.), ADJUIK (M.), WILLIAMS (L.A.), LENGELER (C.), MAUDE (G.H.), ARMAH (G.E.), KAJIHARA (B.), ADIAMAH (J.H.) & SMITH (P.G.). - Impact of permethrin impregnated bednets on child mortality in Kassena-Nankana district, Ghana: a randomized controlled trial. *Trop. Med. Int. Health*, 1996, 1, 147-154.
- BISHOP (A.) & McCONNACHIE (E.W.). - Further observations on the *in vitro* development of the gametocytes of *Plasmodium gallinaceum*. *Parasitology*, 1960, 50, 431-438.
- BLISS (C.I.) & FISHER (R.A.). - Fitting the negative binomial distribution to biological data. *Biometrika*, 1953, 9, 176-196.
- BOUDIN (C.), LYANNAZ (J.), BOSSENO (M.F.), CHAIZE (J.) & CARNEVALE (P.). - Productions de sporozoïtes de *Plasmodium falciparum* humains à Bobo-Dioulasso (Burkina Faso). *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, 1989, 69, 3-23.
- 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.
- BOUDIN (C.), LE HESRAN (J.Y.), RINGWALD (P.), GOUAGNA (L.C.), SAFEUKUI (I.), MULDER (B.) & VERHAVE (J.P.). - Comparaison de la gamétocytogénèse *in vivo* chez les souches de *Plasmodium falciparum* chloroquino-sensibles ou résistantes. *Bull. Liais. Doc. OCEAC*, 1996, 29, 9-15.
- BOURGEADE (A.) & DELMONT (J.). - Du bon usage des médicaments antipaludiques actuellement disponibles. *Bull. Soc. Path. Ex.*, 1998, 91, 493-496.

- BRANDICOURT (O), DRUILHE (P.), DIOUF (F.), BRASSEUR (P.), TURK (P.) & DANIS (M.). - Decreased sensitivity to chloroquine and quinine of some *Plasmodium falciparum* strains from Senegal in September 1984. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1986, **35**, 717-721.
- BRASSEUR (P.), BITSINDOU (P.), MOYOU SOMO (R.S.) et al. - Fast emergence of *Plasmodium falciparum* resistance to halofantrine. *Lancet*, 1993, **341**, 901-902.
- BRASSEUR (P.), KOUAMOUCO (J.), MOYOU SOMO (R.) & DRUILHE (P.). - Multidrug resistant *falciparum* malaria in Cameroon in 1987-1988: II. Mefloquine resistance confirmed *in vivo* and *in vitro* and its correlation with quinine resistance. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1992, **46**, 8-14.
- BRENGUES (J.) & COZ (J.). - Quelques aspects fondamentaux de la biologie d'*Anopheles gambiae* Giles et d'*Anopheles funestus* Giles, en zone de savane humide d'Afrique de l'ouest. *Cah. ORSTOM Sér. Ent. Méd. Parasitol.*, 1973, **11** (2), 107-126.
- BUCKLING (A.J.), RANFORD-CARTWRIGHT (L.C.), MILES (A.) & READ (A.F.). - Chloroquine increases *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis *in vitro*. *Parasitology*, 1999, **118**, 339-346
- BURGESS (R.W.) & YOUNG (M.D.). - The development of pyrimethamine resistance by *Plasmodium falciparum*. *Bull. WHO*, 1959, **20**, 37-46.
- BYGBJERG (I.C.), SCHAPIRA (A.), FLACHS (H.), GOMME (G.) & JEPSEN (S.). - Mefloquine resistance of *falciparum* malaria from Tanzania enhanced by treatment. *Lancet*, 1983, **1**, 774-775.
- CAMICAS (J.L.), HERVY (J.P.), HERVE (J.P.), FERRARA (L.), HEBRARD (G.) & CORNET (J.P.). - *Activités du laboratoire ORSTOM de zoologie médicale. Rapport sur le fonctionnement technique de l'Institut Pasteur de Dakar*, 1987, 118-131.
- CARNEVALE (P.), ROBERT (V.), BOUDIN (C.), HALNA (J.M.), PAZARD (L.), GAZIN (P.), RICHARD (A.) & MOUCHET (J.). - La lutte contre le paludisme par les moustiquaires imprégnées de pyrèthrinoïdes au Burkina Faso. *Bull. Soc. Patho. Ex.*, 1988, **81**, 832-846.
- CARTER (R.) & CHEN (D.H.).- Malaria transmission blocked by immunisation with the gametes of malaria parasite. *Nature*, 1976, **263**, 53-60.
- CARTER (R.) & GRAVES (P.M.).- Gametocytes. In *Malaria, principles and practice of malariology*. Eds. Churchill Livistone Edinburg, 1988, **1**, 253-306.
- CARTER (R.) & MILLER (L.H.).- Evidence of environmental modulation gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum* in continuous culture. *Bull. W.H.O.*, 1979, **57** (1), 37-52.
- CAVALIE (P.) & MOUCHET (J.).- Les campagnes expérimentales d'éradication du paludisme dans le nord de la république du Cameroun. *Méd. Trop.*, 1962, **22**, 95-118.
- CELLI (A.). - Storia della malaria nell'agro romano. *Accademia dei Lincei*, Roma, 1925.
- CHARMOT (G.), LE BRAS (J.) & COULAUD (J.P.). - Les antibiotiques dans la chimioprévention et le traitement du paludisme: mode d'action, activités, indications. *Annales de l'Institut Pasteur: actualités* 5, 1994, **4**, 307-314.
- CHARMOT (G.), AMAT-ROSE (J.M.), RODHAIN (F.), LE BRAS (J.) & COULAUD (J.P.). - Abord géographique de l'épidémiologie de la chloroquino-résistance de *Plasmodium falciparum* en Afrique tropicale. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, 1991, **71**, 187-197.
- CHUTMONGKONKUL (M.), MAIER (W.A.) & SEITZ (H.M.). - *Plasmodium falciparum*: effect of chloroquine, halofantrine and pyrimethamine on the infectivity of gametocytes for *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 1992, **86**, 103-110.

- COLLINS (W.E.) & ROBERTS (J.M.). - *Anopheles gambiae* as a host for geographic isolates of *Plasmodium vivax*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 1991, 7, 569-573.
- COLLINS (F.H.) & BESANSKY (N.J.). - Vector biology and the control of malaria in Africa. *Science*, 1994, 264, 1874.
- COLLINS (W.E.), WARREN (Mc.W.), RICHARDSON (B.B.), SKINNER (J.C.) & KEARSE (T.S.). - Selected pupal phenotypes of *Anopheles freeborni* and their susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Mosquito News*, 1979, 39, 466-472.
- COLLINS (W.E.), McCLURE (H.), STROBERT (E.), SKINNER (J.C.), RICHARDSON (B.B.), ROBERTS (J.M.), GALLAND (G.G.), SULLIVAN (J.), MORRIS (C.L.) & ADAMS (S.R.). - Experimental infection of *Anopheles gambiae s.s.*, *Anopheles freeborni* and *Anopheles stephensi* with *Plasmodium malariae* and *Plasmodium brasilianum*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 1993, 9 (1), 68-71.
- COLUZZI (M.). - Maintenance of laboratory colonies of *Anopheles* mosquitoes. *Bull. WHO*, 1964, 24, 441-443.
- COLUZZI (M.). - Heterogeneities of the malaria vectorial system in tropical Africa and their significance in malaria epidemiology and control. *Bull. WHO*, 1984, 62, 107-113.
- CORNET (M.), ROBIN (Y.), CHATEAU (R.), HEME (G.), ADAM (C.), VALADE (M.), LE GONIDEC (G.), JAN (C.), RENAUDET (J.), DIENG (P.L.), BANGOURA (J.F.) & LORAND (A.). - Isolement d'arbovirus au Sénégal Oriental à partir de moustiques (1972-1977) et notes sur l'épidémiologie des virus transmis par les *Aedes*. *Ent. Méd. Parasitol.*, 1979, 17, 149-163.
- COT (M.), GINESTE (B.), BARRO (D.), ROISIN (A.), YADA (A.) & CARNEVALE (P.). - Comparaison de deux méthodes de dosage de la chloroquine dans les urines sur le terrain. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, 1991, 71, 17-25.
- COX (F.). - Systematics of parasitic protozoa, In: KREIER (J.P.) and BAKER (J.R.) Eds. *Parasitic Protozoa*, London, Academic Press, 1991, 1, 55-80.
- CRAMPTON (J.M.). - Approaches to vector control: new and trusted. 3. Prospects for genetic manipulation of insect vectors. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1994, 88, 141.
- CRAMPTON (J.M.), MORRIS (A.C.), LYCETT (G.J.), WARREN (A.) & EGGLESTON (P.). - Transgenic mosquitoes: a future vector control strategy? *Parasitol. Today*, 1990, 6, 31.
- CURTIS (C.F.). - Translocations, hybrid sterility and the introduction into pest populations of genes favourable to man. In *Genetics in Relation to Insect Management*, eds. Hoy (M.A.) & McKelvey (J.J.Jr.), Bellagio Italy: Rockefeller Foundation Symposium, 1979, 19-30.
- DANIS (M.) & MOUCHET (J.). - *Paludisme*, UREF. Eds. Ellipses/AUPELF, 1991, 239p.
- DARRIET (F.), ROBERT (V.), THO VIEN (N.) & CARNEVALE (P.). - Evaluation de l'efficacité sur les vecteurs de paludisme de la perméthrine en imprégnation sur les moustiquaires intactes et trouées. WHO/VBC/1984.899 ou WHO/MAL/1984.1009.
- DEI-CAS (E.), MAUROIS (P.), LANDAU (I.), DUTOIT (E.), MILTGEN (F.), VERNES (A.) & BIGUET (J.). - Morphologie et infectivité des gamétocytes de *Plasmodium inui*. *Ann. Parasitol. hum. Comp.*, 1980, 55, 621-633.
- DESFONTAINES (M.A.), TCHIKANGWA (I.), LE GOFF (G.), ROBERT (V.) & CARNEVALE (P.). - Influence de l'alimentation des larves d'*An. gambiae* (Diptera, *Culicidae*) sur le développement préimaginal en insectarium. *Bull. Liais. Doc. OCEAC*, 1991, 98, 12-14.

DIAGNE (N.), FONTENILLE (D.), KONATE (L.), FAYE (O.), LAMIZANA (M.T.), LEGROS (F.), MOLEZ (J.F.) & TRAPE (J.F.). - Les anophèles du Sénégal: liste commentée et illustrée. *Bull. Soc. Path. Ex.*, 1994, **87**, 267-277.

DIALLO (S.), DIOUF (F.), VICTORIUS (A.), BAH (I.B.), NDIR (O.) & DIENG (Y.) - Les maladies parasitaires endémiques de Basse et Moyenne Casamance. *Doc. Ronéo Ser. Parasitol. Fac. Méd. Pharm. Univ. Dakar*, 1979, 46 p.

DIATTA (M.), SPIEGEL (A.), LOCHOUARN (L.) & FONTENILLE (D.). - Similar feeding preferences of *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* in Senegal. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1998, **92**, 270-272.

DIOP (A.), FAYE (O.) & MOLEZ (J.F.). - Mise en place en insectarium d'une souche d'*Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae). *Bull. Soc. Path. Ex.*, 1998, **91**, 340-343.

DRUILHE (P.) & BRASSEUR (P.). - Poly-chimiorésistances du paludisme: en un combat douteux. *Annales de l'Institut Pasteur: actualités* 5, 1994, **4**, 292-306.

DRUILHE (P.), BRASSEUR (P.), BRANDICOURT (O.), KOUAMOULO (J.), RICHARD-LENOBLE (D.), DIOUF (F.), GAY (F.), MOYOU (R.S.), DANIS (M.), KOMBILA (M.Y.), DIALLO (P.) & GENTILINI (M.). - *Plasmodium falciparum* drug resistance in West Africa. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, 1986, **66**, 297-300.

FAIRLEY (N.H.). - Researches on Paludrine (M4888) in malaria: An experimental investigation undertaken by LHQ medical research unit (AIF), Cairns, Australia. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1946, **40**, 105-162.

FAIRLEY (N.H.). - Sidelights on malaria in man obtained by subinoculation experiments. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1947, **40**, 621-676.

FAYE (O.), DIALLO (S.), FAYE (O.) & MOUCHET (J.). - Evaluation de l'efficacité du fenitrothion (Sumithion® PM40) sur la densité du vecteur et la prévalence du paludisme à Pout (thiès, Sénégal). *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, 1992, **72**, 103-112.

FAYE (O.), FONTENILLE (D.), HERVE (J.P.), DIACK (P.A.), DIALLO (S.) & MOUCHET (J.). - Le paludisme en zone sahélienne du Sénégal. 1. Données entomologiques sur la transmission. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, 1993, **73**, 21-30.

FAYE (O.), KONATÉ (L.), GAYE (O.), FONTENILLE (D.), SY (N.), DIOP (A.), DIAGNE (M.) & MOLEZ (J.F.) - Impact de l'utilisation des moustiquaires pré-imprégnées de perméthrine sur la transmission du paludisme dans un village hyperendémique du Sénégal. *Méd. Trop.* 1998, **58**, 355-360.

FENG (Z.), HOFFMANN (R.N.), NUSSENZWEIG (R.S.), TSUJI (M.), FUJIOKA (H.), AIKAWA (M.), LENSEN (T.), PONNUDURAI (T.) & POLOGE (L.G.). - Pfs2400 can mediate antibody-dependent malaria transmission inhibition and may be the *Plasmodium falciparum* 11,1 gene product. *J. Experimental Medicine*, 1993, **177**, 273-281.

FINDLAY (G.M.), MAEGRAITH (B.G.), MARKSON (J.L.) & HOLDEN (J.R.). - Investigations in the chemotherapy of malaria in West Africa. V. Sulfonamide compounds. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 1946, **40**, 358-367.

FOGH (S.), JEPSEN (S.) & EFFERSON (O.). - Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Kenya. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1979, **73**, 226-229.

FONTENILLE (D.), FAYE (O.), KONATE (L.), SY (N.) & COLLINS (F.H.). - Comparaison des techniques PCR et cytogénétique pour la détermination des membres du complexe *Anopheles gambiae* au Sénégal. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1993, **68**, 239-240.



FONTENILLE (D.), LOCHOUARN (L.), DIATTA (M.), SOKHNA (C.), DIA (I.), DIAGNE (N.), LEMASSON (J.J.), BA (K.), TALL (A.), ROGIER (C.) & TRAPE (J.F.). - Four year's entomological study of the transmission of seasonal malaria in Senegal and the bionomics of *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1997, **91**, 647-652.

FOSTER (W.A.) - Colonisation and maintenance of mosquitoes in the laboratory. *Malaria* J. P. Kreier Eds., Academic Press., 2, 1980, 103-151.

GAD (A.M.), MAIER (W.A.) & PIEKARSKI (G.). - Pathology of *Anopheles stephensi* after infection with *Plasmodium berghei berghei*. I. Mortality rate. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 1979, **60**, 249-261.

GARNHAM (P.C.C.). - Observations on *Plasmodium falciparum* with special reference to the production of crescents. *Kenya & East Afric. Med. J.*, 1931, **8**, 2-21.

GARNHAM (P.C.C.). - *Malaria parasites and other haemosporidia*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1966.

GAYE (O.), BAH (I.B.), DIALLO (S.), VICTORIUS (A.), BENGUA (E.), FAYE (O.) & FAYE (O.). - Emergence du paludisme chloroquinorésistant à Dakar (Sénégal). *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, 1990, **70**, 33-37.

GAYE (O.), BABOU (I.), FAYE (O.), FALL (A.), MOLEZ (J.F.), BAH (I.B.) & DIALLO (S.). - Morbidité palustre et efficacité thérapeutique des antipaludéens. Etude menée dans la région de Dakar. *Méd. Trop.*, 1993, **53**, 479-485.

GAYE (O.), DANSOKHO (E.F.), FAYE (O.), FAYE (O.), SENE (M.J.), DIENG (Y.) & DIALLO (S.). - Evaluation du traitement du paludisme par la quinine en cure de 3 jours à Dakar. *Méd. Trop.*, 1997, **57**, 47-48.

GAYE (O.), FAYE (O.), BAH (I.B.), DIALLO (S.), DIOUF (M.), NDIAYE (P.), NDIAYE (A.A.) & TRAPE (J.F.). - Evolution de la chloroquinorésistance en zones urbaine. Résultats d'enquêtes menées à Dakar et Pikine (Sénégal). *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, 1991, **71**, 329-330.

GILLIES (M.T.) & DE MEILLON (B.). - The *Anophelinae* of Africa south of the Sahara (Ethiopian zoogeographical region). *Pub. South Afr. Inst. Med. Res.*, 1968, **54**, 343 p.

GITHEKO (A.K.), BRANDLING-BENNETT (A.D.), BEIER (M.), ATIEMI (F.), OWAGA (M.) & COLLINS (F.H.). - The reservoir of *Plasmodium falciparum* malaria in holoendemic area of western Kenya. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1992, **86**, 355-358.

GOUAGNA (L.C.), MULDER (B.), NOUBISSI (E.), TCHUIKAM (T.), VERHAVE (J.) & 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.

GRAVES (P.M.). - Studies on the use of a membrane feeding technique for infecting *Anopheles gambiae* with *Plasmodium falciparum*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1980, **74**, 738-742.

HAMON (J.), COZ (J.), ADAM (J.P.) HOLSTEIN (M.), RICKENBACH (A.), BRENGUES (J.), SUBRA (R), SALES (S.) & EYRAUD (M.). - Contribution à l'étude de la répartition des anophèles en Afrique Occidentale. *Cah. ORSTOM, Sér. Ent. Méd. Parasitol.*, 1966, **4**, 13-70.

HARTE (P.G.), ROGERS (N.C.) & TARGETT (G.A.T.). - Role of T cells in preventing transmission of rodent malaria. *Immunology*, 1985, **56**, 1-7.

- HASKINS (W.T.). - A simple qualitative test for chloroquine in urine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1958, 7, 199-200.
- HELLGREN (U.), ARDAL (O.K.), LEBBAD (M.) & ROMBO (L.). - Is chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria emerging in Senegal or the Gambia? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1987, 81 (5), 728.
- HOGH (B.), THOMSON (R.), HETZEL (C.), FLECK (S.L.), KRUSE (N.A.A.), JONES (I.), DGEDGE (M.), BARRETO (J.) & SINDEN (R.E.). - Specific and non-specific responses to *Plasmodium falciparum* blood-stage parasites and observations on the gametocytemia in schoolchildren living in a malaria-endemic area of Mozambique. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1995, 52, 50-59.
- HOGH (B.), GAMAGE-MENDIS (A.), BUTCHER (G.A.), THOMPSON (R.), BEGRUP (K.), MENDIS (C.), ENOSSE (S.M.), DGEDGE (M.), BARRETO (J.), ELING (W.) & SINDEN (R.E.). - 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.
- HOLLINDALE (M.R.). - Entry of the *Plasmodium berghei* sporozoite into cultured cells and their transformation into trophozoites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1983, 32, 682-690.
- HOLSTEIN (M.). - Biologie d'*An. gambiae*. Recherches en Afrique Occidentale française. O.M.S., sér. monogr., Genève, 1952, 9, 176 p.
- HOVANITZ (W.). - Physiological factors which influence the infection of *Aedes aegypti* with *Plasmodium gallinaceum*. *Am. J. Hyg.*, 1947, 45, 67-81.
- HUNT (R.H.), COETZEE (M.) & FETTENE (M.). - The *Anopheles gambiae* complex: a new species from Ethiopia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1998, 92, 231-235.
- ICHIMORI (K.). - Correlation of mosquito size, blood meal size and malarial oocyst production. *Jap. J. San. Zool.*, 1989, 2, 81-85.
- JAWARA (M.), MCBEATH (J.), LINES (J.D.), PINDER (M.), SANYANG (F.) & GREENWOOD (B.M.). - Comparison of bednets treated with alphacypermethrin, permethrin or lambda-cyhalothrin against *Anopheles gambiae* in the Gambia. *Med. Vet. Entomol.*, 1998, 12, 60-66.
- JENSEN (J.B.). - Observations on gametogenesis in *Plasmodium falciparum* from continuous culture. *J. Protozol.*, 1979, 26, 129-132.
- JONES (W.H.S.). - *Malaria and Greek history*. Manchester University Press, 1909.
- KABIRU (E.W.), MBOGO (C.M.), MUIRIRI (S.K.), MARSH (K.), SNOW (R.W.), OUMA (J.H.), GITHURE (J.I.) & BEIER (J.C.). - Sporozoite loads of naturally infected *Anopheles* vectors in Kilifi District, Kenya. *J. Am. Mosq. Control. Ass.*, 1997, 13, 259-262.
- KASLOW (D.C.), QUAKYI (I.A.), BRAY (R.S.), SYIN (C.), RAUM (M.G.), KEISTER (D.B.), COLIGAN (J.E.), McCUTCHAN (T.F.) & MILLER (L.H.). - A vaccine candidate from sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains. *Nature*, 1988, 333, 74-76.
- KASLOW (D.C.), BATHURST (I.C.) & BARR (P.J.). - Malaria transmission-blocking vaccines. *Trends Biotechnol.*, 1992, 10, 388-391.
- KASLOW (D.C.). - Towards a transmission-blocking vaccine for malaria. *Vaccine Res.*, 1993, 2, 197-205.

- KAY (B.H.) & KEMP (D.H.). - Vaccines against arthropods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1994, **50**, 87-96.
- KEAN (B.H.). - Chloroquine-resistant *falciparum* malaria from Africa. *J. Am. Med. Ass.*, 1979, 241-395.
- KITTHAWEE (S.), EHMAN (J.D.) & SATTABONGKOT (J.). - Evaluation of survival potential and malaria susceptibility among different size classes of laboratory-reared *Anopheles dirus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1990, **43**, 328-332.
- KLEIN (T.A.), HARISSON (B.A.), ANDRE (R.G.), WHITMIRE (R.E.) & INLAO (I.). - Detrimental effects of *Plasmodium cynomolgi* infections on the longevity of *Anopheles dirus*. *Mosq. News*, 1982, **42**, 265-271.
- KLEIN (T.A.), HARISSON (B.A.), GROVE (J.S.), DIXON (S.V.) & ANDRE (R.G.). - Correlation of survival rates of *Anopheles dirus* A with different infection densities of *Plasmodium cynomolgi*. *Bull. WHO*, 1986, **64**, 901-907.
- KLEIN (T.A.), TADA (M.S.) & LIMA (J.P.B.). - Infection of *Anopheles darlingi* fed on patients with *Plasmodium falciparum* before and after treatment with quinine or quinine plus tetracycline. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1991, **44**, 604-608.
- KROTOSKI (W.A.), GARNHAM (P.C.C.), BRAY (R.S.), KROTOSKI (D.M.), KILLICK-KENDRICK (R.), DRAPER (C.C.), TARGET (G.A.) & GUY (M.W.). - Observations on early and late post-sporozoite tissue stages in primate malaria. I. Discovery of a new latent forms of *Plasmodium cynomolgi* (the hypnozoite) and failure to detect hepatic forms within the first 24 hours after incubation. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1982a, **31**, 24-35.
- KROTOSKI (W.A.), COLLINS (W.E.), BRAY (R.S.), GARNHAM (P.C.C.), COGSWELL (F.B.), GWADZ (R.), KILLICK-KENDRICK (R.), WOLF (R.H.), SINDEN (R.), KOONTZ (L.C.) & STANFILL (P.S.). - Demonstration of hypnozoites in sporozoite-transmitted *Plasmodium vivax* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1982b, **31**, 1291-1293.
- LAING (A.B.G.). - Proguanil resistance: Extension to the gametocytes of *Plasmodium falciparum*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1956, **50**, 496-504.
- LANDAU (I.), MILTGEN (F.), BOULARD (Y.), CHABAUD (A.G.) & BACAM (D.). - Etudes sur les gamétocytes des *Plasmodium* du groupe "*vivax*": morphologie, évolution, prise par les anophèles et infectivité des microgamétocytes de *Plasmodium yoelii*. *Ann. Parasitol. hum. Comp.*, 1979, **54**, 145-161.
- LARIVIÈRE (M.), HOCQUET (P.) & CAMERLYNCK (P.). - Enquête parasitaire chez les enfants des écoles de la Basse Casamance. *Bull. Soc. Méd. Afr. Noire Fr.*, 1961, **6** : 717-723.
- LE BRAS (J.) & DELORON (P.). - In vitro study of drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*: evaluation of a new semi-microtest. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1983, **32**, 447-453.
- LE BRAS (J.), ANDRIEU (B.), HATIN (I.), SAVEL (J.) & COULAUD (J.P.). - *Plasmodium falciparum*: interpretation du semi-microtest de chimiosensibilité *in vitro* par incorporation de 3-hypoxanthine. *Path. Biol.*, 1984, **32**, 463-466.
- LEMASSON (J.J.), FONTENILLE (D.), LOCHOUARN (L.), DIA (I.), SIMARD (F.), BA (K.), DIOP (A.), DIATTA (M.) & MOLEZ (J.F.). - Comparison of behaviour and vector efficiency of *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) in Barkedji, a sahelian area of Senegal. *J. Med. Entomol.*, 1997, **34**, 396-403.

- 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. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1996, **90**, 20-22.
- LINES (J.D.), WILKES (T.J.) & LYIMO (E.O.). - Human malaria infectiousness measured by age-specific sporozoites rates in *Anopheles gambiae* in Tanzania. *Parasitology*, 1991, **102**, 167-177.
- LYIMO (E.O.) & KOELLA (J.C.). - Relationship between body size of adult *anopheles gambiae s.l.* and infection with the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*, 1992, **104**, 233-237.
- MACDONALD (W.W.). - The influence of genetic and other factors on vector susceptibility to parasites. In *Genetics of Insect Vector of Disease*, eds. WRIGHT (J.M.) & PAL (R.) Amsterdam Elsevier, 1967, 567-584.
- MACK (S.R.) & VANDERBERG (J.P.). - Hemolymph of *Anopheles stephensi* from non-infected and *Plasmodium berghei*-infected mosquitoes. 1. Collection procedure and physical characteristics. *J. Parasitol.*, 1978, **64**, 918-923.
- MACKERRAS (M.J.) & ERCOLE (Q.N.). - Observations on the action of Paludrine on malarial parasites. I. The action of Paludrine on *Plasmodium vivax*. II. The action of Paludrine on *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1947, **41**, 365-376.
- MACKERRAS (M.J.) & ERCOLE (Q.N.). - Observations on the action of quinine, atebrin and plasmoquine on the gametocytes of *Plasmodium falciparum*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1949, **42**, 455-463.
- McNEILL (W.H.). - Plagues and peoples. Blackwell, Oxford Major 1939 Athanasius Kircher. *Annals of Medical history*, 1977, **1**, 105-120.
- MAZIER (D.), LANDAU (I.), DRUILHE (P.), MILTGEN (F.), GUGUEN-GUILLOUZO (C.), BACCAM (D.), BAXTER (J), CHIGOT (J.P.) & GENTILINI (M.). - Cultivation of the liver forms of *Plasmodium vivax* in human hepatocytes. *Nature*, 1984, **307**, 367-369.
- MEIS (J.F.G.M.), VERHAVE (J.P.) JAP (P.H.K.) SINDEN (R.E.) & MEUWISSEN (J.H.E.T.). - Ultrastructural observations on the infection of rat liver by *Plasmodium berghei* sporozoites *in vivo*. *Journ. Protozoology*, 1983, **30**, 361-366.
- MENDIS (K.N.) & TARGETT (G.A.T.). - Immunization against gametes and sexual erythrocytic stages of a rodent malaria parasite. *Nature*, 1979, **277**, 389-391.
- MEUWISSEN (J.H.E.Th.) & PONNUDURAI (T.). - Some aspects of transmission-blocking immunity reviewed. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. *Intern. Symp. on Malaria*, 1986, **81** (suppl. II), 69-75.
- MISSIROLI (A.). - The control of domestic insects in Italy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1950, **30**, 773-783.
- MOLINEAUX (L.) & GRAMMICCIA (G.). - *The Garki project: research on the epidemiology and control of malaria in the Sudan savanna of West Africa*. W. H. O., 1980.
- MOUNT (D.L.), PATCHEN (L.C.), WILLIAMS (S.B.) & CHURCHILL (F.C.). - Colorimetric and thinlayer chromatographic methods for field assay of chloroquine and its metabolites in urine. *Bull. WHO*, 1987, **65**, 615-623.
- MUIRHEAD-THOMSON (R.C.). - Factors determining the true reservoir of infection of *Plasmodium falciparum* and *Wuchereria Bancrofti* in West African villages. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1954, **48**, 208-225.

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.

MUIRHEAD-THOMSON (R.C.) & MERCIER (E.C.). - Factors in malaria transmission by *Anopheles albimanus* in Jamaica (Part II). *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 1952, 46, 201-213.

NEVILL (C.G.), SOME (E.S.), MUNG'ALA (V.O.), MUTEMI (W.), NEW (L.), MARSH (K.), LENGELER (C.) & SNOW (R.W.). - Insecticide-treated bednets reduce mortality and severe morbidity from malaria among children on the Kenya coast. *Trop. Med. Int. Health*, 1996, 1, 139-146.

NJOKOU (M.), YUBI (J.) & BOUDIN (C.). - Sensibilité, gametocytogénèse et infectivité pour *Anopheles gambiae* après traitement des souches de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine, à l'amodiaquine et à la sulfadoxine-pyriméthamine. *Bull. Liais. Doc. OCEAC*, 1999, 32 (2), 46-52.

NODEN (B.H.), VAUGHAN (J.A.), IBRAHIM (M.S.) & BEIER (J.C.). - An immunological factor that affects *Anopheles gambiae* survival. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 1995, 11, 45-49.

O.M.S. - *Chimiothérapie du paludisme et résistance aux antipaludiques*: Rapport d'un groupe scientifique de l'OMS, 1973, série de rapports techniques N° 529.

O.M.S. - *La lutte antivectorielle par l'aménagement de l'environnement*: Quatrième rapport du comité OMS d'experts de la biologie des vecteurs et de la lutte antivectorielle, 1980, série de rapports techniques N° 649.

O.M.S. - *Biologie des plasmodies*: Rapport d'un groupe scientifique de l'OMS, 1987, série de rapports techniques N° 743.

O.M.S. - *La lutte contre les maladies tropicales: le paludisme*, Organisation mondiale de la Santé Genève, 1992, 16p.

O.M.S. - World malaria situation in 1993. *Weekly Epidemiol. Rec.*, 1996, 71, 17-32.

PAMPANA (E.J.). - Lutte antipaludique par les insecticides à action rémanente: résultats des grandes campagnes. *Bull. WHO*, 1951, 3, 557-619.

PETRARCA (V.), VERCRUYSSSE (J.) & COLUZZI (M.). - Observations on the species of the *Anopheles gambiae* complex in the Senegal river basin. *Med. Vet. Entomol.*, 1987, 1, 303-312.

PICHON (G.) & MULLON (C.). - Sur les distributions rencontrées en parasitologie: 1) ParaDis, logiciel pour l'analyse statistique des distributions parasitaires. 2) Le logiciel CinéFil: simulation des relations hôtes-parasites. ORSTOM Ed, Paris. *Colloques et Séminaires SEMINFOR*, 1992, 5, 289-301.

PONNUDURAI (T.), LENSEN (A.H.W.), MEIS (J.F.G.M.) & MEUWISSEN (J.H.E.Th.). - Synchronisation of *Plasmodium falciparum* gametocytes using an automated culture system. *Parasitology*, 1986, 98, 165-173.

POTOCNJAC (P.), YOSHIDA (N.), NUSSENZWIEG (R.S.) & NUSSENZWIEG (V.). - Monovalent fragments (Fab) of monoclonal antibodies to a sporozoite surface antigen (Pb 44) protect against malaria infection. *J. Exp. Med.*, 1980, 151, 1504-1513.

- PRINGLE (G.). A count of the sporozoites in an oocyst of *Plasmodium falciparum*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1965, 59, 289-290.
- RAMASAMY (R.) & RAMASAMY (M.S.). - The role of host immunity to arthropod vectors in regulating the transmission of vector-borne diseases. *Insect Sci. Appl.*, 1990, 11, 845-850.
- RINGWALD (P.), LE BRAS (J.), VOYER (C.) & COULAUD (J.P.). - Reduced *in vitro* susceptibility to halofantrine of *Plasmodium falciparum* in West Africa. *Lancet*, 1990, 335, 421-422 .
- ROBERT (V.). - La transmission du paludisme humain: la zone des savanes de l'Afrique de l'Ouest. Thèse, Université Paris 6, 1989, 325 p.
- ROBERT (V.). - Age grading *Anopheles arabiensis*: their gorging and surviving responses using a membrane feeding system. *Parasite*, 1998, 5, 87-90.
- ROBERT (V.), AWONO-AMBENE (H.P.) & THIOULOUSE (J.).- Ecology of Larval Mosquitoes, with Special Reference to *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) in Market-Garden Wells in Urban Dakar, Senegal. *J. Med. Entomol.*, 1998, 35, 6, 948-955.
- ROBERT (V.), MOLEZ (J.F.) & TRAPE (J.F.). - 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.
- ROBERT (V.), VERHAVE (J.P.) & CARNEVALE (P.). - *Plasmodium falciparum* infection does not increase the precocious mortality rate of *An. gambiae*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1990, 84, 346-347.
- ROBERT (V.) & TRAPE (J.F.). - Dynamiques de la gamétocytémie à *Plasmodium falciparum* en fonction de la réponse thérapeutique à la chloroquine en zone de mésoendémie palustre. *Bull. Soc. Path. Ex.*, 1998, 91, 2, 142-145.
- ROCHE (J.), AYECABA (S.), BENITO (A.), MOLINA (R.) & ALVAR (J.). - Evaluation *in vivo* de la chimiosensibilité de *Plasmodium falciparum* en Guinée Equatoriale, 1991-1993. *Bull. Liais. Doc. OCEAC*, 1995, 28, 73-80.
- ROLLER (N.F.) & DESSER (S.S.). - The effect of temperature, age and density of gametocytes, and changes in gas composition on exflagellation of *Leucocytozoon simondi*. *Canadian J. Zool.*, 1973, 51, 577-587.
- ROSENBERG (R.) & RUNGSIWONGSE (J.). - The number of sporozoites produced by individual malaria oocysts. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1991, 45, 574-577.
- ROSS (R.). - On some peculiar pigmented cells found in two mosquitoes fed on malaria blood. *Brit. Med. Journ.*, 1897, 2, 1786-1788.
- ROSS (R.). - *The prevention of malaria*, 2nd eds. Murray, London, 1911.
- ROSS (G.A.P.). - Insecticide as a major measure in control of malaria. *Quarterly Bull. Health Org. of the League of Nations*, 1936, 5, 114-139.
- RUSSELL (P.F.) & KNIPE (R.). - Malaria control by spray killing adult mosquitoes. *J. Mal. Inst. India*, 1939, 2, 229-237.
- RUSSELL (P.F.). - *Man's mastery of malaria*. Oxford University Press, London, 1955.

- RUTLEDGE (L.C.), WARD (R.A.) & BUCKWALTER (R.M.). - *Plasmodium spp.*: dispersion of malarial oocyst populations in anopheline and culicine mosquitoes. *Exp. Parasitol.*, 1973, **34**, 132-141.
- RUTLEDGE (L.C.), WARD (R.A.) & GOULD (D.J.). - Studies on the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder. *Mosq. News*, 1964, **24**, 407-419.
- SANSONETTI (P.J.), LEBRAS (C.), VERDIER (F.), CHARMOT (G.), DUPONT (B.) & LAPRESLE (C.). - Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Cameroon. *Lancet*, 1985, **1**, 1154-1155.
- SERVICE (M.W.). - Mosquitoes (Culicidae). In: Lane (R.P.) & Crosskey (R.W.) eds. *Medical Insects and Arachnids*. Chapman & Hall, London, 1983, 120-240.
- SHAHADUDDIN (M.) & KASLOW (D.C.). - Chitinase: a novel target for blocking parasite transmission. *Parasitol. Today*, 1993, **9**, 252.
- SHAHADUDDIN (M.), CRISCIO (M.) & KASLOW (D.C.). - Unique specificity of *in vitro* inhibition of mosquito midgut trypsin-like activity correlates with *in vivo* inhibition of malaria parasite infectivity. *Exp. Parasitol.*, 1995, **80**, 212-219.
- SHAHADUDDIN (M.), TOYOSHIMA (T.), AIKAWA (M.) & KASLOW (D.C.). - Transmission blocking activity of a chitinase inhibitor activation of malarial parasite chitinase by a mosquito protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, **90**, 4266-4270.
- SHAPIRA (A.) & SCHWALBACH (J.F.L.). - Evaluation of four therapeutic regimens for falciparum malaria in Mozambique, 1986. *Bull. OMS*, 1988, **66**, 219-226.
- SHUTE (P.G.) & MARYON (M.). - A study of gametocytes in a West African strain of *Plasmodium falciparum*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1951, **44**, 421-438.
- SHUTE (P.G.) & MARYON (M.). - A study of human malaria oocysts as an aid to species diagnosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1952, **46**, 275-292.
- SHUTE (P.G.) & MARYON (M.). - The effect of pyrimethamine (Daraprim) and the gametocytes and oocysts of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1954, **48**, 50-63.
- SIDJANSKI (S.) & VANDERBERG (J.P.). - Delayed migration of *Plasmodium* sporozoites from bite site to the blood. *Am J. Trop. Med. Hyg.*, 1997, **57**, 426-429.
- SINDEN (R.E.) & SMALLEY (M.E.). - Gametocytes of *Plasmodium falciparum*: Phagocytosis by leucocytes *in vivo* and *in vitro*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1976, **70**, 344-345.
- SMALLEY (M.E.). - *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis *in vitro*. *Nature*, 1976, **264**, 271-272.
- SMALLEY (M.E.). - *Plasmodium falciparum* gametocytes: the effect of chloroquine on their development. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1977, **71**, 526-529.
- SMALLEY (M.E.) & BROWN (J.). - *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis stimulated by lymphocytes and serum from infected Gambian children. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1981, **75**, 316-317.
- SMALLEY (M.E.), ABDALLA (S.) & BROWN (J.). - The distribution of *Plasmodium falciparum* in the peripheral blood and bone marrow of Gambian children. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1980, **75**, 103-105.

SMALLEY (M.E.), BROWN (J.) & BASSETT (N.M.). - The rate of production of *Plasmodium falciparum* gametocytes during natural infections. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1981, **75**, 318-319.

SMITH (S.M.).- Appendix to notes on sickle cell polymorphism. *Ann. Hum. Genetics*, 1954, **19**, 51-57.

SOKHNA (C.S.), MOLEZ (J.F.), DIAGNE (P.), SANE (B.) & TRAPE (J.F.). - Tests *in vivo* de chimiosensibilité de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine au Sénégal: évolution de la résistance et estimation de l'efficacité thérapeutique *Bull. Soc. Path. Ex.*, 1997, **90** (2), 83-89.

SOPER (F.L.) & WILSON (B.D.). - *Anopheles gambiae* in Brazil: 1930-1940 Rockefeller Foundation: New York, 1949, 262p.

TAYLOR (K.A.), KOROS (J.K.), NDUATI (J.), COPELAND (R.S.), COLLINS (F.H.) & BRANDLING-BENNETT (A.D.). - *Plasmodium falciparum* infection rates in *Anopheles gambiae*, *Anopheles arabiensis* and *Anopheles funestus* in western Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1990, **43**, 124-129.

TAYLOR (T.E.), WILLS (B.A.), KAZEMBE (P.), CHISALE (M.), WIRIMA (J.J.), RATSMA (E.Y.E.C.) & MOLYNEUX (M.E.). - Rapid coma resolution with artemether in Malawian children with cerebral malaria. *Lancet*, 1993, **341**, 661-662.

TCHUINKAM (T.), MULDER (B.), DECHERING (K.), 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 gametocytes carriers in Cameroon: factors influencing the infectivity to mosquitoes. *Trop. Med. Parasitol.*, 1993, **44**, 271-276.

TERZIAN (L.A.), STAHLER (N.) & DAWKINS (A.T.). - The sporogonous cycle of *Plasmodium vivax* in *Anopheles* mosquitoes as a system to evaluating the prophylactic and curative capabilities of potential antimalarial compounds. *Exp. Parasitol.*, 1968, **23**, 56-66.

THOMSON (J.G.) & ROBERTSON (A.). - The structure and development of *Plasmodium falciparum* gametocytes in the internal organs and peripheral circulation. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1935, **29**, 31-40.

TOURAY (M.G.), WARBURG (A.), LAUGHINGHOUSE (A.), KRETTLI (A.U.) & MILLER (H.). - Developmentally regulated infectivity of malaria sporozoites for mosquito salivary glands and the vertebrate host. *J. Exp. Med.*, 1992, **175**, 1607.

TOUZE (J.E.) & CHARMOT (G.). - Le paludisme à *Plasmodium falciparum*: situation actuelle et perspectives. *Cahiers Santé*, 1992, **3**, 217-219.

TRAPE (J.F.).- Rapid evaluation of malarial parasite density and standardization of thick smear examination for epidemiological investigations. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1985, **79**, 2, 181-184.

TRAPE (J.F.), LEFEBVRE-ZANTE (E.), LEGROS (F.), NDIAYE (G.), BOUGANALI (H.), DRUILHE (P.) & SALEM (G.).- Vector density gradients and the epidemiology of urban malaria in Dakar, Senegal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1992, **47**, 181-189.

TRAPE (J.F.), PISON (G.), PREZIOSI (M.P.), ENEL (C.), DESGREES DU LOUP (A.), DELAUNEY (V.), SAMB (B.), LAGARDE (E.), MOLEZ (J.F.) & SIMONDON (F.).- Impact of chloroquine resistance on malaria mortality. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris série III*, 1998, **321**, 689-697.



- VANDERBERG (J.P.) - Gametocytogenesis: In *Malaria, principles and practice of malariology*. eds. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1988, 1, 331-348.
- VANDERBERG (J.P.) & GWADZ (R.W.). - The transmission by mosquitoes of Plasmodia in the laboratory. In KREIR (J.P.) eds, *Malaria*. Academic Press, Inc., 1980, New York, N.Y.
- VAUGHAN (J.A.), NODEN (B.H.) and BEIER (J.C.). - Population dynamics of *Plasmodium falciparum* sporogony in Laboratory-infected *Anopheles gambiae*. *J. Parasitol.*, 1992, 78, 716-724.
- VAUGHAN (J.A.), NODEN (B.H.) and BEIER (J.C.). - Sporogony development of *Plasmodium falciparum* in six species of Laboratory-reared *Anopheles* Mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1994, 51, 233-243.
- VERCRUYSSSE (J.). - Etude entomologique sur la transmission du paludisme humain dans le bassin du fleuve Sénégal (Sénégal). *Ann. Soc. Belge Med. Trop.*, 1985, 65, 171-179.
- VERCRUYSSSE (J.) & JANCLOES (M.). - Etude entomologique sur la transmission du paludisme humain dans la zone urbaine de Dakar (Sénégal). *Cah. ORSTOM Sér. Entomol. Med. Parasitol.*, 1981, 9, 165-178.
- VERMEULEN (A.N.), PONNUDURAI (T.), BECKERS (P.J.A.), VERHAVE (J.P.), SMITS (M.) & MEUWISSEN (J.H.E.Th.). - 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.
- VIAL (H.) & OLLIARO (P.). - Une urgence: développer de nouvelles molécules antipaludéennes. *Annales de l'Institut Pasteur: actualités* 5, 1994, 4, 315-323.
- WARBURG (A.) & MILLER (H.). - Critical stages in the development of *Plasmodium* in mosquitoes. *Parasitol. Today*, 1991, 7, 179.
- WARHURST (D.C.) & SCHOFIELD (C.J.) eds. - *Halofantrine in the treatment of multidrug resistant malaria*. Cambridge: Elsevier, 1989.
- WARREN (Mc.W.), COLLINS (W.E.), RICHARDSON (B.B.) & SKINNER (J.C.). - Naturally occurring pupal phenotypes of *Anopheles albimanus* and their susceptibility to *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. *Mosq. News*, 1979, 39, 472-477.
- WATKINS (W.M.), OLOO (J.J.), LURY (J.D.), MOSOBA (M.), KARIUKI (D.), MJOMBA (M.), KOECH (D.K.) & GILLES (H.M.). - Efficacy of multiple-dose halofantrine in treatment of chloroquine-resistant falciparum malaria in children in Kenya. *Lancet*, 1988, ii, 247-250.
- WEATHERSBY (A.B.). - Further studies on exogenous development of malaria in the haemocoels of mosquitoes. *Exp. Parasitol.*, 1960, 10, 211-213.
- WERNDORFER (W.H.) & PAYNE (D.) - The dynamics of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol. Ther.*, 1991, 50, 95-121.
- WERY (M.). - *Protozoologie Médicale*. Eds. De Bœck & Larcier Aupelf-Uref, 1995, 274 pp.
- WILKINSON (R.N.), NOEYPATIMANONDH (S.) & GOULD (D.L.). - Infectivity of falciparum malaria patients for anopheline mosquitoes before and after chloroquine treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1976, 70, 306-307.
- ZAVALA (F.), COCHRANE (A.H.), NARDIN (E.H.), NUSSENZWEIG (R.S.) & NUSSENZWEIG (V.). - Circumsporozoite proteins of Malaria parasites contain a single immunodominant region with two or more identical epitopes. *J. Exp. Med.*, 1983, 157, 1947-1957.



# Annexes

# Fiche d'enquête

n°:

25

139

## Critères préliminaires

(1) un volontaire (si enfant, accord des parents), (2) âge ≥ 5ans, (3) résident depuis au moins deux ans dans la presqu'île du Cap-V., (4) aucune prise d'antipaludique dans les 10 jours précédant J0, (5) absence de prophylaxie antipaludique habituelle, (6) présence de P. falciparum dans le sang.

## IDENTIFICATION

Nom:

Prénom:

si enfant: Nom du père:

Nom de la mère:

Adresse exacte (quartier, rue, n° concession, téléphone):

Grand Yoff Djeddah 2.

Âge: 20 ans

Poids: 61 kg

Sex: ♂

Voyage depuis deux mois (où):

Néau

## EXAMEN CLINIQUE à J0

Malade depuis: 1 jours Fièvre depuis: 1 jours Anémie: ⊖

Température axillaire: 36,2 °C Température rectale: / °C

Date de la dernière prise de médicament antipaludéen: / jours

Nature de l'antipaludéen: Niant Posologie:

## SUIVI

date	Jour	État général de la personne	température (préciser rectal, axillaire)	antipaludique		vomissement après le passage précédent	Observations divers	Nom enquêteur
				nature	dose			
15-10-96	J0 vacutainer (Oui/Non)	un peu fatigué	36,7 A	chloroquine	600 mg		Céphalées	P. Ndiasy Paul
16-10-96	J1	couchi	37,0 A	" "	600 mg	Non	Non	" "
17-10-96	J2 GE (Oui/Non)	Va un peu mieux	36,5 A	" "	300 mg	Non	Asthénie	P. Ndiasy
19-10	J4 GE (Oui/Non)	OK	36,5 A	—	—	non	pusit	Pap
22-10	J7 vacutainer (Oui/Non)	OK	36,7 A	—	—	—		Pap Paul
29-10-96	J14 GE (Oui/Non)	Couché	38,7	/	/	/	Céphalées	Pap
	J30 GE et capillaire (Oui/Non)							

## REMARQUES DIVERSES

HALFAN à J15 à 30-10-96 2y. 15h30 - 2y. 21h30 - 2y. 3h30 Pap

J18 à 03-11-96 GE 37,4 A RAS Pap

J22 à 06-11-96 GE 37,2 A RAS Pap

J27 à 13-11-96 GE capillaire 36,6 RAS Pap

# Fiche dissection moustiques

Nom:

Prénom

correspondant à cage n°

n°: GSR à J

date de la dissection :

soit à J<sub>3</sub> après le repas sanguin

nombre attendu de femelles survivantes :

nom du lecteur d'oocystes :

	oocyste	remarque		oocyste	remarque
1			26		
2			27		
3			28		
4			29		
5			30		
6			31		
7			32		
8			33		
9			34		
10			35		
11			36		
12			37		
13			38		
14			39		
15			40		
16			41		
17			42		
18			43		
19			44		
20			45		
21			46		
22			47		
23			48		
24			49		
25			50		

nb total disséqués	nb total de moustiques positifs	% moustiques positifs	nb total oocystes	nb moy d'oocyste / estomac disséqué	nb moy d'oocyste / estomac positif

REMARQUES DIVERSES :

<b>Fiche du porteur de gamétocytes</b>		n°: PG
nom:	prénom:	date:

*Critères préliminaires*

(1) un volontaire (si enfant, accord des parents), (2) au moins un gamétocyte sur 50 champs microscopiques  
 (3) âge ≥ 5ans, (4) pas en accès palustre, (5) pas infecté par un autre Plasmodium que *P. falciparum*,  
 (6) n'a pas subi de prélèvement sanguin avant 30 jours

si enfant: Nom du père:

Nom de la mère:

Adresse exacte (ville ou village, quartier, rue, n°concession, téléphone):

Âge:

Poids:

Sex:

Voyage depuis deux mois (période, destination):

Groupe sanguin demandé: oui ou non, si oui résultat:

EXAMEN CLINIQUE à J0

Malade depuis: jours-----Fièvre depuis: jours-----Anémie:

Température axillaire: °C-----ou Température rectale: °C

Date, nature et posologie des dernières prises de médicament antipaludéen (au cours du mois précédent):

Heure exacte du prélèvement sanguin:

## LECTURE DE LA (DES) GOUTTE(S) ÉPAISSE(S)

J	date	nb blanc / champ	<i>P. falciparum</i>					autres <i>Plasmodium</i>	nom du lecteur	Divers
			stades asexués	gamétocytes						
				femelles	mâles	indéter minés	total /200 champs			
J0										
J										
J										

REMARQUES DIVERSES

**Fiche "transport de moustiques" (ALLER)**

date du voyage : responsable :

lieu de départ : lieu d'arrivée :

heure de départ : heure d'arrivée :

à l'arrivée température maxi: mini :

REMARQUES DIVERSES :

**Fiche "transport de moustiques" (RETOUR)**

date du voyage : responsable :

lieu de départ : lieu d'arrivée :

heure de départ : heure d'arrivée :

à l'arrivée température maxi: mini :

REMARQUES DIVERSES :

Fiche "pot de moustiques" n°		n° PG
# 1 direct	<i>An. arabiensis</i> Colobane	mollet <u>droit</u> ou <u>gauche</u>
# 2 membrane	<i>An. arabiensis</i> Colobane	<u>premier</u> ou <u>second</u> pot
# 3 membrane	<i>An. arabiensis</i> Dielmo	<u>premier</u> ou <u>second</u> pot
# 4 membrane	<i>An. gambiae</i> Dielmo	<u>premier</u> ou <u>second</u> pot
# 5 membrane	<i>An. arabiensis</i> Colobane	<u>premier</u> ou <u>second</u> pot
# 6 membrane	<i>An. arabiensis</i> Colobane	<u>premier</u> ou <u>second</u> pot

Nom: \_\_\_\_\_ Prénom: \_\_\_\_\_ date du repas sanguin: \_\_\_\_\_

heure de mise du sang sur la cage: \_\_\_\_\_ durée du repas de sang: \_\_\_\_\_

date de l'émergence des moustiques: \_\_\_\_\_ soit un gorgement à J \_\_\_\_\_

repas de sang antérieur OUI ou NON ; si oui, préciser nature et nombre ( mouton, cobbyte, homme, )

nb de femelles mises à gorger: \_\_\_\_\_ nb de femelles gorgées: \_\_\_\_\_ technicien responsable: \_\_\_\_\_

après le repas sanguin, si autre chose que eau sucrée, préciser: \_\_\_\_\_

Tableau des nombres quotidiens de moustiques morts, observés à partir du lendemain du repas sanguin

J0	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	Total

date de la dissection: \_\_\_\_\_ soit à J \_\_\_\_\_ après le repas sanguin

nombre attendu de femelles survivantes: \_\_\_\_\_ nom du lecteur d'oocystes: \_\_\_\_\_

	oocyste	aile	remarque		oocyste	aile	remarque
1				16			
2				17			
3				18			
4				19			
5				20			
6				21			
7				22			
8				23			
9				24			
10				25			
11				26			
12				27			
13				28			
14				29			
15				30			

nb total disséqués	nb total positifs	% moustiques positifs	nb total oocystes	nb moy d'oocyste / estomac disséqué	nb moy d'oocyste / estomac positif

REMARQUES DIVERSES: \_\_\_\_\_

# Liste des publications

(auxquelles j'ai participé)

- 1- AWONO-AMBENE H.P. & ROBERT V., (1998). - Gorging response of wild *Anopheles arabiensis* using membrane feeder with baudruche or Parafilm<sup>®</sup>. *Parasite*, **5**: 294.
- 2- ROBERT V., AWONO-AMBENE H.P. & THIOULOUSE J., (1998). - Ecology of larval mosquitoes, with special reference to *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culcidae) in market-garden wells in urban Dakar, Senegal. *Journal of Medical Entomology*, **35**, 6: 948-955.
- 3- AWONO-AMBENE H.P. & ROBERT V., (1998). - Estimation of *Plasmodium falciparum* oocysts survival in *Anopheles arabiensis*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **92**, 8: 889-890.
- 4- AWONO-AMBENE H.P. & ROBERT V., (1999). - Survival and emergence of immature *Anopheles arabiensis* mosquitoes in market-gardener wells in Dakar, Senegal. *Parasite*, **6**: 179-184.
- 5- ROBERT V., AWONO-AMBENE H.P. & LE HESRAN J.Y., (2000) - Gametocytemia and infectivity to mosquitoes of patients with uncomplicated falciparum malaria attack treated by chloroquine or sulfadoxine+pyrimethamine. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* (sous presse).
- 6- AWONO-AMBENE H.P., DIAWARA L. & ROBERT V. - Comparison of direct and membrane feeding methods in order to infect *Anopheles arabiensis* with *Plasmodium falciparum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* (soumis).
- 7- PICHON G., AWONO-AMBENE H.P. & ROBERT V. - High variability in numbers of *Plasmodium falciparum* gametocytes in mosquito intakes from the same host. *Parasitology* (soumis)



Patients treated with antimalarial drugs harbour commonly gametocytes in their blood flow. This gametocytemia was evaluated over an uncomplicated malaria attack, and the infectivity of gametocyte carriers was determined on mosquitoes using infection trials.

The study was carried out in two areas of Senegal in 1996-1998. In Great Dakar, volunteers with uncomplicated falciparum malaria attack were appointed from September to December. They received 25 mg/kg of chloroquine (CQ) over 3 days or 25 mg/kg of sulfadoxine + 1,25 mg/kg of pyrimethamine (SP) in single dose; they were included in an *in vivo* sensitivity tests for 28 days. At day 7 after treatment, the blood of patients harbouring gametocytes was proposed to feed mosquitoes, using membrane feeder with venous punctured blood or directly through the skin. In 1998, gametocyte carriers were selected in Thiès (60 km in the East of Dakar) to infect mosquitoes. Wild mosquitoes (*An. arabiensis*) were collected at larval stages in marshes or pools of Great Dakar, then were reared in insectarium up to the adult stage. Mosquitoes from Dielmo (*An. arabiensis* et *An. gambiae s.s.*) were bred in insectarium since 1994. Females were fed with blood of volunteers harbouring gametocytes 3 days after their emergence. Gametocytemia was measured from thick smears and the infection of mosquitoes was determined at the oocyst stage, 3 or 7 days after the blood-meal, using respectively an immunologic target (FITC-25) or a 1% mercuroceine drop. Sometimes, the number of gametocytes ingested by mosquitoes was also evaluated in each mosquito blood-meal.

Overall, 43% (37/86) and 0% (0/34) of falciparum infections were respectively resistant 14 days after treatment with CQ or SP. Gametocytemia was higher after the treatment than before, especially within resistant infections. However, the volunteers treated with SP or quinine (Q) harboured more gametocytes in the blood than those treated with CQ.

The efficiency of mosquito infections was high after treatment. The number of volunteers infective to mosquitoes has increased before the treatment from 29% to 64% after the treatment with CQ, as the percentage of infected mosquitoes (29% to 41%) and the mean number of oocysts per infected mosquitoes (2,4 to 4,1). Besides, CQ infections were more efficient than SP infections, with respectively 33% vs. 16% of infected mosquitoes and 3,5 vs. 1,6 oocysts per infected mosquito. Patients treated with Q were also more infective to mosquitoes than those treated with CQ (respectively 25% vs. 13% of infected mosquitoes and 8,3 vs. 1,3 oocysts per infected mosquito).

Mean number of oocysts per infected mosquito has increased significantly from 2,5 to 3,1 between CQ sensitive infections and CQ resistant infections; but the number of infected mosquitoes was not significantly different (30% vs. 33%).

Comparative studies showed a same susceptibility between *An. arabiensis* and *An. gambiae s.s.* to be infected by gametocyte carriers. An aggregation of *P. falciparum* gametocytes in the midgut of mosquito was evidenced by the distribution of ingested gametocytes by mosquitoes. This mechanism probably facilitates the conjunction of gametes and fertilisation.

Our observations suggest a persistence of chloroquinoreistance in Great Dakar in 1996-1997, which is probably due to (1) a limited effect of CQ (common antimalarial) in sporogonic development or (2) a high capacity of resistant strains to continue its development in the vector. Sensitive SP infections are gametocytogenous, but not favourable to the sporogonic development; this inhibitory effect could be an interesting asset to limit malaria transmission in Dakar.

Key words: Gametocytemia, *Plasmodium falciparum*, chloroquine, sulfadoxine-pyrimethamine, sporogony, *Anopheles gambiae*, Senegal.