

UNIVERSITE DE PARIS-SUD
CENTRE D'ORSAY

THESE

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE PARIS XI ORSAY

Pascale GAUBERE

Etude cytologique, enzymologique et immunologique de la
compétence vectorielle d'*Anopheles stephensi* Liston, 1901 (Diptera : Culicidae)
vis-à-vis de *Plasmodium yoelii yoelii* Landau et Killick-Kendrick, 1966
(Haemosporidia : Plasmodiidae)

soutenue le 19 Juin 1993

devant la commission d'examen :

Melle Ginette LAUGE
M. Michel BREHELIN
M. François NOIREAU
Mme Nicole MONTENY
M. Vincent ROBERT
M. Pierre CASSIER

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur

UNIVERSITE DE PARIS-SUD
CENTRE D'ORSAY

THESE

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE PARIS XI ORSAY

par

Pascale CAUBERE

Etude cytologique, enzymologique et immunologique de la
compétence vectorielle d'*Anopheles stephensi* Liston, 1901 (*Diptera* : *Culicidae*)
vis-à-vis de *Plasmodium yoelii yoelii* Landau et Killick-Kendrick, 1966
(*Haemosporidia* : *Plasmodiidae*).

soutenue le 19 Juin 1993
devant la commission d'examen :

Melle Ginette LAUGE	Présidente
M. Michel BREHELIN	Rapporteur
M. François NOIREAU	Rapporteur
Mme Nicole MONTENY	Examineur
M. Vincent ROBERT	Examineur
M. Pierre CASSIER	Examineur

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	8
AVANT PROPOS.....	17
INTRODUCTION	23
1. Le paludisme.....	24
1.1. Le cycle du paludisme.....	24
1.1.1. Le développement du parasite dans le moustique.....	24
1.1.2. Le développement du parasite chez le vertébré.....	25
1.1.2.1. La schizogonie hépatique.....	26
1.1.2.2. La schizogonie érythrocytaire.....	27
1.2. L'histoire de la parasitologie du paludisme	27
1.2.1. Le paludisme humain	27
1.2.2. Le paludisme de rongeurs	28
2. Les méthodes de lutte antipaludique	29
2.1. Historique.....	29
2.2. Les méthodes actuelles de lutte antivectorielle.....	30
2.2.1. Les insecticides de synthèse.....	30
2.2.2. Les agents de lutte biologique.....	31
2.2.3. Les autres méthodes de lutte	31
2.3. La chimiothérapie du paludisme.....	32
2.4. Les perspectives.....	32
3. La compétence vectorielle	33
3.1. Le tube digestif.....	34
3.1.1. L'ingestion des gamétocytes	34
3.1.2. La membrane péritrophique	35
3.1.3. L'épithélium du tube digestif.....	36
3.2. L'hémolymphe	37
3.3. Les glandes salivaires	37
4. Les vaccins anti-paludisme.....	38
4.1. Le vaccin anti-sporozoïte.....	39
4.2. Le vaccin anti-mérozoïte	40

4.3. Le vaccin anti-gamétocyte.....	41
4.4. Vers un vaccin multivalent.....	42
5. L'immunité chez les insectes : état actuel des connaissances.....	43
5.1. Introduction.....	43
5.2. Les cellules immunitaires	44
5.2.1. Les prohémosocytes	44
5.2.2. Les plasmatocytes	44
5.2.3. Les oenocytoides	45
5.2.4. Les cellules à sphérules.....	45
5.2.5. Les thrombocytoïdes.....	46
5.2.6. Les granulocytes.....	46
5.2.6.1. Les granulocytes de type I (GHI).....	46
5.2.6.2. Les granulocytes de type II (GHII).....	47
5.2.6.3. Les granulocytes de type III (GHIII).....	48
5.3. Les réactions immunitaires.....	48
5.3.1. Les réactions à médiation cellulaire.....	49
5.3.1.1. La phagocytose.....	49
5.3.1.2. La formation de nodules.....	50
5.3.1.3. L'encapsulation cellulaire et humorale.....	50
5.3.1.4. Les facteurs humoraux intervenant dans l'immunité cellulaire	52
Les lectines	52
Le système phénoloxydase	53
5.3.2. Les réactions à médiation humorale	54
6. La présentation de l'étude	55
CHAPITRE I.....	58
Matériel et méthodes	
1. <i>Anopheles stephensi</i> Liston, 1901	59
1.1. Origine	59
1.2. La technique d'élevage en laboratoire	59
1.2.1. Les œufs.....	59
1.2.2. Les larves.....	60
1.2.3. Les nymphes.....	61

1.2.4. Les imagos	61
1.3. Le protocole de choix des moustiques.....	61
2. <i>Plasmodium yoelii yoelii</i> Landau et Killick-Kendrick, 1966	62
2.1. La durée de développement du <i>Plasmodium</i>	62
2.1.1. Le développement du parasite dans le moustique.....	62
2.1.2. Le développement du parasite chez la souris.....	62
2.2. Les modes d'infestation et d'infection.....	63
2.2.1. L'infestation du vecteur.....	63
2.2.2. L'infection du vertébré.....	63
2.2.2.1. L'infestation naturelle.....	63
2.2.2.2. Le passage sanguin	63
3. La mise en évidence et l'isolement des stades parasitaires	64
3.1. Les stades parasitaires chez le moustique	64
3.1.1. La dissection des anophèle	64
3.1.1.1. Le tube digestif	64
3.1.1.2. Les glandes salivaires.....	65
3.1.2. La centrifugation des sporozoïtes.....	70
3.1.3. Le dénombrement des sporozoïtes	70
3.2. Les stades parasitaires chez la souris	71
3.2.1. Les frottis sanguins	71
3.2.2. La congélation des formes sanguines	71
4. L'inoculation des moustiques.....	74
4.1. Le choix des adultes	74
4.2. Le protocole d'inoculation	75
4.3. L'analyse de l'infectivité des femelles inoculées	75
4.3.1. La dissection des femelles.....	75
4.3.2. Le repas sanguin.....	78
5. L'étude cytologique des relations <i>Anopheles-Plasmodium</i>	78
5.1. Le mode de prélèvement de l'hémolymphe	78
5.2. La microscopie optique.....	79
5.3. La microscopie électronique	79
5.3.1. Le protocole d'inclusion.....	79
5.3.2. La coloration et l'observation des coupes	80

6. L'étude enzymatique des relations <i>Anopheles-Plasmodium</i>	80
6.1. Le prélèvement des moustiques	81
6.2. La préparation des échantillons.....	82
6.3. Le protocole de dosage des estérases.....	82
6.4. La gamme étalon	82
6.5. La présentation des résultats.....	83
7. Les techniques immunologiques de détection des antigènes sporozoïtares chez le moustique.....	84
7.1. La fabrication d'anticorps anti-sporozoïtes	84
7.1.1. Le protocole de vaccination	84
7.1.1.1. La vaccination des souris.....	85
7.1.1.2. La vaccination du lapin	85
7.1.2. Le prélèvement et le conditionnement des anticorps.....	85
7.1.3. L'épuisement des immunosérums	86
7.2. La technique d'immunofluorescence indirecte.....	86
7.2.1. La préparation des échantillons	86
7.2.2. Le protocole.....	87
7.2.3. L'observation des lames.....	87
7.3. Le dosage immuno-enzymatique (ELISA).....	87
7.3.1. La préparation des échantillons	88
7.3.2. La sensibilisation des plaques.....	88
7.3.3. Les étapes du dosage.....	90
7.3.4. Les témoins de réaction et la gamme étalon	90
7.3.4. La présentation des résultats	92

CHAPITRE II.....94

Cytologie de l'hémolymph de *Anopheles stephensi*

1. Introduction.....	95
2. Les hémocytes d' <i>A. stephensi</i> et leurs rôles dans les réactions de défense du moustique	95
2.1. Les prohémoscytes.....	96
2.2. Les oenocytoides.....	96
2.3. Les plasmatocytes macrophages	103
2.4. Les adipohémocytes	110

2.5. Les autres types de cellules en circulation.....	117
2.5.1. Les cellules du corps gras	117
2.5.2. Les cellules à "double membrane".....	121
3. Discussion	131
CHAPITRE III.....	135
Etude enzymatique des relations <i>Anopheles-Plasmodium</i> : les estérases totales	
1. Introduction.....	136
2. Le dosage des estérases totales chez les anophèles adultes.....	137
2.1. Les résultats	138
2.2. Discussion	141
3. Le dosage des estérases totales après injections de corps étrangers.....	144
3.1. Les résultats	145
3.2. Discussion	147
4. Discussion, conclusion.....	147
CHAPITRE IV.....	149
Détection des antigènes sporozoïtaires chez <i>Anopheles stephensi</i> par ELISA	
1. Introduction.....	150
2. Le calibrage de l'épreuve ELISA en double sandwich.....	150
2.1. L'anticorps lapin anti-sporozoïtes matures (AcL/GS).....	150
2.2. Les anticorps souris anti-sporozoïtes immatures (AcS/TD) ou matures (AcS/GS).....	151
2.3. Les antigènes	153
2.4. Conclusion : le calibrage de l'épreuve ELISA.....	154
3. Les caractéristiques du titrage immuno-enzymatique	154
3.1. La reproductibilité de la méthode ELISA.....	154
3.2. L'évaluation de la charge sporozoïtaire en ELISA	156

3.3. Le seuil de positivité de la réaction.....	157
3.4. La fiabilité relative et la spécificité de la réaction	160
3.5. Les valeurs diagnostiques.....	162
3.6. Discussion	163
4. La détection des antigènes de sporozoïtes chez les anophèles inoculés.....	165
4.1. Les sporozoïtes immatures.....	165
4.2. Les sporozoïtes matures.....	166
4.3. Discussion	167
5. Discussion, conclusion.....	168
CONCLUSION GENERALE	172
BIBLIOGRAPHIE.....	179
ANNEXE 1	222
ANNEXE 2	224
ANNEXE 3	226
ANNEXE 4	229
ANNEXE 5	233

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

Figure 1.....	25
Le cycle sexué du <i>Plasmodium</i> dans le vecteur femelle.	
Figure 2.....	26
Le cycle asexué du <i>Plasmodium</i> chez le mammifère.	
Figure 3.....	60
Le cycle biologique des anophèles.	
Figure 4.....	81
La dénomination de l'âge des moustiques depuis l'émergence (J0) jusqu'au 20ème jour (J20).	
Figure 5.....	83
Exemple de droite de référence permettant de déterminer graphiquement, à partir des densités optiques (DO), les quantités de β -naphthol formées dans chacun des échantillons dosés.	
Figure 6.....	89
Les étapes du dosage des antigènes sporozoïtaires par la technique ELISA en double sandwich.	
Figure 7.....	91
Exemple de droite de référence permettant de déterminer graphiquement, à partir des densités optiques (DO), la concentration d'antigènes sporozoïtaires contenue dans les échantillons (dosage avec l'anticorps souris anti-sporozoïtes glandes salivaires, AcS/GS).	
Figure 8.....	92
Exemple de droite de référence permettant de déterminer graphiquement, à partir des densités optiques (DO), la concentration d'antigènes sporozoïtaires contenue dans les échantillons (dosage avec l'anticorps souris anti-sporozoïtes tube digestif, AcS/TD).	

Figure 9	138
Variations des taux d'estérases (en μM naphthol formé / moustique) chez les mâles (mâle), les femelles saines (fem S), les femelles non gorgées (fem NG) et les femelles infestées (fem I).	
Figure 10	139
Variations du poids (en mg / moustique) chez les mâles (mâle), les femelles saines (fem S), les femelles non gorgées (fem NG) et les femelles infestées (fem I).	
Figure 11	146
Variation des taux d'estérases chez des femelles <i>A. stephensi</i> inoculées avec des corps étrangers de type hématies (H), latex (L), sporozoïtes immatures (sp), RMPI (RP). Les femelles saines (fem S) servent de témoin.	
Figure 12	151
Variation des densités optiques (DO) en fonction de différentes concentrations d'anticorps lapin et d'antigènes négatifs (fem-) et positifs (fem+), pour une concentration fixée d'anticorps souris, 1/200.	
Figure 13	152
Variations des densités optiques (DO) en fonction de différentes concentrations d'anticorps souris AcS/TD (13-1), d'anticorps souris AcS/GS (13-2) et d'antigènes négatifs (fem-) ou positifs (fem+).	
Figure 14	153
Variation des densités optiques obtenues avec des dilutions différentes de femelles saines et infestées.	
Figure 15	155
Distribution des densités optiques (DO) en ELISA avec l'anticorps souris AcS/GS. Les concentrations sporozoïtaires (sp) sont calculées pour un volume de 200 μl .	
Figure 16	156
Distribution des densités optiques (DO) en ELISA avec l'anticorps souris AcS/TD. Les concentrations sporozoïtaires (sp) sont calculées pour un volume de 200 μl .	

Figure 17.....	158
Distribution des moustiques d'élevage sains et infestés en fonction des densités optiques obtenues en ELISA : 17-1 : avec l'anticorps anti-sporozoïte tube digestif (AcS/TD), 17-2 : avec l'anticorps anti-sporozoïte glandes salivaires (AcS/GS).	

TABLEAUX

Tableau 1.....	155
Variation des densités optiques moyennes et de leur écart-type (σ) pour les solutions standards du témoin négatif (-) et positif (+) en ELISA, avec les anticorps souris AcS/TD et AcS/GS.	
Tableau 2.....	161
Corrélation entre les résultats parasitologiques et immunologiques sur un même lot de moustiques (V+ : vrai positif, V- : vrai négatif, F+ : faux positif, F- : faux négatif, + : positif, - : négatif). 2-1 : dosage ELISA avec l'AcS/TD, 2-2 : dosage ELISA avec l'AcS/GS.	
Tableau 3.....	162
Les valeurs diagnostiques de l'épreuve ELISA selon les anticorps anti-sporozoïtes immatures (AcS/TD) ou anti-sporozoïtes matures (AcS/GS).	
Tableau 4.....	166
Evolution au cours du temps des résultats parasitologiques et immunologiques des sporozoïtes immatures injectés chez des femelles saines.	
Tableau 5.....	167
Evolution au cours du temps des résultats parasitologiques et immunologiques des sporozoïtes matures injectés chez des femelles saines.	
Tableau 6.....	230
Variation des taux moyens d'estérases totales, au cours des 20 premiers jours, chez les adultes <i>Anopheles stephensi</i> . Les concentrations enzymatiques sont exprimées en μ M de naphthol formées par adulte \pm écart-type (σ).	

Tableau 7.....	231
Evolution du poids, au cours des 20 premiers jours, chez les adultes <i>Anopheles stephensi</i> . Les poids sont exprimés en gramme par adulte \pm écart-type (σ).	
Tableau 8.....	232
Variation des taux moyens d'estérases totales chez les femelles <i>Anopheles stephensi</i> inoculées avec des corps étrangers (hématies (H), latex (L), sporozoïtes (sp) et RPMI (RP)). Les concentrations sont exprimées μ M de naphthol formées par adulte \pm écart-type (σ).	
Tableau 9.....	234
Variation des densités optiques chez les femelles saines (-) et infestées (+) pour différentes concentrations (Ac 1/100 à Ac 1/800) d'anticorps lapin anti-sporozoïtes matures (AcL/GS). Le dosage est effectué avec l'AcS/GS au 1/200.	
Tableau 10.....	234
Variation des densités optiques chez les femelles saines (-) et infestées (+) pour différentes concentrations (Ac 1/100 à Ac 1/800) d'anticorps souris anti-sporozoïtes matures (AcS/GS). Le dosage est effectué avec l'AcL/GS au 1/200.	
Tableau 11.....	234
Variation des densités optiques chez les femelles saines (-) et infestées (+) pour différentes concentrations (Ac 1/100 à Ac 1/800) d'anticorps souris anti-sporozoïtes immatures (AcS/TD). Le dosage est effectué avec l'AcL/GS au 1/200.	
Tableau 12.....	235
Variation des densités optiques pour différentes concentrations (A 1/20 à A 1/10240) de femelles saines (-) et infestées (+), avec l'AcL/GS et l'AcS/GS au 1/200.	
Tableau 13.....	235
Distribution des densités optiques pour la gamme de sporozoïtes, lors du dosage avec l'AcS/TD. La moyenne (Moy) et l'écart-type (σ) sont calculés sur l'ensemble des 5 plaques testées.	
Tableau 14.....	236
Distribution des densités optiques pour la gamme de sporozoïtes, lors du dosage avec l'AcS/GS. La moyenne (Moy) et l'écart-type (σ) sont calculés sur l'ensemble des 5 plaques testées.	

Tableau 15	236
Répartition des moustiques sains (-) et infestés (+) en fonction des densités optiques (DO), lors du dosage avec l'AcS/TD.	
Tableau 16	237
Répartition des moustiques sains (-) et infestés (+) en fonction des densités optiques (DO), lors du dosage avec l'AcS/GS.	

PLANCHES PHOTOS

PLANCHE I	66
L'infestation de l'anophèle au niveau du tube digestif	

Photo 1 : Tube digestif infesté par <i>P. y. yoelii</i>	67
Photo 2 : Oocystes à différents stades de maturation.....	67
Photo 3 : Oocystes mûrs.....	67

PLANCHE II	68
L'infestation de l'anophèle au niveau des glandes salivaires	

Photo 4 : Glandes salivaires d' <i>A. stephensi</i>	69
Photo 5 : Glandes salivaires infestées 1+.....	69
Photo 6 : Glandes salivaires infestées 2+.....	69
Photo 7 : Glandes salivaires infestées 3+.....	69

PLANCHE III	72
Les stades parasites chez la souris	

Photo 8 : Gamétocyte femelle.....	73
Photo 9 : Gamétocyte mâle.....	73
Photo 10 : Schizonte érythrocytaire mûr, contenant des mérozoïtes	73

PLANCHE IV.....	76
L'inoculation des anophèles	
Photo 11 : Appareil utilisé pour les inoculations de moustiques.....	77
Photo 12 : Technique d'inoculation des anophèles.....	77
PLANCHE V.....	97
Les prohémyocytes	
Photo 13 : Prohémyocyte mitotique en microscopie électronique.....	99
Photo 14 : Prohémyocyte en microscopie optique à contraste de phase.....	99
PLANCHE VI.....	100
Les oenocytoïdes	
Photo 15 : Oenocytoïde en microscopie électronique	102
Photo 16 : Fragment de cytoplasme d'un oenocytoïde en microscopie électronique	102
Photo 17 : Oenocytoïde en microscopie optique à contraste de phase.....	102
PLANCHE VII.....	104
Les plasmatocytes macrophages en microscopie électronique	
Photo 18 : Plasmatocytes macrophage en microscopie électronique.....	106
Photo 18' : Détail du cytoplasme d'un plasmatocyte macrophage en microscopie électronique	106
Photo 19 : Plasmatocytes macrophage en microscopie électronique.....	106
Photo 19' : Détail du cytoplasme d'un plasmatocyte macrophage en microscopie électronique	106
PLANCHE VIII.....	107
Les plasmatocytes macrophages en microscopie optique	
Photo 20 : Plasmatocyte macrophage avec un cytoplasme homogène	109
Photo 21 : Plasmatocyte macrophage avec un cytoplasme hétérogène.....	109
Photo 22 : Plasmatocyte macrophage avec des pseudopodes.....	109
Photo 23 : Plasmatocyte macrophage avec des voiles	109

PLANCHE IX 111

Les adipohémocytes

Photo 24 : Adipohémocyte en microscopie électronique.....113

Photo 25 : Adipohémocyte en microscopie optique à contraste de phase.....113

Photo 26 : Adipohémocyte d'une larve en microscopie électronique.....113

PLANCHE X 114

Le processus de phagocytose par les adipohémocytes

Photo 27 : Adipohémocyte en microscopie électronique.....116

Photo 28 : Détail d'une vacuole de phagocytose en microscopie électronique
.....116

Photo 28' : Détail d'une vacuole de phagocytose en microscopie électronique
.....116

PLANCHE XI 118

Les cellules du corps gras ou adipocytes

Photo 29 : Adipocyte en microscopie électronique120

Photo 29' : Adipocyte en microscopie électronique120

Photo 30 : Adipocyte en microscopie optique à contraste de phase120

PLANCHE XII 122

Les cellules à "double membrane"

Photo 31 : Cellules à "double membrane" en microscopie électronique.124

Photo 32 : Cellules à "double membrane" en microscopie électronique.124

PLANCHE XIII 125

Les cellules à "double membrane"

Photo 33 : Cellules à "double membrane" en microscopie électronique127

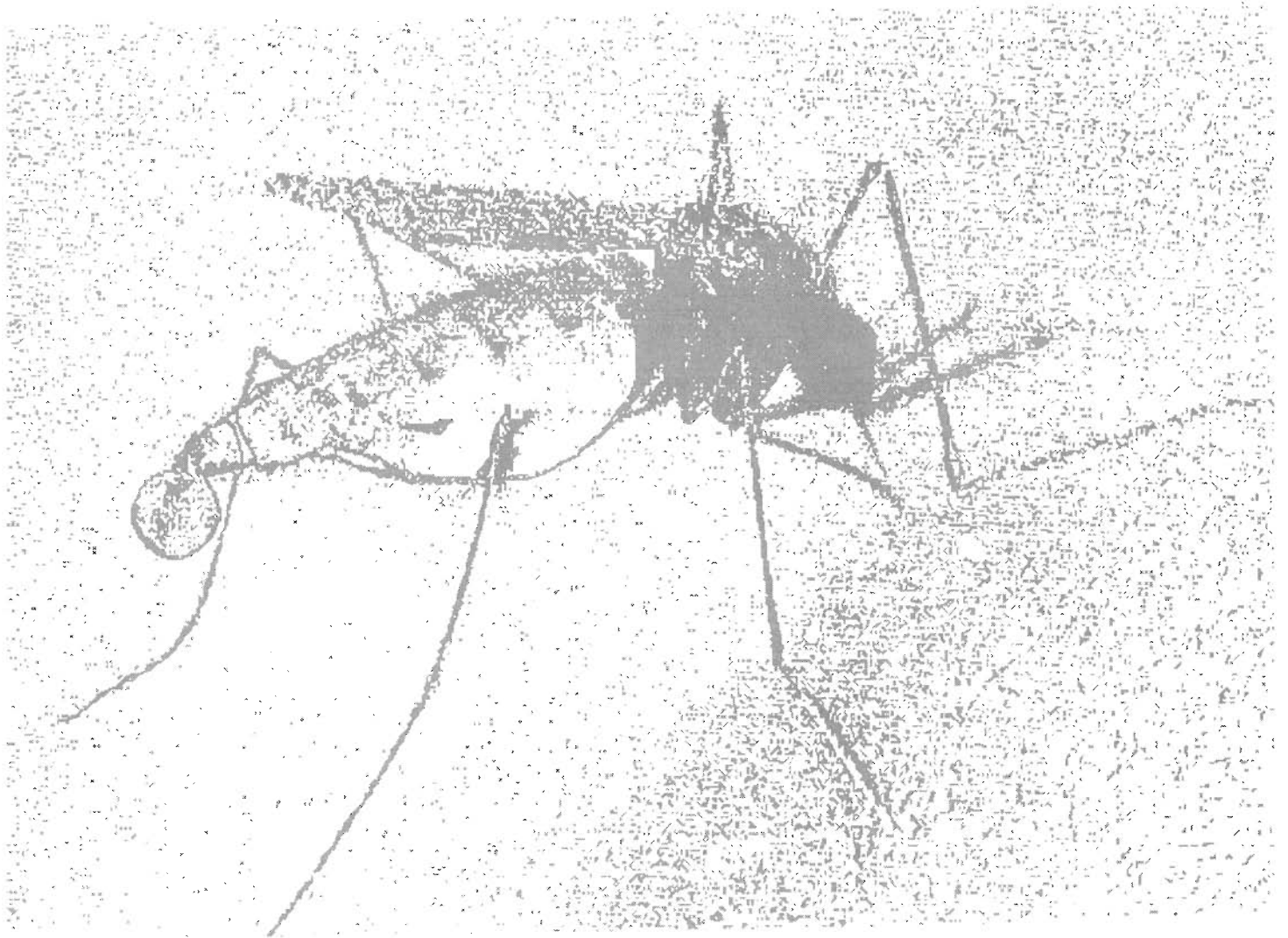
Photo 33' : Détail d'une cellule à "double membrane" en microscopie
électronique127

PLANCHE XIV..... 128

Les cellules à "double membrane"

Photo 34 : Jonctions septées entre deux cellules à "double membrane" en
microscopie électronique.130

Photo 34' : Jonctions septées entre deux cellules à "double membrane" en
microscopie électronique.130



AVANT PROPOS

A l'aube du XXI^{ème} siècle, les maladies parasitaires (paludisme, filarioses, trypanosomiase, leishmanioses, bilharzioses...) continuent à ravager le monde. Chaque année, le *Plasmodium* (*Haemosporida* : *Plasmodidae*), parasite responsable du paludisme, infecte 110 millions de personnes et entraîne la mort de 2 millions d'entre elles (OMS, 1985 a ; 1990). L'OMS estime à 2 milliards le nombre d'individus exposés à la maladie (OMS, 1991 a ; 1992 b).

L'entomologie médicale et la médecine se sont appliquées à combattre ces fléaux sur deux fronts :

- l'agent pathogène chez son hôte vertébré, au moyen de médicaments,
- le vecteur, hôte invertébré, à l'aide de moyens chimiques (insecticides de synthèse) et/ou biologiques (bio-pesticides, lâchers de mâles stériles, aménagements des gîtes...).

Malheureusement, le bilan de 90 années de lutte contre le paludisme est plutôt décevant (Mouchet *et al.*, 1991).

Le traitement des cas cliniques par la chimioprophylaxie a montré ses limites : la chimiorésistance des parasites s'étend dangereusement, et les firmes pharmaceutiques ne découvrent plus de nouveaux antimalariques (Danis et Mouchet, 1991 ; Haworth, 1991).

L'immense espoir créé par les outils de la biologie moléculaire autour du vaccin anti-paludisme a cédé la place à la perplexité devant la complexité du *Plasmodium* lui-même, et de ses relations avec le système immunitaire de l'homme (Cherfas, 1990 ; Marshall, 1990 ; Nussenzweig, 1990).

Les campagnes de lutte antivectorielle utilisant des insecticides de synthèse ont connu des heures de gloire après la deuxième guerre mondiale, avec le DDT, puis d'autres insecticides tels les cyclodiènes, les organophosphorés, les carbamates ou les pyréthrinoïdes. Dès la fin des années 50 l'homme s'est aperçu de la plasticité génétique de la nature : les vecteurs résistants remplacent peu à peu les espèces sensibles (Van der Kaay, 1991 ; Denholm et Rowland, 1992 ; OMS, 1992 a). De plus, l'usage inconsidéré d'insecticides engendre les problèmes de pollution de l'environnement (Coosemans, 1991).

La recherche s'est alors orientée vers des solutions plus naturelles, grâce aux insecticides biologiques (inhibiteurs de croissance, bactéries entomopathogènes, champignons, nématodes...) (Dobrokhotoy, 1991 ; Zaritsky *et al.*, 1992). Mais pour la plupart des espèces anophéliennes, les gîtes larvaires sont trop nombreux et trop temporaires pour que ce type de lutte soit réellement efficace.

L'insecte vecteur, hôte intermédiaire, joue un rôle déterminant dans la transmission d'une maladie. Il permet le développement ou la multiplication d'agents pathogènes, ainsi que leur dispersion. Il représente ainsi un maillon crucial. De sa compétence à assurer la transmission

dépendra le maintien de la chaîne épidémiologique.

Si l'on considère les couples insectes vecteurs-agents pathogènes, et plus particulièrement *Anopheles-Plasmodium*, la réduction de la compétence vectorielle reste une voie d'interruption de la transmission du paludisme. Avant d'y parvenir, certains mécanismes physiologiques et génétiques des relations hôte-parasite doivent être élucidés.

Nos connaissances sur le cycle du *Plasmodium* chez le moustique se limitent à des descriptions morphologiques, alors qu'il est désormais indispensable de l'appréhender au niveau moléculaire (Brey, 1991). La biologie moléculaire et la génétique offrent aujourd'hui des outils performants et les programmes de recherches sur la compétence vectorielle n'en sont qu'à leurs débuts : beaucoup de questions demeurent encore sans réponse. Comment l'anophèle parvient-il à localiser son hôte vertébré ? Comment le parasite, après avoir évité le système immunitaire d'un vertébré, arrive-t-il à éviter aussi celui du moustique ? Quelles sont les conditions qui lui permettent de se développer dans telle espèce d'anophèle ? Comment le système immunitaire du moustique tolère-t-il le *Plasmodium* ?

Le système immunitaire des insectes, et surtout celui des diptères, a suscité peu de travaux. Les vecteurs de maladies ont une quantité infime d'hémolymphe (par analogie le sang des vertébrés) et par conséquent, peu de cellules jouant un rôle dans les réactions immunitaires (les hémocytes), ce qui entraîne de sérieuses difficultés de manipulations. Cependant, les travaux de Maudlin et Welburn (1988 a ; 1988 b) sur la compétence vectorielle de la mouche tsé-tsé (*Diptera : Glossinidae*) vis-à-vis du trypanosome, parasite responsable de la maladie du sommeil, montrent à quel point ce type de recherche ouvre des perspectives en matière de lutte antivectorielle. Les arthropodes ne possèdent pas d'anticorps comme les mammifères, mais sécrètent des facteurs humoraux, appelés lectines, capables de distinguer le "soi" du "non-soi". Chez les glossines, les lectines contrôlent l'infestation de l'insecte par les trypanosomes (Maudlin et Welburn, 1987).

Nous avons donc tenté d'apporter de nouvelles informations sur la compétence vectorielle de l'anophèle en travaillant sur un modèle de paludisme de rongeur, *Anopheles stephensi-Plasmodium yoelii yoelii*. Nous nous sommes intéressés au système immunitaire de l'anophèle et au stade parasitaire qui se retrouve au contact de ce système : le sporozoïte.

Nous avons caractérisé, dans un premier temps, le système immunitaire des anophèles adultes en décrivant la composition cellulaire de l'hémolymphe. Nous avons ensuite isolé des sporozoïtes à partir d'anophèles chez qui ils effectuaient leur développement, "tolérés" par le système immunitaire. Ces parasites, ainsi que des corps étrangers inertes, ont été injectés dans

l'hémolymph de moustiques sains dans le but de déclencher et de mettre en évidence des réactions de défense de la part des moustiques.

La compétence du système immunitaire, c'est-à-dire son aptitude à distinguer le "soi" du "non-soi", a fait l'objet d'une étude cytologique, en microscopie électronique, et d'une étude enzymatique, grâce au dosage des estérases. En effet, ces enzymes sont impliquées dans le phénomène d'encapsulation humorale, réaction de défense caractéristique des moustiques (Collins *et al.*, 1991).

Enfin, nous avons voulu savoir si des sporozoïtes introduits artificiellement chez un anophèle étaient capables d'y achever leur développement. Pour ce faire, nous avons utilisé une méthode de dosage immuno-enzymatique afin de détecter la présence de sporozoïtes dans le moustique. Cette technique est basée sur la révélation des antigènes de surface sporozoïtaire.

Il m'aurait été difficile de respecter les objectifs fixés lors de la détermination du sujet, et ce dans les délais assignés, sans le concours d'un certain nombre de personnes. Pour leur aide, pour leur assistance, pour leur conseils voire pour leur soutien moral, qu'ils en soient remerciés.

Je souhaite toutefois faire quelques mentions particulières.

Mademoiselle Ginette LAUGE,

Vous me faites l'honneur de présider ce jury.

Depuis longtemps déjà, vous avez discrètement participé à ma vocation pour l'entomologie. Vous avez toujours gentiment approuvé mes choix et m'avez soutenu, bien souvent moralement, malgré les distances et les vicissitudes de la vie. Votre aide et vos conseils m'ont été précieux, voire même indispensables. Je vous renouvelle ici mon amitié sincère et respectueuse.

Madame Nicole MONTENY,

Vous avez, durant trois ans, suivi mes recherches et mis à ma disposition matériels et personnels du laboratoire que vous dirigez. Vous avez aussi contribué à l'obtention d'une aide matérielle pour l'achèvement de ma thèse. Je vous témoigne de mes remerciements sincères.

*Je vous remercie
pour votre aide*

Monsieur Michel BREHELIN,

Vous avez accepté de mettre à profit vos connaissances en matière d'immunité sur les insectes pour diriger une partie de mes recherches et pour m'aider à les réaliser dans votre laboratoire. Vous avez, de plus, accepté la tâche de rapporteur. Je vous apporte ici mes remerciements sincères, et vous témoigne de mon amitié sincère.

Monsieur François NOIREAU,

Vous avez spontanément accepté la charge de rapporteur sur un sujet éloigné de vos recherches habituelles. Vous avez déclenché mes motivations pour la recherche en me permettant de partager avec vous votre passion pour les expériences de terrain lors de mon DEA. Vous assumez pleinement, encore aujourd'hui les conséquences de vos incitations. Je vous assure de mon amitié sincère et fidèle.

Monsieur Vincent ROBERT,

Vous avez spontanément accepté de participer à ce jury, sans doute par passion pour le sujet choisi. Je vous en remercie sincèrement.

Monsieur Pierre CASSIER,

Vous avez accepté de participer à ce jury. Je vous en remercie sincèrement.

Madame Jeanne BARATHE,

Vous avez accepté de vous convertir aux "microlitres" et au dosage colorimétrique avec une joie de vivre constante malgré les difficultés techniques. Je vous remercie pour votre aide précieuse et votre amitié.

Madame Christiane SANNIER,

Vous avez participé activement à mes expériences et avez toujours gardé confiance malgré certains échecs. Je vous témoigne de toute mon affection.

Mademoiselle Florence FOURNET,

Vous m'avez toujours apporté une aide précieuse au cours des discussions fréquentes que nous avions. Je vous témoigne de mon amitié sincère.

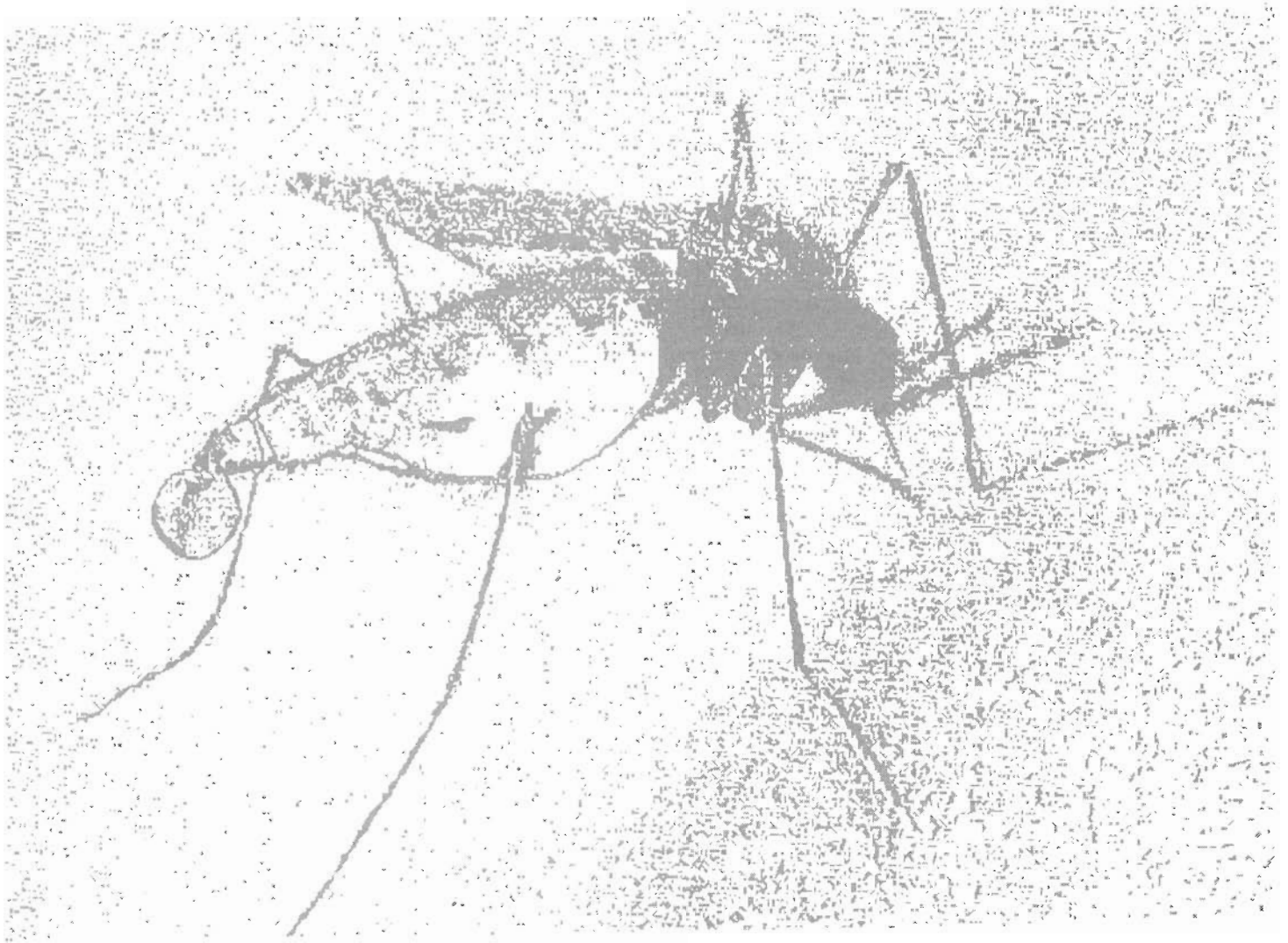
Madame Yolande ROSSO,

Vous m'avez apporté votre aide précieuse et tous vos talents en matière de coupes semi et ultra-fines. Trouvez ici toute ma reconnaissance.

Mes collègues du Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles, Marie-France RIANDEY, Patricia LE FUR et Didier BOUCHARINC, pour m'avoir apporté leur soutien.

Madame Annick AING et Monsieur FELTENS, qui m'ont apporté leur aide grâce à leurs talents.

Je ne saurais oublier Bruno et mes parents qui ont su comprendre les joies, les angoisses et les sautes d'humeur qui accompagnent la préparation d'une thèse.



INTRODUCTION

1. Le paludisme.

Le paludisme est provoqué par la présence de protozoaires du genre *Plasmodium* (Coccidiomorpha : Haemosporida). Trois espèces sont strictement humaines, *Plasmodium falciparum*, *P. ovale* et *P. vivax*. La quatrième, *P. malariae*, est sans doute partagée avec d'autres primates (Danis et Mouchet, 1991).

Les espèces plasmodiales parasites de mammifères sont transmises par des moustiques de la sous-famille des *Anophelinae* alors que celles parasites d'amphibiens, de reptiles ou d'oiseaux le sont principalement par la sous-famille des *Culicinae*.

On dénombre actuellement 70 espèces d'anophèles (*Diptera*, *Culicidae*) vectrices du paludisme humain et réparties dans le monde entier (OMS, 1985 a).

1.1. Le cycle du paludisme.

Des moustiques à l'homme (ou autre vertébré), les parasites du genre *Plasmodium* ont un cycle complexe. Il fait intervenir deux hôtes successifs :

- le moustique femelle, chez lequel se produit la multiplication sexuée (figure 1),
- l'homme ou un autre mammifère, où s'effectue la multiplication asexuée (figure 2).

1.1.1. Le développement du parasite dans le moustique.

Au cours d'un repas sanguin sur un sujet infecté, l'anophèle prélève différents stades parasitaires (figure 1). Tous seront digérés, à l'exception des gamétocytes sexués, formes infestantes du *Plasmodium* pour le moustique (Gass, 1977).

Dans l'estomac, les gamétocytes femelles grossissent et se transforment en macrogamètes femelles, tandis que les gamétocytes mâles subissent le processus d'exflagellation (Nijhout, 1979 ; Rosenberg *et al.*, 1984) pour donner naissance à 8 gamètes mâles flagellés (Strome et Beaudoin, 1974).

La fécondation aboutit à la formation d'un zygote mobile : l'ookinète (Gamham *et al.*, 1969). Celui-ci traverse la paroi du tube digestif moyen et se transforme en oocyste (Strome et Beaudoin, 1974 ; Hubert *et al.*, 1991 ; Syafruddin *et al.*, 1991). Le noyau de l'oocyste subit le processus de méiose et les sporozoïtes s'individualisent (Beaudoin *et al.*, 1974 ; Rosenberg et Rungsiwongse, 1991). A maturité, les oocystes éclatent pour libérer dans l'hémolymph des

sporozoïtes "immatures" (Vanderberg *et al.*, 1967 ; Garnham *et al.*, 1969 ; Vanderberg, 1974).

Ceux-ci migrent vers les glandes salivaires, *via* l'hémolymphe, en moins de 24 heures (Gabaldon et Ulloa, 1978). Ils se rassemblent alors au niveau du lobe médian et de la partie distale des lobes latéraux (Garnham *et al.*, 1963 ; Sterling *et al.*, 1973 ; Vanderberg, 1974) : ils deviennent alors infectants ou "matures" (Vanderberg, 1975).

Ainsi, l'anophèle est infectant, et au cours d'un repas de sang ultérieur, il injectera les sporozoïtes, formes infectantes des plasmodies pour le vertébré (Rickman *et al.*, 1990).

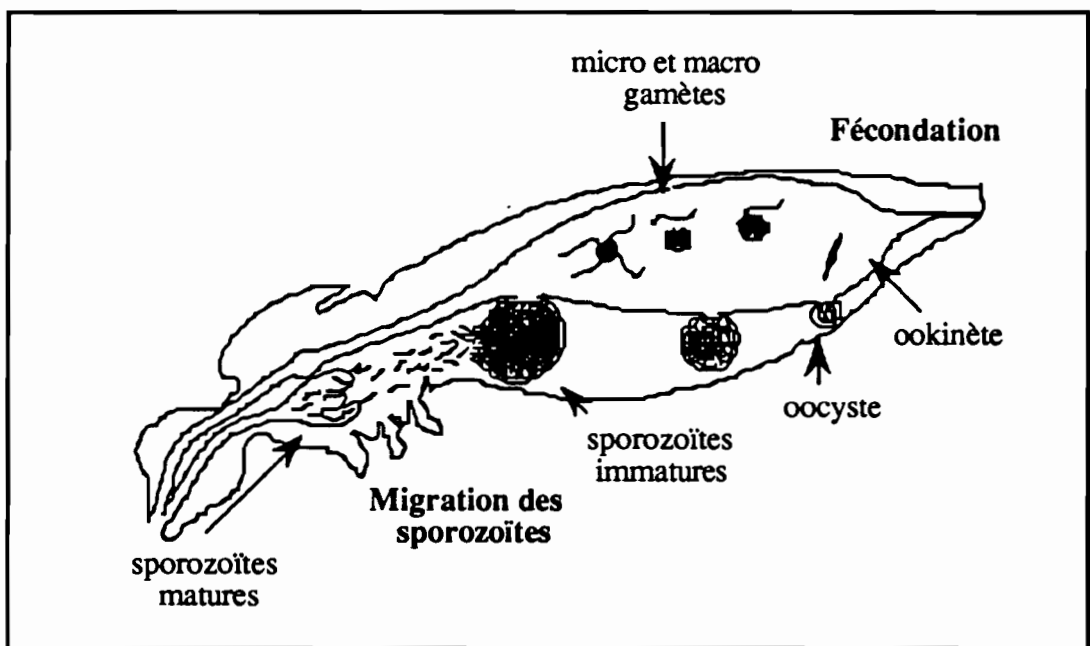


Figure 1 : Le cycle sexué du *Plasmodium* dans le vecteur femelle.

1.1.2. Le développement du parasite chez le vertébré.

Les sporozoïtes introduits dans le sang périphérique du vertébré (figure 2) subissent deux transformations (Schneider, 1970) :

- la schizogonie hépatique dans les cellules du foie (Van den Berghe *et al.*, 1950 ; Wery, 1966),
- la schizogonie érythrocytaire dans les globules rouges (Arnold *et al.*, 1969 ; Berendt *et al.*, 1990).

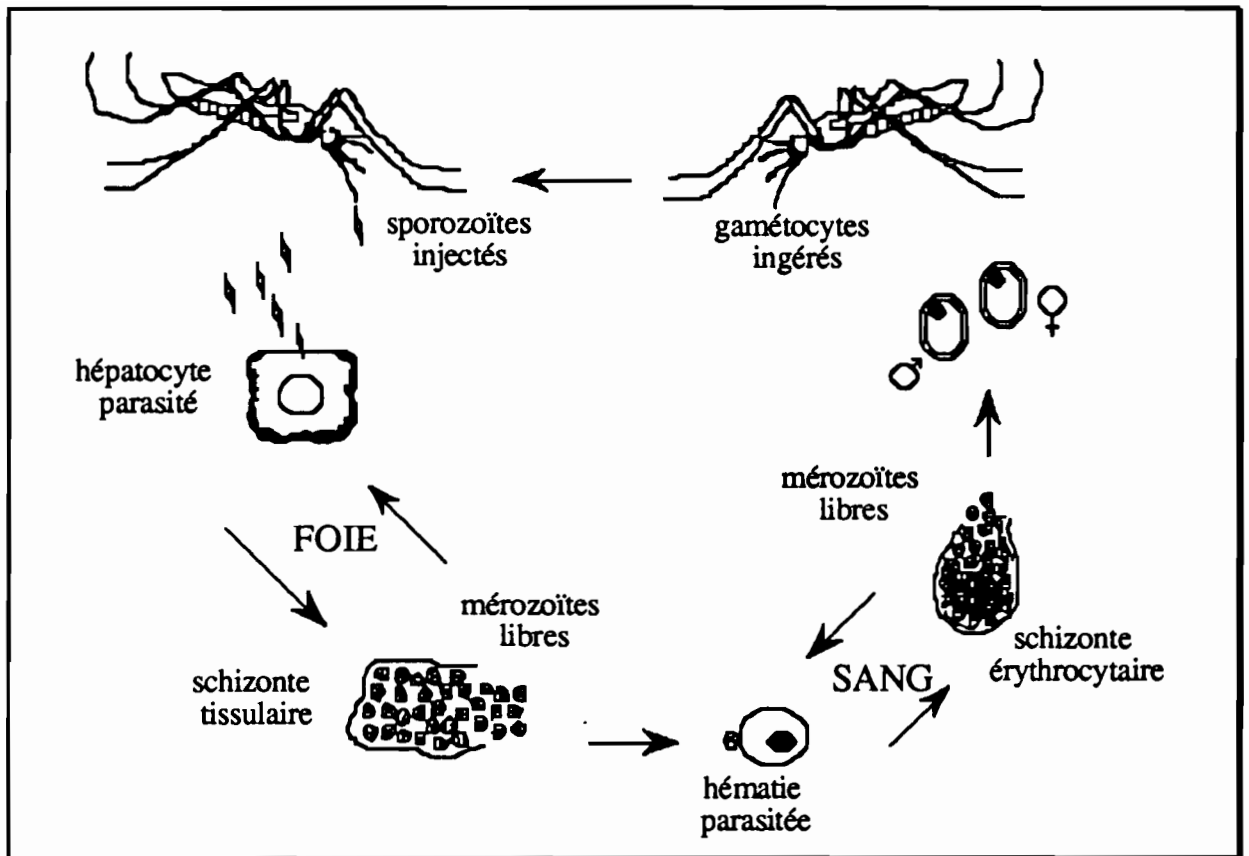


Figure 2 : Le cycle asexué du *Plasmodium* chez le mammifère.

1.1.2.1. La schizogonie hépatique.

Au cours d'une piqûre, l'anophèle infesté fait passer par sa salive un certain nombre de sporozoïtes dans un vaisseau sanguin (Beier *et al.*, 1991 b). Les parasites se répartissent dans tout le corps *via* la circulation générale du vertébré. Les sporozoïtes qui aboutissent dans le foie poursuivent leur développement (Graham *et al.*, 1973 a ; 1973 b).

Chacun des sporozoïtes infecte une cellule hépatique (Cox, 1992), et se transforme alors en un trophozoïte. Il se divise et forme en quelques semaines un schizonte (Landau *et al.*, 1976). A maturité, le schizonte hépatique éclate, et les mérozoïtes libérés vont envahir l'organisme et initier la phase érythrocytaire (Van den Berghe *et al.*, 1950 ; Beaudoin et Strome, 1973).

1.1.2.2. La schizogonie érythrocytaire.

Les mérozoïtes libres envahissent les globules rouges sains (Arnold *et al.*, 1969 ; Schneider, 1970). Ils migrent au centre de l'hématie et se transforment en un anneau caractéristique, le trophozoïte. Les trophozoïtes matures, appelés "corps en rosace", libèrent des mérozoïtes qui infectent à nouveau d'autres hématies (Beaudoin et Strome, 1973).

Après plusieurs cycles érythrocytaires, certains parasites évoluent en microgamétocytes mâles et en macrogamétocytes femelles (Schneider, 1970). Ces gamétocytes pourront être ingérés par un moustique femelle lors du repas de sang (Berendt *et al.*, 1990).

1.2. L'histoire de la parasitologie du paludisme.

1.2.1. Le paludisme humain.

En 1880, un médecin militaire français, Alfonse Laveran, découvre la cause de la maladie ancienne et meurtrière, provoquant des fièvres périodiques, et répandue en Afrique, en Asie, en Amérique du nord et en Europe. "Le mal est dû à une espèce de *Contagium vivum*", un parasite dans le sang des malades". On lui donne successivement le nom d'*Oscillaria*, *Haemamoeba*, *Haemosporidium*, *Haematozoon* pour aboutir enfin à *Plasmodium*" (in Bruce-Chwatt, 1980). Quelques années plus tard, les quatre espèces responsables du paludisme humain étaient identifiées : *Plasmodium malariae* (Laveran, 1881), *Plasmodium vivax* (Grassi et Feletti, 1890), *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897) et *Plasmodium ovale* (Stephens, 1922).

Entre 1885 et 1890, les phases évolutives du parasite dans le sang sont décrites (Garnham, 1966). Le cycle de développement complet des plasmodies restera mystérieux jusqu'en 1948, date à laquelle Shortt et Garnham apportent la preuve que *Plasmodium cynomolgi* se développe dans les cellules hépatiques du singe.

Ronald Ross démontre, en 1897, que les relations hypothétiques entre le moustique et les plasmodies sont bien réelles. Il observe des oocystes se développant chez "les moustiques aux ailes tachetées", nom qu'il donne alors aux anophèles. L'année suivante, il décrit le cycle complet de deux espèces de *Plasmodium* chez le moustique, l'une aviaire et l'autre humaine. La transmission des *Plasmodium* par les moustiques du genre *Anopheles* est établie (Ross, 1898).

La première culture *in vitro* de *P. falciparum* est réalisée bien des années plus tard (Trager et Jensen, 1976). Des études sur la sensibilité de l'hématozoaire aux insecticides ou aux antimalariques peuvent être entreprises, ainsi que d'autres sur le parasite lui-même dans l'espoir d'un vaccin (Lambros et Vanderberg, 1979 ; Graves *et al.*, 1984).

1.2.2. Le paludisme de rongeurs.

Au début du XX^{ème} siècle, les découvertes successives sur les plasmodies parasites de rongeurs vont drainer un grand nombre de travaux relatifs aux plasmodies humaines.

Ainsi, le British Museum décrit en 1938, *Anopheles duren* (*Diptera : Culicidae*) à partir d'un spécimen récolté en forêt zaïroise. Dès 1941, Vincke part sur le terrain, récolte des femelles d'*A. duren* et observe des sporozoïtes dans les glandes salivaires. La biologie de l'anophèle est étudiée, en 1946, c'est une espèce exophile, et ses préférences trophiques identifiées, essentiellement des rongeurs et des animaux insectivores (Killick-Kendrick et Peters, 1978).

En 1948, au Zaïre, Vincke et Lips découvrent un spécimen de *Grammomys surdaster* (Mammifère : Rongeur) avec de nombreux parasites sanguins. Le sang de ce rongeur est inoculé à des rongeurs de laboratoire, permettant ainsi de décrire *Plasmodium berghei*. Pendant ce temps, en Angleterre, Shortt et Garnham décrivent la phase hépatique de l'hématozoaire.

En 1950, la confirmation de la transmission de *P. berghei* par *A. duren* est apportée. Des sporozoïtes, isolés de femelles infestées, sont inoculés à des rats blancs et leur évolution au niveau du foie est suivie (Van den Berghe, 1948 ; Van den Berghe *et al.*, 1950 ; Rodhain *et al.*, 1955). *P. berghei* suscite déjà beaucoup d'intérêt car il se maintient facilement sur des rongeurs de laboratoire.

Très vite, la nécessité d'obtenir un vecteur expérimental se fait sentir car *A. duren* est une espèce beaucoup trop fragile. Des essais sont réalisés avec *Anopheles stephensi*, *Anopheles aztecus* et *Anopheles quadrimaculatus* mais la maturation des oocystes est incomplète (Yoeli et Wall, 1951 ; 1952 ; Yoeli et Most, 1960). En 1963, Yoeli, travaillant au Zaïre, eut l'idée de mesurer les conditions climatiques dans les zones boisées de captures d'anophèles infestés. La température était de 22°C dans la galerie forestière alors qu'à l'extérieur, il faisait 32°C. La transmission cyclique de *P. berghei* chez *A. quadrimaculatus* puis chez *A. stephensi* est alors réalisée, avec une production régulière d'oocystes (Yoeli *et al.*, 1964 ; Vanderberg et Yoeli, 1966 ; Vanderberg *et al.*, 1968 ; Yoeli, 1973).

Les années qui suivent permettront la découverte de nombreuses autres espèces de plasmodies de rongeurs ainsi que leur adaptation sur des vecteurs expérimentaux (Hawking *et al.*, 1957 ; Landau et Chabaud, 1965 ; Adam *et al.*, 1966 ; Garnham, 1966).

C'est ainsi que ces cycles de rongeurs ont remplacé peu à peu, au laboratoire, les modèles avec plasmodies d'oiseaux. Aux Etats Unis, *P. berghei* est utilisé dans le domaine de la chimiothérapie et plus de 150 000 molécules antimalariques sont testées. Par la suite, 50 000 substances seront testées chaque année (Graves *et al.*, 1984 ; Coosemans, 1991).

2. Les méthodes de lutte antipaludique.

2.1. Historique.

Le paludisme est décrit depuis l'antiquité, provoquant des fièvres épidémiques, mais toujours en relation avec des perturbations climatiques provoquant des pluies, des inondations ou des réserves d'eau stagnante. On décide alors d'éliminer les formes aquatiques du moustique : les marécages sont assainis de façon à éliminer tous les gîtes larvaires (in Danis et Mouchet, 1991).

On se protège aussi de façon individuelle, avec des "filets", les ancêtres des moustiquaires actuelles, ou avec des fleurs de pyrèthre (Danis et Mouchet, 1991 ; Pietra *et al.*, 1991).

Le traitement thérapeutique du paludisme débuta avec la découverte, en 1630, du quinquina et de ses vertus curatives. Il faudra attendre le XIX^{ème} siècle pour que des pharmaciens isolent l'extrait chimiquement actif du quinquina : la quinine. Cette dernière est alors utilisée en masse, soit en traitement curatif, soit en traitement préventif (Pietra *et al.*, 1991).

La lutte antivectorielle débute avec la découverte des propriétés insecticides du DDT en 1942. L'ère de la lutte imagoicide commençait, avec un seul but : éradiquer les moustiques donc la maladie. Les habitants se protégeaient des anophèles dans leur domicile par des aspersions d'insecticides. On espérait éliminer les moustiques alors qu'ils pénétraient dans les habitations pour se nourrir. Les premiers résultats furent miraculeux : le paludisme était pratiquement

éliminé du bassin méditerranéen, en Asie et aux Etats Unis (Gabaldon, 1951; Pampana, 1963). Ailleurs, les résultats étaient contradictoires, tantôt satisfaisants (Cameroun) tantôt décevants (Afrique de l'Ouest et Inde). Seulement, dès l'arrêt des traitements, le paludisme repartait de plus belle.

2.2. Les méthodes actuelles de lutte antivectorielle.

Aujourd'hui encore, devant l'ampleur de la maladie, les buts de la lutte antipaludique restent les mêmes, à savoir prévenir la mortalité, réduire la morbidité et les pertes socio-économiques que provoque le paludisme (OMS, 1992 b). De plus, la lutte antivectorielle reste la seule stratégie applicable dans toutes les zones endémiques (Van der Kaay, 1991; Knudsen et Sloof, 1992).

2.2.1. Les insecticides de synthèse.

L'éradication du paludisme grâce à la disparition des anophèles a été envisagée lors de la découverte des premiers insecticides de synthèse, les organochlorés (DDT, dieldrine, HCH...). Ceux-ci sont utilisés d'abord comme larvicides, puis comme imagocides en pulvérisations intradomiciliaires. Mais dès 1953, la résistance des anophèles aux organochlorés est signalée. Alors on persévère dans la découverte d'insecticides nouveaux, comme les organophosphorés (malathion, fénitrothion), les carbamates (propoxur) ou les pyréthrinoïdes (deltaméthrine, perméthrine) (Harbach *et al.*, 1990). Mais la plasticité génétique de la nature permet aux anophèles de tolérer des doses d'insecticides qui auraient été létales pour une population normale. La résistance des vecteurs est le résultat de modifications génétiques des individus ou de phénomènes épigénétiques qui concernent les modifications du comportement des populations vectrices, et en particulier l'exophilie (Mouches *et al.*, 1986 ; Merryweather *et al.*, 1990 ; Poirié et Pasteur, 1991 ; OMS, 1992 a).

Devant cet état de fait, on préconise la prévention par la protection individuelle (Pietra *et al.*, 1991 ; Bermejo et Veeken, 1992). L'utilisation des moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes assure une excellente protection, notamment en Chine (Lu Bao Lin, 1988) et en Afrique sub-saharienne, où on a réduit de 90% la transmission anophélienne (Carnevale *et al.*, 1992).

Cependant, la toxicité des insecticides pour les mammifères et leur environnement implique la recherche de solutions plus naturelles.

2.2.2. Les agents de lutte biologique.

Les agents de lutte biologique peuvent être des poissons larvivores, des larves de *Toxorhynchites* (Diptera : Culicidae : Toxorhynchitinae) prédatrices de larves de moustiques (Pichon et Rivière, 1979 ; Robert *et al.*, 1983 ; Horio et Tsukamoto, 1985), des champignons (Rafanomezantsoa-Randriambololona *et al.*, 1992), des bactéries entomopathogènes (Zaritsky *et al.*, 1992) ou des insectes parasitoïdes (OMS, 1985 b).

Dans le cas du paludisme, seuls les poissons larvivores (*Poeciliidae*), *Gambusia* ou *Poecilia* (guppies), sont préconisés contre les larves d'anophèles. Leur utilisation reste cependant limitée car les gîtes larvaires sont bien souvent temporaires et inaccessibles aux poissons (Mouchet *et al.*, 1991).

Les bactéries entomopathogènes, largement utilisées en agriculture, se sont avérées toxiques pour les larves de moustiques. *Bacillus thuringiensis* sérotype H14 est très efficace contre les larves de simulies mais beaucoup moins sur celles d'anophèles. En effet, les formulations sédimentent très vite au fond des gîtes alors que les larves d'anophèles se nourrissent en surface. La recherche tente maintenant de faire produire la protéine toxique de *Bacillus* chez des bactéries qui ont la capacité de rester à la surface de l'eau (Dobrokhotov, 1991).

2.2.3. Les autres méthodes de lutte.

Les programmes d'aménagements de l'environnement visent à éliminer les gîtes larvaires afin de réduire les populations vectrices.

Les méthodes génétiques peuvent également participer activement à la lutte antivectorielle (Tibayrenc et Ayala, 1991).

Les lâchers de mâles stériles dans la nature n'ont pas eu le succès escompté par manque de compétitivité avec les mâles sauvages (Akram et Aslamkhan, 1975 ; Mouchet *et al.*, 1991).

Depuis quelques années, des souches d'anophèles réfractaires au *Plasmodium* sont sélectionnées (Al-Mashhadani *et al.*, 1980 ; Collins *et al.*, 1986; Sluiters *et al.*, 1986). La résistance à l'hématozoaire du paludisme, phénomène contrôlé génétiquement (Frizzi *et al.*, 1975 ; Vernick *et al.*, 1989), se traduit par l'encapsulation humorale du parasite au niveau du tube digestif (Vernick et Collins, 1989). De récents travaux indiquent que les estérases, enzymes impliquées dans la résistance des vecteurs aux insecticides, le sont également dans la sensibilité des anophèles au *Plasmodium* (Collins *et al.*, 1991 ; Poirié et Pasteur, 1991).

Actuellement un espoir réside dans les moustiques transgéniques (Crampton *et al.*, 1990 a). La mise au point de tels moustiques nécessite d'introduire de l'ADN étranger dans les lignées germinales des anophèles en utilisant des éléments capables de s'intégrer au génome du moustique. Les succès du transport de gènes chez la drosophile grâce au transposon P de *Drosophila melanogaster* (Diptera : *Drosophilidae*) (Rubin et Spradling, 1982 ; Spradling et Rubin, 1982 ; Laski *et al.*, 1986 ; Rio *et al.*, 1986) laissent espérer une extension à d'autres espèces (Brennan *et al.*, 1984). Malheureusement, les essais sur *Locusta migratoria* (Orthoptera : *Acrididae*) ont été infructueux (Walker, 1989) et ceux sur *Anopheles gambiae* (Miller *et al.*, 1987), *Aedes triseriatus* (Diptera : *Culicidae*) (McGrane *et al.*, 1988) et *Aedes aegypti* (Morris *et al.*, 1989) indiquent que l'intégration d'ADN réussie n'est probablement pas due à l'élément P. On s'oriente maintenant vers la recherche de transposons endogènes aux moustiques (Crampton *et al.*, 1990 a ; 1990 b).

2.3. La chimiothérapie du paludisme.

Le traitement et la prophylaxie du paludisme se sont longtemps résumés à l'ingestion de doses de quinine. La pharmacologie des antipaludiques de synthèse s'est alors développée, les allemands découvrent les amino-4-quinoléines (chloroquine) et les américains, les sulfamides (proguanil) (Danis et Mouchet, 1991). Mais là encore, la pression de sélection est telle que dès 1960, les premières souches de *P. falciparum* résistantes aux amino-4-quinoléines apparaissent en Amérique du Sud et en Asie (Gentilini *et al.*, 1984). La chimiorésistance est maintenant signalée partout dans le monde et les médecins sont contraints de proposer des associations médicamenteuses. La carence en antipaludiques est réelle, et les derniers nés (méfloquine et halofantrine) ne présentent pas l'efficacité espérée (Danis et Mouchet, 1991 ; OMS, 1991 c ; Van Kessel et Lelijveld, 1992).

2.4. Les perspectives.

Les stratégies classiques de lutte antipaludique aboutissent à une impasse car le paludisme est en recrudescence partout dans le monde (OMS, 1991 a). Ce bilan montre à quel point les axes de recherche auraient dû être diversifiés beaucoup plus tôt. La recherche fondamentale sur les relations hôte-parasite a fait d'énormes progrès ces dix dernières années mais cela reste encore insuffisant devant l'ampleur de la maladie (Van der Kay, 1991).

Les nouvelles technologies permettent d'isoler deux thèmes de recherches porteurs d'espoir : la compétence vectorielle et le vaccin.

Quelques souches d'anophèles résistantes au développement plasmodial sont sélectionnées (Al-Mashhadani *et al.*, 1980 ; Collins *et al.*, 1986).

Le génome d'*A. gambiae*, organisé en trois paires de chromosomes, vient d'être cloné (Kitzmiller et Masson, 1967 ; Jost et Mameli, 1972 ; Chowdaiah et Seetharam, 1975 ; Zheng *et al.*, 1991). Les gènes codant pour certains antigènes parasites sont également clonés et ouvrent des perspectives vaccinales (Wortman *et al.*, 1989 ; Frontali et Pizzi, 1991 ; Sina et Hollingdale, 1991).

Ces progrès laissent espérer la compréhension des bases moléculaires de la compétence vectorielle (Frizzi *et al.*, 1975). En priorité, la recherche doit s'appliquer à identifier les gènes du moustique et du *Plasmodium* qui interviennent dans le développement parasite, ainsi que les mécanismes immunitaires et leurs enzymes associées, responsables de la résistance ou de la sensibilité du vecteur.

La lutte contre les anophèles doit s'orienter vers l'étude de tout ce qui peut perturber la maturation du *Plasmodium* chez le moustique dans le but d'interrompre la transmission du parasite. Cette idée avait déjà été proposée (Garrett-Jones, 1964) mais elle avait eu alors peu d'adeptes. En 1991, l'OMS reprend le flambeau et préconise de déterminer les bases moléculaires de la compétence vectorielle (Dobrokhotov, 1991 ; OMS, 1991 b).

3. La compétence vectorielle.

Le devenir d'un système hôte-parasite est conditionné par l'alternative suivante (Lackie, 1980) :

- la mort de l'hôte provoquée par les dommages du parasitisme,
- la coexistence entre l'hôte et le parasite, avec une évolution qui résulte souvent de milliers d'années.

Cette adaptation du parasite à l'hôte, et *vice versa*, aboutit à un vecteur dont le système immunitaire tolère le parasite (Ball, 1965 ; Yoeli, 1973).

L'étude de la compétence vectorielle a pour but de définir (OMS, 1991 b) :

- le comportement, la neurobiologie et la chimie des mécanismes de recherche de l'hôte par les anophèles,
- les interactions du *Plasmodium* avec le moustique afin d'identifier les gènes de l'hôte et du parasite qui régulent le développement du parasite,
- les mécanismes responsables de la résistance de l'anophèle vis-à-vis du parasite, en particulier au niveau du système immunitaire du moustique, des enzymes ou des facteurs humoraux associés à cette résistance et d'en identifier les gènes correspondants,
- d'autres souches d'anophèles réfractaires au *Plasmodium* afin d'obtenir des modèles supplémentaires d'étude de la génétique et de la base moléculaire de la résistance.

Si l'on s'intéresse au système vecteur-parasite responsable du paludisme, les phases critiques du développement du *Plasmodium* dans le moustique (Warburg et Miller, 1991) se situent au niveau :

- du tube digestif, avec l'ingestion des gamétocytes, la barrière "membrane péritrophique" et l'invasion de l'épithélium par les ookinètes,
- de l'hémolymph, lors de la migration des sporozoïtes immatures libérés des oocystes,
- des glandes salivaires, avec l'invasion de certaines parties des lobes par les sporozoïtes.

3.1. Le tube digestif.

3.1.1. L'ingestion des gamétocytes.

Lors d'un repas sanguin sur un hôte infecté, l'anophèle prélève le parasite à différents stades. Seuls les gamétocytes échappent à la digestion et poursuivent leur développement (Gass, 1977).

Chez le moustique, la libération du gamétocyte de son enveloppe érythrocytaire, la formation des gamètes femelles et l'exflagellation des gamètes mâles sont contrôlées par des changements physico-chimiques, comme la baisse de température et du pH (Rosenberg *et al.*, 1984 ; Warburg et Miller, 1991), et par un facteur présent au niveau de la tête et du tube digestif, nommé "mosquito exflagellator factor" ou MEF (Nijhout, 1979). Le MEF est un peptide de 10 kD (Sinden et Kawamoto, 1991) qui ne semble cependant pas être obligatoire pour le développement parasitaire.

Des injections de sang parasité dans l'hémolymphe provoquent également l'exflagellation des gamètes mâles (Weathersby et Mac Call, 1968). L'infectivité des gamétocytes pour le moustique est d'autant plus importante que la parasitémie asexuée est élevée (Sinden, 1991). Elle peut être diminuée lors de l'ingestion d'anticorps anti-gamétocytes avec le repas sanguin (Carter *et al.*, 1979) ou de certaines substances antimalariques (McCarthy et Clyde, 1973 ; Samish *et al.*, 1991).

La migration des microgamètes et la fécondation peuvent être inhibées dans le moustique. Ces phénomènes semblent dépendre du groupe sanguin du vertébré sur lequel la femelle s'est gorgée (Carter *et al.*, 1979). Le système immunitaire et les enzymes digestives du moustique ne semblent intervenir qu'au moment de la formation de l'ookinète (Freyvogel, 1980 ; Collins *et al.*, 1991).

3.1.2. La membrane péritrophique.

La membrane péritrophique des vecteurs de maladies a longtemps été considérée comme un obstacle à l'infestation parasitaire (Le Berre, 1967 ; Billingsley, 1990 a ; Walters *et al.*, 1992). Chez l'anophèle, c'est une membrane de sécrétion qui se forme autour du bol alimentaire au moment de la digestion, puis disparaît environ 72 heures après, une fois le sang digéré (Billingley, 1990 a). Contrairement aux *Aedes*, la membrane péritrophique d'*Anopheles* est ouverte et contient des résidus sucrés mais pas de chitine (Berner *et al.*, 1983).

L'ookinète doit traverser la membrane péritrophique pour atteindre la bordure en brosse de l'épithélium digestif (Syafuddin *et al.*, 1991). Les ookinètes détruisent la membrane péritrophique grâce à une chitinase qui digère la chitine lorsqu'elle en contient (Huber *et al.*, 1991). Dans le cas contraire, des liaisons spécifiques interviennent par le biais de lectines membranaires (Freyvogel et Staübli, 1965 ; Peters *et al.*, 1983 ; Rubin et Hecker, 1989 ; Huber *et al.*, 1991 ; Sieber *et al.*, 1991). La découverte du rôle des chitinases parasitaires est la seule démonstration qu'une molécule, spécifique d'un stade parasitaire, peut influencer la compétence vectorielle.

3.1.3. L'épithélium du tube digestif.

Les ookinètes traversent l'épithélium digestif par des voies intra et extra-cellulaires (Miller, 1991; Syafruddin *et al.*, 1991 ; Warburg et Miller, 1991). Certaines enzymes (Freyvogel, 1980) ainsi qu'une substance érythrocytaire libérée lors de la digestion, contrôlèrent la capacité des ookinètes à pénétrer cet épithélium (Rosenberg *et al.*, 1984). La phénoloxydase semble également impliquée dans les relations *Anopheles-Plasmodium*. Chez un individu réfractaire au parasite, l'activité phénoloxydasique est très supérieure à ce qu'elle est chez un individu sensible (Paskewitz *et al.*, 1989).

Gwadz et ses collègues (1989) provoquent la lyse des ookinètes dans l'épithélium du tube digestif en injectant des peptides antibactériens de grenouille dans le moustique (cécropines et magainines). *intra coelomique*

D'autres systèmes de reconnaissance moléculaire semblent impliqués mais sont encore à définir. Comment l'ookinète est-t-il reconnu par l'épithélium du tube digestif ? L'ookinète utilise-t-il des mécanismes d'invasion semblables à ceux utilisés par les mérozoïtes pour envahir les globules rouges (Sina et Hollingdale, 1991) ? Comment l'ookinète se fait-il reconnaître comme "soi" ou comme "non-soi" par le moustique ? S'il est reconnu comme "non-soi", comment échappe-t-il aux réactions du système immunitaire ?

Les oocystes se développent au contact de l'hémolymph, entre les cellules épithéliales et la lame basale de l'épithélium digestif. Ils sont entourés d'une double membrane dont une partie dérive du moustique (Vanderberg *et al.*, 1967). Il arrive cependant que des oocystes jeunes soient encapsulés par un phénomène humoral, *ie* sans participation cellulaire, chez les moustiques réfractaires au *Plasmodium* (Collins *et al.*, 1986).

L'encapsulation humorale est considérée comme la réaction de défense majoritaire chez les moustiques (Götz, 1986 ; Brey *et al.*, 1988 ; Ashida *et al.*, 1990). Les enzymes de la cascade prophénoloxydasique et celles du tube digestif font partie intégrante de ce système de défense en provoquant la synthèse de la mélanine et son dépôt autour du corps étranger encapsulé (Frizzi *et al.*, 1975 ; Collins *et al.*, 1991). L'activité enzymatique dans le tube digestif semble également influencer la maturation des oocystes (Freyvogel *et al.*, 1968).

Le développement des oocystes peut aussi être influencé par différents sucres ^{C6} (Weathersby et Noblet, 1973), le nombre ou la qualité des repas sanguins (Gass, 1977 ; Vaughan *et al.*, 1988 ; Samish *et al.*, 1991), des sels (Noblet et Weathersby, 1973 ; Peters et Ramkaran, 1980) ou des microsporidies (Bano, 1958 ; Jadin *et al.*, 1966).

3.2. L'hémolymph.

A maturité des oocystes, les sporozoïtes immatures sortent par effraction et se retrouvent dans l'hémolymph. On estime à 20% la proportion d'entre eux qui atteint les glandes salivaires (Rosenberg et Runsiwongse, 1991). La traversée de l'hémolymph par les sporozoïtes reste un mystère (Freyvogel, 1980) alors que c'est à ce niveau que le parasite entre en contact avec les cellules immunitaires de l'anophèle (Christensen et Forton, 1986 ; Brey *et al.*, 1988).

De quelle façon arrive-t-il à échapper au système de défense, à ne pas déclencher l'encapsulation humorale ? Comment se dirige-t-il pour migrer vers les glandes salivaires ? Une hypothèse a été émise sans jamais avoir été ni infirmée ni confirmée : la stratégie du *Plasmodium* au moment de migrer du tube digestif vers les glandes salivaires est de submerger le système immunitaire par un nombre impressionnant de sporozoïtes (Foley, 1978 ; Bayne, 1984). Ce phénomène d'évitement du système immunitaire, soit par immunodépression, soit par débordement, est inconnu mais mérite cependant toutes les attentions pour caractériser enfin les mécanismes impliqués dans la compétence vectorielle. La production excessive de sporozoïtes par les oocystes est un argument en faveur du débordement (Pringle, 1965 ; Rosenberg et Runsiwongse, 1991).

il espère
impressionner
qui ?

Des changements physico-chimiques existent entre l'hémolymph d'un moustique infesté et celle d'un moustique sain (Mack *et al.*, 1979 a ; 1979 b ; Maier *et al.*, 1987).

La présence d'albumine stimule la motilité des sporozoïtes (Vanderberg, 1974).

Il existerait également un facteur toxique au niveau de l'hémolymph d'anophèle et de *Culex* réfractaires au *Plasmodium*, qui empêcherait les sporozoïtes injectés dans l'hémolymph de migrer vers les glandes salivaires (Weathersby et Mac Call, 1968 ; Rosenberg, 1985 ; Warburg et Miller, 1991).

3.3. Les glandes salivaires.

Les mécanismes de reconnaissance et d'invasion des glandes salivaires par le *Plasmodium* sont inconnus. Chez les moustiques sensibles au parasite, les sporozoïtes se concentrent dans les parties distales des lobes latéraux et des lobes médians, là où le canal salivaire ne contient pas de chitine (Sterling *et al.*, 1973). Des expériences de transplantations de glandes salivaires d'une espèce d'anophèle à une autre indiquent que les sporozoïtes n'envahissent les glandes salivaires que de l'hôte compétent (Sinden, 1984 ; Rosenberg, 1985).

controversé

Les sporozoïtes immatures et matures sont identiques morphologiquement mais présentent des antigènes de surfaces différents (Aikawa *et al.*, 1981). Ils sont recouverts d'une protéine de surface majoritaire, la protéine circum-sporozoïte ou CSP (Vanderberg *et al.*, 1972). Cette protéine CS se met en place dans l'oocyste et est indispensable pour l'infectivité des sporozoïtes matures (Nussenzweig et Nussenzweig, 1985). Chez le vertébré, elle est capable d'engendrer une réaction immunitaire mais permet aussi l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes (Kolota, 1984 ; Warburg et Miller, 1991).

L'étude du génome des sporozoïtes révèle qu'il existe une seule copie du gène codant pour la protéine CS (Godson, 1985 ; Nussenzweig et Nussenzweig, 1985 ; Zavala *et al.*, 1985 ; Wortman *et al.*, 1989). La synthèse d'un très grand nombre de CSP et son apparition dès le stade oocyste, semblent indiquer un rôle de la protéine dans l'hémolymphe ainsi qu'au moment de la pénétration des glandes salivaires, mais aucune preuve formelle n'est encore disponible.

Les lectines sont également soupçonnées d'intervenir lors de la pénétration des glandes salivaires. Des sites récepteurs de lectines (Rosenberg, 1985 ; Perrone *et al.*, 1986) ont été identifiés sur certains lobes de glandes salivaires chez *A. aegypti* alors qu'aucun n'est disponible à la surface des sporozoïtes (Rudin et Hecker, 1989).

4. Les vaccins anti-paludisme.

La vaccination des hommes ou des animaux est reconnue comme la meilleure méthode pour contrôler l'évolution des maladies. Des recherches sont en cours pour tenter de mettre au point des vaccins contre des protozoaires ou des nématodes : on provoque une réponse immunitaire par des antigènes spécifiques de parasite (Ramasamy and Ramasamy, 1990 a ; 1990 b). L'ampleur de la maladie et ses difficultés de traitement ont stimulé les recherches de vaccins efficaces. Les principes de l'immunité acquise des mammifères vis-à-vis du *Plasmodium* ont été définis depuis 1930 par Sargent et Taliaferro mais la complexité des phénomènes immunologiques reste un obstacle difficilement surmontable (McGregor, 1965 ; Gobert *et al.*, 1972 ; Claman, 1973).

La réponse immunitaire est spécifique de chacune des espèces plasmodiales et de chacun des stades parasitaires (Ungureanu *et al.*, 1980 ; Knowles *et al.*, 1984 ; Godson, 1985 ; Nussenzweig, 1990).

Les connaissances acquises sur le cycle de développement du *Plasmodium* permettent de définir trois cibles potentielles qu'un vaccin pourrait atteindre :

- le sporozoïte, forme infectante pour le vertébré et inoculé par l'anophèle,
- le mérozoïte, forme responsable des symptômes de la maladie,
- le gamétocyte, forme infestante pour l'anophèle et responsable de la transmission de la maladie.

La culture de *P. falciparum* dans des hématies humaines n'est possible que depuis 1976 (Trager et Jensen, 1976). Les techniques ont été améliorées mais ne permettent pas de fabriquer de grandes quantités de parasites pour obtenir un vaccin en quantité suffisante. C'est pourquoi les chercheurs s'orientent vers la fabrication d'un vaccin par génie génétique (Herrington *et al.*, 1987 ; 1991 ; Vreden *et al.*, 1991). Plusieurs antigènes parasitaires ont été identifiés comme étant potentiellement vaccinaux.

Il existerait, en outre, une possibilité d'utiliser les antigènes spécifiques du vecteur lui-même dans le but de contrôler le moustique de façon immunologique (Vaughan et Azad, 1988 ; Contreras et Beier, 1992). On sait, depuis quelques années, que des composants salivaires ou digestifs induisent également une réponse immunitaire chez le vertébré (Wikel, 1982 ; Ramasamy *et al.*, 1988).

4.1. Le vaccin anti-sporozoïte.

L'idée de fabriquer un vaccin anti-sporozoïte repose sur deux observations importantes :

- les sporozoïtes sont capables, à l'état unitaire, d'engendrer un accès pernicieux chez le vertébré (Rickman *et al.*, 1990),
- l'injection de sporozoïtes irradiés à un vertébré induit la synthèse d'anticorps, lui procurant ainsi une certaine protection (Nussenzweig *et al.*, 1969 ; 1972 ; Alger et Harant, 1976 ; Tapchaisri *et al.*, 1983 ; Herrington *et al.*, 1987).

Le sporozoïte est considéré comme un stade parasitaire envahisseur. On peut espérer le contrôler au niveau de la circulation sanguine ou des hépatocytes, chez le vertébré, mais également chez l'insecte vecteur.

L'équipe de Nussenzweig est à l'origine des grandes découvertes sur les antigènes de sporozoïtes. Comme nous l'avons vu précédemment, les sporozoïtes ont, à leur surface, une protéine membranaire majoritaire, la protéine "circum-sporozoïte" (Aikawa *et al.*, 1981 ; Golenda *et al.*, 1991). Ils possèdent également un autre antigène de surface nommé CSP-2 (Hollingdale *et al.*, 1990).

La CSP est composée d'une séquence de 4 acides aminés (Asn-Ala-Asn-Pro- ou NANP) répétée un grand nombre de fois. Cet épitope principal est reconnu par les lymphocytes B et induit la formation d'anticorps chez un vertébré (Zavala *et al.*, 1983 ; Lagardère, 1991).

Un vaccin dirigé contre la protéine CS a été fabriqué et injecté à des volontaires. Malheureusement, les taux d'anticorps fabriqués chez l'homme sont très inférieurs à ceux obtenus sur les modèles animaux (Potocnjak *et al.*, 1980 ; Yoshida *et al.*, 1980 ; Herrington *et al.*, 1987 ; Etlinger *et al.*, 1988 ; Vreden *et al.*, 1991). Les modèles animaux révèlent également que la protection contre les sporozoïtes est due à la stimulation des lymphocytes B et T (Alger et Harant, 1976 ; Kolota, 1984). Des travaux récents tentent d'inclure au vaccin des auxiliaires aptes à stimuler les lymphocytes T afin d'obtenir une protection plus satisfaisante chez l'homme (Ballou *et al.*, 1987 ; Herrington *et al.*, 1991).

On peut également atteindre les sporozoïtes dans le vecteur afin de limiter la transmission. En effet, les anticorps qu'un anophèle ingère avec le repas de sang traversent le tube digestif et se retrouvent dans l'hémolymphe en trois heures (Vaughan et Azad, 1988). Ce potentiel de régulation de la transmission semble important surtout quand il s'agit d'anticorps anti-sporozoïtes. Ils se fixent soit sur les oocystes jeunes et induisent une surproduction de sporozoïtes, soit sur les sporozoïtes immatures libres dans l'hémolymphe et diminuent l'infestation des glandes salivaires (Vaughan *et al.*, 1988). Toutefois, il semble que ce phénomène soit sans incidence épidémiologique dans les zones de forte endémie (Beier *et al.*, 1989).

4.2. Le vaccin anti-mérozoïte.

Les mérozoïtes sont présents dans le développement parasitaire lors de la phase hépatique et érythrocytaire. Contrairement aux sporozoïtes, les antigènes de mérozoïtes sont très nombreux. Ils sont testés *in vitro* pour évaluer leur immunogénicité. Actuellement, on dispose de trois antigènes potentiellement vaccinaux.

Les mérozoïtes du stade hépatique ont longtemps été négligés car on supposait que les antigènes parasitaires n'étaient pas accessibles au système immunitaire. L'intérêt d'un vaccin contre ce stade serait de bloquer l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes.

Le principal antigène du schizonte mature est la protéine LSA, "liver stage antigen", constituée de séquences répétées tout comme la protéine CS (Guérin-Marchand *et al.*, 1987 ; Hollingdale *et al.*, 1990). Malgré les difficultés de culture (Hollingdale *et al.*, 1983), le gène codant pour l'antigène LSA a été isolé et exprimé chez *Escherichia coli* (Guérin-Marchand *et al.*, 1987). Le peptide synthétique correspondant a été inoculé à des singes mais il ne provoque

qu'une protection partielle (Patarroyo *et al.*, 1988).

La protéine CS joue également un rôle au moment de l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes. Elle sert de ligand et se lie aux récepteurs présents sur les cellules du foie (Cox, 1992). Les phénomènes immunitaires sont également très complexes mais l'invasion des hépatocytes peut être inhibée par l'interleukine-1 si elle est présente avant l'entrée des sporozoïtes dans les cellules hépatiques (Mellouk *et al.*, 1987).

Les mérozoïtes ont une phase érythrocytaire durant laquelle ils induisent les symptômes cliniques du paludisme. Un vaccin contre le stade sanguin du parasite aurait une incidence sur la mortalité palustre.

Un des antigènes importants de l'hématie parasitée est nommé RESA, "ring erythrocyte surface antigen". Il provoque *in vitro* la fabrication d'anticorps qui préviennent, dans certains cas, contre une réinvasion (Vernes *et al.*, 1984 ; Patarroyo *et al.*, 1988).

La troisième catégorie de protéines étudiée est constituée par les points d'attaches par lesquels les mérozoïtes se lient aux érythrocytes, les rhoptries parasitaires (Sinden, 1985 ; Lagardère, 1991).

4.3. Le vaccin anti-gamétocyte.

On connaît mal les antigènes des gamétocytes mais de récentes études indiquent qu'il existe des anticorps anti-gamétocytes chez des sujets impaludés (Bruce *et al.*, 1990). Ces anticorps n'ont aucun effet sur le parasite, mais lorsqu'ils sont ingérés par le moustique, bloquent la transmission (Carter *et al.*, 1979 ; Ramasamy et Ramasamy, 1990 a).

Cependant, l'idée d'un vaccin anti-gamétocyte est très controversée. Son effet serait de bloquer la transmission du *Plasmodium* de l'homme au moustique (Gwadz, 1976 ; Danis et Mouchet, 1991). Ce vaccin "altruiste" n'éviterait pas la maladie de l'homme parasité mais empêcherait que d'autres sujets soient infectés. Il conviendrait alors de l'associer à un vaccin capable de protéger du paludisme.

Sachant qu'il existe une relation directe entre le nombre de gamétocytes ingérés et le nombre d'oocystes formés, des essais sont réalisés sur des modèles animaux (Gwadz, 1976 ; Carter et Chen, 1976 ; Sinden, 1991). La perte d'infectivité des gamétocytes pour le moustique est provoquée par l'augmentation de la parasitémie asexuée chez le vertébré (Petit *et al.*, 1982). L'ingestion d'anticorps anti-gamétocyte module également l'infectivité des gamétocytes chez le moustique, et ce, en fonction du titre d'anticorps (Mendis *et al.*, 1987 ; Peiris *et al.*, 1988).

4.4. Vers un vaccin multivalent.

Nous venons de voir qu'aux modifications morphologiques du parasite correspondent des modifications antigéniques profondes. L'idée d'obtenir un vaccin efficace contre tel ou tel stade du *Plasmodium* évolue progressivement vers celle d'un vaccin multivalent (Langsley, 1988 ; Ramasamy et Ramasamy, 1990 b). Les premiers essais effectués sur le terrain sont porteurs d'espoir (Cox, 1993).

Les progrès récents sur les antigènes parasitaires indiquent que les cibles potentielles de chacun des candidats vaccins ne sont pas aussi strictes que l'on pensait. Des antigènes communs sont identifiés entre les sporozoïtes et les gamétocytes, les sporozoïtes et les stades hépatiques et les stades hépatiques et érythrocytaires (Hollingdale *et al.*, 1983 ; Sina et Hollingdale, 1991).

Le vaccin anti-paludisme promis depuis de nombreuses années a bien du mal à voir le jour devant un parasite "caméléon". Il semble alors intéressant de ne pas négliger les recherches sur la possibilité d'un vaccin anti-transmission car il permettra peut-être d'obtenir un moyen efficace de limiter l'extension de la maladie (Targett, 1991).

La transmission du *Plasmodium* de l'homme à l'anophèle peut être affectée par divers autres anticorps, dirigés soit contre des antigènes du moustique, soit contre des antigènes des stades parasitaires dans le moustique.

Chez *Anopheles stephensi*, on observe une mortalité accrue après un repas de sang pris sur un lapin immunisé avec des antigènes de tube digestif (Alger et Cabrera, 1972). L'immunisation de lapin avec des broyats d'*Aedes aegypti* entiers, des fragments d'abdomen ou de tube digestif entraîne une réduction de la fécondité chez des moustiques gorgés (Sutherland et Ewen, 1974 ; Ramasamy *et al.*, 1988 ; Ramasamy *et al.*, 1990). Des observations similaires sont faites chez des glossines nourries sur des lapins immunisés avec des symbiontes du tube digestif de la mouche (Nogge, 1978). Des immunisations de vertébrés avec des antigènes de surface de gamètes (Gwadz, 1976), zygotes et ookinètes (Vermeulen *et al.*, 1985) bloquent également l'infectivité du parasite vis-à-vis du moustique quand les anticorps sont ingérés avec le repas sanguin infectieux (Peiris *et al.*, 1988).

L'immunisation de souris avec des glandes salivaires de moustique protège la souris de l'infection par le parasite (Alger et Harant, 1976), alors qu'une immunisation avec des têtes entières ne provoque aucune protection particulière (Ramasamy et Ramasamy, 1990 a).

Ces travaux permettent de mieux comprendre les relations "intimes" entre le moustique et le *Plasmodium* mais le puzzle est loin d'être achevé. Le domaine de l'immunité des insectes vecteurs de maladie peut également contribuer à la compréhension des systèmes hôtes-parasites.

5. L'immunité chez les insectes : état actuel des connaissances.

La compétence vectorielle offre de nouveaux espoirs de lutte contre le paludisme mais les connaissances sur le système immunitaire des diptères, et des moustiques en particulier, font cruellement défaut. Nous proposons donc de dresser l'état des connaissances acquises chez les diptères.

5.1. Introduction.

La première description d'une réaction de défense chez un invertébré date de 1822, lorsque Metchnikoff met en évidence le phénomène de phagocytose chez une larve d'étoile de mer. Entre 1891 et 1910, Cuvier fut le premier à révéler l'existence des organes lymphoïdes chez les crustacés et les insectes, organes qui joueraient un rôle dans la phagocytose et la multiplication cellulaire.

Les insectes, comme tous les autres animaux, possèdent un milieu interne, l'hémolymphe. L'hémolymphe contient des cellules, des sels minéraux, des protéines, des acides aminés libres et de l'eau (Jones, 1953 a). Son rôle est de transporter les matières nutritives et les hormones, de distribuer les produits du métabolisme et les enzymes qui détoxifient certains produits chimiques et de débarrasser l'organisme des micro-organismes, des parasites et des particules solides (Mack et Vanderberg, 1978).

La compétence d'un système immunitaire est définie comme sa capacité à distinguer le "soi" du "non-soi". Chez l'insecte, elle est due à l'action combinée des cellules immunitaires, des facteurs humoraux de l'hémolymphe et de la coagulation.

Nous allons présenter les cellules immunitaires décrites chez les insectes puis les différents mécanismes immunitaires mis en jeu, avec une mention particulière pour les *Culicidae*.

5.2. Les cellules immunitaires.

L'hémolymph des insectes est composée du plasma et de cellules nucléées, les hémocytes. Les hémocytes sont soit des cellules libres, en circulation dans le plasma, soit des cellules adhérant de façon lâche aux organes (Brehélin, 1977).

La classification des hémocytes d'insectes a toujours été controversée. De nombreux types ont été décrits, avec des divergences selon l'espèce étudiée et l'auteur. En 1986, Brehélin et Zachary proposent d'établir une nouvelle classification des hémocytes d'insecte (Brehélin et Zachary, 1986).

On distingue classiquement 9 types d'hémocytes : les prohéocytes, les plasmatocytes, les oenocytoïdes, les cellules à sphérules, les thrombocytoïdes, et trois types de granulocytes. Ainsi, il est possible de caractériser une espèce par les types d'hémocytes présents et leurs concentrations respectives. Les moustiques sont connus pour leur pauvreté en hémocytes circulants, soit moins de 4000 cellules par millimètre cube d'hémolymph (Jones, 1953 a ; 1962).

5.2.1. Les prohéocytes.

Les prohéocytes sont de petites cellules arrondies avec un gros noyau. Le cytoplasme, peu développé, est riche en ribosomes libres. Le réticulum endoplasmique rugueux (RER) est peu développé. Les mitochondries sont petites et peu nombreuses.

Ces cellules sont supposées être celles des organes hématopoïétiques, *ie* les cellules souches des hémocytes, car on les observe presque toujours en mitose (Beaulaton, 1979 ; Kaaya et Ratcliffe, 1982 ; Brehélin et Zachary, 1986). Elles sont présentes dans toutes les espèces étudiées à ce jour, et correspondent aux "prohéocytes" de la littérature antérieure à 1986.

5.2.2. Les plasmatocytes.

Les plasmatocytes sont très polymorphes et amoeboïdes : quand ils sont en contact avec un support (lame de verre...), ils émettent des pseudopodes (Wago et Ichikawa, 1979 b ; Wago, 1980 c) ou des voiles (Foley, 1978). Ces hémocytes ont un grand noyau rond ou ovoïde, placé au centre du cytoplasme. On observe des ribosomes libres très nombreux, un

réticulum endoplasmique rugueux bien développé et de nombreuses mitochondries.

Leurs fonctions principales sont la phagocytose, la formation de capsules (Rowley et Ratcliffe, 1976 ; Wago, 1980 b ; Chen et Laurence, 1985) ou de nodules (Rahmet-Alla et Rowley, 1989) autour des corps étrangers.

Les plasmatocytes sont décrits chez les lépidoptères et quelques diptères (Harpaz *et al.*, 1969 ; Kaaya et Ratcliffe, 1982). Ils correspondent aux "plasmatocytes agranulaires" (Ratcliffe et Rowley, 1981), aux "plasmatocytes typiques" (Brehélin et Zachary, 1983) ou aux "lamellocytes" de Drosophiles (Rizki, 1957).

5.2.3. Les oenocytoïdes.

Les oenocytoïdes sont des cellules de grande taille avec un faible rapport noyau-cytoplasme. Le noyau, rond, est toujours excentré dans la cellule. Les organites cytoplasmiques sont peu nombreux (mitochondries, appareil de Golgi, RER) et les inclusions de types granules sont rares. On observe cependant des microtubules et des fibres chez les Lépidoptères (Akai et Sato, 1973) ou des cristaux chez les drosophiles (Rizki et Rizki, 1959 ; Brehélin, 1982).

Les test cytochimiques réalisés chez les moustiques (Drif et Brehélin, 1983) ou chez les lépidoptères (Essawy *et al.*, 1985), ainsi que des marquages par anticorps (Ashida *et al.*, 1990) ont montré la présence de phénoloxydase dans le cytoplasme de ces cellules (Iwana et Ashida, 1986). On considère actuellement que leur fonction principale est la synthèse de cette enzyme, très importante dans les réactions de défense des insectes. Ils jouent également un rôle dans le métabolisme de la mélanine et des agents de tannage (Brehélin et Zachary, 1986).

Ils sont présents chez tous les insectes mais en très petit nombre, et correspondent aux "oenocytoïdes" de la littérature. Ils sont absents chez *L. migratoria* (Acrididae) (Brehélin et Zachary, 1986).

5.2.4. Les cellules à sphérules.

Les cellules à sphérules sont de grande taille, et renferment des grandes inclusions rondes, appelées sphérules, parfois si nombreuses qu'elles induisent des déformations de la cellule et de son noyau. Ces inclusions peuvent être opaques aux électrons, comme chez *Melolontha melolontha* (Coleoptera : Scarabaeidae), ou présenter une structure interne sous

forme d'enroulements de membranes comme chez certains lépidoptères (Beaulaton, 1979 ; Essawy *et al.*, 1985).

Les fonctions de ces cellules sont inconnues. Elles sont communes à beaucoup d'insectes (Akai et Sato, 1973), pouvant être nombreuses chez *M. melolontha* ou absentes chez les diptères. Elles étaient classiquement appelées "adipohémocytes" (Harpaz *et al.*, 1969).

5.2.5. Les thrombocytoïdes.

Les thrombocytoïdes ont une allure générale régulière. La membrane cytoplasmique de ces hémocytes présente des invaginations très profondes et sinueuses (Zachary et Hoffmann, 1975). Cela conduit parfois à un fractionnement de la cellule en fragments cytoplasmiques anucléés, indépendants les uns des autres.

Chez *Calliphora erythrocephala* (Diptera : Calliphoridae), les thrombocytoïdes phagocytent des bactéries *in vitro* (Rowley et Ratcliffe, 1976) mais non *in vivo* (Zachary, 1978). Ils participent également à la formation des capsules autour des corps étrangers (Zachary *et al.*, 1975).

Ces cellules sont connues uniquement chez les diptères (Kaaya et Ratcliffe, 1982) mais semblent être absentes chez les *Drosophilidae* et les *Culicidae*. Elles correspondent aux "thrombocytoïdes" de la littérature (Zachary et Hoffmann, 1975).

5.2.6. Les granulocytes.

Les granulocytes, ou hémocytes à granules, sont les plus importants en nombre et en fonction chez les insectes. Ils sont divisés en 3 types, selon les caractéristiques de leurs granules.

5.2.6.1. Les granulocytes de type I (GHI).

Les granulocytes de type I sont des cellules très polymorphes avec de nombreuses digitations et des vésicules de pinocytose. Le réticulum endoplasmique rugueux est très développé sous forme de citernes dilatées. Ils contiennent trois types d'inclusions cytoplasmiques (Wago, 1980 a ; 1980 b).

Les GHI sont capables de phagocyter des corps inertes ou vivants présents dans l'hémolymph, soit après lyse des tissus, soit après injection (Wago, 1981 ; Wago et Ichikawa, 1979 a ; 1979 b). Ils sont les plus importants lors des processus de reconnaissance du "non-soi" et de coagulation d'hémolymph (Brehélin *et al.*, 1975 ; Rowley, 1977 ; Ratcliffe et Rowley, 1979). Au contact des corps étrangers, ils subissent des transformations ; ils relâchent quelques granules (chez les lépidoptères) ou se lysent complètement (chez *L. migratoria*), libérant dans l'hémolymph des facteurs qui vont entourer les corps étrangers, les agglutiner et permettre ainsi leur reconnaissance pour être encapsulés (Brehélin et Hoffmann, 1980 ; Ratcliffe et Rowley, 1981 ; Ratcliffe *et al.*, 1984).

Tous les insectes possèdent des GHI, exceptés les diptères. Ils étaient appelés "coagulocytes" (Hoffmann, 1968 ; Goffinet et Gregoire, 1975), "cellules granuleuses" (Ratcliffe et Rowley, 1981), ou "plasmatocytes" (Wigglesworth, 1973).

5.2.6.2. Les granulocytes de type II (GHII).

Les granulocytes de type II sont de forme sphérique ou ovoïde, et leur membrane ne présente généralement pas de vésicules de pinocytose. Le RER est peu développé, l'appareil de Golgi est très développé. Les inclusions sont uniformément denses aux électrons, ce qui donne aux GHII une très forte réfringence lorsqu'ils sont observés en microscopie optique.

Dans l'hémolymph, ils participent à la formation de capsules autour des corps étrangers en formant la couche cellulaire la plus interne (Salt, 1960 ; François, 1975 ; Bitkowska *et al.*, 1982). Chez *L. migratoria*, ils encapsulent des corps étrangers trop gros pour être phagocytés (Brehélin et Zachary, 1986). Chez d'autres espèces ils forment des nodules (Hagopian, 1971) et synthétisent une partie du lysozyme sanguin (Brehélin, 1990).

Ces granulocytes sont présents principalement chez les orthoptères et chez les larves de *M. melolontha*, et absents chez les diptères (Brehélin et Zachary, 1986). Ils peuvent être appelés "granulocytes", "hémocytes granuleux" ou "plasmatocytes à granules".

5.2.6.3. Les granulocytes de type III (GHIII).

Les granulocytes de type III sont des hémocytes macrophages, caractérisés par de très nombreuses dilatations et des vésicules de pinocytose. Les granules, parfois nombreux, augmentent considérablement en nombre et en taille si les particules à phagocyter sont nombreuses dans l'hémolymphe. Toutes les inclusions sont des lysosomes secondaires renfermant du matériel en cours de résorption (Brehélin et Zachary, 1986).

Les GHIII, ou "plasmatocytes macrophages", ont un rôle très important d'endocytose. Ils phagocytent les corps injectés vivants (globules rouges, bactéries) ou inertes (Brehélin, 1982).

Ils sont présents chez les diptères, les orthoptères et les dictyoptères (Harpaz *et al.*, 1969 ; Hagopian, 1971), et absents chez les lépidoptères (Amouriq, 1960 ; Foley, 1978 ; Beaulaton, 1979 ; Essawy *et al.*, 1985).

5.3. Les réactions immunitaires.

Chez les mammifères, ce sont les anticorps qui jouent le rôle de facteurs humoraux de reconnaissance des antigènes étrangers (Warr, 1981).

Les arthropodes, dont les insectes, n'ont pas d'anticorps, mais sécrètent des facteurs humoraux de reconnaissance appelés hémagglutinines. Très peu d'informations sur le système immunitaire des diptères sont disponibles (Lackie, 1988) alors que les mécanismes de défenses sont mieux connus chez les crustacés ou les mollusques (Bang, 1973 ; Williams, 1979 ; Benex et Matricon-Gondran, 1981 ; Bayne et Yoshino, 1989 ; Aspan *et al.*, 1990 ; Chagot *et al.*, 1992 ; Moore *et al.*, 1992 ; Mourton *et al.*, 1992).

Les réactions immunitaires sont classées en deux grands types (Brehélin, 1986 ; 1990) :

- les réactions à médiation cellulaire, où une ou plusieurs cellules ingèrent le corps étranger en collaboration avec des médiateurs chimiques,
- les réactions à médiation humorale, avec production de substances circulantes, essentiellement anti-bactériennes.

5.3.1. Les réactions à médiation cellulaire.

Les réactions de défense à médiation cellulaire se rencontrent chez tous les invertébrés. Elles sont déclenchées à la suite de blessures, d'infections ou de la présence de parasites. On distingue la phagocytose, la formation de nodule et l'encapsulation cellulaire (Ratcliffe, 1986). Les corps étrangers de petite taille (bactéries, virus, levures, champignons, particules d'encre...) sont phagocytés ou inclus dans des nodules alors que ceux de grande taille (parasites, nématodes, implants de tissus, billes de latex...) sont encapsulés.

Les cellules ou tissus du système immunitaire interviennent en collaboration avec des substances humorales. Ce sont des médiateurs chimiques qui jouent le rôle des opsonines des vertébrés et participent, en synergie avec les hémocytes, aux phénomènes de reconnaissance des corps étrangers.

5.3.1.1. La phagocytose.

La phagocytose est une des rares réactions de l'immunité des insectes qui présente de fortes analogies avec l'immunité des vertébrés (Kaaya, 1989). Le processus de phagocytose est efficace contre des objets de petite taille, et se met en place en 1 heure environ (Ratcliffe et Rowley, 1979). Le matériel vivant englouti est généralement dégradé par les enzymes du phagosome (Cameron, 1934).

Les mécanismes de la phagocytose ont été décrits par Metchnikoff en 1884 (Metchnikoff, 1884) alors qu'il avait injecté des levures chez *Daphnia magna* (Crustacea : Cladocera). Depuis, divers corps étrangers ont été injectés chez des mollusques (Mourton *et al.*, 1992 ; Tripp, 1992) et des insectes (Kaaya, 1989) afin d'apprécier l'efficacité de la phagocytose et d'en connaître les diverses étapes (Wago, 1982 a ; 1982 b ; 1982 c ; 1983 ; 1984). Les hémocytes d'insectes phagocytent des corps étrangers aussi divers que des bactéries (Rowley et Ratcliffe, 1976), des virus, des protozoaires (Gilliam et Shimanuki, 1967), des champignons ou des hématies (Wago et Ichikawa, 1979 b), et des corps inertes comme les particules d'encre, des poudres organiques ou inorganiques et du polystyrène (Cameron, 1934 ; Weathersby et McCall, 1968 ; Ryan et Nicholas, 1972 ; Kaaya *et al.*, 1986).

Chez les glossines, la phagocytose est efficace contre des bactéries, des particules d'encre ou des hématies mais inefficace contre les trypanosomes (Kaaya *et al.*, 1986). Après injection de gamétocytes dans l'hémolymph de *Culex* et d'*Aedes* adultes, les oocystes en formation sont encapsulés (Weathersby et McCall, 1968). Chez les larves de ces mêmes espèces, les

plasmatocytes phagocytent des billes de latex et des ions saccharates (Drif, 1983 ; Drif et Brehélin, 1983). Cependant, la phagocytose ne semble pas jouer un rôle dans la compétence vectorielle des vecteurs, car les moustiques sensibles et réfractaires au *Plasmodium* ont une capacité à phagocyter identique (Weathersby et McCall, 1968).

5.3.1.2. La formation de nodules.

La formation de nodules intervient lorsque de grandes quantités de corps étrangers envahissent l'hémolymphe de l'insecte. Les nodules sont formés en quelques minutes (Rahmet-Alla et Rowley, 1989). Ils ont été trouvés chez des insectes récoltés sur le terrain (Ratcliffe et Rowley, 1979).

Des nodules sont formés chez les adultes *Glossina m. morsitans* après injection de bactéries, mais ils sont de taille inférieure à ceux décrits chez les lépidoptères (Götz et Vey, 1974 ; Kaaya *et al.*, 1986). Les injections de trypanosomes ne provoquent aucune formation de nodule chez des glossines sensibles au parasite alors qu'elle se produit chez *Rhodnius sp* (Hemiptera : Cimicidae). Cette différence peut être due au faible nombre d'hémocytes existant chez les mouches tsé-tsé (Kaaya *et al.*, 1986).

5.3.1.3. L'encapsulement cellulaire et humoral.

La formation de capsules est une réaction de défense très développée chez les invertébrés et les insectes. Elle aboutit à la formation d'un nouveau tissu, la capsule, formée autour de particules trop grosses pour être phagocytées individuellement. Ce phénomène se produit avec des parasites (trématodes, cestodes, nématodes, insectes parasites et champignons), des implants (œufs, débris de tissus...) ou des corps inertes (nylon, coton, billes de latex) (Salt, 1960 ; 1963 ; François, 1975).

On distingue classiquement deux types de capsules. Les capsules cellulaires formées d'hémocytes circulants qui deviennent sédentaires (Akai et Sato, 1973 ; Ratcliffe et Rowley, 1979), et les capsules "humorales" formées essentiellement de mélanine (Kaaya, 1989). Götz et son équipe (1977) ont montré que la formation de la capsule, cellulaire ou humorale, dépendait du nombre d'hémocytes circulants par mm³ d'hémolymphe dans l'espèce considérée. Chez les diptères (*Anopheles*, *Culex*, *Chironomus*...) qui ont un taux d'hémocytes circulants très bas, entre 500-4000 hémocytes / mm³ d'hémolymphe, la capsule est humorale. Les espèces d'insectes qui possèdent jusqu'à 40 000 hémocytes / mm³ forment des capsules cellulaires (Götz *et al.*, 1977).

Les phases de formation d'une capsule cellulaire sont les mêmes que dans le cas de la phagocytose. Les granulocytes sont, dans un premier temps, attirés par le corps à encapsuler (chimiotactisme). Ils reconnaissent puis se fixent à la particule. Au contact du corps étranger, certains hémocytes rejettent leurs granules (Brehélin *et al.*, 1975) et provoquent le dépôt d'une substance flocculeuse à la surface du corps à encapsuler. A la suite du dépôt de cette substance, les hémocytes, de plus en plus nombreux, se déposent en couches concentriques autour du corps étranger (Ratcliffe et Rowley, 1979). Très souvent, se déposent, entre les hémocytes des couches les plus internes, des substances de type mélanine (Grimstone *et al.*, 1967).

Cette mélanine est le principal constituant des capsules humorales, dans lesquelles l'accumulation d'hémocytes circulants n'est jamais observée (Götz, 1969 ; 1986). Cependant, les hémocytes circulants interviennent en rejetant dans l'hémolymphe certains composés du système phénoloxydase qui vont former les couches de mélanine après réaction avec d'autres composés du plasma (Vey et Götz, 1975 ; Zahedi *et al.*, 1992).

L'encapsulation humorale fut décrite en 1962 (Bronskill, 1962 ; Esslinger, 1962) chez des larves de *Culicidae* parasitées par des nématodes, mais ce phénomène avait déjà été observé sous la forme de "spores noires" au niveau du tube digestif d'anophèle porteur d'oocystes (Ross, 1898). Elle est efficace contre des parasites (Bronskill, 1962 ; Poinar et Leutenegger, 1971 ; Brengues et Bain, 1972 ; Brunhes et Brunhes, 1972 ; Andreadis et Hall, 1976 ; Ho *et al.*, 1982 ; Drif et Brehélin, 1983 ; Christensen *et al.*, 1984 ; Lafond *et al.*, 1985 ; Spray et Christensen, 1991), des spores de champignons (Götz et Vey, 1974 ; Brey *et al.*, 1988), des bactéries (Götz *et al.*, 1987) ou des corps inertes (Zahedi *et al.*, 1992). On aboutit à la mort du parasite encapsulé en 48 heures (Forton *et al.*, 1985).

Dans le genre *Aedes*, la capacité de mélanisation des microfilaires dépend de l'âge (Christensen *et al.*, 1986 ; Christensen et Lafond, 1986) et du sexe (Harris *et al.*, 1986). L'encapsulation humorale semble jouer un rôle dans la compétence vectorielle car elle est plus importante chez une espèce résistante que chez une espèce sensible (Christensen *et al.*, 1984).

Concernant le paludisme, le phénomène humoral a été décrit sur des anophèles résistants, chez lesquels les ookinètes étaient mélanisés lors de leur passage dans les cellules du tube digestif. Des hémocytes ont été observés à proximité des ookinètes mais jamais en contact (Collins *et al.*, 1986 ; Lackie, 1986 ; Paskewitz *et al.*, 1988).

A l'inverse, les gamétocytes injectés chez des *Culex* résistants disparaissent de l'hémolymph en 72 heures sans avoir été mélanisés (Weathersby et McCall, 1968). L'absence de mélanisation a été signalée chez les simulies adultes (Ham *et al.*, 1988) et à l'état larvaire (Poinar *et al.*, 1979). Ce phénomène indique une déficience dans certains facteurs biochimiques nécessaires à la synthèse de la mélanine et explique l'extrême susceptibilité des simulies au parasitisme.

Chez *A. quadrimaculatus*, l'injection de microfilaires déclenche un dépôt de mélanine suivi d'un étalement des plasmatocytes autour des microfilaires (Chen et Laurence, 1985). Ceci constitue la seule description d'encapsulation humorale puis cellulaire chez un *Culicidae*.

5.3.1.4. Les facteurs humoraux intervenant dans l'immunité cellulaire.

Les molécules de type opsonines des insectes sont les lectines, ou hémagglutinines, et le système phénoloxydases, composé d'une cascade enzymatique dont le produit final est la mélanine. Ces facteurs synergiques favorisent la reconnaissance et/ou l'adhésion des cellules sur les corps étrangers (Gupta, 1991).

Les lectines.

Les lectines sont des glycoprotéines qui agglutinent les érythrocytes de mammifères (Ibrahim *et al.*, 1984 ; Ingram et Molyneux, 1990), les bactéries (Minnick *et al.*, 1986 ; Miegville *et al.*, 1987), les protozoaires (Tripp, 1992) ou les métazoaires, grâce à la présence de certains polysaccharides à la surface des corps étrangers.

Elles sont présentes chez les végétaux et les animaux (Ratcliffe, 1986). Parmi les insectes, elles ont été décrites d'abord chez les lépidoptères (Bernheimer, 1952 ; Qu *et al.*, 1987), puis chez les diptères (Ibrahim *et al.*, 1984 ; Ingram *et al.*, 1984 ; Stynen *et al.*, 1985 ; Wallbanks *et al.*, 1986 ; Natori, 1987), les coléoptères (Stynen *et al.*, 1982), les orthoptères (Hapner et Jermyn, 1981 ; Lackie, 1981 ; Stiles *et al.*, 1988), les hémiptères (Pereira *et al.*, 1981) et chez les dictyoptères (Seaman et Robert, 1968 ; Anderson *et al.*, 1972 ; Kubo et Natori, 1987 ; Richards *et al.*, 1988).

Les lectines sont synthétisées par les hémocytes, le corps gras et les ovaires (Ratcliffe, 1986 ; Stiles *et al.*, 1988) et leur rôle dans la reconnaissance des corps étrangers est toujours très controversé. Elles sont normalement présentes dans l'hémolymph (Ingram et Molyneux,

1990), mais leur synthèse peut également être induite (Komano *et al.*, 1980 ; 1981) à la suite d'injections de bactéries (Rasmuson et Boman, 1979 ; Minnick *et al.*, 1986 ; Qu *et al.*, 1987) ou de champignons (Pendland et Boucias, 1985).

Leur fonction biologique est de provoquer l'agglutination des micro-organismes présents dans l'hémolymph ayant à leur surface les résidus sucrés correspondants. De tels agrégats seraient ensuite encapsulés ou phagocytés. Leur activité est inhibée par des sucres particuliers, confirmant ainsi la fonction des liaisons spécifiques dans les phénomènes de reconnaissance (Maudlin et Welburn, 1987 ; Kaaya, 1989). Leur rôle est bien compris chez les mollusques : elles établissent des liaisons entre les récepteurs de la membrane des hémocytes et les corps étrangers afin de permettre la reconnaissance du "non-soi" par ces hémocytes (Mullainadhan et Renwranz, 1986 ; Bayne et Yoshino, 1989).

Les lectines semblent contrôler la compétence vectorielle des glossines (Kaaya, 1989 ; Rudin et Hecker, 1989 ; Maudlin et Welburn, 1988 a ; 1988 b). L'infestation des mouches tsé-tsé par des trypanosomes est régulée par les lectines du tube digestif (Maudlin et Welburn, 1987 ; 1988 a), elles-mêmes sous contrôle des RLO (Rickettsia-like-organisms) (Maudlin et Welburn, 1988 b).

Dans le cas du paludisme, des sites récepteurs de lectines ont été identifiés au niveau de la membrane péritrophique d'*A. aegypti* et d'*A. stephensi* (Rudin et Hecker, 1989) et de leurs glandes salivaires (Perrone *et al.*, 1986). Pourtant, le rôle des lectines dans les phénomènes de reconnaissance du vecteur par le *Plasmodium* n'est pas acquis car aucun site récepteur de lectine n'a été identifié au niveau des ookinètes et des sporozoïtes (Rudin et Hecker, 1989).

Le système phénoloxydase.

Chez les insectes, les enzymes de type phénoloxydase interviennent dans la sclérotinisation et la mélanisation de la cuticule. Elles sont présentes dans les hémocytes (Chadwick, 1966 ; Leonard *et al.*, 1985 ; Iwama et Ashida 1986), le plasma (Richards, 1978) et le sérum (Brehélin *et al.*, 1989), mais sous la forme d'un précurseur inactif, la prophénoloxydase (Ashida et Dohke, 1980 ; Götz, 1986 ; Ashida *et al.*, 1990).

L'activation du système phénoloxydase induit la synthèse de la mélanine (Chadwick, 1966). Ce système est composé d'une cascade d'enzymes, de type sérines protéases, qui permettent la transformation de la prophénoloxydase (proPO) en phénoloxydase (PO) (Söderhäll, 1982 ; Söderhäll et Smith, 1984 ; Leonard *et al.*, 1985 ; Aspan *et al.*, 1990). Parmi

celles-ci, on cite les estérases (Yoshida et Ashida, 1986) et les enzymes "trypsine-like" (Ashida *et al.*, 1990). La prophénoloxydase est activée par l'invasion de parasites ou d'autres corps étrangers, comme des composants membranaires fongiques (Yoshida et Ashida, 1986) ou des ions Ca^{++} (Leonard *et al.*, 1985 ; Ashida *et al.*, 1990).

L'hypothèse du rôle des phénoloxydases dans les réactions immunitaires de l'insecte avait été émise par Taylor en 1969. Depuis, l'importance de l'activation du système phénoloxydase pour la reconnaissance du "non-soi" a été démontrée, et l'on comprend pourquoi la mélanine est présente dans diverses réactions immunitaires, comme l'encapsulation cellulaire ou humorale et la formation de nodules (Ratcliffe *et al.*, 1984 ; Kaaya, 1989).

La phénoloxydase semble être également un marqueur de compétence vectorielle. Chez un moustique (*A. gambiae*) réfractaire au *Plasmodium*, l'activité de la PO est très importante au niveau du tube digestif, près des ookinètes encapsulés, alors qu'elle est pratiquement nulle chez un moustique sensible (Paskewitz *et al.*, 1989). Ce taux élevé de PO dans la souche sensible, après un repas infectant, contribue à l'encapsulation des ookinètes.

5.3.2. Les réactions à médiation humorale.

L'immunité humorale est essentiellement anti-bactérienne. Elle est assurée par des facteurs humoraux qui sont soit présents dans le corps de l'insecte, soit synthétisés à la suite d'une invasion de corps étrangers.

Le peptide à activité anti-bactérienne le plus répandu chez les insectes est le lysozyme (Powning et Davidson, 1973 ; 1976). C'est une protéine basique que l'on retrouve dans la plupart des fluides biologiques, chez les invertébrés comme chez les vertébrés. Son mode d'action est très bien défini. Il attaque la paroi bactérienne au niveau de la couche de peptidoglycanes, entre les résidus acide N-acétyl muramique et N-acétyl glucosamine.

La première démonstration de l'activité antibactérienne de l'hémolymphe chez des insectes immunisés date des années 50 (Briggs, 1958 ; Stephens, 1959). Les insectes répondent à des injections de bactéries par la synthèse de facteurs antibactériens divers.

La première enzyme bactériolytique isolée a été le lysozyme (Mohrig et Messner, 1968 a ; 1968 b). Il est actif au niveau de l'hémolymphe et du tube digestif (Mohrig et Messner, 1968 a), et son taux augmente immédiatement suite à des injections de bactéries (Faye, 1978 ; Boman

et al., 1981). Contrairement aux autres facteurs antibactériens, la synthèse de lysozyme est activée par des bactéries vivantes et mortes (Kaaya, 1989). Il est stocké sous une forme primaire dans les granulocytes (Zachary et Hoffmann, 1984) et les cellules péricardiales (Crossley, 1972).

Des protéines anti-bactériennes autres que le lysozyme existent chez les insectes. Certaines de ces protéines ont été purifiées et leur séquence d'acides aminés déterminée (Seaman et Robert, 1968 ; Weathersby et McCall, 1968 ; Natori, 1987). Chez le lépidoptère, *Hyalophora cecropia*, on distingue deux familles de peptides anti-bactériens, les cécropines (lorsque leur poids moléculaire est d'environ 4 kD), et les attracines (lorsque qu'il est compris entre 20 et 48 kD) (Bayne, 1984). Elles sont produites par le corps gras et par les hémocytes. Depuis lors, beaucoup d'autres protéines ont été mises en évidence dans toutes les familles d'insectes (Spray et Christensen, 1991), à l'exception des orthoptères (Hoffmann, 1980).

Chez les glossines, l'injection de trypanosomes induit la synthèse d'un facteur anti-trypanosome plus importante chez les femelles que chez les mâles, et ce en rapport avec les taux d'infestations plus faibles rencontrés chez les mâles (Kaaya *et al.*, 1986). Chez *Culex pipiens*, un facteur inhibiteur du développement du *Plasmodium* a été mis en évidence (Weathersby et McCroddan, 1982). L'injection de cécropines dans un moustique infesté inhibe également le développement du *Plasmodium* (Gwadz *et al.*, 1989).

6. Présentation de l'étude.

Les diverses méthodes de lutte contre le paludisme, que nous venons d'exposer, indiquent que l'éradication de la maladie et de ses vecteurs est pour l'instant impossible. Pourquoi ne pas essayer alors de réduire les anophèles à un niveau où ils ne seraient plus nuisibles ?

La biologie moléculaire offre aujourd'hui des outils de recherche performants dans le but ultime d'obtenir un jour des anophèles génétiquement résistants au *Plasmodium*. L'application de ces travaux sur le terrain est encore inconnue, et reste dépendante de la détermination des bases moléculaires des relations *Anopheles-Plasmodium*. Cependant, les travaux sur la physiologie ou la génétique de la compétence vectorielle commencent à apporter des informations mais beaucoup de secteurs restent obscurs.

Partant des récentes découvertes sur les relations *Anopheles-Plasmodium*, nous avons choisi d'étudier certains aspects de la compétence vectorielle grâce à un cycle de paludisme de laboratoire entretenu sur des rongeurs : *Anopheles stephensi-Plasmodium yoelii yoelii*.

Plus particulièrement, nous avons étudié le stade parasitaire qui se retrouve en contact avec le système immunitaire moustique, les sporozoïtes. Des auteurs ont émis l'hypothèse que la stratégie du *Plasmodium* est de submerger le système immunitaire du moustique, sachant qu'environ 20% des sporozoïtes produits par les oocystes se retrouvent dans les glandes salivaires (Foley, 1978 ; Bayne, 1984 ; Rosenberg et Rungsiwongse, 1991). Cependant, aucune étude n'a été entreprise à ce jour pour apporter des informations permettant de confirmer ou d'infirmer cette observation. Nous avons donc tenté d'apporter des éléments supplémentaires d'informations dans l'espoir de comprendre une partie des relations *Anopheles-Plasmodium*.

Dans un premier temps, nous avons étudié et décrit la composition en cellules immunitaires de l'hémolymph de moustiques adultes. Les rares observations d'hémocytes de *Culicidae* ont été faites sur des larves, alors que ce sont les adultes qui transmettent les agents pathogènes. L'extrapolation de tels résultats à des adultes ne nous satisfaisaient aucunement.

Nous avons ensuite étudié les mécanismes immunitaires déclenchés par l'injection de sporozoïtes dans l'hémolymph d'adultes sains. Par comparaison, des corps étrangers inertes ont également été inoculés. L'injection de sporozoïtes n'avait jamais été réalisée chez des anophèles. Pour ce faire, nous avons adapté la méthode décrite pour l'inoculation de virus chez d'autres moustiques, essentiellement des *Aedes*, à nos besoins.

Anopheles stephensi, comme d'autres diptères, est caractérisé par sa faible quantité d'hémocytes. Dans ce cas, le système de défense immunitaire mis en jeu est l'encapsulation humorale, avec l'activation du système phénoloxydase (Kaaya, 1989). L'activation de ce système répond à l'invasion de l'hémolymph par des corps étrangers et aboutit à la synthèse de mélanine.

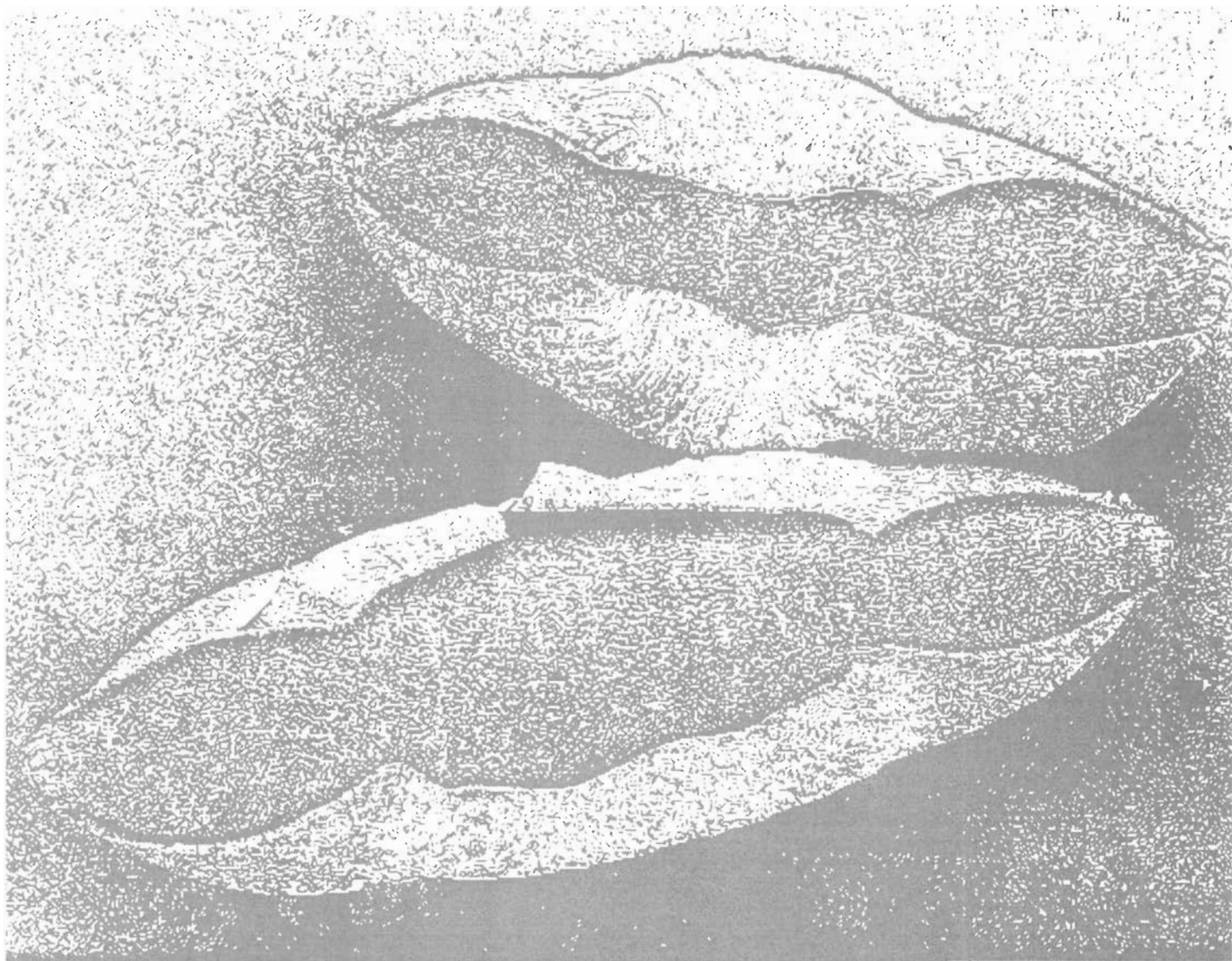
Une cascade de réactions se déclenche, et parmi les enzymes, on cite les estérases (Yoshida et Ashida, 1986). D'autre part, des moustiques résistants au *Plasmodium* ont été sélectionnés, et l'étude génétique révèle que la sensibilité de l'anophèle est contrôlée par au moins un locus estérasique (Vernick *et al.*, 1989 ; Vernick et Collins, 1989 ; Collins *et al.*, 1991).

Les estérases ont donc retenu notre attention et nous les avons dosées après la mise au point d'une microméthode de dosage colorimétrique. Nous avons ainsi déterminé les taux enzymatiques chez des adultes sains et infestés, ainsi que ceux des moustiques sensibles au *Plasmodium* inoculés avec divers corps étrangers. Cela a permis d'appréhender la compétence

du système phénoloxydase chez des anophèles sensibles.

Dans une dernière partie, nous nous sommes intéressés à la stratégie du *Plasmodium* lorsqu'il migre des oocystes vers les glandes salivaires *via* l'hémolymph. Les sporozoïtes sont recouverts d'une protéine de surface majoritaire, la protéine CS. Longtemps considérée comme l'antigène caractéristique du stade sporozoïte mature (dans les glandes salivaires), on sait qu'elle se met en place dès le stade sporozoïte immature (dans les oocystes). La synthèse de la protéine CS mature est corrélée avec l'apparition de l'infectivité des sporozoïtes pour le vertébré (Nussenzweig et Nussenzweig, 1985). Mais cette synthèse représente surtout un coût énergétique énorme pour le parasite, sachant que le gène codant pour cette protéine CS n'est présent qu'en un seul exemplaire (Godson, 1985). Si le rôle de l'antigène CS était limité aux sporozoïtes dans les glandes salivaires, le *Plasmodium* limiterait sa synthèse à ce niveau.

Nous avons émis l'hypothèse que cet antigène CS mature jouait un rôle au niveau de la traversée de l'hémolymph par les sporozoïtes, et abordé le problème par une technique immunologique de reconnaissance des antigènes parasitaires. L'utilisation des techniques immunologiques pour détecter la présence de sporozoïtes dans les moustiques ont affiné les estimations des taux d'infection dans les populations anophéliennes. Faisant suite à la mise au point des techniques radio-immunologiques (IRMA) (Zavala *et al.*, 1982 ; Collins *et al.*, 1985), les techniques immuno-enzymatiques (ELISA) se sont développées et standardisées pour *Plasmodium falciparum* (Burkot *et al.*, 1984 a ; Wirtz *et al.*, 1987), *P. vivax* (Wirtz *et al.*, 1985) et plus récemment pour *P. ovale* et *P. malariae* (Beier *et al.*, 1988 a ; 1988 b ; Collins *et al.*, 1988). Elles offrent des avantages pratiques par rapport aux techniques laborieuses de dissection (Zavala *et al.*, 1982 ; Burkot *et al.*, 1984 ; Collins *et al.*, 1985 ; Wirtz *et al.*, 1985) et donnent des résultats satisfaisants (Collins *et al.*, 1984 ; Beier *et al.*, 1987 ; Boudin *et al.*, 1988). La technique ELISA permet de détecter la présence d'antigènes particuliers grâce à la spécificité des réactions antigènes-anticorps. Sachant que notre but était de détecter les antigènes CS des sporozoïtes, nous avons fabriqué des anticorps dirigés contre ces antigènes, et adapté la méthode ELISA à notre modèle de paludisme de rongeur. Nous avons pu suivre l'apparition de la protéine CS depuis le stade oocyste jusqu'au stade sporozoïte dans les glandes salivaires, avec une attention toute particulière au niveau de l'hémolymph. Nous avons également suivi le devenir de sporozoïtes vivants inoculés.



CHAPITRE I

Matériel et méthodes

1. *Anopheles stephensi* Liston, 1901.

Parmi les diptères nématocères, les moustiques constituent la famille des *Culicidae*. Cette famille compte environ 3000 espèces, réparties dans le monde entier et surtout connues pour leur rôle dans la transmission d'agents pathogènes.

Anopheles stephensi appartient à la sous-famille des *Anophelinae*.

1.1. Origine.

Anopheles stephensi assure la transmission de *Plasmodium falciparum* dans les régions orientales (Golfe persique, Pakistan, Inde, Sri Lanka...) (Scalon *et al.*, 1968 ; Reisen et Aslamkhan, 1979). Ce moustique, surtout urbain, se développe dans les citernes d'eau domestique des villes, mais on le trouve aussi dans les zones rurales d'Iran et d'Irak (Aslamkhan *et al.*, 1972 ; Batra et Reuben, 1979 ; Menon et Rajagoplan, 1979).

Depuis 1965, il est connu comme modèle de laboratoire, vecteur de l'agent pathogène du paludisme de rongeurs : *Plasmodium yoelii yoelii* (Garnham, 1966 ; Scalon *et al.*, 1968).

La souche d'*Anopheles stephensi*, élevée au laboratoire ORSTOM de lutte contre les insectes nuisibles (Bondy) depuis 1973, provient d'Irak.

1.2. La technique d'élevage en laboratoire.

Le cycle biologique de l'anophèle se déroule en milieu aérien, pour les imagos, et en milieu aquatique, pour les œufs larves et les nymphes (figure 3).

1.2.1. Les œufs.

Les œufs sont pondus isolément, et déposés à la surface de l'eau des pondoirs.

Ils sont récoltés sur un papier filtre, puis immergés 40 minutes dans une solution de formaldéhyde à 0,01% pour éviter les contaminations par des bactéries et des champignons (Bano, 1958 ; Jadin, 1967 ; Vavra et Undeen, 1970 ; Davies *et al.*, 1971 ; Maier, 1980).

Ils sont ensuite répartis dans des cristallisoirs, à raison de 200 œufs environ pour 2 litres d'eau (Reisen, 1975).

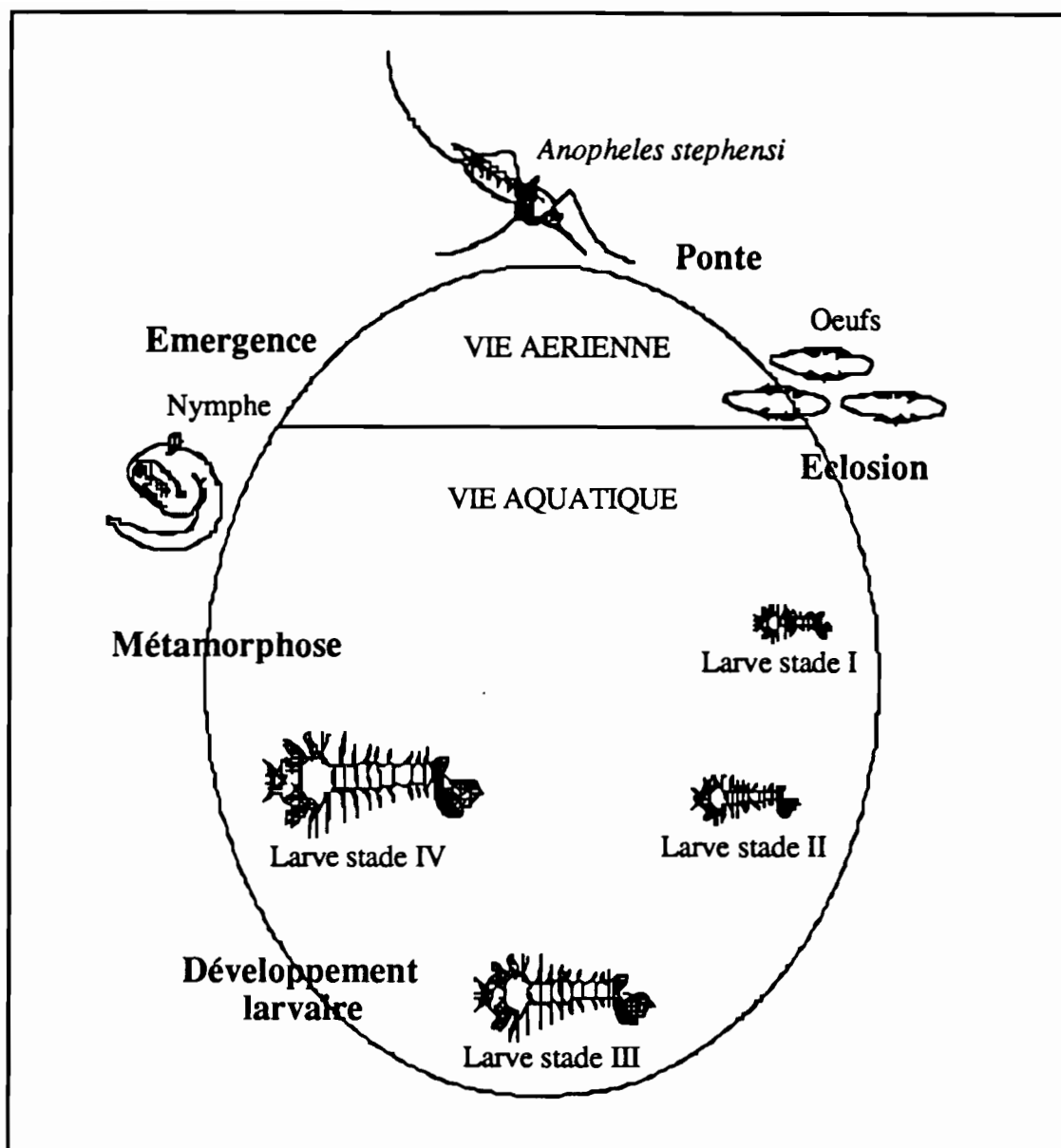


Figure 3 : Le cycle biologique des anophèles.

1.2.2. Les larves.

Le développement larvaire comprend 4 stades séparés par des mues (in Jones, 1953). Il dure 15 jours dans les conditions suivantes : une température de $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, une humidité relative de 60% et une photopériode de 12 heures de jour et 12 heures de nuit.

Le premier stade larvaire dure environ 2 jours. Les larves sont nourries avec 5 mg par cristalliseur de nourriture pour alevins en poudre.

Les stades larvaires suivants (II à IV) sont nourris avec 30 à 50 mg par cristalliseur de biscuits pour souris réduits en poudre, et tamisés.

1.2.3. Les nymphes.

Les nymphes sont prélevées quotidiennement, et sont regroupées dans des gobelets d'eau.

Elles sont ensuite placées dans des cages pour l'émergence.

1.2.4. Les imagos.

Après l'émergence, les adultes mâles et femelles sont nourris avec une solution de glucose à 10% (Weathersby et Noblet, 1973). Ils sont maintenus à $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, avec une humidité relative et une photopériode identique à celle des larves (Thompson et Bell, 1968).

Les femelles âgées de trois à quatre jours sont susceptibles de prendre un premier repas de sang (Boudin *et al.*, 1989 ; Billingsley, 1990 a). Elles sont alors assoifées 8 h avant l'horaire prévue du repas (la solution sucrée est retirée de la cage) pour que la prise de sang soit la plus homogène possible. Les femelles se gorgent sur des souris blanches pendant la nuit.

1.3. Le protocole de choix des moustiques.

Pour toutes les manipulations portant sur les anophèles adultes, l'âge des insectes est déterminé de la façon suivante : des nymphes sont mises à éclore dans une même cage au temps fixé J0. Celles qui n'ont pas émergé au bout de 24 heures sont éliminées.

La population qui résulte est alors composée d'adultes qui ont au maximum 24 heures de différence, et leur âge est noté J1 (figure 4 page 81).

2. *Plasmodium yoelii yoelii* Landau et Killick-Kendrick, 1966.

Le parasite de rongeur étudié est un protozoaire (*Coccidiomorpha : Haemosporiida*) de la famille des *Plasmodiidae*. *Plasmodium yoelii yoelii* souche 17X, appartient au groupe *vivax* (Landau *et al.*, 1976 ; 1979).

Son développement, comme nous l'avons décrit en introduction (paragraphe 1.1.), fait intervenir deux hôtes, et se divise en deux phases (Vanderberg *et al.*, 1968) :

- une phase sexuée chez l'insecte vecteur (*Anopheles stephensi*) (figure 1 page 14),
- une phase asexuée chez le vertébré (souris blanches OF1) (Landau et Killick-Kendrick, 1966 ; Coosemans *et al.*, 1981) (figure 2 page 15).

2.1. La durée de développement du *Plasmodium*.

2.1.1. Le développement du parasite dans le moustique.

Le cycle dure 14 jours à $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (Coosemans *et al.*, 1981).

Si la température dépasse le seuil limite de 24°C , les sporozoïtes perdent leur infectivité vis-à-vis de l'hôte vertébré (Gill, 1921 ; Ball, 1965 ; Vanderberg et Yoeli, 1966 ; Wery, 1966 ; Boudin *et al.*, 1989).

2.1.2. Le développement du parasite chez la souris.

Chez le vertébré, le cycle sexué s'amorce lors de différenciation de certains mérozoïtes en gamétocytes. Ces parasites sexués, ou gamétocytes, sont produits en très forte quantité entre 7 et 16 jours après que la souris ait été infectée par le *Plasmodium* (Vanderberg *et al.*, 1968). *In vivo*, leur infectivité pour le moustique est cependant maximum entre 3 et 5 jours (Landau *et al.*, 1979 ; Petit *et al.*, 1982).

Quand une souris est infectée par voie intrapéritonéale, les parasites sont visibles dès le lendemain dans le sang circulant. Généralement, après un pic initial, la parasitémie diminue au cours du temps et la souris survit. Pour 5% des souris, la parasitémie augmente et la souris meurt d'anémie en 15 jours (Deschiens et Lamy, 1965 ; Wery, 1966).

2.2. Les modes d'infestation et d'infection.

2.2.1. L'infestation du vecteur.

L'anophèle femelle s'infeste lors de l'ingestion d'un repas sanguin sur une souris impaludée.

A chaque repas, 2 à 10 µl de sang sont absorbés (Briegel et Rezzonico, 1985). Tous les stades parasitaires sont digérés à l'exception des gamétocytes mâles et femelles (Gass, 1977).

2.2.2. L'infection du vertébré.

Les souris ont été infectées selon deux méthodes :

- l'infestation naturelle,
- le passage sanguin.

2.2.2.1. L'infestation naturelle.

Les sporozoïtes sont injectés directement avec la salive à des souris saines au moment de la prise d'un repas de sang par des femelles infestantes, *ie* ayant des sporozoïtes dans les glandes salivaires (Shute, 1945 ; Vanderberg, 1975 ; Beier *et al.*, 1990 ; Ponnudurai *et al.*, 1991). Ces souris développent des gamétocytes en 5 jours, puis des mérozoïtes au bout de deux ou trois semaines selon l'intensité de la parasitémie (Landau et Killick-Kendrick, 1966).

Ce mode de contraction du paludisme est très important. Il permet la conservation, au laboratoire, des formes sanguines du *Plasmodium* (voir paragraphe 3.2.2.).

Plasmodium

2.2.2.2. Le passage sanguin.

Chaque souriceau, âgé de 6 à 8 semaines, reçoit par injection intrapéritonéale 0,5 ml de sang parasité sous forme de mérozoïtes libres. Il développera des gamétocytes en 3 jours (Landau *et al.*, 1979).

3. La mise en évidence et l'isolement des stades parasitaires.

La présence du *Plasmodium* peut être observée :

- chez le moustique, au niveau de l'estomac et des glandes salivaires,
- chez la souris, dans le sang périphérique.

3.1. Les stades parasitaires chez le moustique.

L'infestation d'un anophèle par le *Plasmodium* peut être mise en évidence par des techniques parasitologiques (Yoeli et Wall, 1951 ; Adam *et al.*, 1960 ; Garnham *et al.*, 1963 ; Vanderberg *et al.*, 1967) ou immunologiques (Voller, 1964 ; Sodeman et Jeffery, 1964 ; Voller *et al.*, 1975 ; 1976 ; Billingsley *et al.*, 1991).

Nous mentionnons ici l'examen parasitologique, en microscopie optique, du *Plasmodium* à l'état frais, après dissection des moustiques infestés (Adam *et al.*, 1960 ; Pringle, 1965). Deux stades d'infestation sont retenus pour l'entretien du cycle de paludisme et pour les expérimentations futures.

Ainsi, nous distinguons les femelles :

- infestées, ayant des oocystes au niveau de l'estomac ; les sporozoïtes sont dits "immatures",
- et infestantes, avec des sporozoïtes "matures" dans les glandes salivaires, ie infestants pour la souris.

3.1.1. La dissection des anophèles.

Les femelles sont endormies quelques minutes au froid. Elles sont déposées sur une lame de verre, et disséquées soit dans une goutte de liquide physiologique, pour l'examen classique, soit dans du RPMI, quand les parasites sont destinés à être injectés dans d'autres moustiques.

3.1.1.1. Le tube digestif.

Avec une minutie, on incise de chaque côté l'extrémité de l'abdomen. On exerce une traction sur l'extrémité de l'abdomen, tout en tenant le moustique immobilisé au niveau du thorax. Le tube digestif est expulsé, puis isolé dans une autre goutte de liquide de dissection.

L'examen direct en microscopie optique révèle la présence d'oocystes à différents stades de maturation (planche I, photos 1, 2 et 3).

3.1.1.2. Les glandes salivaires.

A l'aide d'une minutie, nous appuyons sur le thorax en exerçant une légère pression pour tendre la membrane du cou. Avec une autre minutie, nous tirons doucement sur la tête tout en maintenant la pression sur le thorax (Pringle, 1966). La membrane du cou se déchire, libérant les deux paires de glandes salivaires qui sont en position ventrale, au niveau de la première paire de pattes. Les glandes salivaires sont alors isolées dans une goutte de sérum physiologique ou de RPMI (planche II, photo 4).

L'examen au microscope permet de mettre en évidence la présence de sporozoïtes (Pringle, 1965 ; Choudhury et Ghosh, 1982), et de classer les glandes salivaires selon l'abondance de sporozoïtes (planche II, photos 5, 6 et 7) en : - (0), 1+ (1 à 10), 2+ (11 à 100) et 3+ (>101).

PLANCHE I

L'infestation de l'anophèle au niveau du tube digestif

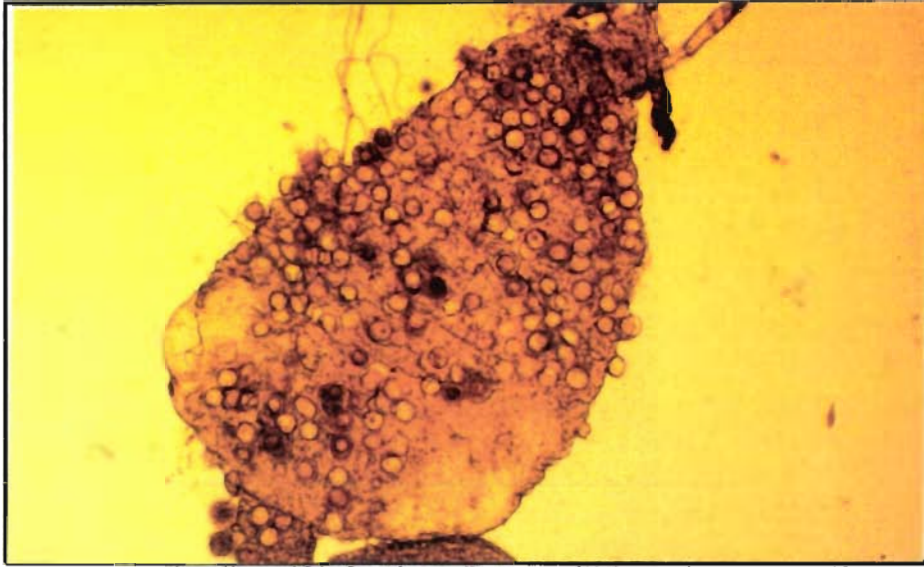


Photo 1 : Tube digestif infesté par *P. y. yoelii* (grossissement x60).

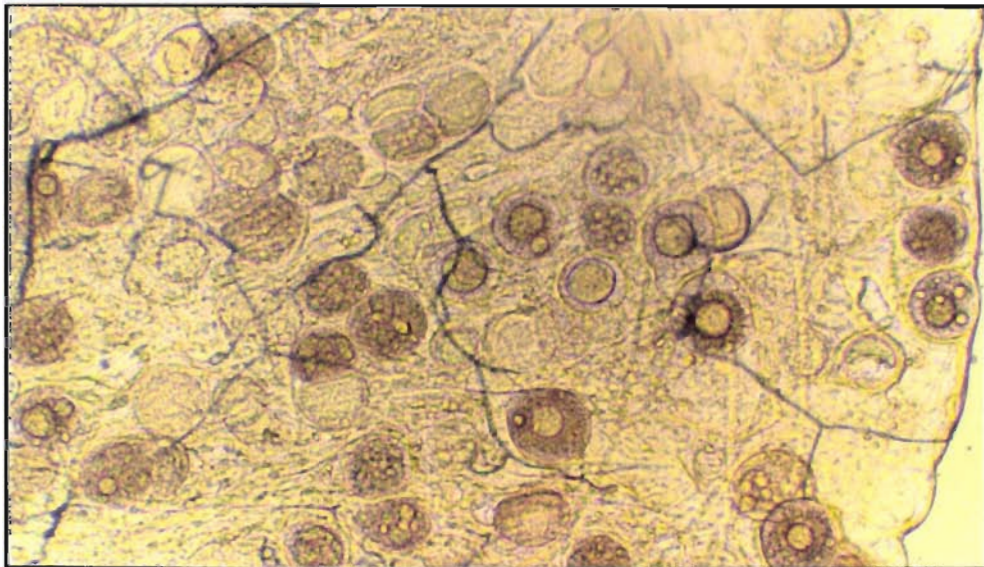


Photo 2 : Oocystes à différents stades de maturation (grossissement x150).

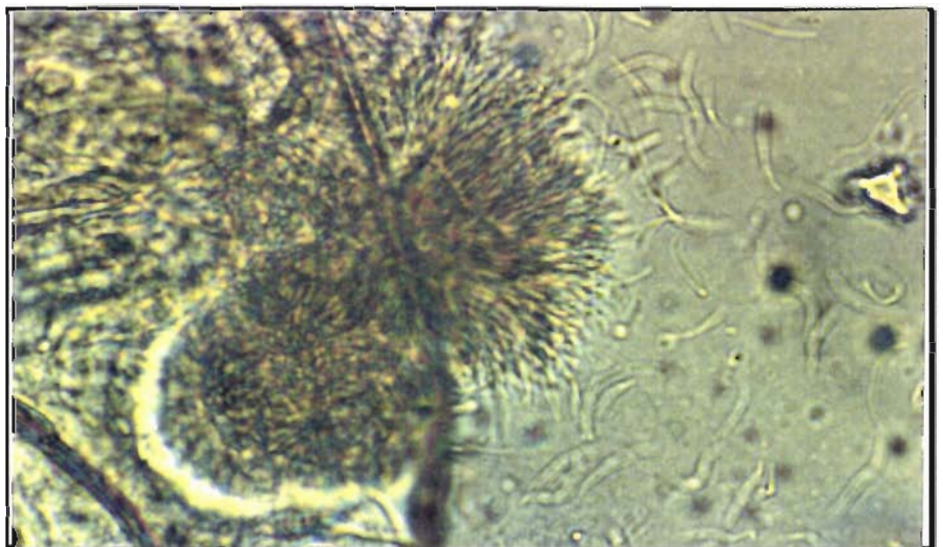


Photo 3 : Oocystes mûrs (grossissement x1500).

PLANCHE II

L'infestation de l'anophèle au niveau des glandes salivaires



Photo 4 : Glandes salivaires d'*A. stephensi* (grossissement x60).



Photo 5 : Glandes salivaires infestées 1+ (grossissement x400).



Photo 6 : Glandes salivaires infestées 2+ (grossissement x300).

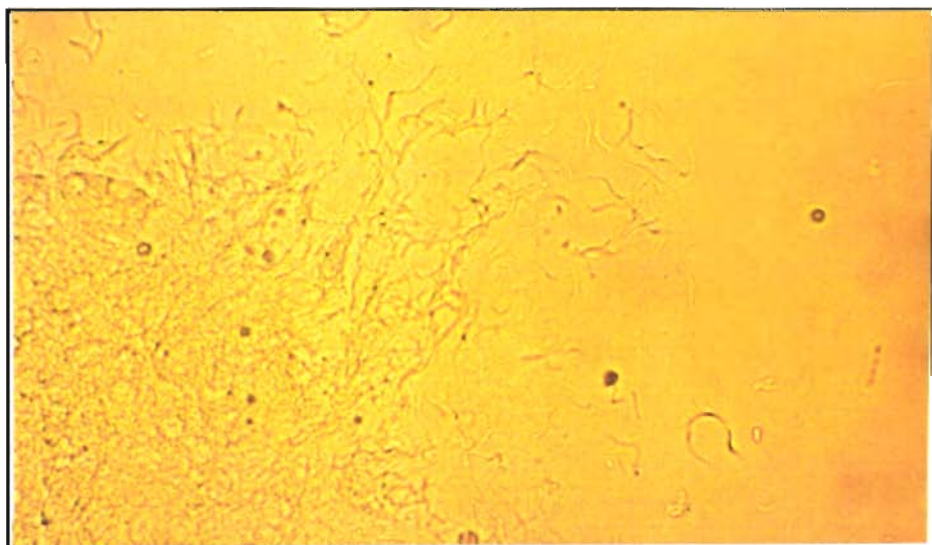


Photo 7 : Glandes salivaires infestées 3+ (grossissement x300).

3.1.2. La centrifugation des sporozoïtes.

Toutes les étapes d'isolement des sporozoïtes se déroulent à 4°C pour maintenir les parasites vivants (Pacheco *et al.*, 1979).

Les femelles infestantes sont transférées dans un broyeur de Thomas contenant du milieu de culture (RPMI 1640 ¹) afin d'être broyées. Pour isoler des sporozoïtes immatures (sp TD), seuls les tubes digestifs sont récoltés ; pour obtenir des sporozoïtes matures (sp GS), seules les glandes salivaires le sont.

Le broyat est centrifugé à 1000 g pendant 10 minutes. Le culot est éliminé et le surnageant est centrifugé de nouveau à 1000 g pendant 10 minutes.

Le nouveau surnageant est traité à 10000 g pendant 15 minutes pour obtenir un culot de sporozoïtes (Ozaki *et al.*, 1984).

Le surnageant est éliminé et le culot de sporozoïtes est mis en suspension dans du RPMI frais. La suspension peut être conservée 24 heures à +4°C, mais aussi plusieurs mois à -80°C (Jeffery et Rendtorff, 1955).

3.1.3. Le dénombrement des sporozoïtes.

Une goutte de la suspension de sporozoïtes est déposée sur la zone quadrillée d'une cellule de Malassez. On compte le nombre de sporozoïtes présents dans un échantillon de 10 carreaux sur 25.

Une moyenne géométrique est calculée à partir des 10 valeurs (Williams, 1973). Les sporozoïtes sont ainsi dénombrés dans un volume de 1 mm³ soit 1 µl.

Les concentrations sont exprimées en nombre de sporozoïtes par microlitre (sp / µl).

¹ RPMI 1640 1X (IMPERIAL LABORATORIES 154507)

3.2. Les stades parasites chez la souris.

L'infection chez le vertébré est caractérisée par la présence de gamétocytes ou de mérozoïtes. Ces formes parasites sanguines sont mises en évidence lors de l'examen de frottis sanguins (Schneider, 1970).

La présence de gamétocytes (planche III, photos 8 et 9) indique que les souris sont infectantes pour les anophèles. Si l'on observe des mérozoïtes érythrocytaires (planche III, photo 10), le sang de la souris sera prélevé et conservé 3 mois à -80 °C.

3.2.1. Les frottis sanguins.

On prélève une goutte de sang au bout de la queue des souris. La perle de sang est déposée sur une lame de verre. Au moyen d'une autre lame, placée à 30° par rapport à la première, on étale la goutte sur toute la longueur de la lame.

Le frottis est séché à l'air libre quelques minutes. Il est fixé au méthanol pendant 2 minutes, puis rincé. Il est coloré avec une solution aqueuse de Giemsa ² (14:1) 30 minutes. Les lames sont rincées, séchées puis examinées au microscope.

3.2.2. La congélation des formes sanguines.

Lorsque une souris impaludée présente des mérozoïtes en forme libre (planche III, photo 10), son sang est prélevé avec une seringue héparinée pour éviter la coagulation. Ce sang peut alors être conservé, à volumes équivalents, dans du glycérol à 10% à -80°C pendant 3 mois (Molinari, 1961).

² Giemsa R (RHONE-POULENC)

PLANCHE III

Les stades parasites chez la souris



Photo 8 : Gamétocyte femelle
(grossissement x400).

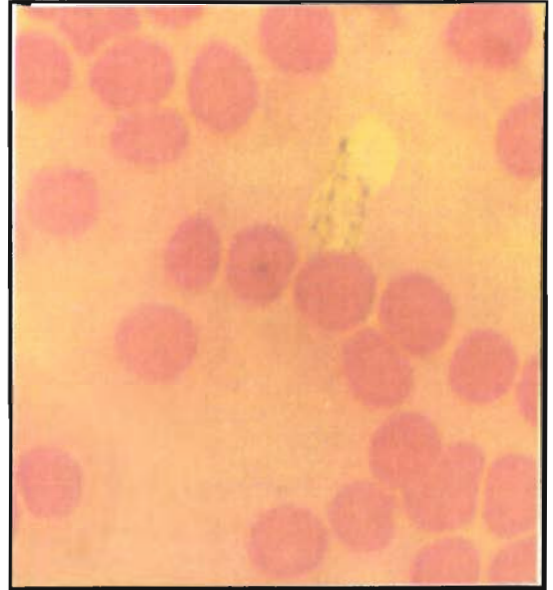


Photo 9 : Gamétocyte mâle
(grossissement x400).

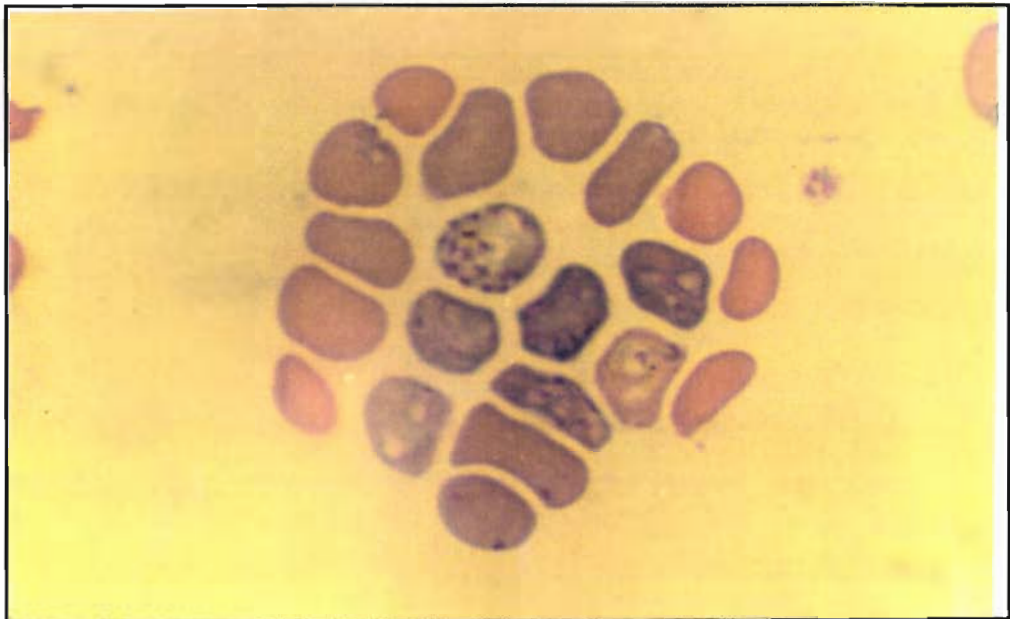


Photo 10 : Schizonte érythrocytaire mûr, contenant des mérozoïtes
(grossissement x400).

4. L'inoculation des moustiques.

La technique d'inoculation permet d'introduire artificiellement des sporozoïtes immatures ou matures, des hématies de lapin ³ ou des billes de latex calibrées ⁴ dans l'hémolymphe d'anophèles adultes. Nous avons travaillé uniquement avec des femelles car elles sont vectrices des espèces de *Plasmodium*.

L'introduction de sporozoïtes immatures et matures vivants a permis de déterminer leur aptitude à achever leur développement chez un moustique différent de celui d'origine. L'injection de sporozoïtes et divers autres corps étrangers indique le type de réaction immunitaire efficace chez des femelles saines. Par souci de comparaison, les corps étrangers inertes choisis sont des hématies et des billes de latex. Les moustiques témoins ont reçu une injection de RPMI.

4.1. Le choix des adultes.

Des anophèles femelles âgées de 24 heures sont choisies aléatoirement dans une population homogène.

Nous avons travaillé avec des adultes récemment émergés car cela présente quelques avantages :

- le volume d'hémolymphe est plus important (Foley, 1978 ; Mack et Vanderberg, 1978),
- la capacité de mélanisation est plus importante (Christensen *et al.*, 1986),
- leur espérance de survie au stress de l'inoculation est maximum,
- la pénétration de l'inoculum jusque dans l'abdomen est facilitée car le tube digestif est vide.

Les lots de femelles sont répartis de la façon suivante :

- témoins non inoculés,
- témoins "neutre", inoculés avec du RPMI,
- inoculés avec 100 sp / μ l et 300 sp / μ l de sporozoïtes immatures et matures,
- inoculés avec 2000 hématies / μ l,
- inoculés avec 0,24 μ l d'une suspension à 10^5 billes de latex / μ l.

³ Hématies de lapin (BIOMERIEUX 7.229.1)

⁴ Estapor polyvinyltoluène (PROLABO 23.694.126)

4.2. Le protocole d'inoculation.

L'appareil utilisé (planche IV, photo 11) a été conçu selon la méthode décrite par Rosen et Gubler (1974).

Les aiguilles servant à l'inoculation des corps étrangers sont fabriquées à partir de tubes à hématocrites calibrés⁵ effilés au dessus d'une résistance électrique. Chaque aiguille est graduée extérieurement tous les millimètres de façon à injecter un inoculum calibré à 0,24 µl par femelle, dose normalement tolérée par un moustique adulte (Rosen, 1984).

Les moustiques sont endormis au froid. Ils sont immobilisés sur le dos, et sont inoculés au niveau de la membrane du cou, directement dans l'hémolymphe (planche IV, photo 12). Les manipulations sont réalisées sous hotte stérile de façon à limiter les contaminations.

Les moustiques sont placés ensuite en observation à $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pour permettre aux parasites inoculés vivants de préserver un maximum de leur vitalité.

4.3. L'analyse de l'infectivité des femelles inoculées.

Une partie des femelles inoculées avec des sporozoïtes "immatures" et "matures" a été gardée en observation afin d'évaluer la capacité des sporozoïtes à envahir les glandes salivaires d'un hôte différent.

4.3.1. La dissection des femelles.

A différents intervalles de temps, *ie* 24 heures, 48 heures, 3 jours, 5 jours et 7 jours après l'inoculation des sporozoïtes dans l'hémolymphe, les femelles sont disséquées selon la méthode décrite au paragraphe 3.1.1.

Les glandes salivaires, l'estomac et l'hémolymphe des femelles sont analysés à l'état frais, en microscopie optique. Les sporozoïtes repérés sont dénombrés et classés selon leur état physiologique (morts ou vivants).

⁵ Tubes calibrés à micro-hématocrite (CAL-MARK)

PLANCHE IV

L'inoculation des anophèles



Photo 11 : Appareil utilisé pour les inoculations de moustiques.

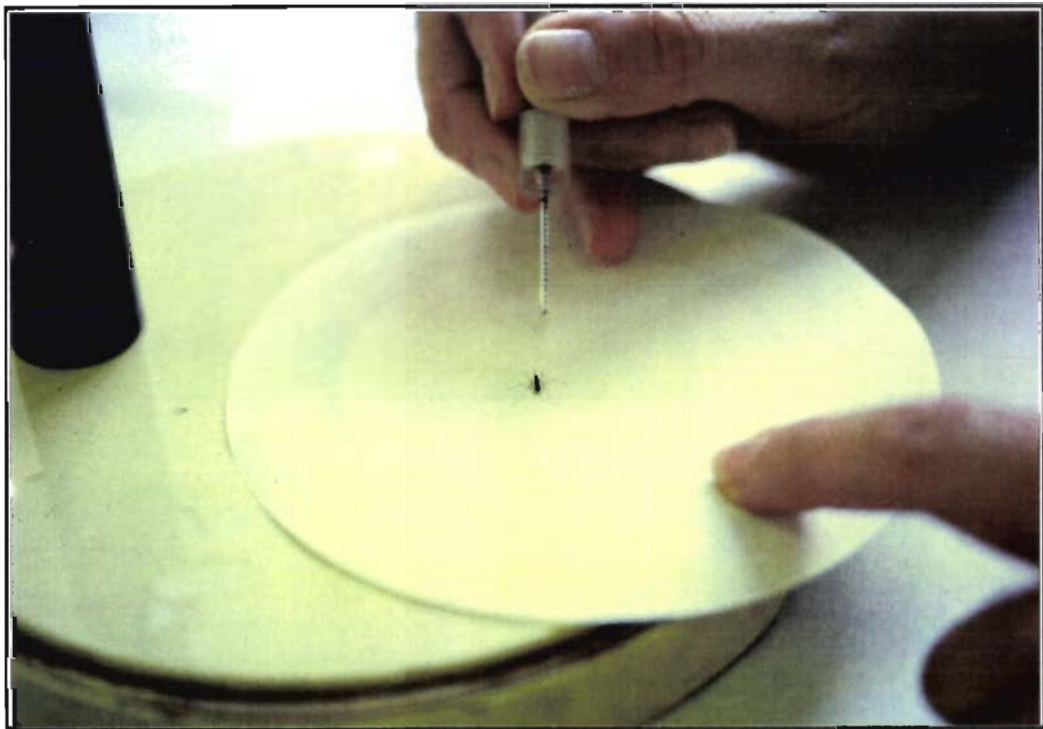


Photo 12 : Technique d'inoculation des anophèles.

4.3.2. Le repas sanguin.

Afin de vérifier si les sporozoïtes ont migré dans les glandes salivaires, nous avons offert aux femelles inoculées un repas sanguin sur des souris saines. Comme un nombre infime de sporozoïtes infestants déclenche le paludisme (Beier *et al.*, 1991 b), la méthode d'infestation naturelle complète l'observation parasitologique.

Le sang des souris était analysé 5 jours après, sur frottis, comme dans le cas d'une infection naturelle.

5. L'étude cytologique des relations *Anopheles-Plasmodium*.

L'étude cytologique a porté sur des culots d'hémolymphe récoltés sur :

- des larves et des femelles adultes saines d'*Anopheles stephensi*,
- des femelles inoculées avec des billes de latex (témoin inerte), des hématies de lapin (témoin biologique) et des sporozoïtes "immatures".

La composition de l'hémolymphe en hémocytes circulants, ainsi que les réactions immunitaires provoquées par l'introduction de corps étrangers, ont fait l'objet d'observations en microscopie à contraste de phase et en microscopie électronique.

5.1. Le mode de prélèvement de l'hémolymphe.

Les anophèles, à l'état larvaire ou adulte, sont connus pour leur faible quantité d'hémolymphe (entre 70 et 80 nl par adulte) et leur pauvreté en hémocytes circulants (Foley, 1978). L'hémolymphe est donc prélevée, sous loupe binoculaire, au niveau de la membrane du cou pour les adultes, et au niveau de l'abdomen pour les larves. Les prélèvements d'hémolymphe sont effectués par aspiration car la pression de l'hémolymphe est négative par rapport à celle de l'air (Mack *et al.*, 1979 a ; 1979 b).

50 à 80 moustiques ont été ponctionnés à chacun des intervalles de temps : 1 heure, 6 heures et 24 heures après l'inoculation.

5.2. La microscopie optique.

L'examen de l'hémolymph en contraste de phase permet d'observer, à l'état frais, les différents types cellulaires de l'hémolymph.

Une goutte d'hémolymph, prélevée soit sur une larve de stade IV soit sur une femelle adulte, est déposée sur une lame et recouverte d'une lamelle. L'examen se fait directement au microscope optique en contraste de phase.

5.3. La microscopie électronique.

La microscopie électronique permet d'étudier l'ultrastructure des hémocytes ainsi que certaines réactions immunitaires déclenchées par les inoculations. Cette technique implique l'inclusion du matériel étudié dans une résine et de débiter cette dernière en coupes fines.

Les blocs de résine taillés au microtome ⁶ permettent d'obtenir :

- des coupes semi-fines (0,5 à 2 μ m d'épaisseur) examinées en microscopie optique,
- des coupes ultra-fines (50 à 60 nm d'épaisseur) sur lesquelles porte l'observation au microscopie électronique ⁷.

5.3.1. Le protocole d'inclusion.

Toutes les solutions nécessaires à l'inclusion sont décrites en annexe 1.

L'hémolymph collectée est fixée au glutaraldéhyde 5% durant une nuit à 4°C. Elle est ensuite centrifugée à 5000 g (15 min) pour former un culot d'hémocytes.

Le culot est lavé 2 fois avec du tampon phosphate 0,1 M, post-fixé à l'osmium 1% pendant 1 heure, puis lavé à nouveau 2 fois.

La déshydratation se fait dans des bains successifs d'éthanol (30°, 50°, 70°, 95° et 100°), et enfin dans 2 bains d'oxyde de propylène pur.

Le matériel est pré-imprégné avec un bain d'oxyde de propylène et d'épon (1:1).

L'inclusion se fait dans l'épon et la résine se polymérise en une nuit à 60°C.

⁶ Microtome Reichert

⁷ Microscopie électronique JEOL (1200xE)

5.3.2. La coloration et l'observation des coupes.

Les blocs de résine sont taillés sur un microtome (Laboratoire d'Evolution des Etres Organisés, Université Paris VI).

Les coupes semi-fines sont colorées au bleu de toluidine (annexe 1). Les coupes ultra-fines sont contrastées à l'acétate d'uranyle, 15 à 20 min, puis au citrate de plomb pendant 6 minutes (annexe 1).

Les coupes ultra-fines sont analysées au microscope électronique à une tension de 80 kV (Laboratoire de Pathologie Comparée, Université Montpellier II).

6. L'étude enzymatique des relations *Anopheles-Plasmodium*.

Les estérases sont connues pour être impliquées dans les phénomènes de résistance des vecteurs aux insecticides (Tadano et Brown, 1966 ; Dorval et Brown, 1970 ; Georghiou et Pasteur, 1978 ; Georghiou *et al.*, 1980 ; Villani *et al.*, 1983 ; Maruyama *et al.*, 1984 ; Raymond *et al.*, 1985 ; Denholm et Rowland, 1992).

Des études récentes indiquent que les estérases servent aussi de marqueurs de compétence vectorielle car elles interviennent dans la résistance des anophèles au *Plasmodium* et dans les phénomènes d'encapsulation humorale (Yoshida et Ashida, 1986 ; Vernick *et al.*, 1989 ; Collins *et al.*, 1991).

Nous avons choisi les estérases totales de l'anophèle pour appréhender la compétence vectorielle d'*A. stephensi* vis-à-vis de *P. y. yoelii*. Les taux enzymatiques ont été déterminés, par une méthode de dosage colorimétrique, d'abord chez des moustiques sains et infestés, puis chez des femelles inoculées avec des corps étrangers (sporozoïtes, hématies, billes de latex et RPMI).

Le principe d'un dosage colorimétrique utilise la réaction des estérases avec leurs substrats, l' α -naphthylacétate ⁸ et le β -naphthylacétate ⁹. Cette réaction enzyme-substrat forme deux produits, l' α -naphthol ¹⁰ et le β -naphthol ¹¹, que l'on révèle par un colorant. Les estérases

⁸ α -naphthylacétate (SIGMA N-8505)

⁹ β -naphthylacétate (SIGMA N-6875)

¹⁰ α -naphthol (SIGMA N-1000)

¹¹ β -naphthol (SIGMA N-1250)

stage
JP
BOULÉ

ne sont pas dosées directement, mais leur taux peut être estimé à partir de la quantité de produit formé lors de la réaction enzyme-substrat.

6.1. Le prélèvement des moustiques.

Les taux enzymatiques de référence sont déterminés chez des femelles nourries avec du jus sucré (notées "fem NG"), des femelles gorgées sur des souris saines (notées "fem S"), des femelles gorgées sur des souris infectées (notées "fem I") et enfin chez des mâles (notés "M"). Ils servent de référence pour les expériences d'inoculations de corps étrangers chez les anophèles femelles.

Les adultes sont prélevés quotidiennement, depuis l'émergence (J0) jusqu'au 20^{ème} jour (J20) (figure 4). Les femelles sont nourries sur des souris saines ou infectées, lorsqu'elles sont âgées de 4 jours (J4).

Les échantillons sont constitués par des lots de 10 moustiques pour limiter au maximum les variations individuelles.

L'effet de l'introduction de corps étrangers dans l'hémolymphe sur les taux d'estérase est évalué sur des femelles uniquement, car elles seules sont vectrices du *Plasmodium*.

Les anophèles inoculés ont été prélevés 1, 2, 6, 24, 48 et 72 heures après l'introduction des sporozoïtes, des hématies, des billes de latex ou du RPMI.

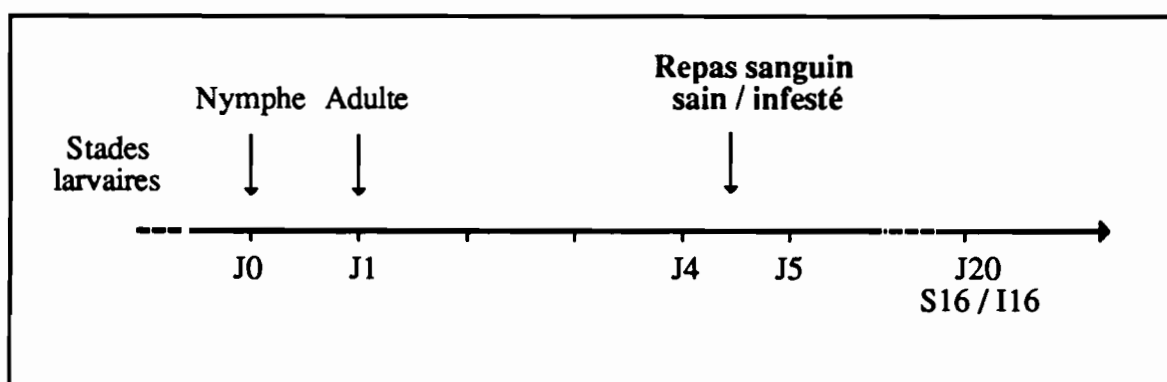


Figure 4 : La dénomination de l'âge des moustiques depuis l'émergence (J0) jusqu'au 20^{ème} jour (J20). Les femelles gorgées sur des souris saines deviennent J5 S1 jusqu'à J20 S16, celles gorgées sur des souris infectées deviennent J5 I1 jusqu'à J20 I16.

6.2. La préparation des échantillons.

Les moustiques récoltés sont traités à l'état frais car la congélation induit une perte d'activité estérasique (Freyvogel *et al.*, 1968).

Chaque moustique ou lot de moustiques est tué au froid, pesé puis immédiatement broyé dans du tampon phosphate (annexe 2), sur un lit de glace. Il est ensuite dilué de façon à doser 1/100 de moustique par cupule.

6.3. Le protocole de dosage des estérases.

Le dosage colorimétrique a été mis au point en adaptant des techniques de révélations enzymatiques utilisées en électrophorèse (Asperen, 1962 ; Cochrane et Richmond, 1979 ; Villani *et al.*, 1983). Il est calibré sur un volume total de 200 μ l par cupule de façon à travailler avec des plaques de microtitration ¹².

Les solutions nécessaires, ainsi que le schéma d'une plaque de dosage colorimétrique sont décrits en annexe 2.

On dépose 150 μ l de substrat puis 25 μ l de l'échantillon à doser, et on incube 1 heure à 37°C.

La réaction enzymatique est ensuite stoppée avec 25 μ l de colorant GBC (annexe 2) dans chacune des cupules.

La coloration rose-rouge se développe pendant 10 minutes. La lecture des densités optiques (DO) est faite au spectrophotomètre à 450 nm.

6.4. La gamme étalon.

La gamme étalon est établie, sur chacune des plaques, avec les produits de la réaction estérase-substrat : l' α et le β -naphthol. Les différentes concentrations d' α et β -naphthol nous permettent d'établir une relation entre l'intensité des densités optiques lues et la concentration en produit formé dans les cupules.

¹² Plaques NUNC

Nous présentons un exemple de gamme de β -naphthol obtenu au cours d'un dosage colorimétrique (figure 5). Les concentrations de produits sont exprimées en micro moles par cupule (μM naph / cup).

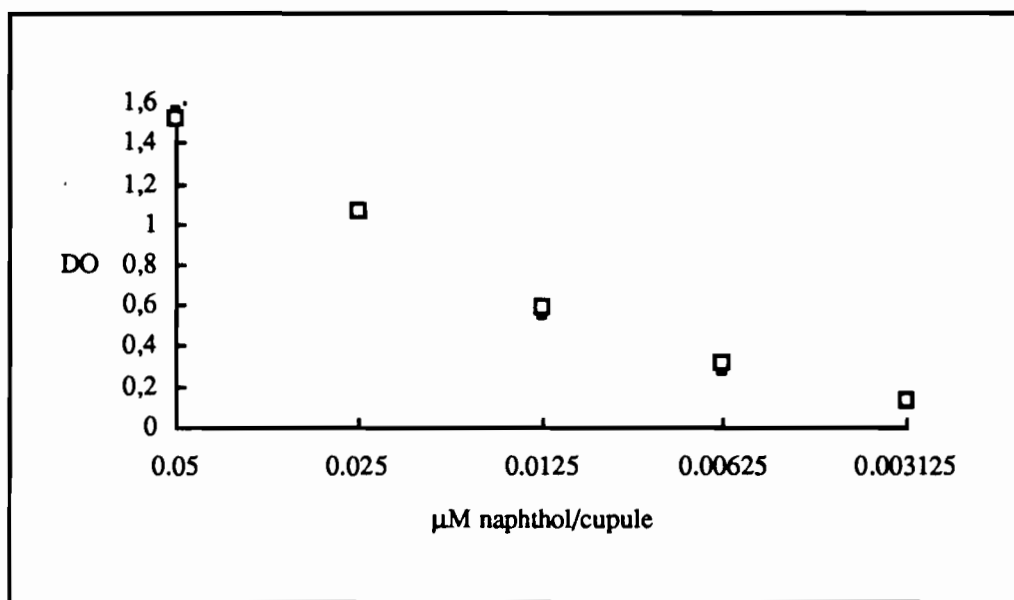


Figure 5 : Exemple de droite de référence permettant de déterminer graphiquement, à partir des densités optiques (DO), les quantités de β -naphthol formées dans chacun des échantillons dosés.

*ce n'est visiblement pas une droite
→ courbe de référence
- ? déviation standard -*

6.5. La présentation des résultats.

En se reportant à la droite étalon, chaque valeur de densité optique est transformée en quantité de naphthol formé. Les résultats sont exprimés en micro moles de produit formé par moustique, soit μM naph / fem ou μM naph / mâle, à partir d'une moyenne calculée sur 8 valeurs pour chacun des individus.

Le traitement statistique des données est fait selon Schwartz (1981). La comparaison des moyennes observées est établie à partir des résultats du test t de Student-Fisher.

7. Les techniques immunologiques de détection des antigènes sporozoïtaires chez le moustique.

Les antigènes sporozoïtaires peuvent être mis en évidence par des techniques immunologiques telles que l'immunofluorescence, la radio-immunologie ou l'immuno-enzymologie, basées sur la spécificité des réactions antigène-anticorps (OMS, 1977 ; Ruitenberg et VanKnapen, 1977).

Nous avons adapté deux d'entre elles, l'immunofluorescence et l'ELISA, à la détection et au dosage des antigènes CS de *P. y. yoelii*. Pour ce faire, nous avons fabriqué au laboratoire, des anticorps polyclonaux dirigés contre des sporozoïtes immatures et matures.

à un stade précoce et en phase mature

7.1. La fabrication d'anticorps anti-sporozoïtes.

Nous avons fabriqué :

- un anticorps anti-sporozoïtes "immatures" sur des souris,
- deux anticorps anti-sporozoïtes "matures", le premier sur des souris blanches et le second sur un lapin de race Nouvelle Zélande.

7.1.1. Le protocole de vaccination.

Les protéines CS du *Plasmodium* sont majoritaires à la surface du parasite et correspondent aux antigènes les plus immunogènes (Nussenzweig *et al.*, 1972 ; Tibayrenc, 1982 ; Zavala *et al.*, 1983).

Les antigènes injectés aux mammifères pour la production des anticorps sont :

- une suspension de sporozoïtes, isolée à partir d'un broyat d'estomacs infestés par des oocystes de *P. y. yoelii* , soit environ 7 à 10 jours après le repas sanguin. L'anticorps souris ainsi fabriqué est dirigé contre les sporozoïtes "immatures",
- une suspension de sporozoïtes faite à partir d'un broyat de glandes salivaires contenant des sporozoïtes infestants. Il induit la synthèse d'anticorps anti-sporozoïtes "matures".

7.1.1.1. La vaccination des souris.

Pour chacun des anticorps fabriqués, les souris ont reçu, par injection intrapéritonéale :

- 0,25 ml de broyat antigénique et 0,25 ml d'adjuvant de Freund à des jours fixes après celui du début de l'immunisation (J1) : J1, J2, J3, J4, J14, J21 et J28,
- 0,5 ml de sarcome TG180 ¹³ (1:100) à J25 afin d'augmenter la quantité d'anticorps fabriqués (Sartorelli *et al.*, 1966).

7.1.1.2. La vaccination du lapin.

Le lapin a reçu, par injection intrapéritonéale :

- 0,5 ml de broyat antigénique et 0,5 ml d'adjuvant de Freund à des jours fixes après celui du début de l'immunisation (J1) : J1 et J8,
- 0,5 ml de broyat antigénique à J14, J28 et J42.

7.1.2. Le prélèvement et le conditionnement des anticorps.

10 jours après l'injection du sarcome aux souris, la lymphe est prélevée au niveau de l'abdomen, puis centrifugée 10 minutes à 2000 g. Le surnageant est récupéré car il contient les anticorps soit anti-sporozoïtes "immatures" (AcS/TD), soit anti-sporozoïtes "matures" (AcS/GS). Il est séparé en aliquotes de 100 µl, qui peuvent être conservées plusieurs années à -80°C (Jakstys *et al.*, 1974).

Le lapin a été saigné au niveau de la veine jugulaire. Le sang est placé à température ambiante durant une nuit pour que la caillot se forme. Le sérum est alors centrifugé 10 minutes à 2000 g. Le culot est éliminé et le surnageant contenant les anticorps lapin anti-sporozoïtes "matures" (AcL/GS) est séparé en aliquotes de 100 µl, et conservé à -80°C.

La concentration protéique des anticorps a été déterminée par la méthode de dosage au bleu de Coomassie ¹⁴, avec pour protéine de référence, l'albumine bovine fraction V (Bramhall *et al.*, 1969).

¹³ Sarcome TG180 fournit par Mme Guillon (Institut Pasteur, Paris)

¹⁴ Kit de dosage au bleu de coomassie (PIERCE 23200)

7.1.3. L'épuisement des immunsérums.

Afin d'obtenir des anticorps anti-sporozoïtes le plus spécifiques possible des antigènes CS, nous avons épuisé chacune des aliquotes par un broyat d'anophèles femelles saines (10 femelles).

Pour cela, les anticorps dilués au 1/200 sont incubés une heure à 37°C en présence du broyat de moustiques.

A la fin de l'incubation, le précipité est éliminé par une centrifugation de 15 minutes à 2000 g. Le surnageant est récupéré et utilisé pour la réaction immunologique.

7.2. La technique d'immunofluorescence indirecte.

La technique d'immunofluorescence appliquée à la recherche de sporozoïtes "immatures" ou "matures" (Voller, 1964) a permis de tester la spécificité des anticorps fabriqués au laboratoire.

Son principe est basé sur la révélation du complexe antigène-anticorps par un autre anticorps couplé à la fluorescéine. La lecture au microscope à épifluorescence permet de visualiser les antigènes ainsi marqués (Hyman et McInnis, 1979).

7.2.1. La préparation des échantillons.

Nous avons prélevé 10 femelles infestées par *P. y. yoelii*, dont 5 au stade oocyste et 5 au stade glande salivaire. Les anticorps anti-sporozoïtes matures sont testés sur les femelles hébergeant des sporozoïtes dans les glandes salivaires, l'anticorps anti-sporozoïtes immatures l'est sur les femelles présentant des oocystes.

Les tubes digestifs et les glandes salivaires infestés sont disséqués selon la méthode décrite au paragraphe 3.1.1., puis isolés dans des tubes eppendorf. Chaque échantillon est broyé dans 10 µl de RPMI.

7.2.2. Le protocole.

Sur une lame à immunofluorescence, on dépose 10 µl de chacun des échantillons à tester, et on laisse sécher à température ambiante une nuit.

Les lames sont fixées 1 heure dans un bain d'acétone à -20°C, puis séchées.

On dépose 100 µl d'anticorps lapin ou souris anti-sporozoïtes dilués au 1/100 sur les échantillons. La réaction antigène-anticorps se développe durant 1 heure à 37°C. Les lames sont rincées 3 fois 10 minutes avec du sérum physiologique, puis séchées.

On dépose 100 µl de solution d'anticorps anti-souris ¹⁵ ou anti-lapin ¹⁶ conjugué à la fluorescéine (1:100, avec 5 µl de bleu d'Evans). On incube 1 heure à 37°C. Les lames sont rincées à nouveau 3 fois 10 minutes avec du sérum physiologique, puis séchées.

On peut alors procéder à la lecture des lames.

7.2.3. L'observation des lames.

La lecture des lames est réalisée avec un microscope à épifluorescence, après les avoir recouvertes d'une solution aqueuse de glycérol (1:9) et d'une lamelle.

Les sporozoïtes marqués par la fluorescéine apparaissent en fluorescence verte alors que les accrochements non spécifiques fluorescent en jaune, rouge ou bleu.

7.3. Le dosage immuno-enzymatique (ELISA).

Le dosage des antigènes sporozoïtaires par une méthode immuno-enzymatique a pour principe de révéler les complexes antigènes-anticorps grâce à autre anticorps, couplé cette fois à une enzyme (Nakane et Pierce, 1967). L'enzyme est ensuite révélée par une réaction colorimétrique (OMS, 1977).

Cette technique est très utilisée, par ailleurs, pour le diagnostic des maladies parasitaires et l'évaluation des charges parasitaires chez l'homme (Voller *et al.*, 1975 ; Ruitenberget Buys, 1977 ; Ambroise-Thomas et Desgeorges, 1978 , Naot et Remington, 1981 ; Konoshi et Yamaoka, 1982).

¹⁵ Anticorps marqués anti IgG souris, fluorescéine (DIAGNOSTICS PASTEUR 74641)

¹⁶ Anticorps marqués anti IgG lapin, fluorescéine (DIAGNOSTICS PASTEUR 74641)

La technique ELISA a été adaptée à la détection des antigènes de sporozoïtes immatures et matures de *P. y. yoelii*. Les anticorps dont nous disposons n'étant pas spécifiques des antigènes CS, nous avons augmenté la spécificité de la réaction par un dosage en double sandwich (Voller *et al.*, 1976). Ainsi, les échantillons que l'on veut tester se lient à un premier anticorps puis à un second (figure 6).

La mise au point du dosage ELISA porte sur la comparaison de femelles infestées par *P. y. yoelii* avec des femelles saines, dans les conditions du laboratoire. L'épreuve est ensuite utilisée pour évaluer la charge sporozoïtaire des femelles après inoculation.

7.3.1. La préparation des échantillons.

Des femelles infestées sont prélevées tous les jours, depuis le 7^{ème} jour après le repas de sang jusqu'au 18^{ème} jour. Les femelles inoculées avec des sporozoïtes immatures et matures, ont été prélevées 24 et 48 heures après l'inoculation, puis 3 jours, 5 jours et 7 jours après.

Chaque moustique est isolé dans un tube et congelé à -80°C. Une semaine après, il est décongelé, broyé dans du tampon de dilution (annexe 3) puis recongelé jusqu'au dosage.

7.3.2. La sensibilisation des plaques.

Des plaques à très haute adsorption ¹⁷ sont utilisées comme support de coating par les anticorps lapin anti-sporozoïtes (AcL/GS).

Sensibilisation
"Coatée" a disparu, c'est bien

Chaque cupule est tapissée avec 200 µl d'une solution d'anticorps lapin anti-sporozoïtes à 8 µg / cupule. Après 2 heures d'incubation à 37°C, les cupules sont saturées par 100 µl d'albumine bovine à 3% (annexe 3), puis incubées au moins 12 heures à 4°C. Les plaques sont alors prêtes à l'emploi.

¹⁷ Plaques GREINER

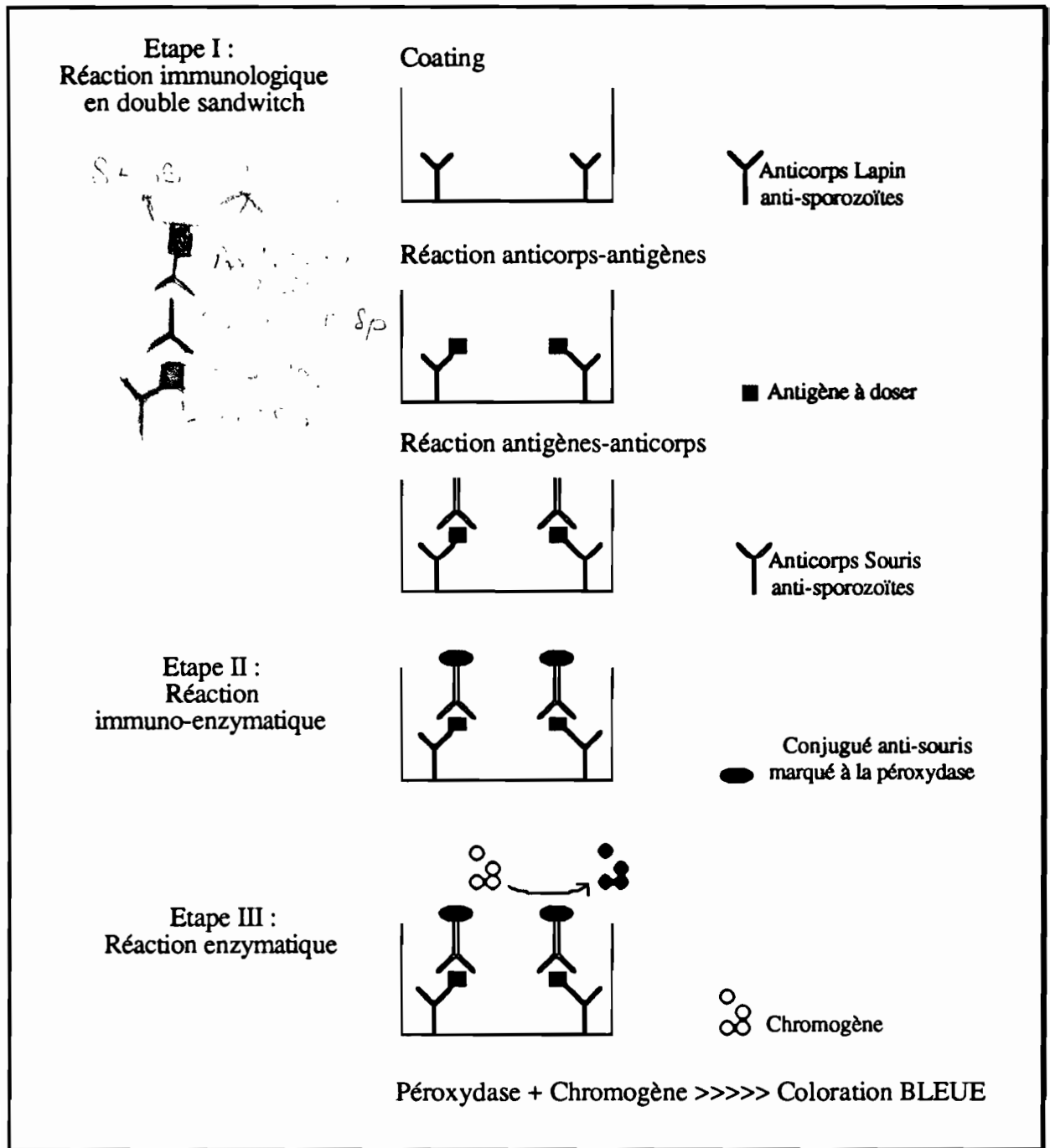


Figure 6 : Les étapes du dosage des antigènes sporozoïtaires par la technique ELISA en double sandwich.

7.3.3 Les étapes du dosage.

Les solutions nécessaires au dosage immuno-enzymatique, ainsi que le schéma de la plaque obtenue sont présentés en annexe 3.

Les étapes successives du dosage ELISA sont établies avec un volume de 200 µl / cupule. A la suite de chacune des étapes décrites ci-dessous, on procède à une incubation de 1 heure à 37°C, à un triple lavage avec du tampon de lavage à 0,1% de tween 20¹⁸ (durée totale du lavage 9 minutes), et un égouttage à sec.

L'antigène à doser est dilué à 1/80, et déposé dans les cupules.

On ajoute ensuite les anticorps souris anti-sporozoïtes "immatures" (AcS/TD) ou anti-sporozoïtes "matures" (AcS/GS) à la concentration de 8 µg / cupule.

Le complexe anticorps-antigène-anticorps est révélé par l'anticorps anti-souris conjugué à la peroxydase¹⁹, à 8,2 µg / cupule.

On dépose ensuite le substrat de l'enzyme, l'orthotolidine²⁰ (Monget, 1978). La peroxydase réagit avec son substrat en donnant une coloration bleue, d'autant plus intense que le nombre de sporozoïtes est élevé.

L'appréciation de la coloration est faite par un spectrophotomètre, à 630 nm, qui la transcrit en densités optiques. La lecture des plaques est faite après 30 minutes, temps au bout duquel la coloration est optimale (Ambroise-Thomas et Desgeorges, 1978 ; Ambroise-Thomas *et al.*, 1981).

7.3.4. Les témoins de réaction et la gamme étalon.

Sur chaque plaque nous avons réalisé les témoins suivants :

- un bruit de fond (F), correspondant aux accrochements non spécifiques entre les différents anticorps déposés,
- un témoin positif de référence (T+), réalisé à partir d'un broyat de 75 femelles infestées par *P. y. yoelii*, et réparti en aliquotes congelées à -80°C,
- un témoin négatif de référence (T-), réalisé avec un broyat de 75 femelles saines et séparé en aliquotes congelées à -80°C,
- une gamme étalon composée de dilutions successives d'une suspension standard de sporozoïtes matures de concentration connue (paragraphe 3.1.1.).

¹⁸ Polyoxyéthylène-sorbitan monolaurate "Tween 20" (SIGMA P-1379)

¹⁹ Anticorps mouton anti-souris conjugué à la peroxydase (SIGMA A-5906)

²⁰ Orthotolidine (SIGMA T-6269)

Les densités optiques obtenues avec les T- ont permis de fixer le seuil en dessous duquel il fallait considérer l'échantillon comme négatif, soit non-infesté soit faux-négatif. Ce témoin permet d'évaluer les antigènes non CS reconnus par les anticorps.

Les densités optiques lues pour les T+ nous indiquaient que la réaction était positive, c'est-à-dire que les antigènes sporozoïtaires sont bien révélés par le dosage ELISA.

limite ,

Les densités optiques obtenues avec la gamme permettent d'estimer la concentration de sporozoïtes présents dans les échantillons dosés.

Nous présentons deux exemples de gamme de référence obtenue à l'issue d'un dosage immuno-enzymatique (figures 7 et 8). Les concentrations sporozoïtaires sont exprimées en nombre de sporozoïtes par cupule (sp).

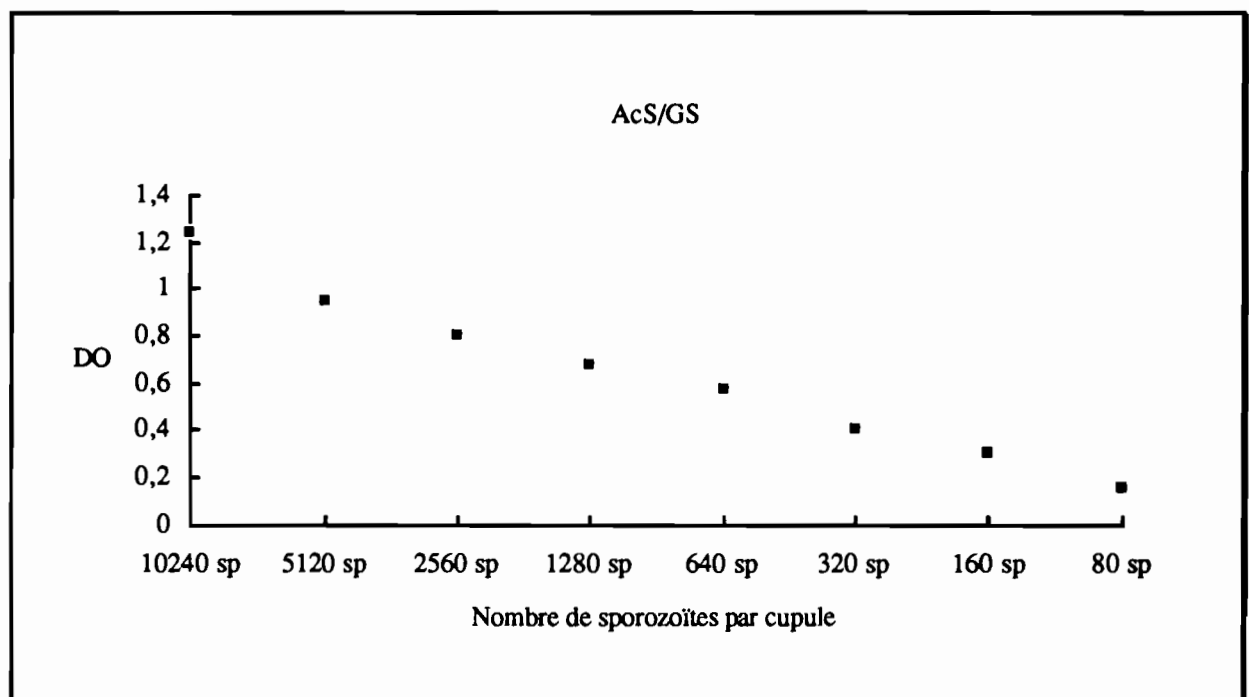


Figure 7 : Exemple de droite de référence permettant de déterminer graphiquement, à partir des densités optiques (DO), la concentration d'antigènes sporozoïtaires contenue dans les échantillons (dosage avec l'anticorps souris anti-sporozoïtes glandes salivaires, AcS/GS).

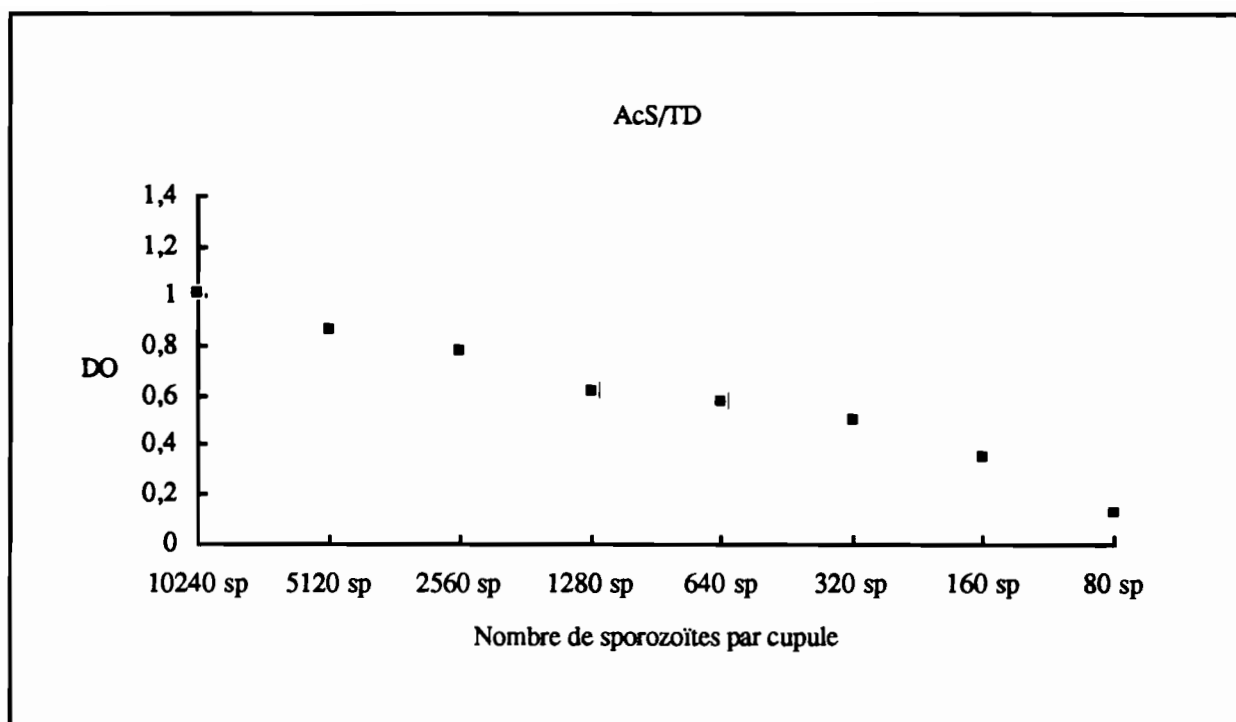


Figure 8 : Exemple de droite de référence permettant de déterminer graphiquement, à partir des densités optiques (DO), la concentration d'antigènes sporozoïtaires contenue dans les échantillon (dosage avec l'anticorps souris anti-sporozoïtes tube digestif, AcS/TD).

7.3.4. La présentation des résultats.

Toutes les valeurs de densités optiques (DO) obtenues en ELISA correspondent aux DO lues sur les plaques corrigées par la valeur du bruit de fond et celle du témoin négatif:

$$DO = DO \text{ (lue)} - DO \text{ (bruit de fond)} - DO \text{ (T-)}$$

Pour la gamme étalon, les quantités de sporozoïtes sont exprimées en nombre de sporozoïtes par cupule, soit sp / cup.

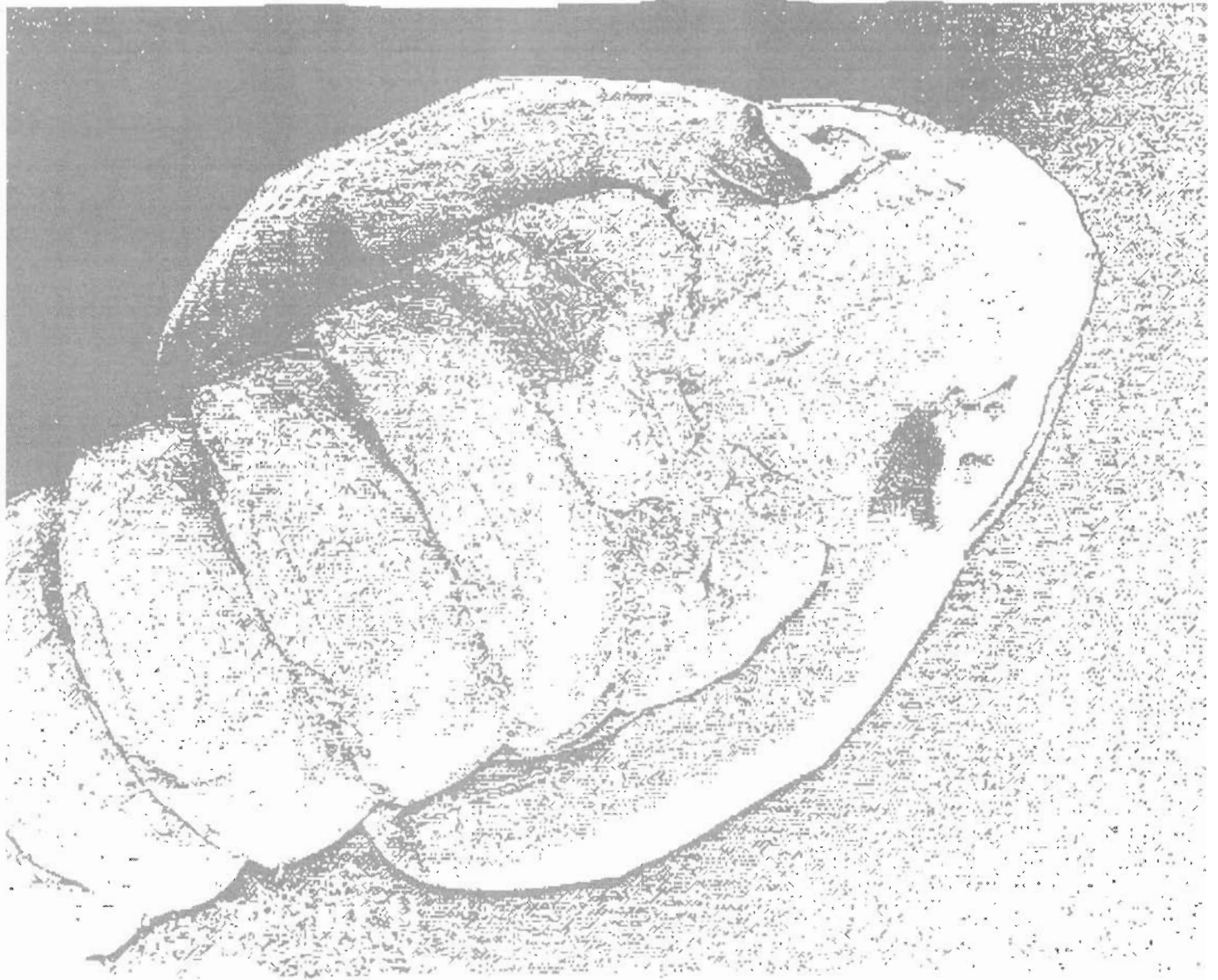
Pour les échantillons, les quantités de sporozoïtes estimées sont exprimées en nombre de sporozoïtes par femelle, soit sp / fem.

L'épreuve ELISA est évaluée à partir de différents paramètres, tels :

- la fiabilité relative (F), soit la proportion de moustiques positifs et négatifs correctement classés en ELISA rapportés à la totalité des moustiques,
- la spécificité (SP), soit la proportion de moustiques sains négatifs en ELISA rapportée à l'ensemble des moustiques sains à la dissection,
- la spécificité (S), soit le nombre minimum de sporozoïtes détectés par l'ELISA,

- la valeur prédictive d'un diagnostic positif (VPD+), qui est la proportion de moustiques infestés par rapport à l'ensemble des moustiques positifs en ELISA,
- la valeur prédictive d'un diagnostic négatif (VPD-), qui est la proportion de moustiques sains par rapport à l'ensemble des moustiques négatifs en ELISA,
- la valeur globale de l'épreuve (VG), soit la proportion de moustiques infestés ou sains correctement classés rapporté à la totalité des moustiques testés.

L'analyse statistique des données est faite selon Schwartz (1981). Les pourcentages observés sont comparés par un test de Chi2, à partir d'un tableau de contingence 2x2.



CHAPITRE II

Cytologie de l'hémolymph d'*Anopheles stephensi*

1. Introduction.

La description des hémocytes d'insectes basée sur des caractères morphologiques et cytochimiques a abouti à des classifications nombreuses et variées. Ainsi, un même type d'hémocytes peut être décrit sous des noms différents selon les auteurs, ou bien, des termes identiques peuvent être appliqués à des hémocytes de types variés (Wigglesworth, 1959 ; Jones, 1962 ; Price et Ratcliffe, 1974). L'étude en microscopie optique ne permet pas de différencier les types cellulaires d'insectes à partir des propriétés tinctoriales comme elle le permet chez les vertébrés.

L'utilisation de la microscopie électronique a permis de décrire l'ultrastructure des hémocytes et d'en simplifier la nomenclature (Hoffmann, 1968). Des études sont développées dans beaucoup d'ordres d'insectes. Les classifications actuelles des hémocytes sont d'abord établies sur des caractères ultrastructuraux. A la suite de la description de leurs caractères cytologiques, les types d'hémocytes sont repérés en microscopie optique. La classification est établie en essayant de tenir compte à la fois des caractères morphologiques et de certains caractères fonctionnels (Brehélin et Zachary, 1986).

La même démarche est utilisée pour la réalisation de cette étude. La composition cytologique de l'hémolymph de *Anopheles stephensi*, au 4ème stade larvaire et au stade adulte femelle, est décrite à partir d'observations en microscopie électronique puis en microscopie optique. Nous exposons la morphologie des hémocytes et abordons le rôle de ces cellules dans les réactions de défense des moustiques.

La faible concentration d'hémocytes chez le moustique, à l'état larvaire comme à l'état adulte, entraîne des difficultés de manipulation. Les chances d'observer un hémocyte sur des coupes d'insectes entiers sont faibles et nous nous sommes appliqués à travailler sur des culots d'hémocytes. Cela a imposé de prélever l'hémolymph d'un grand nombre de moustiques de façon à obtenir un culot de cellules suffisamment conséquent pour être fixé et inclus dans la résine.

2. Les hémocytes d'*A. stephensi* et leurs rôles dans les réactions de défense du moustique.

Les hémocytes d'*Anopheles stephensi* sont très peu nombreux mais présentent les mêmes caractéristiques chez les larves de stade IV et chez les adultes. La description que nous faisons est donc valable pour les deux stades étudiés.

L'étude morphologique permet de mettre en évidence :

- trois types d'hémocytes définis selon la classification de Brehélin et Zachary (1986) : les prohémoscytes, les oenocytoides et les plasmatocytes macrophages,
- diverses autres cellules dont l'appartenance aux hémocytes est discutée.

2.1. Les prohémoscytes.

Les prohémoscytes (planche V, photos 13 et 14) sont des cellules arrondies de petite taille (5 à 7 μm) dont le rapport nucléo-cytoplasmique est très élevé. Le cytoplasme est peu développé, confiné à la périphérie de la cellule, et dépourvu d'inclusions. L'ergastoplasme et l'appareil de Golgi sont discrets alors que les ribosomes libres sont abondants.

Ce type d'hémocyte est observé en nombre réduit dans l'hémolymphe. D'après leurs caractères ultrastructuraux, ces cellules apparaissent comme les cellules souches des hémocytes. De plus, elles sont souvent observées en cours de mitose (planche V, photo 13).

En microscopie optique, ces hémocytes ont un noyau qui semble occuper 80% du volume cellulaire. Le peu de cytoplasme apparaît homogène, sans inclusions.

2.2. Les oenocytoides.

Les oenocytoides sont des cellules de grande taille (10 à 12 μm de diamètre), dont l'aspect extérieur est régulier, sans digitations (planche VI, photo 15). Le rapport nucléo-cytoplasmique est faible. Le cytoplasme ne contient que des ribosomes libres, lui conférant son aspect graniteux. Les organites cellulaires (mitochondries, appareil de Golgi et réticulum endoplasmique) sont très peu représentés. On y observe des zones moins opaques aux électrons et qui semblent dépourvues de ribosomes (planche VI, photo 16).

En microscopie optique, Le noyau est toujours en position excentrée dans la cellule et de petite taille. Le cytoplasme est clair, homogène et sans inclusions (planche VI, photo 17).

Ce type d'hémocyte a été observé uniquement chez les larves de stade IV.

PLANCHE V

Les prohémostocytes

Photo 13 : Prohémocyte d'*A. stephensi* en microscopie électronique (x 6 000).

La cellule est en cours de mitose : la chromatine (Ch) est condensée. Le noyau (N) est volumineux, et délimité par la membrane nucléaire (Mn). Le cytoplasme (C) est réduit à la périphérie de la cellule.

Photo 14 : Prohémocyte d'*A. stephensi* en microscopie optique à contraste de phase (x 1 250).

Le noyau occupe 80% de la cellule. Le cytoplasme apparaît sans inclusions.

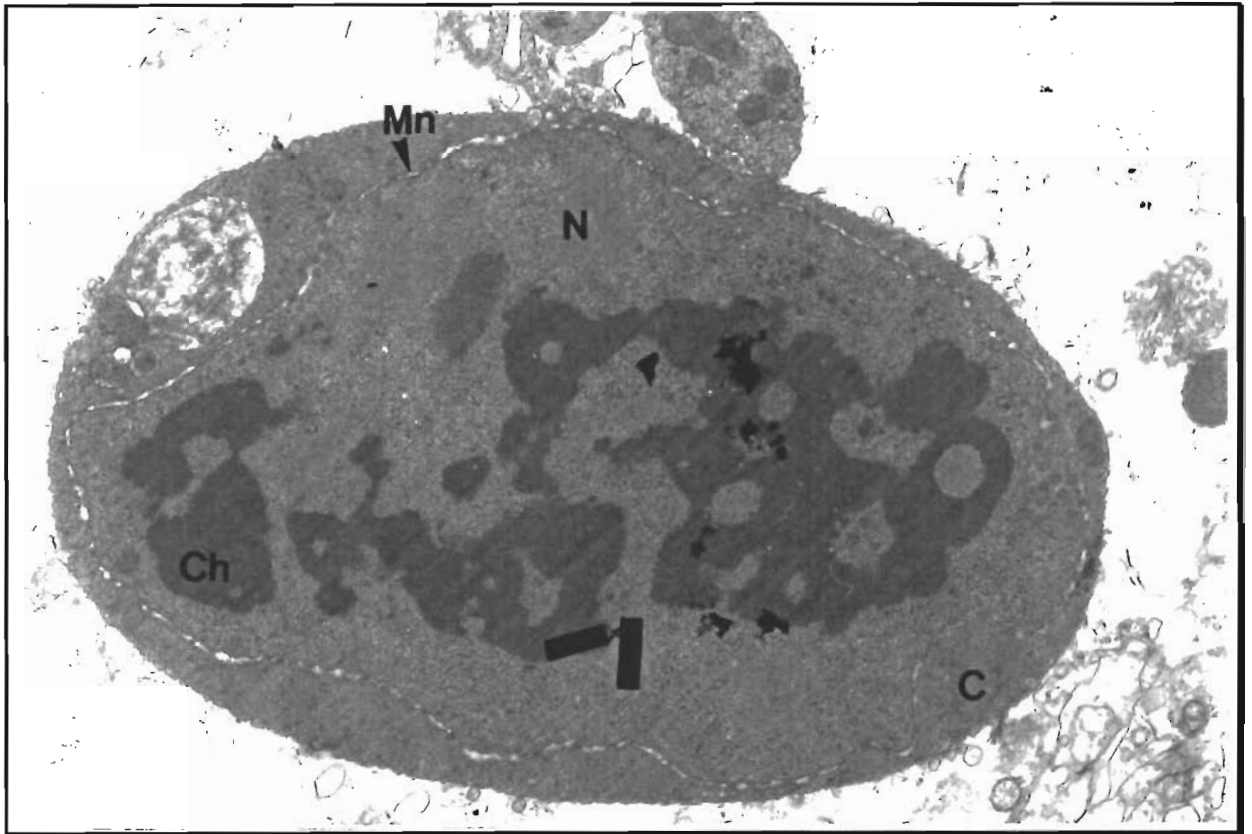


Photo 13

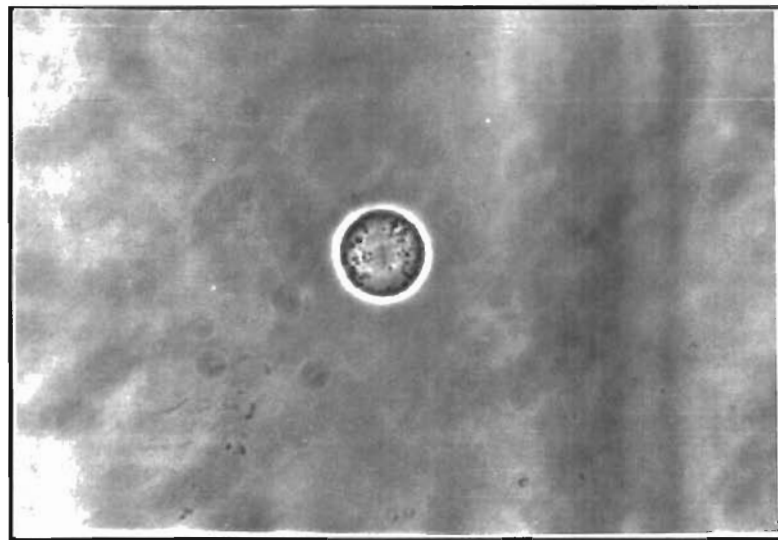


Photo 14

PLANCHE VI

Les oenocytoïdes

Photo 15 : Oenocytoïde d'*A. stephensi* en microscopie électronique (x 6 000).

Ce type cellulaire est caractérisé par sa forme régulière, et un noyau (N) en position excentrée. Le cytoplasme (C) est pauvre en organites cellulaires. On note quelques mitochondries (M) et des ribosomes libres (R) très nombreux. Les plages de cytoplasme claires semblent dépourvues de ribosomes.

Photo 16 : Fragment de cytoplasme d'un oenocytoïde d'*A. stephensi* en microscopie électronique (x 15 000).

L'abondance des ribosomes libres (R) donne un aspect grenu au cytoplasme. Noyau (N), mitochondries (M).

Photo 17 : Oenocytoïde d'*A. stephensi* en microscopie optique à contraste de phase (x 1 250).

Noter la forme régulière de la cellule, le noyau décentré et le cytoplasme homogène.

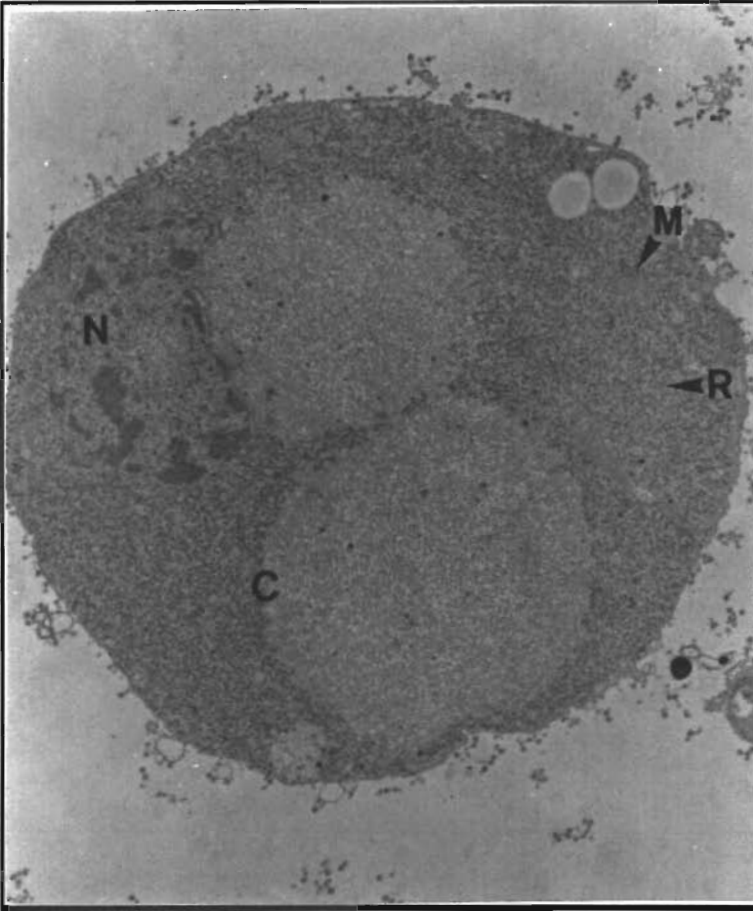


Photo 15

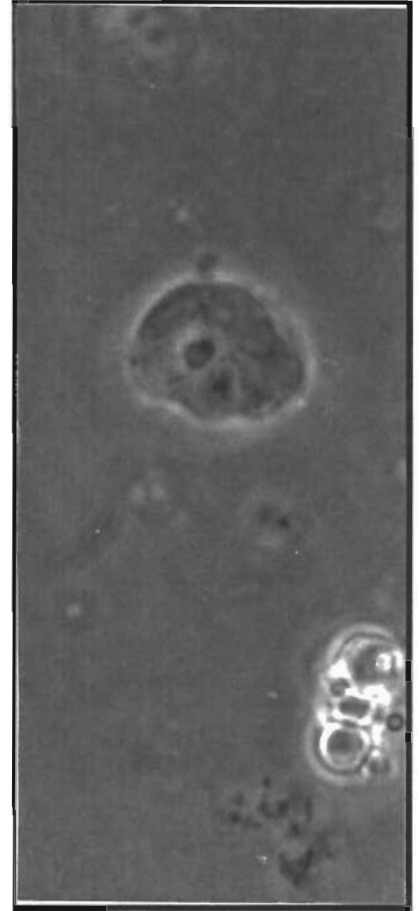


Photo 17

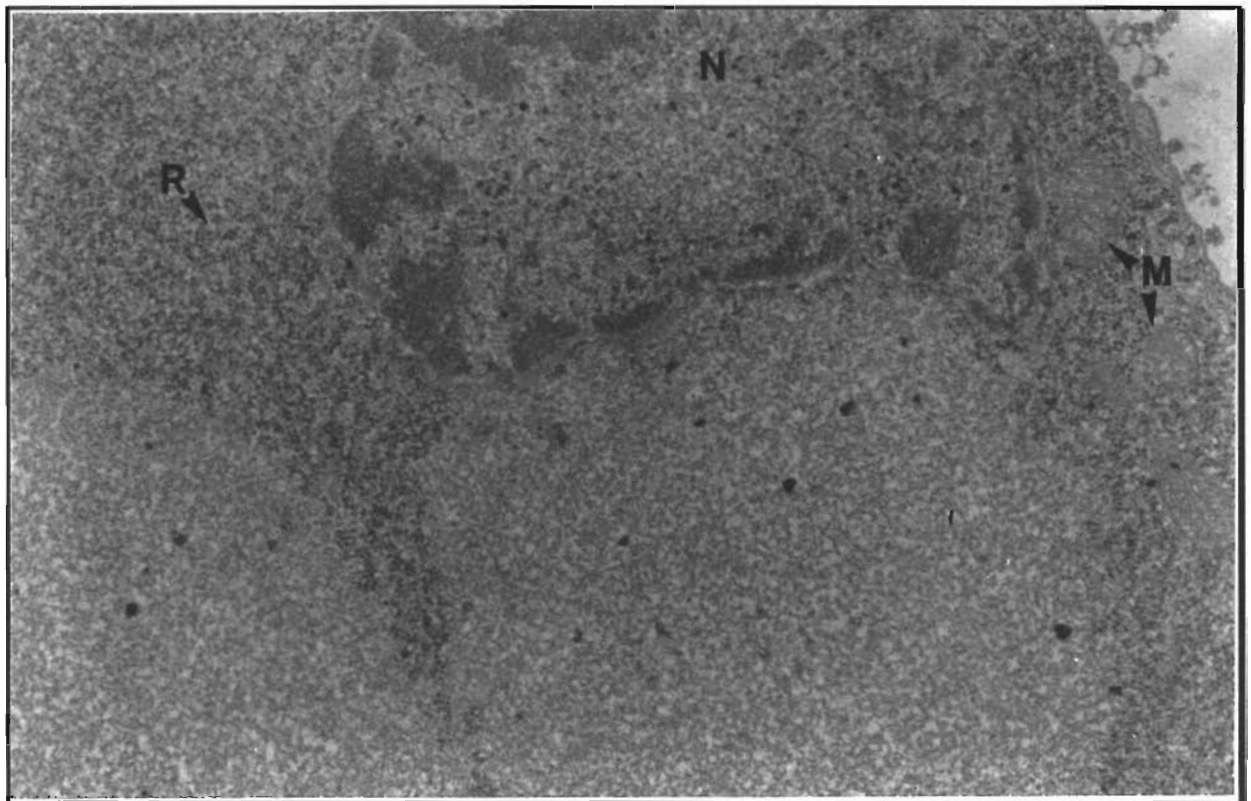


Photo 16

2.3. Les plasmatocytes macrophages.

Les plasmatocytes macrophages ou hémocytes granuleux de type III sont des cellules de grande taille et polymorphes, pouvant être rondes (7 μm de diamètre) ou allongées (2 μm sur 12 μm) (planche VII, photos 18 et 19). Fréquemment, la membrane plasmique s'invagine à l'intérieur du cytoplasme en formant des vésicules à paroi épaisse et ornementée, les vésicules de pinocytose (planche VII, photo 19). Le cytoplasme est riche en ribosomes libres, et le réticulum endoplasmique est surtout constitué de citernes dilatées dont le contenu d'aspect floconneux signe une activité protéosynthétique importante (planche VII, photo 18'). Les mitochondries sont nombreuses, de petite taille, et se répartissent de façon homogène dans tout le cytoplasme.

Les plasmatocytes observés en microscopie en contraste de phase, à l'état frais sont des cellules de formes variées, fusiformes, sphériques ou effilées. Le noyau est souvent excentré. Le cytoplasme apparaît sous deux aspects : homogène, avec des granules de petite taille et peu réfringents (planche VIII, photo 20) ou hétérogène, avec de nombreux granules très denses et des grandes vacuoles claires (planche VIII, photo 21). Les granules, caractérisant les plasmatocytes macrophages, sont normalement peu nombreux mais augmentent considérablement en nombre et en taille si les particules à phagocyter sont nombreuses dans l'hémolymph.

On note également des modifications morphologiques *in vitro*, quand les plasmatocytes sont au contact d'un support après prélèvement de l'hémolymph. Le cytoplasme émet des pseudopodes longs et fins, ou s'étale sous forme de voile à la périphérie de la cellule (planche VIII, photos 22 et 23).

L'appareil de Golgi est bien développé, et son activité sécrétrice importante produit des vésicules qui vont fusionner avec les vésicules de pinocytose ou les vacuoles macrophagiques. On aboutit à la formation de corps multivésiculaires dont l'aspect devient de plus en plus dense et hétérogène : ce sont les corps de résorptions ou lysosomes secondaires (planche VII, photo 19'). Ces lysosomes sont les seuls granules observés dans ce type d'hémocyte.

PLANCHE VII

Les plasmacytes macrophages en microscopie électronique

Photo 18 : Plasmatoocyte macrophage d'*A. stephensi* en microscopie électronique (x 4 000). La cellule est de forme allongée. Le cytoplasme (C) montre un réticulum endoplasmique très développé, sous forme de citernes allongées (cit). Noyau (N).

Photo 18' : Détail du cytoplasme d'un plasmatoocyte macrophage d'*A. stephensi* en microscopie électronique (x 10 000).

Le réticulum endoplasmique est constitué de citernes dilatées (cit), à aspect floconneux. Les ribosomes libres (R) sont nombreux. Noyau (N).

Photo 19 : Plasmatoocyte macrophage d'*A. stephensi* en microscopie électronique (x 8000).

La cellule est de forme arrondie. La membrane plasmique s'invagine pour former des vésicules de pinocytose (V). Noter la présence de corps de résorption (Cr) de grande taille.

Photo 19' : Détail du cytoplasme d'un plasmatoocyte macrophage d'*A. stephensi* en microscopie électronique (x 30 000).

Noter la présence de corps de résorptions ou lysosomes secondaires (Cr), de structure membranaire. Le réticulum endoplasmique est développé sous forme de citernes dilatées (cit). Noyau (N).

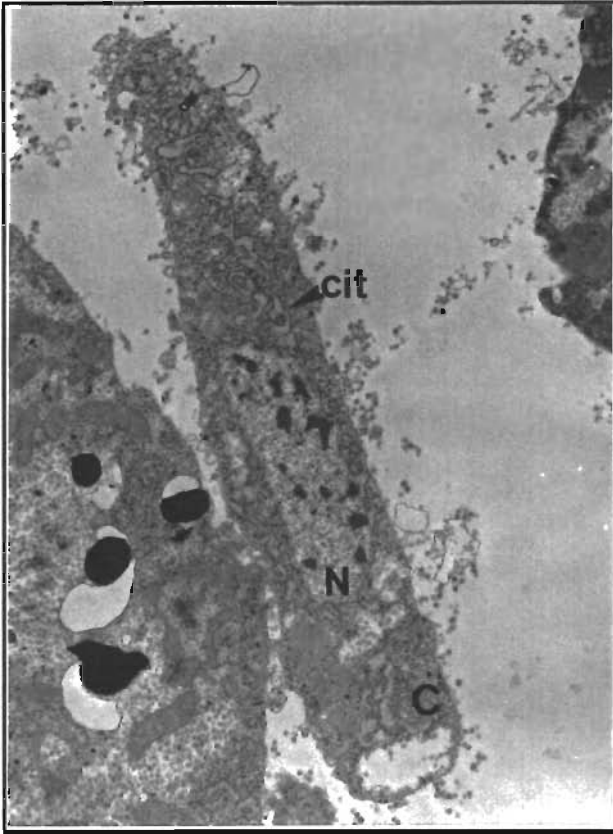


Photo 18

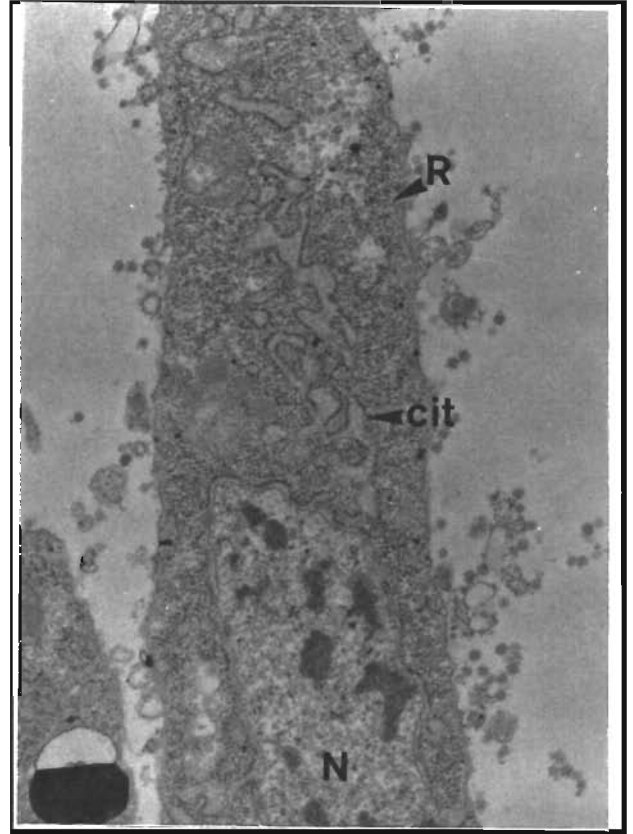


Photo 18'

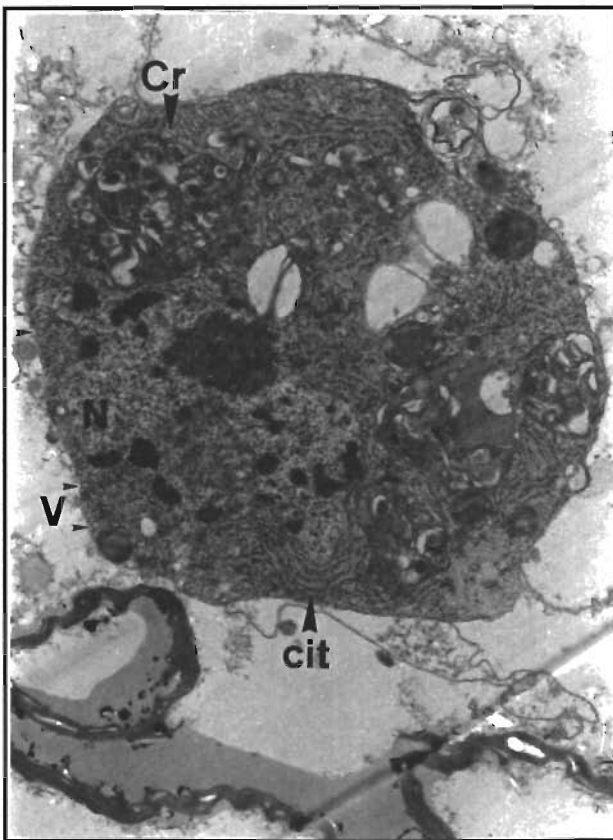


Photo 19

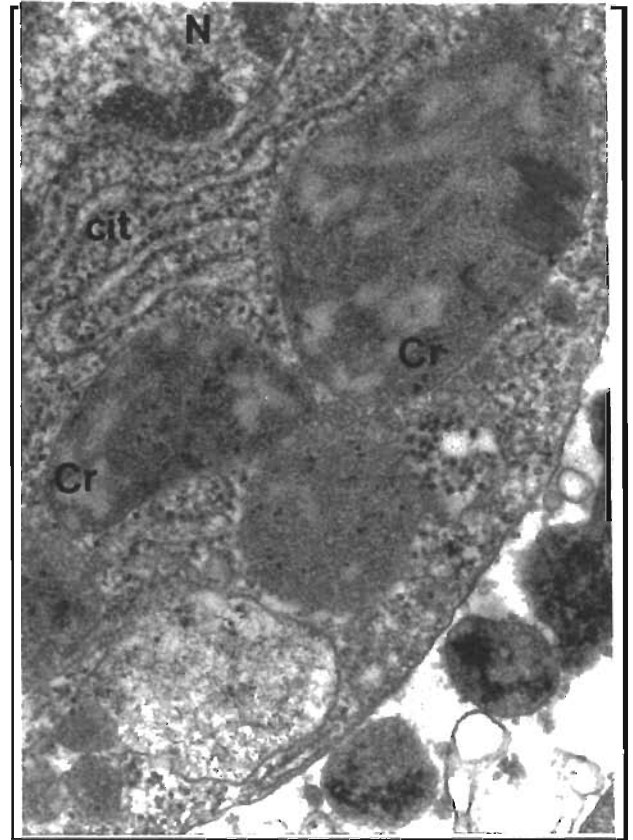


Photo 19'

PLANCHE VIII

Les plasmacytes macrophages en microscopie optique

Photo 20 : Plasmatoocyte macrophage d'*A. stephensi* en microscopie optique (x 1 250).
Le cytoplasme cellulaire est homogène et peu réfringent, avec des granules de petite taille.

Photo 21 : Plasmatoocyte macrophage d'*A. stephensi* en microscopie optique (x 1 250).
Le cytoplasme cellulaire est hétérogène, avec des granules nombreux et de grande taille. On note la présence de grande vacuoles plus claires.

Photo 22 : Plasmatoocyte macrophage d'*A. stephensi* en microscopie optique (x 1 250).
La cellule émet des pseudopodes longs et fins lorsqu'elle se trouve, *in vitro*, à la surface d'un support.

Photo 23 : Plasmatoocyte macrophage d'*A. stephensi* en microscopie optique (x 1 250).
Le cytoplasme de la cellule émet des voiles lorsqu'elle se trouve, *in vitro*, à la surface d'un support.

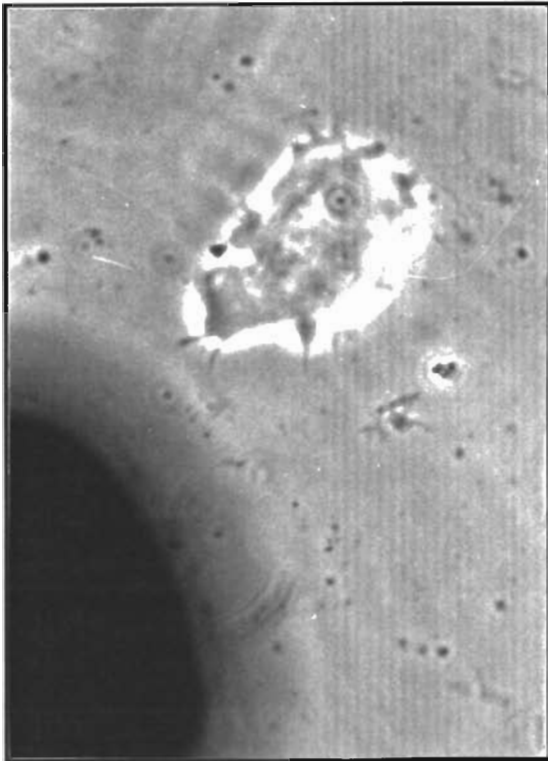


Photo 20

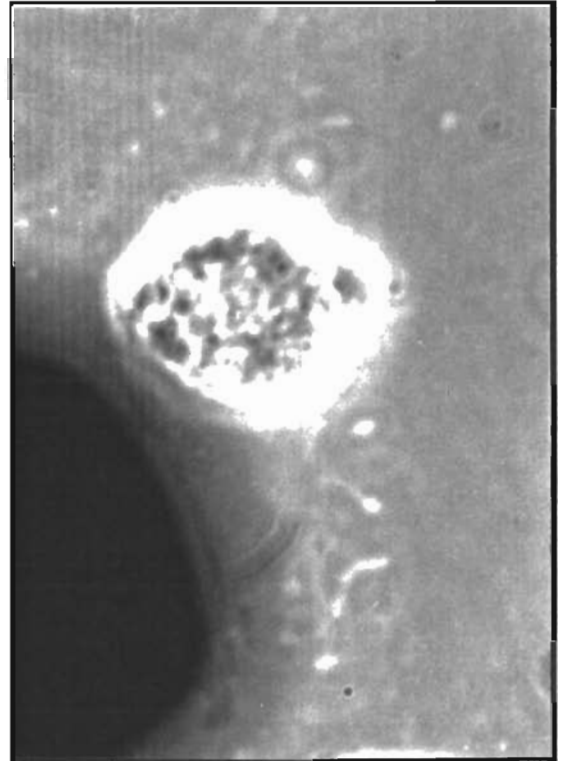


Photo 21

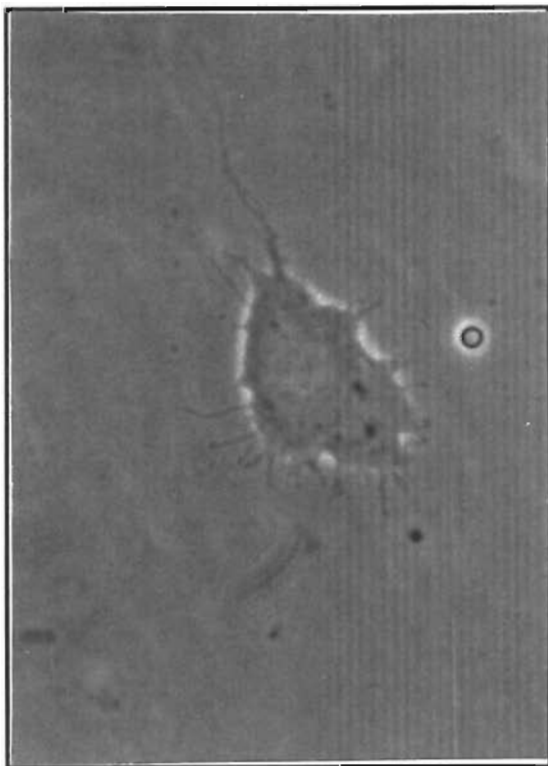


Photo 22

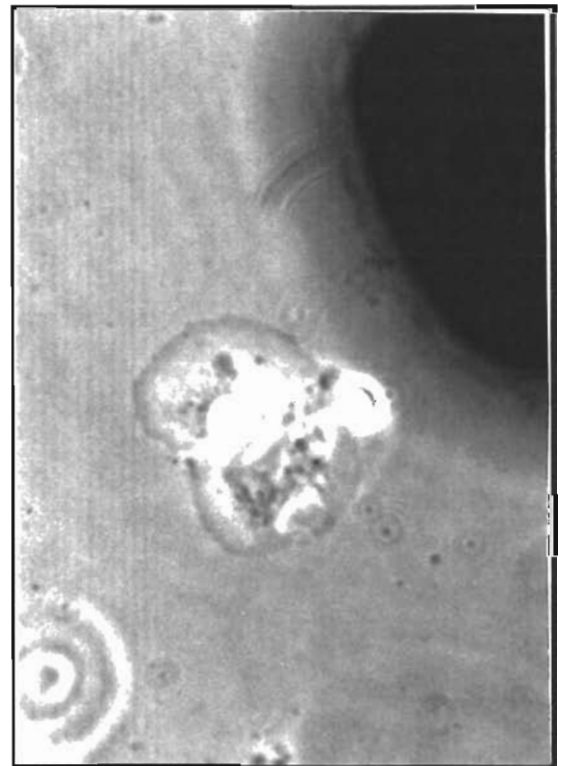


Photo 23

2.4. Les adipohémocytes.

En circulation, nous avons observé des cellules de grande taille (15 μm de diamètre) et contenant de nombreuses inclusions lipidiques (planche IX, photos 24 et 25). Si certaines de ces cellules font partie du tissu adipeux de l'insecte de façon indiscutable (voir paragraphe 2.5.), d'autres en revanche présentent des caractéristiques de cellules circulantes : nous les avons appelées adipohémocytes.

Outre les inclusions lipidiques parfois nombreuses et de grande taille, les adipohémocytes ont une charge en glycogène très importante. Chez la larve, certaines de ces cellules apparaissent beaucoup moins chargées en glycogène et en inclusions lipidiques (planche IX, photo 26). L'ergastoplasme est bien développé, surtout au voisinage du noyau, et forme de nombreuses vésicules dilatées à contenu floconneux. Les mitochondries sont nombreuses et de grande taille.

Les adipohémocytes, en microscopie optique, sont de grandes cellules. Leur cytoplasme est chargé en gros globules très réfringents, de type lipidique, et en petits granules d'aspect sombre.

Dans certaines expériences d'injection de billes de latex, les adipohémocytes ont montré une capacité à phagocyter ces corps inertes. Cette activité importante peut aller jusqu'à un état de surcharge qui provoque la lyse de la cellule (planche X, photo 27).

Lors du processus de phagocytose, la cellule, au contact du corps étranger, émet des prolongements de cytoplasme qui englobent la particule puis qui vont fusionner et emprisonner la particule dans une vacuole à l'intérieur du cytoplasme (planche X, photos 28 et 28'). Ces vacuoles, après fusion avec les vésicules lysosomiales du Golgi, forment les corps de résorption. Le matériel phagocyté est normalement dégradé dans les corps de résorption, ce qui n'est pas le cas, bien sûr, des billes de latex. On observe souvent des vacuoles de résorption de très grande taille (3 μm de diamètre) où sont rassemblés le contenu de plusieurs vacuoles de phagocytose (planche X, photos 27).

PLANCHE IX

Les adipohémocytes

Photo 24 : Adipohémocyte d'*A. stephensi* en microscopie électronique (x 5 000).

Le cytoplasme est riche en inclusions lipidiques (Lp) et en grains de glycogène (Gl). Noyau (N), mitochondries (M).

Photo 25 : Adipohémocyte d'*A. stephensi* en microscopie optique à contraste de phase (x 1 250).

La présence de globules lipidiques nombreux donne un aspect très réfringent à la cellule.

Photo 26 : Adipohémocyte d'une larve d'*A. stephensi* en microscopie électronique (x 4 000).

Le cytoplasme apparaît beaucoup moins chargé en glycogène (Gl) et en inclusions lipidiques (Lp).

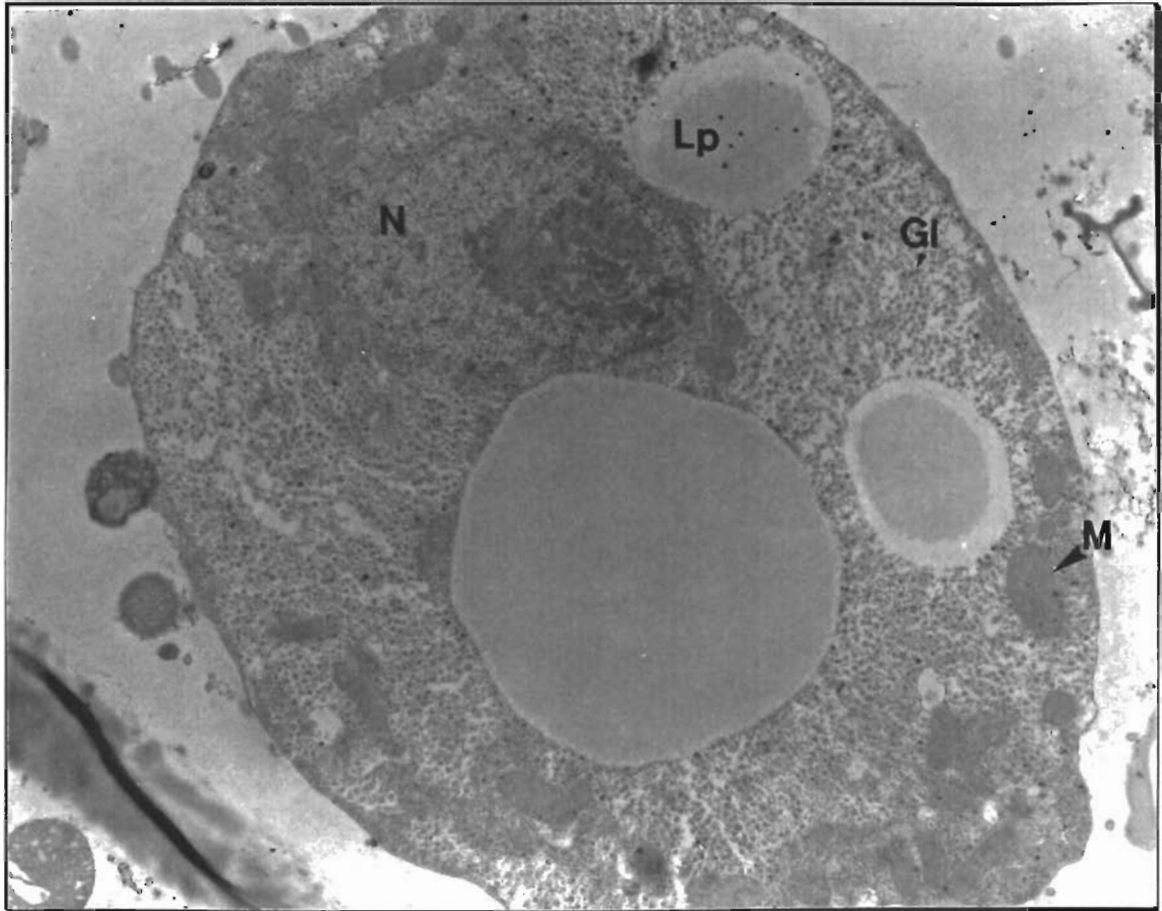


Photo 24

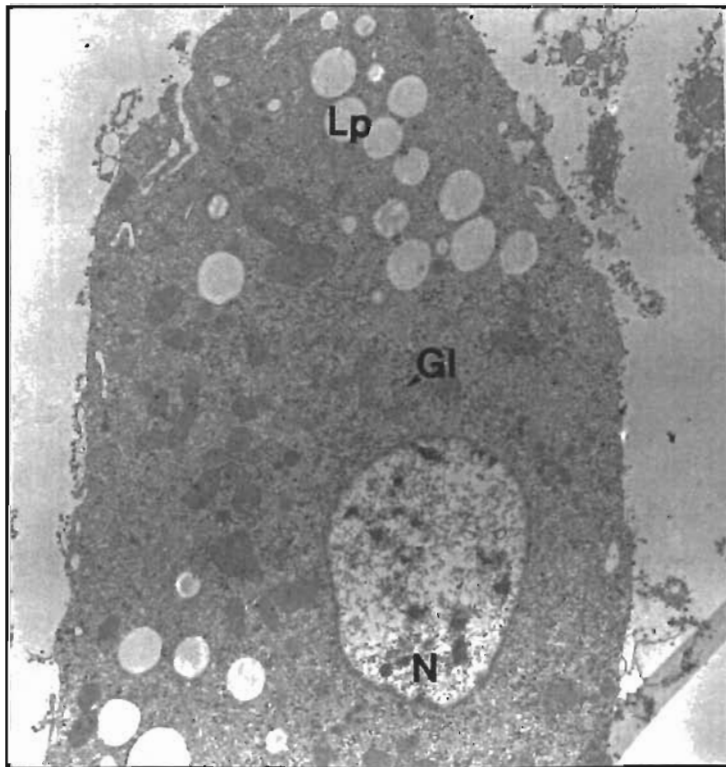


Photo 26

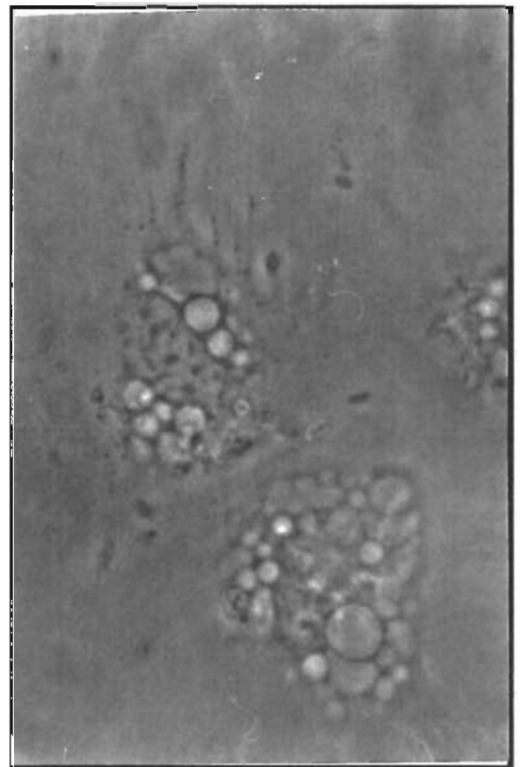


Photo 25

PLANCHE X

Le processus de phagocytose par les adipohémocytes

Photo 27 : Adipohémocyte d'*A. stephensi* en microscopie électronique (x 6 000).

La cellule est totalement lysée par la surcharge en billes de latex (Lx). Noter la présence de corps de résorption (Cr) où sont rassemblés le contenu de plusieurs vacuoles de phagocytose. Inclusions lipidiques (Lp), noyau (N).

Photo 28 : Détail d'une vacuole de phagocytose d'un adipohémocyte d'*A. stephensi* en microscopie électronique (x 15 000).

La bille de latex phagocytée (Lx) et la mitochondrie (M) sont isolées du cytoplasme à l'intérieur d'une vacuole (V). Ribosomes libres (R).

Photo 28' : Détail d'une vacuole de phagocytose d'un adipohémocyte d'*A. stephensi* en microscopie électronique (x 30 000).

La membrane de la vacuole de phagocytose (V) englobe la bille de latex (Lx) et la mitochondrie (M).

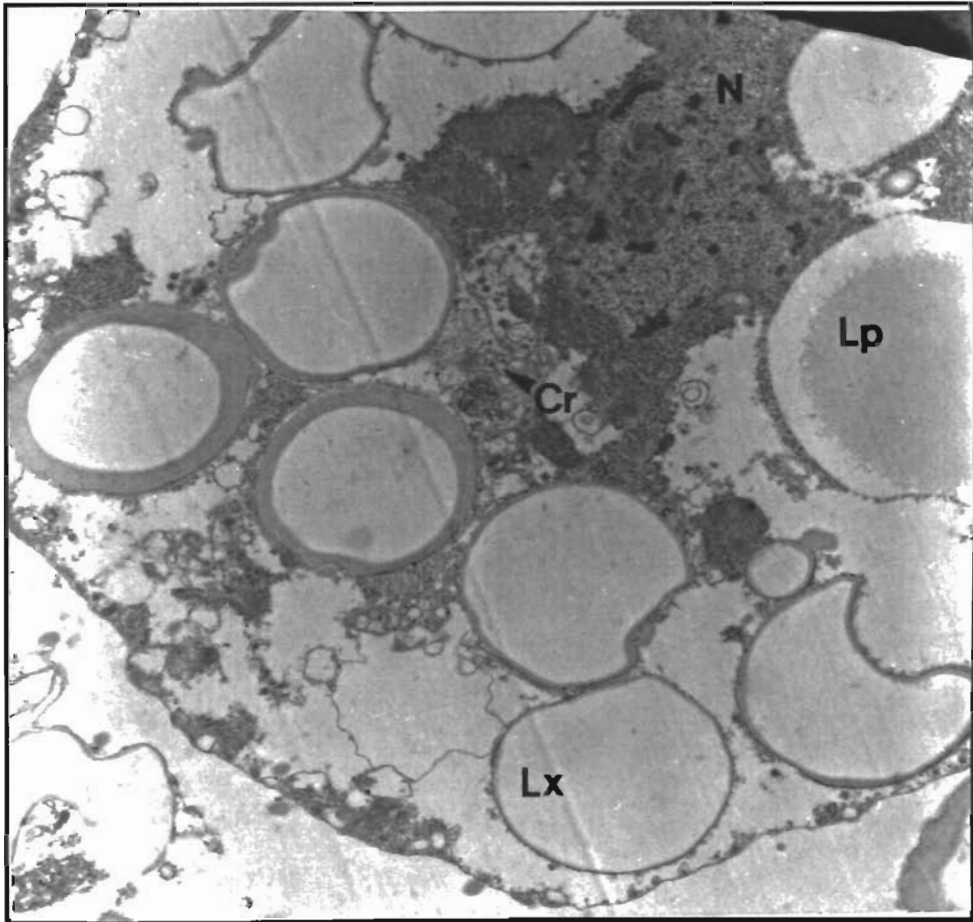


Photo 27

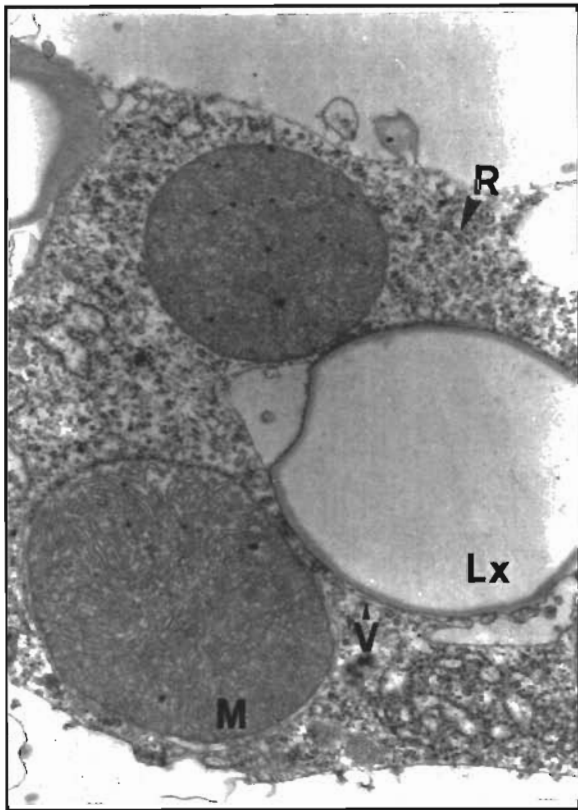


Photo 28

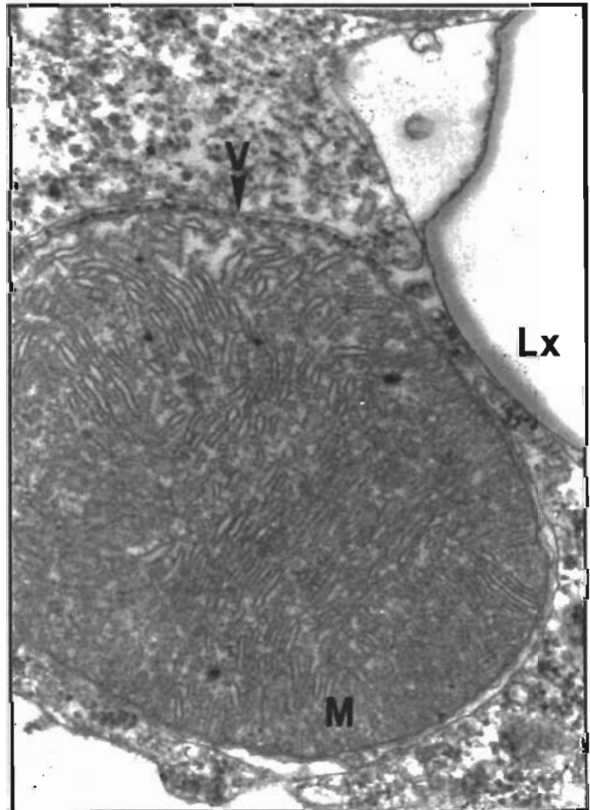


Photo 28'

2.5. Les autres types de cellules en circulation.

En plus des cellules circulantes précédemment décrites, et qui peuvent être rattachées à des types d'hémocytes bien définis, nous observons fréquemment, en circulation des cellules qui appartiennent à deux types :

- les adipocytes, ou cellules du corps gras,
- les cellules à "double membrane".

2.5.1. Les cellules du corps gras.

Les cellules du corps gras sont de grande taille (30 μm de diamètre). Le noyau est souvent entouré d'une couche de hyaloplasme où se concentre l'ergastoplasme (planche XI, photos 29 et 29'). Le cytoplasme est largement occupé par des grains de glycogène et des inclusions lipidiques, parfois très denses aux électrons (planche XI, photo 29). Les mitochondries sont nombreuses et se concentrent autour des grains de lipides.

Certaines de ces cellules peuvent être facilement confondues avec les adipohémocytes. Cependant, dans les cas favorables, on observe la présence d'une fine membrane basale, suggérant ainsi leur appartenance à un tissu fixe (planche XI, photo 29').

En microscopie optique, ces cellules ont une forme arrondie régulière (planche XI, photo 30). Elles sont bourrées de gros granules, très réfringents, les granules lipidiques. Ces cellules n'adhèrent jamais à la lame de verre et se retrouvent en circulation isolées ou par groupe de plusieurs. On retrouve même des globules réfringents libres ou des débris cellulaires provenant de ces cellules.

PLANCHE XI

Les cellules du corps gras ou adipocytes

Photo 29 : Adipocyte d'*A. stephensi* en microscopie électronique (x 3 000).

Le cytoplasme est riche en grains de glycogène (Gl), en inclusions lipidiques (Lp) et en mitochondries (M). Le noyau (N) est entouré d'une zone de hyaloplasme (Hy).

Photo 29' : Adipocyte d'*A. stephensi* en microscopie électronique (x 5 000).

Le noyau de la cellule est entouré d'une couche de hyaloplasme où se concentrent les citernes du réticulum endoplasmique (cit). La membrane basale (Mb) est le vestige de l'appartenance des adipocytes au tissu adipeux. Grains de glycogène (Gl).

Photo 30 : Adipocyte d'*A. stephensi* en microscopie optique à contraste de phase (x 1 250).

Les globules réfringents sont très nombreux.

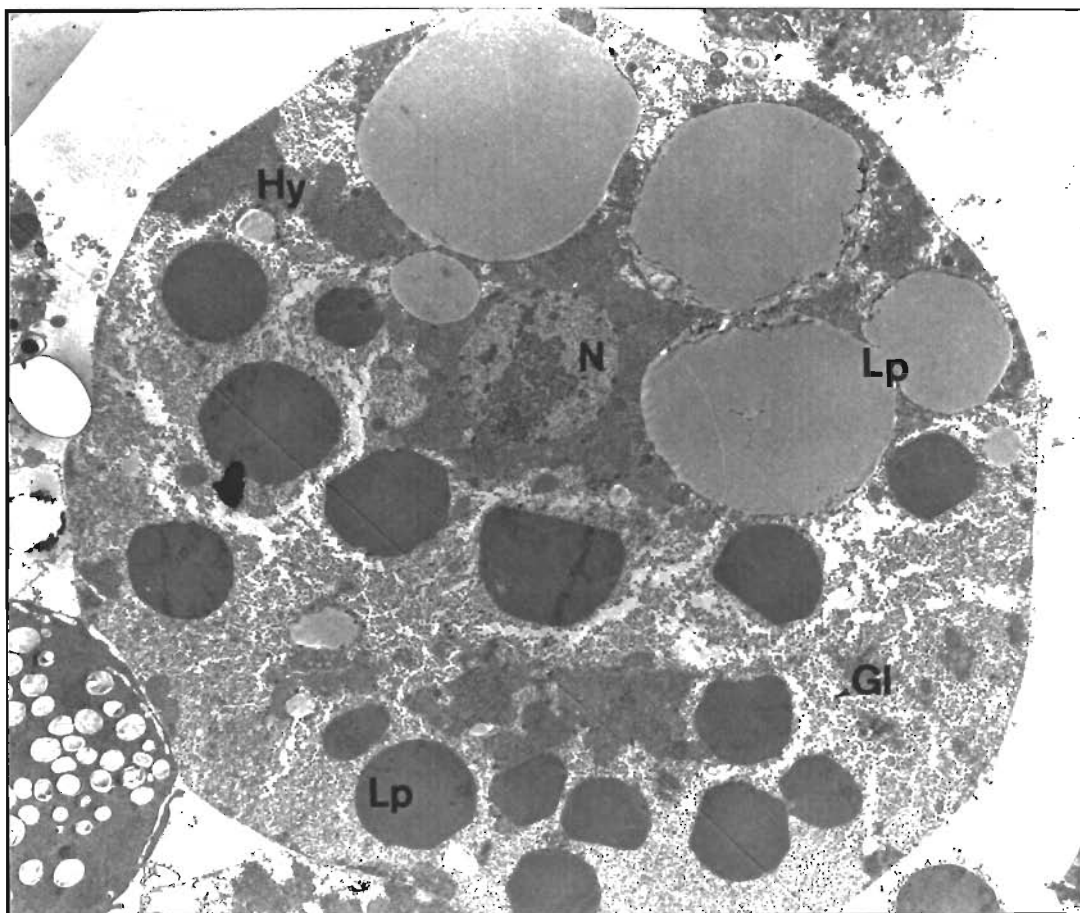


Photo 29

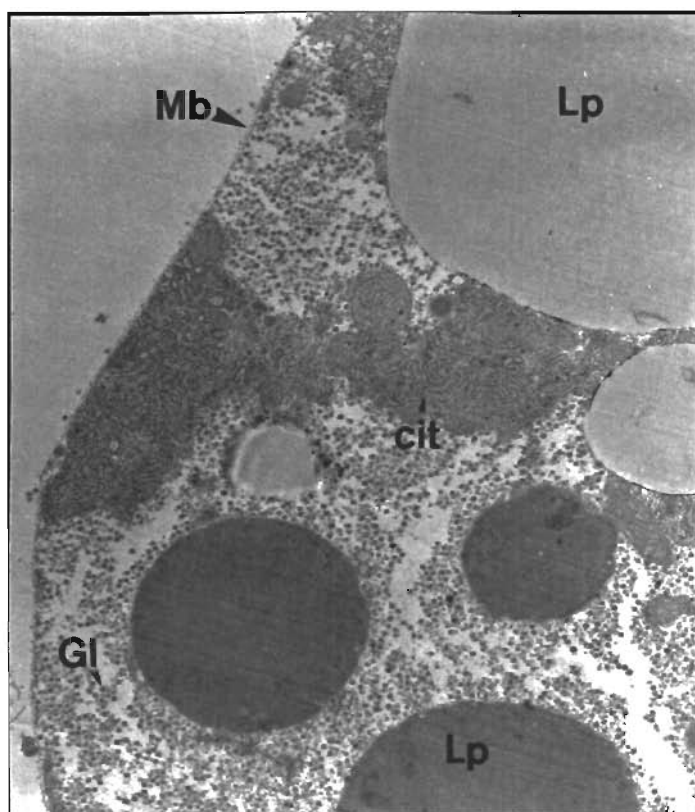


Photo 29'

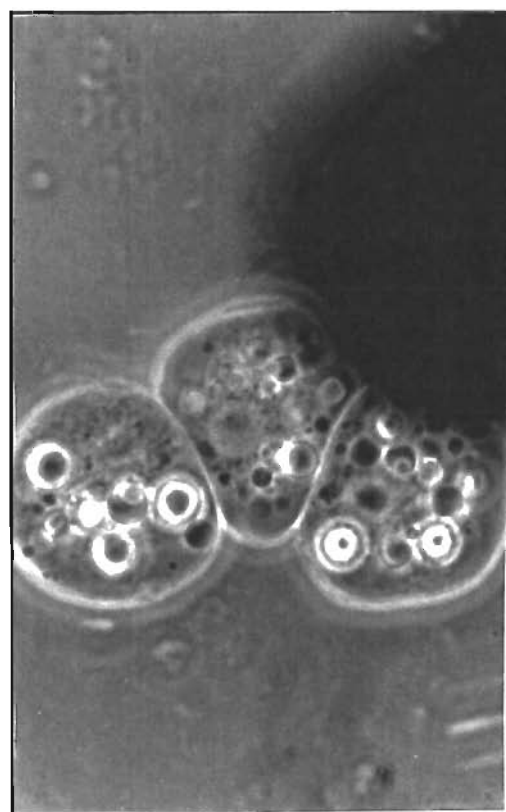


Photo 30

2.5.2. Les cellules à "double membrane".

Certaines de ces cellules présentent des caractéristiques de plasmatocytes, mais l'observation en microscopie électronique révèle la présence d'une membrane plasmique qui semble être double (planche XII, photos 31 et 32).

Ces cellules renferment un appareil de Golgi souvent bien développé et quelques corps de résorption (planche XII, photo 31). Certaines observations ont permis de montrer que la membrane la plus externe provient d'une cellule voisine contigüe mais qui présente une lyse totale et dont seule la membrane semble avoir été conservée (planche XIII, photos 33 et 33'). L'observation, dans de rares cas, d'un type particulier de jonctions inter-cellulaires, les jonctions septées, vient confirmer l'interprétation que nous faisons de ces cellules (planche XIV, photos 34 et 34'). Ces zones d'attache spécialisées des membranes cellulaires, sous forme de "ponts", traversent l'espace intercellulaire.

PLANCHE XII

Les cellules à "double membrane"

Photo 31 : Cellule à "double membrane" d'*A. stephensi* en microscopie électronique (x 12 000).

Noter la présence de la membrane plasmique (Mp) "double". L'appareil de Golgi est bien développé et il y a quelques corps de résorption (Cr). Noyau (N), membrane nucléaire (Mn), mitochondries (M).

Photo 32 : Cellule à "double membrane" d'*A. stephensi* en microscopie électronique (x 25 000).

Noter la présence de la membrane plasmique "double" (Mp).

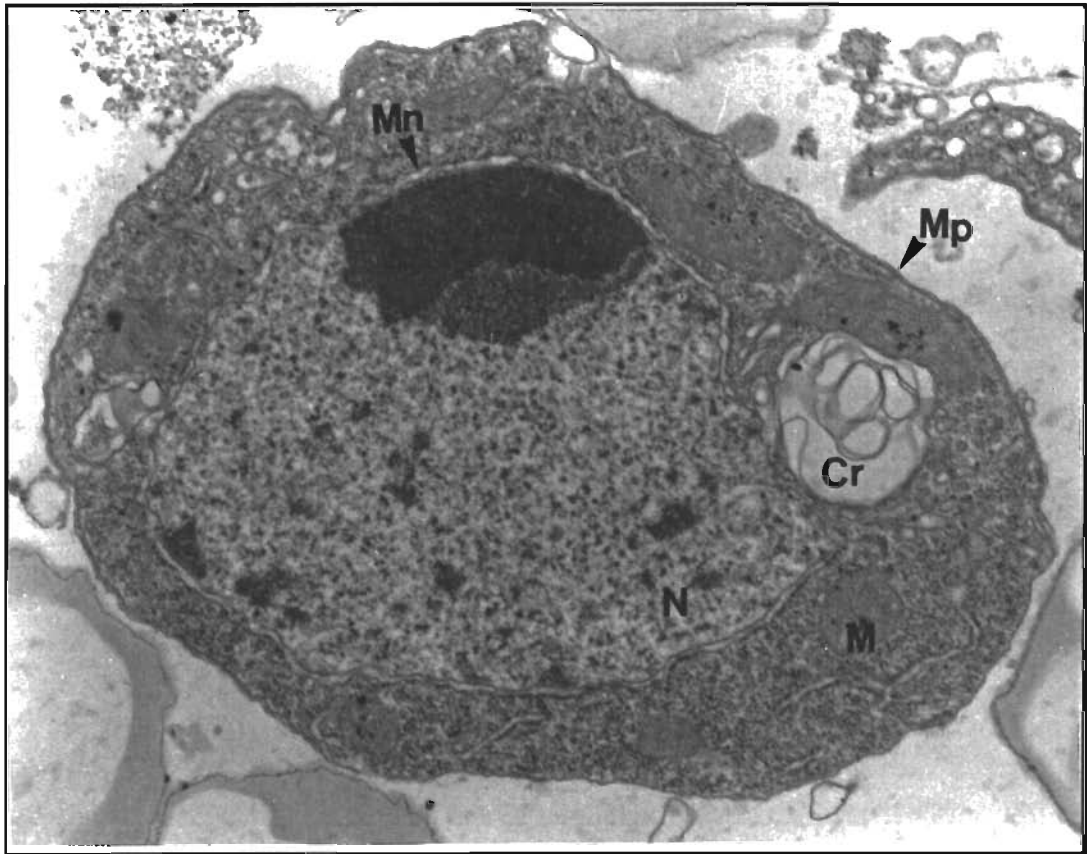


Photo 31

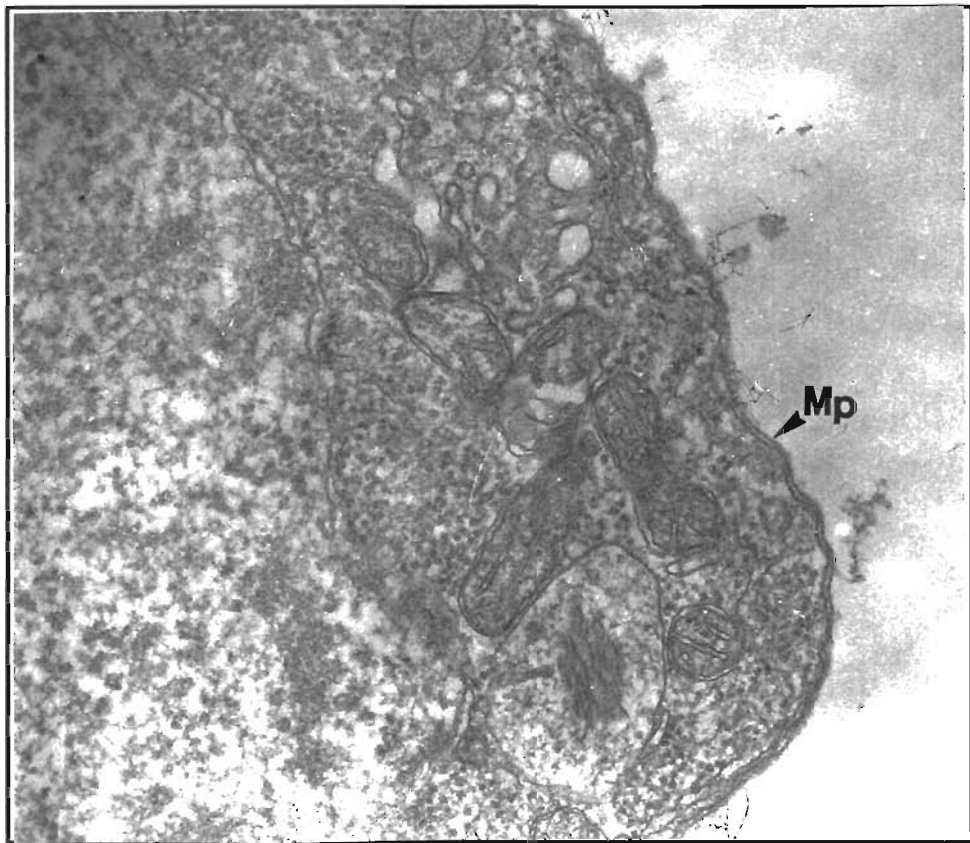


Photo 32

PLANCHE XIII

Les cellules à "double membrane"

Photo 33 : Cellule à "double membrane" d'*A. stephensi* en microscopie électronique (x 10 000).

Noter la présence de la membrane plasmique "double" (Mp) entre les cellules voisines. La cellule (cel) a été lysée et seule la membrane a été conservée.

Photo 33' : Détail d'une cellule à "double membrane" d'*A. stephensi* en microscopie électronique (x 25 000).

La membrane plasmique "double" (Mp) est le seul vestige d'une cellule lysée (cel).

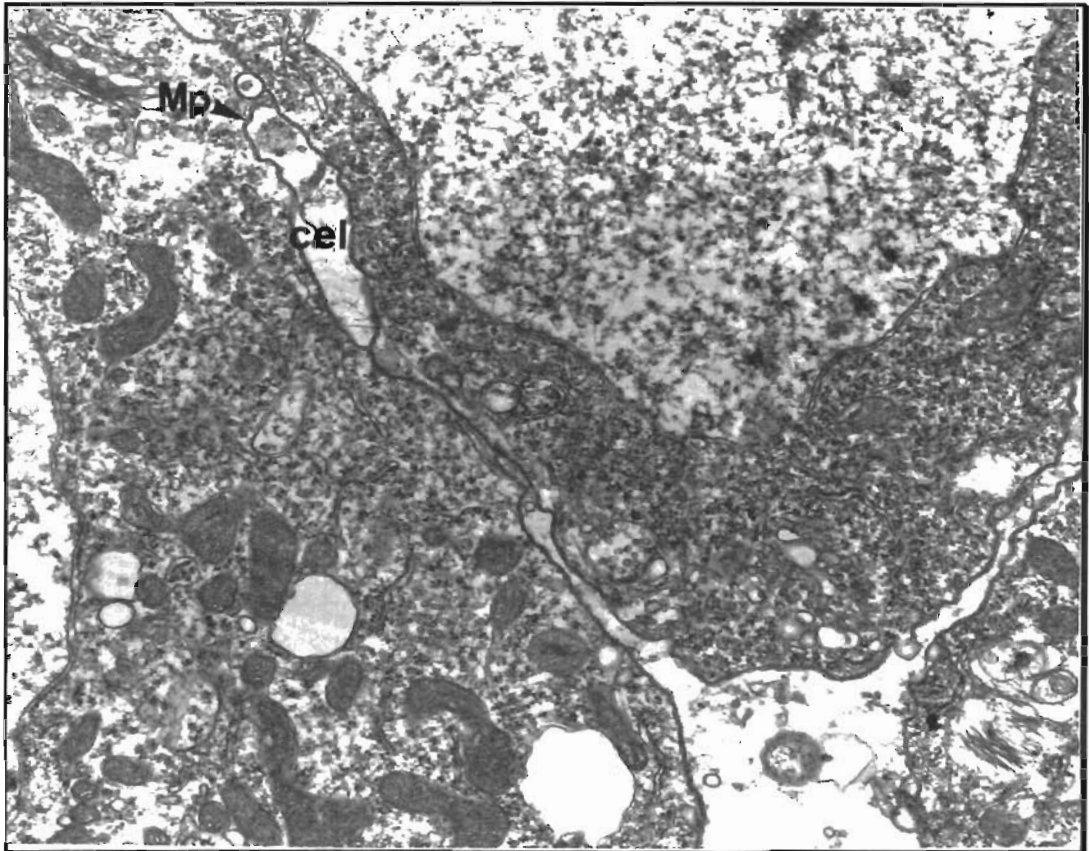


Photo 33

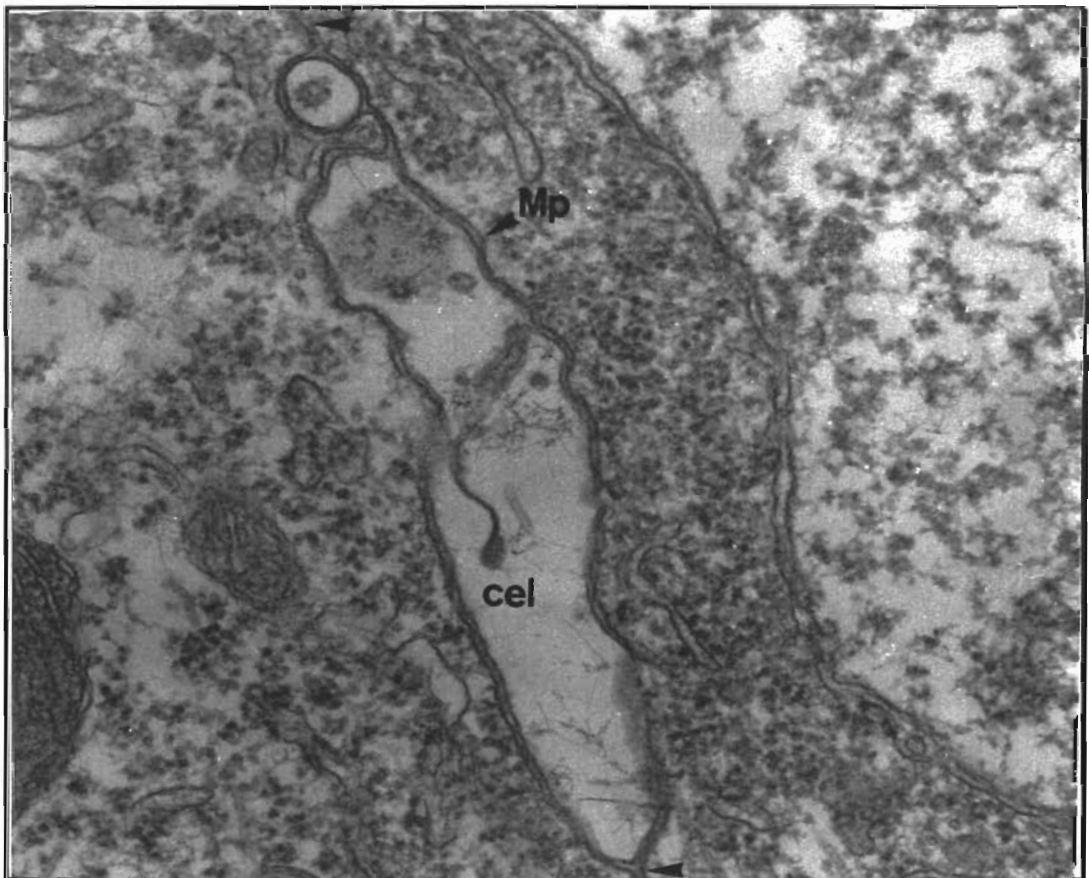


Photo 33'

PLANCHE XIV

Les cellules à "double membrane"

Photo 34 : Cellule à "double membrane" d'*A. stephensi* en microscopie électronique (x 10 000).

Noter la présence de jonctions septées (J) entre deux cellules. Lipides (Lp), noyau (N).

Photo 34' : Détail des jonctions septées (J) entre deux cellules à "double membrane" d'*A. stephensi* en microscopie électronique (x 25 000).

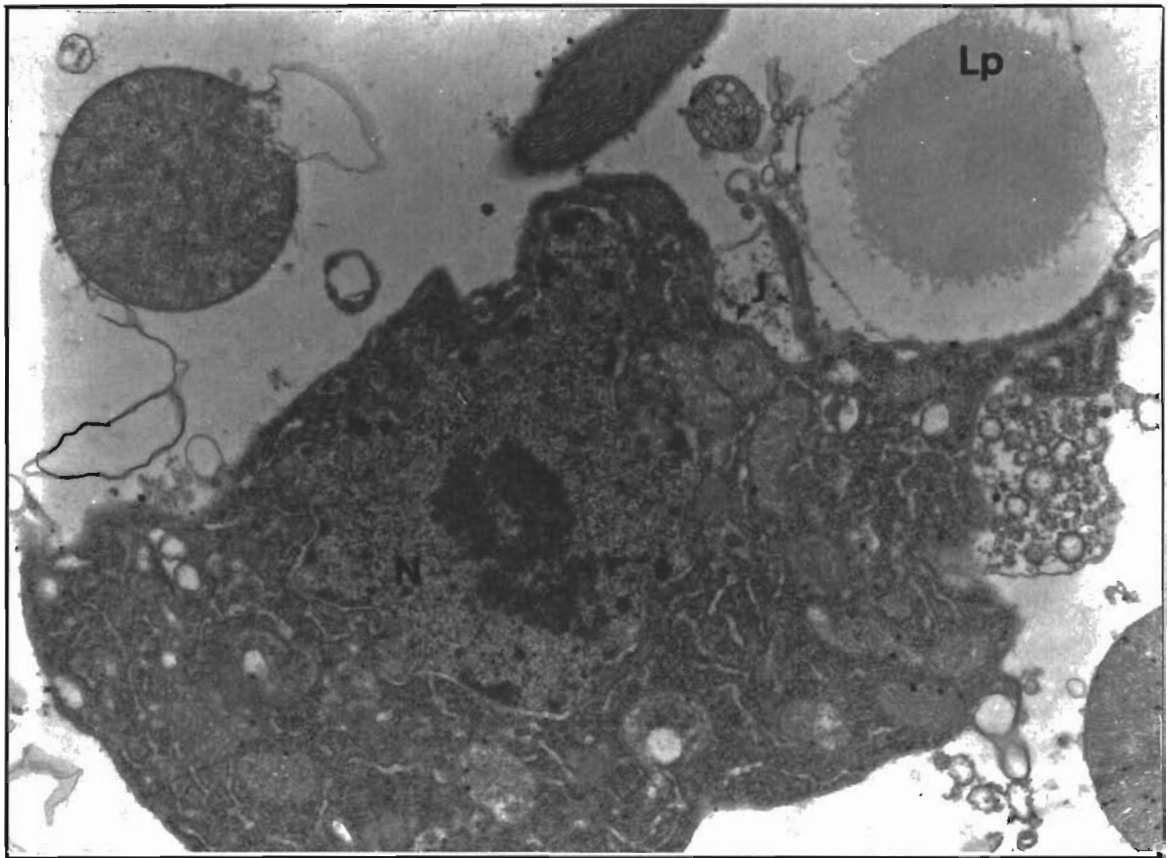


Photo 34

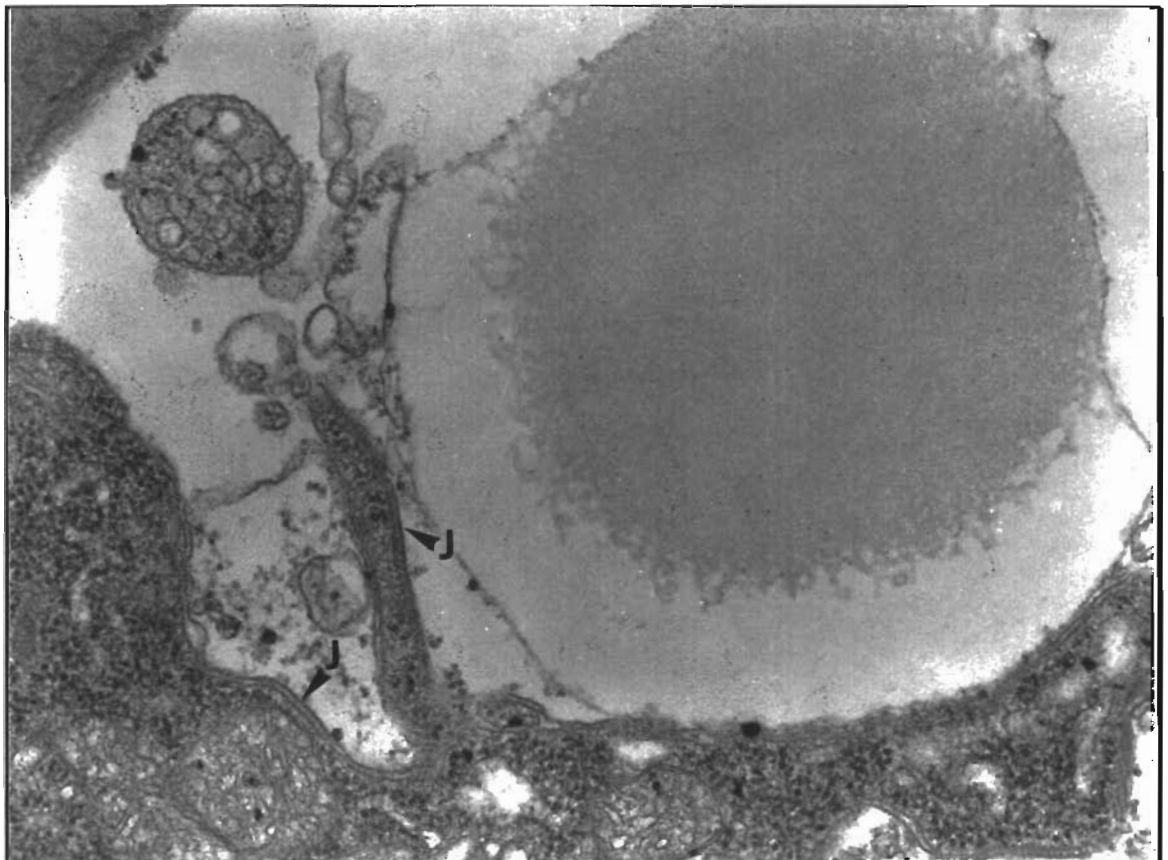


Photo 34'

3. Discussion.

Les insectes hématophages, de par leur rôle épidémiologique variés, ont une importance médicale certaine. Sur le plan de la médecine humaine et vétérinaire, l'ordre des diptères occupe la première place, soit comme vecteurs d'agents pathogènes, soit comme sources de nuisances. En raison de leur capacité à transmettre des agents pathogènes, les moustiques (*Culicidae*) ont donné lieu à une somme considérable de travaux sur leur biologie, leur écologie ou leur physiologie. Or, il est étonnant de constater que l'hématologie des *Culicidae* est mal connue.

Les études, peu nombreuses, ont été réalisées uniquement en microscopie optique (Jones, 1953 b ; Foley, 1978 ; Kaaya et Ratcliffe, 1982). De plus, l'essentiel des données a été obtenu à partir de larves de diverses espèces de moustiques : *Anopheles* (Jones, 1953 b), *Aedes* (Jones, 1958 ; Ho *et al.*, 1982) et *Culex* (Amouriq, 1960).

Drif et Brehélin (1983) ont publié les premières photos en microscopie électronique et proposent une classification des hémocytes d'*Aedes* et de *Culex*. Cependant, cette étude ne porte que sur le stade larvaire. La cytologie des hémocytes d'adultes, quelle que soit l'espèce de *Culicidae*, n'a fait l'objet d'aucune publication à ce jour.

Chez *Anopheles stephensi*, nous avons mis en évidence différents types de cellules circulantes dans les culots obtenus à partir de prélèvements d'hémolymphe centrifugés. Certaines de ces cellules appartiennent au tissu hémolymphatique, et présentent les caractéristiques cytologiques de types d'hémocytes classiquement reconnus dans la littérature : les prohémoscytes, les oenocytoïdes et les plasmatocytes macrophages (Brehélin et Zachary, 1986). D'autres cellules, en revanche, sont vraisemblablement des cellules normalement sessiles provenant de tissus fixes : les adipocytes et les cellules à "double membrane". Un type particulier de cellules circulantes, les adipohémocytes, fait l'objet de nombreuses discussions dans la littérature. Leur existence en temps qu'hémocyte particulier n'est admise que par quelques auteurs (Amouriq, 1960 ; Bronskill, 1962 ; Foley, 1978).

Dans leurs études effectuées sur des adultes, en microscopie optique, Foley (1978) décrit chez *A. stephensi* des prohémoscytes, des plasmatocytes, des hémocytes granuleux, des cellules à sphérules et des adipohémocytes, et Kaaya et Ratcliffe (1982) n'observent pas de cellules à sphérules mais décrivent par contre des oenocytoïdes chez *C. quinquefasciatus* et *A. aegypti*. Chez *A. stephensi*, l'étude basée sur la microscopie électronique et optique, nous a permis de définir quatre types d'hémocytes : les prohémoscytes, les oenocytoïdes, les plasmatocytes

macrophages et les adipohémocytes.

Les prohémyocytes, chez les moustiques comme chez d'autres insectes, présentent les caractéristiques de cellules indifférenciées (planche V, page 97). L'observation de plusieurs d'entre elles en cours de mitose est un argument supplémentaire pour les classer, comme la plupart des auteurs, dans la catégorie des cellules souches d'hémocytes (Beaulaton, 1979 ; Brehélin, 1982 ; Essawy *et al.*, 1985 ; Brehélin et Zachary, 1986).

Très rares en microscopie optique, les prohémyocytes se reconnaissent cependant facilement par leur petite taille et leur rapport nucléo-cytoplasmique plus élevé que chez tous les autres types d'hémocytes (planche V page 97). Ces observations sont en accord avec celles de Foley (1978) et Kaaya et Ratcliffe (1982).

Les oenocytoïdes ont des caractéristiques ultrastructurales particulières à ce type d'hémocyte (planche VI page 100), ie une forme arrondie régulière, un noyau excentré et un cytoplasme homogène avec de très rares organites à l'exception des ribosomes libres très nombreux. Le cytoplasme présente parfois des zones moins denses aux électrons, rappelant ainsi des caractéristiques déjà décrites pour les oenocytoïdes d'un lépidoptère, *Heliothis armigera*, (Essawy *et al.*, 1985) ou les cellules à cristaux de *Drosophila yakuba* (Rizki et Rizki, 1959 ; Brehélin, 1982).

En microscopie optique, nos observations corroborent celles de Kaaya et Ratcliffe (1982). Les oenocytoïdes se reconnaissent à leur forme arrondie et leur noyau excentré. Nous devons cependant préciser que ce type d'hémocyte n'a été observé que chez les larves de stade IV. Nous ne l'avons pas retrouvé chez les adultes.

Les plasmatocytes sont de type macrophage, comme le montrent les nombreuses images de phagocytose (planche VII page 104). Certaines cellules observées dans les culots d'hémocytes de moustiques, ont des caractéristiques ultrastructurales de plasmatocytes mais ont la particularité de montrer une membrane plasmique double. Nos observations indiquent qu'il s'agit en fait de cellules normalement intégrées dans un tissu fixe, et leur présence dans les culots n'est sans doute qu'un artéfact de préparation dû aux prélèvements.

Certains plasmatocytes ont des corps de résorption, ou lysosomes secondaires, parfois nombreux et de grande taille. En microscopie optique, ces derniers peuvent alors être décrits comme des granulocytes. Les véritables granulocytes sont des hémocytes dont les granules représentent des sécrétions spécifiques de la cellule (Brehélin et Zachary, 1986), ce que nous n'avons jamais observé en microscopie électronique chez *A. stephensi*. Pourtant, en microscopie optique, ces hémocytes semblent être les plus nombreux dans l'hémolymph des larves et des adultes. Nous pensons donc que les granulocytes décrits lors des études en microscopie optique (Foley, 1978 ; Kaaya et Ratcliffe, 1982) sont des plasmatocytes chargés de

corps de résorptions. Ce type d'hémocyte est décrit chez beaucoup d'insectes, en particulier chez les orthoptères (Hoffmann, 1968) et les dictyoptères (Hagopian, 1971), et semble absent chez les lépidoptères (Essawy *et al.*, 1985 ; Brehélin et Zachary, 1986).

Les adipohémocytes ont souvent été décrits comme des cellules en circulation dans l'hémolymph. On les retrouve dans la littérature sous des noms différents : "cellules à sphérules" chez *A. aegypti* (Bronskill, 1962) ou "granulocytes" chez *C. hortensis* (Amouriq, 1960). Mais comme le soulignent Kaaya et Ratcliffe (1982), ils sont parfois difficile à distinguer des cellules du corps gras, des granulocytes ou des cellules à sphérules à cause de la présence d'inclusions de grandes tailles. Chez *A. stephensi*, ces deux types d'hémocytes, les granulocytes et les cellules à sphérules, n'existent pas. Par contre, nous avons décrit en microscopie électronique, des cellules circulantes qui présentent d'importantes réserves en lipides et en glycogène et qui appartiennent au type adipohémocyte.

Ces hémocytes sont cependant difficiles à distinguer des adipocytes, ou cellules du corps gras, qui se sont séparées les unes des autres lors du prélèvement (Bronskill, 1962 ; Amouriq, 1960). Dans les cas favorables, les adipocytes en circulation sont regroupés par deux ou trois et ont encore une membrane basale commune, témoin de leur appartenance au tissu adipeux de l'insecte (planche XI page 118). La présence de véritables adipohémocytes est soutenue par l'observation d'une activité de phagocytose intense de ces cellules vis-à-vis du matériel injecté (planche X page 114). Ce type de réaction est difficilement concevable, surtout à si grande échelle, pour des cellules normalement regroupées en tissu entouré d'une membrane basale.

Ces différentes observations confirment les limites d'une étude histologique qui se base uniquement sur des observations en microscopie optique ; la présence d'une membrane basale ne peut être détectée qu'en microscopie électronique.

Les hémocytes d'insectes sont capables de phagocyter des petites particules, comme des bactéries, des protozoaires (Gilliam et Shimanuki, 1967), des hématies (Foley, 1978), des billes de latex (Wago, 1980 a ; 1980 b ; 1980 c) ou des particules d'encre (Weathersby et McCall, 1968 ; Ryan et Nicholas, 1972 ; Rowley et Ratcliffe, 1976) et d'encapsuler des particules de plus grande taille, des fragments de tissus (Kaaya *et al.*, 1986), des nématodes (Bronskill, 1962 ; Poinar et Leutenegger, 1971 ; Andreadis et Hall, 1976 ; Ho *et al.*, 1982 ; Christensen *et al.*, 1984 ; Chen et Laurence, 1985 ; Harris *et al.*, 1986), des spores de champignons (Götz et Vey, 1974 ; Brey *et al.*, 1988) ou des billes de séphadex (Zahedi *et al.*, 1992).

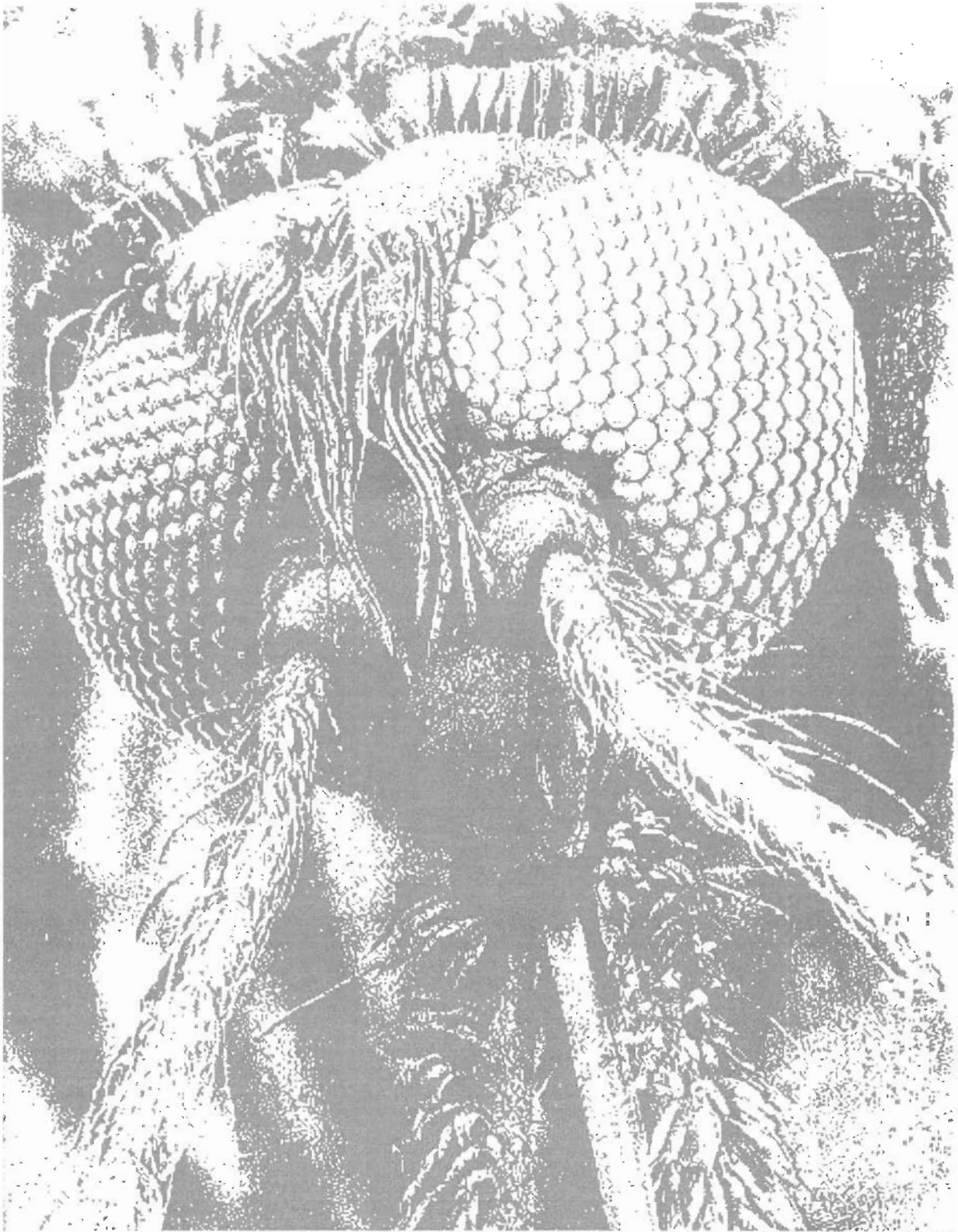
La phagocytose est due aux plasmatocytes de type macrophage (Brehélin et Hoffmann, 1980), et aussi à certains granulocytes (Akai et Sato, 1973 ; Wago et Ichikawa, 1979 a ; 1979

b ; 1979 c ; Brehélin et Zachary, 1986). Chez les diptères, ce sont ces plasmatocytes macrophages, décrits par erreur comme des "hémocytes granuleux" dans les études en microscopie optique, qui assurent normalement la phagocytose de tous les corps étrangers injectés dans l'hémolymphe.

Nous avons émis l'hypothèse que l'infestation d'un anophèle par le *Plasmodium* pouvait supprimer la capacité des hémocytes à intervenir dans les réactions de défense, comme le signalait Huff (1934) chez des *C. pipiens* sensibles à *P. cathemerium* et *P. relictum*. Quand des hématies ou des sporozoïtes immatures ont été injectés dans l'hémolymphe, nous n'avons pas observé de réaction de défense de la part de l'hôte. Les quantités de corps étrangers étaient sans doute trop faibles comparées à celles des billes de latex, mais nous ne pouvons conclure que le système immunitaire n'a pas fonctionné. En effet, Foley (1978) rapporte que les hémocytes d'*A. stephensi* phagocytent *in vitro* et *in vivo* à plus de 95% les bactéries injectées (*E. coli*, *B. subtilis*). En outre, il observe un simple accollement des hémocytes d'*A. stephensi* avec les ookinètes, mérozoïtes, trophozoïtes et sporozoïtes de glandes salivaires *in vitro*. Il n'a pas pu mettre en évidence cette même réaction *in vivo* du fait de mortalité systématique de tous les anophèles inoculés. Nos expérimentations ont supprimé cette mortalité mais n'ont pas permis de mettre en évidence un tel phénomène.

L'encapsulation est la réaction de défense des insectes contre des agents étrangers trop gros pour être phagocytés. L'encapsulation humorale a été décrite chez les diptères dont le nombre d'hémocytes est très faible (< 4000 cellules / mm^3 d'hémolymphe). Chez ceux qui ont plus de 4000 cellules / mm^3 d'hémolymphe, la capsule formée est cellulaire (Götz *et al.*, 1977). L'encapsulation est décrite chez des larves *Aedes* après inoculation de nématodes (Andreadis et Hall, 1976 ; Ho *et al.*, 1982 ; Götz *et al.*, 1987 ; Brey *et al.*, 1988) ou chez des adultes (Christensen *et al.*, 1984 ; Forton *et al.*, 1985 ; Christensen *et al.*, 1986 ; Harris *et al.*, 1986).

Les corps étrangers sont isolés de l'hémolymphe par une capsule anhiste et mélanique (Chen et Laurence, 1985 ; Paskewitz *et al.*, 1988). Divers auteurs rapportent que des hémocytes ont des enzymes de type phénoloxidasique (Crossley, 1972 ; Drif et Brehélin, 1983). Ces enzymes jouent un rôle important dans les phénomènes de reconnaissance. La seule étude ultrastructurale d'encapsulation humorale du *Plasmodium* chez l'anophèle a été faite sur le stade oocyste du parasite (Paskewitz *et al.*, 1988). Nous n'avons observé aucune réaction de ce type envers des corps étrangers, même si les enzymes nécessaires au phénomène de mélanisation sont présents dans le moustique et capables d'agir, notamment pour la cicatrization des plaies. Pourtant, l'activité phénoloxidasique, chez les larves d'*Aedes* et de *Culex*, a été mise en évidence au niveau du cytoplasme des oenocytoïdes (Drif et Brehélin, 1983). Une fois encore, nous ne pouvons conclure sur la présence ou l'absence d'un tel type de réaction de défense immunitaire et des études supplémentaires doivent être entreprises.



CHAPITRE III

Etude enzymatique des relations *Anopheles-Plasmodium* : les estérases totales

1. Introduction.

Dans ce chapitre, nous allons étudier un des aspects de la physiologie des relations *Anopheles-Plasmodium* en utilisant une technique de dosage enzymatique. Les enzymes, protéines qui résultent de l'activité de un ou plusieurs gènes, servent de marqueurs physiologiques car leur activité peut facilement être mise en évidence et évaluée (Tibayrenc, 1979).

Les progrès réalisés dans l'étude des mécanismes biochimiques chez l'insecte ont montré que les estérases sont largement responsables de la résistance des insectes aux organophosphorés et contribuent à la résistance aux carbamates et à certains pyréthrinoïdes (Denholm et Rowland, 1992 ; OMS, 1992 a). Les moustiques sont capables de se défendre face à des molécules étrangères et de résister ainsi à la pression de sélection.

Plusieurs méthodes permettent de mettre en évidence la résistance des vecteurs aux insecticides. Lors de la détoxification des molécules insecticides par les moustiques, on observe une forte augmentation de l'activité des estérases (Georghiou *et al.*, 1980 ; Maruyama *et al.*, 1984 ; Merryweather *et al.*, 1990). Ce phénomène est le résultat d'une amplification du gène codant pour ces enzymes (Devonshire et Field, 1991 ; Poirié et Pasteur, 1991). Chez *Anopheles stephensi*, cette capacité à détoxifier les organophosphorés grâce aux estérases existe et a également été mise en évidence (Herath et Davidson, 1981).

D'autre part, les moustiques réfractaires au développement du *Plasmodium* sont capables d'encapsuler le parasite lors de son passage au travers du tube digestif (Collins *et al.*, 1986). La mélanisation, *ie* le résultat de l'encapsulation humorale, est la principale réaction de défense connue chez les moustiques (Götz, 1986 ; Paskewitz *et al.*, 1989 ; Ashida *et al.*, 1990). Ce phénomène aboutit au dépôt de mélanine autour du corps étranger encapsulé grâce à l'activité d'une série d'enzymes composant la cascade prophénoloxidasique (Brey *et al.*, 1988). Certaines enzymes, comme la phénoloxydase ou les estérases, appartiennent à cette cascade, et sont localisées principalement au niveau du tube digestif. Elles sont, par conséquent, responsables en partie de l'encapsulation des parasites (Freyvogel *et al.*, 1968 ; Pakewitz *et al.*, 1989).

Nous avons choisi de nous intéresser à des enzymes particulières, les estérases.

Nous présentons, dans un premier temps, les taux d'estérases évalués depuis l'émergence jusqu'au vingtième jour de la vie d'anophèles d'élevage. Les profils estérasiques ainsi obtenus sont présentés chez les mâles, chez les femelles nourries avec du jus sucré, et chez les femelles gorgées sur des souris saines et impaludées. Ces taux enzymatiques servent de référence et indiquent le rôle du *Plasmodium* sur l'équipement enzymatique du moustique.

Dans une seconde partie, nous présentons le dosage des estérases effectué chez des moustiques femelles inoculées avec divers corps étrangers (billes de latex, sporozoïtes et hématies). Cette étude permet de définir le rôle des estérases totales dans la capacité du moustique à réagir face à des corps étrangers introduits de façon artificielle dans l'hémolymph.

Le principe du dosage enzymatique est de caractériser les estérases grâce au produit de la réaction enzyme-substrat. L'affinité des estérases pour les substrats, l' α et le β -naphthylacétate, induit l'hydrolyse de ces mêmes substrats en formant deux produits, l' α et le β -naphthol. En réalité, les taux enzymatiques sont évalués au travers des quantités de substrats transformés ou de produits formés.

C'est ainsi que les taux d'estérases présentés dans ce chapitre sont exprimés en quantité (micro moles) de produit formé (naphthol) par moustique, soit μM naph / moustique. Parallèlement au dosage journalier des estérases, l'évolution du poids des anophèles est déterminée, et exprimée en milligrammes par moustique (mg / moustique).

Toutes les valeurs utilisées pour le tracé des figures de ce chapitre sont détaillées en annexe 4.

2. Le dosage des estérases totales chez les anophèles adultes.

Les dosages enzymatiques indiquent les taux d'estérases présents chez les anophèles adultes, depuis le jour de l'émergence (J0) jusqu'au vingtième (J20), selon le protocole décrit au paragraphe 6 du chapitre I. Les profils estérasiques sont présentés chez les mâles, les femelles saines, infestées et celles nourries artificiellement sur du jus sucré toute leur vie. Ils servent de référence pour les expériences d'inoculations de corps étrangers chez les anophèles.

Les taux enzymatiques, exprimés en μM naph / moustique, correspondent à des moyennes calculées sur un minimum de 100 individus, pour chaque âge et chaque catégorie d'adulte.

2.1. Les résultats.

Les quantités d'estérases évaluées, au cours de la vie des anophèles, sont présentées en figure 9. L'évolution du poids des moustiques est représentée en figure 10.

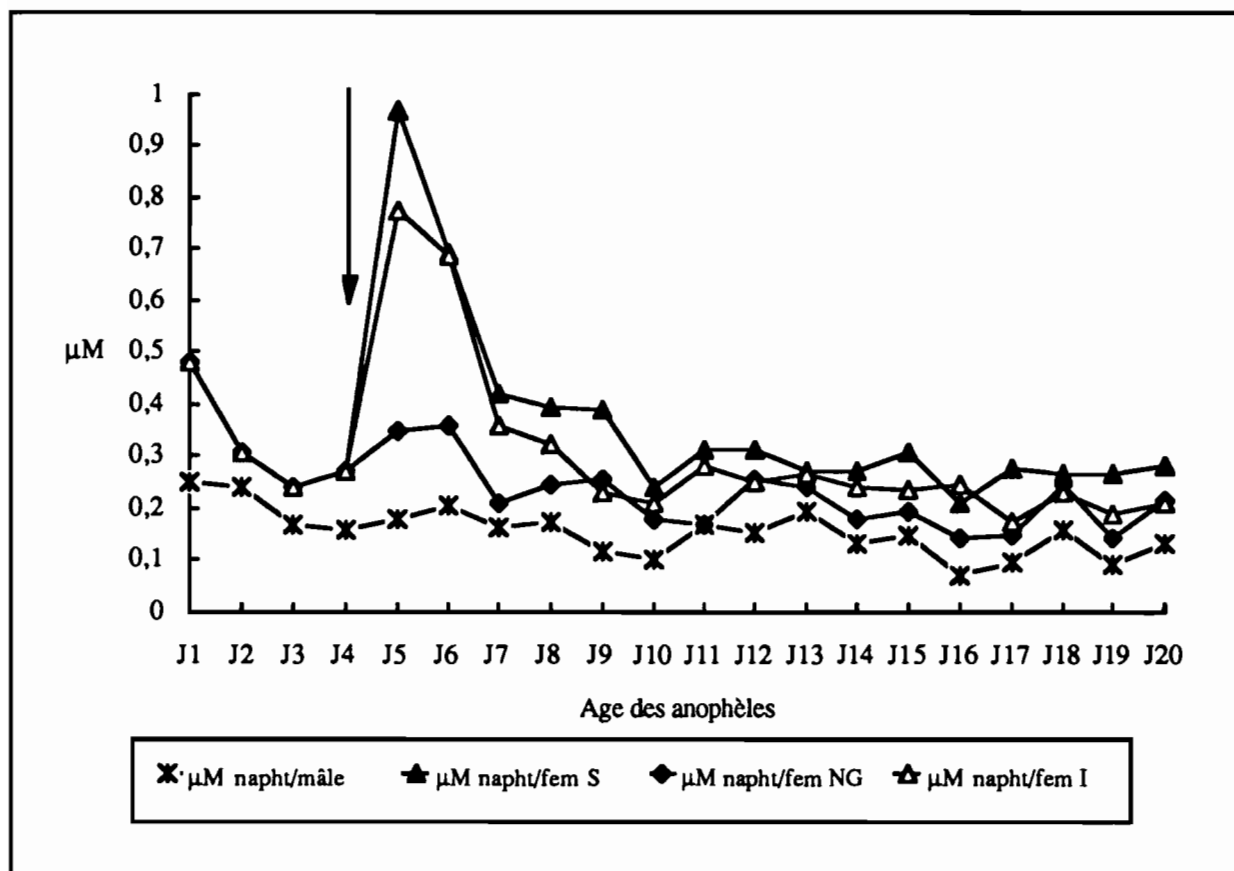


Figure 9 : Variations des taux d'estérases (en μM naphthol formé / moustique) chez les mâles (mâle), les femelles saines (fem S), les femelles non gorgées (fem NG) et les femelles infestées (fem I). La flèche indique le moment de la prise du repas sanguin.

D'une façon générale, les courbes d'évolution des estérases au cours de la vie des anophèles, pour les quatre cas retenus, indiquent que les quantités d'enzymes sont très importantes durant les premières 24 heures (J1), diminuent puis se stabilisent au cours du temps. Dans la cas où les femelles ont reçu un repas sanguin, on remarque une forte augmentation des estérases.

Au moment de l'émergence, les concentrations estérasiques sont les plus importantes. Chez les mâles, cet état dure environ 48 heures (J1-J2), pendant lesquelles on évalue les taux d'estérases à $0,244 \mu\text{M}$ naphthol $\pm 0,008$. Ensuite, durant les 18 autres jours (J3-J20), les estérases se stabilisent autour d'une moyenne estimée à $0,144 \mu\text{M}$ naphthol $\pm 0,037$ ($t = 3,83$ pour $p = 0,001$).

Dans le cas des femelles, le même phénomène se produit, mais uniquement les 24 premières heures (J1). Ainsi, la quantité d'estérases évaluée à J1 est de $0,482 \mu\text{M}$ naphthol $\pm 0,072$ contre $0,307 \mu\text{M}$ naphthol $\pm 0,084$ à J2 ($t = 5,13$ pour $p = 0,001$).

Durant la période testée, soit J1-J20, les mâles et les femelles nourries avec du jus sucré, ont les taux d'estérases les plus bas.

Ils sont estimés respectivement à $0,154 \mu\text{M}$ naphthol $\pm 0,047$ et $0,240 \mu\text{M}$ naphthol $\pm 0,084$. Ces valeurs sont très différentes de celles qui peuvent être calculées lorsque les femelles prennent un repas de sang. De plus, les femelles NG ont un profil estérasiqque identique à celui des mâles, à savoir une quasi constance des taux au cours de la vie du moustique.

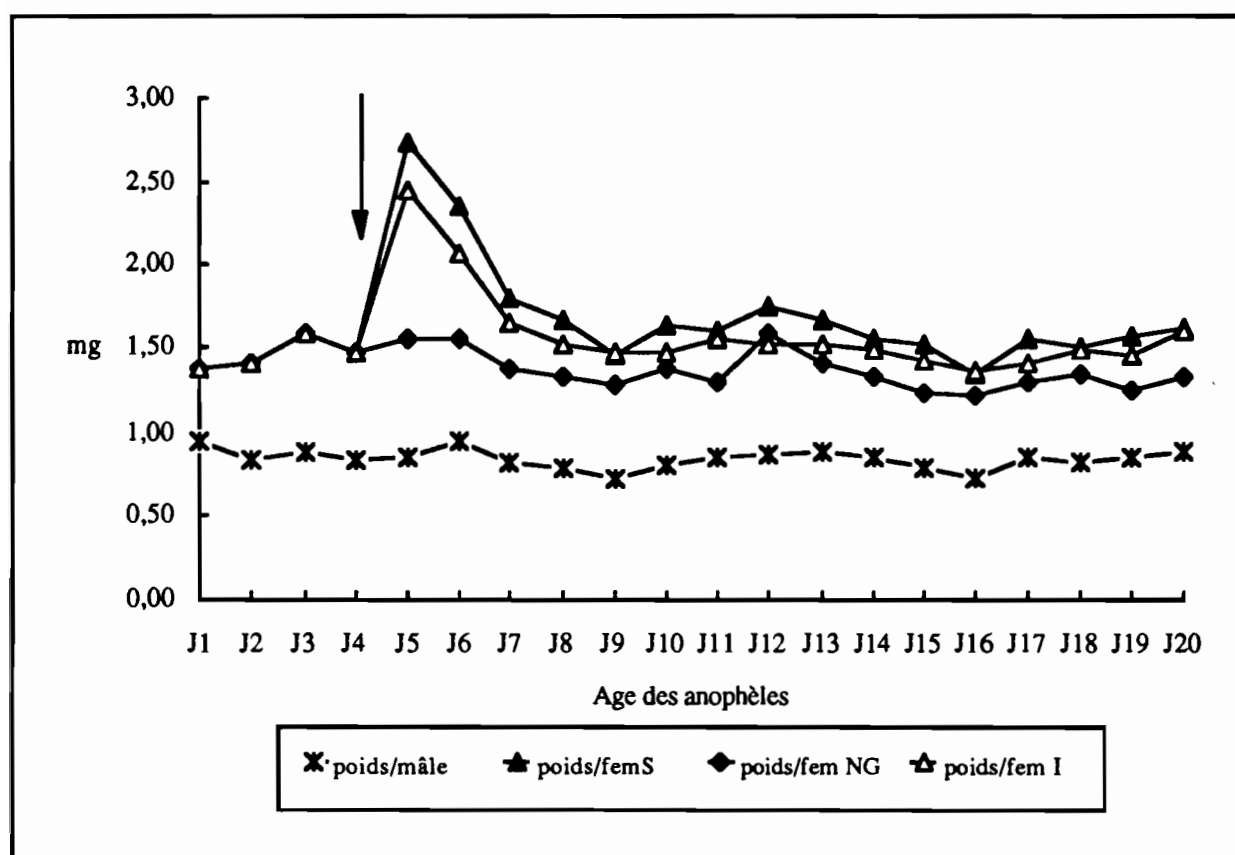


Figure 10 : Variation du poids (en mg / moustique) chez les mâles (mâles), les femelles saines (fem S), les femelles non gorgées (fem NG) et les femelles infestées (fem I). La flèche indique le moment du repas sanguin.

Dans le cas où les femelles prélèvent un repas de sang, l'évolution des estérases devient très différente de celle observée chez les mâles ou les femelles non gorgées.

L'ingestion de sang provoque un pic d'activité immédiat. Les taux estérasiques, à J5, augmentent d'un facteur 3,6 chez les femelles saines ($0,270 \mu\text{M}$ naphthol $\pm 0,042$ à $0,969 \mu\text{M}$ naphthol $\pm 0,148$, $t = 14,76$ pour $p = 0,001$) et d'un facteur 2,8 chez les femelles infestées ($0,270 \mu\text{M}$ naphthol $\pm 0,042$ à $0,773 \mu\text{M}$ naphthol $\pm 0,077$, $t = 18,63$ pour $p = 0,001$).

Lors de la prise d'un repas de sang, entre J4 et J5, les taux d'estérases augmentent de façon significative, chez les femelles infestées ($0,773 \mu\text{M}$ naphthol $\pm 0,077$) et chez les femelles saines ($0,969 \mu\text{M}$ naphthol $\pm 0,148$).

Ce pic d'activité est parallèle à l'augmentation de poids suite à l'ingestion du repas sanguin (figure 10), donc à la quantité de sang ingérée. Les femelles nourries sur une souris impaludée (0,9 mg / femelle) ingèrent en moyenne moins de sang que lorsqu'elles se nourrissent sur des souris saines (1,2 mg / femelle) ($t = 4,22$ pour $p = 0,001$).

Les taux enzymatiques restent élevés durant 4 jours (J5-J8), c'est-à-dire la période nécessaire à la digestion du sang. Les femelles NG ont en moyenne $0,289 \mu\text{M}$ naphthol $\pm 0,073$ contre $0,533 \mu\text{M}$ naphthol $\pm 0,228$ chez les femelles I ($t = 2,46$ pour $p = 0,001$) et $0,619 \mu\text{M}$ naphthol $\pm 0,269$ chez les femelles S ($t = 2,56$ pour $p = 0,001$).

Ensuite, les estérases se stabilisent de J9 à J20. Cependant, les femelles NG restent avec une moyenne faible, $0,196 \mu\text{M}$ naphthol $\pm 0,044$ par rapport à celle des femelles I ($0,229 \mu\text{M}$ naphthol $\pm 0,031$, $t = 2,17$ pour $p = 0,05$) et celle des femelles S ($0,282 \mu\text{M}$ naphthol $\pm 0,045$, $t = 4,84$ pour $p = 0,001$). Nous observons également une évolution significativement différente entre les femelles I ($0,229 \mu\text{M}$ naphthol $\pm 0,031$) et les femelles S ($0,282 \mu\text{M}$ naphthol $\pm 0,045$) ($t = 3,44$ pour $p = 0,01$).

Lors du développement du *Plasmodium* au sein des femelles infestées, dans les conditions expérimentales décrites (paragraphe 2, chapitre I), les sporozoïtes immatures, dans les oocystes, commencent leur migration vers les glandes salivaires dès le 14^{ème} jour. Le transfert des sporozoïtes est continu jusqu'à la maturation complète de tous les oocystes.

Durant cette période, J14 à J20, il existe une différence significative entre le taux moyen d'estérases des femelles infestées et saines, avec respectivement $0,217 \mu\text{M}$ naphthol $\pm 0,028$ et $0,266 \mu\text{M}$ naphthol $\pm 0,029$ ($t = 3,35$ pour $p = 0,01$).

2.2. Discussion.

La première remarque concerne la préparation des échantillons pour le dosage enzymatique.

Des essais préliminaires ont été réalisés à partir d'échantillons congelés et conservés à -80°C durant une période de une à deux semaines. Pour un âge donné, les moustiques congelés avaient une activité enzymatique très faible par rapport aux échantillons frais, tout comme le signalaient Freyvogel et ses collègues (1968).

Suite à cette observation, nous avons travaillé uniquement à partir d'individus frais, impliquant un investissement énorme en temps et en matériel.

Les essais préliminaires ont également porté sur le dosage séparé des estérases A et des estérases B. En électrophorèse, celles qui réagissent avec l' α -naphthol (estérases A) sont visualisées par une coloration bleu/violet et celles qui réagissent avec le β -naphthol (estérases B) le sont par une coloration rouge, en présence du colorant GBC (Asperen, 1962 ; Berl, 1981 ; Villani *et al.*, 1983).

Dans nos conditions expérimentales (paragraphe 6, chapitre I), les spectres colorimétriques des produits de la réaction enzyme-substrat présentent deux maxima d'intensité. L'un se situe à 570 nm pour l' α -naphthol et l'autre à 450 nm pour le β -naphthol. En théorie, ces deux longueurs d'ondes permettent de différencier le type de produit formé, donc le type d'estérase impliqué dans la réaction.

Des essais ont donc été réalisés en présence des deux substrats séparés, *ie* un même échantillon réagissait avec l' α -naphthylacétate ou le β -naphthylacétate dans deux cupules distinctes. La révélation des complexes enzyme-substrat laissait apparaître une coloration identique dans toutes les cupules, soit un mélange de bleu violet et de rouge.

Lorsque les essais ont été effectués en présence du mélange α et β -naphthylacétate pour un même échantillon, les cupules avaient également une couleur intermédiaire.

Ces observations nous indiquent que la réaction de l'enzyme (estérase A ou B) avec son substrat (α ou β -naphthylacétate) n'est pas spécifique mais qu'il s'agit plutôt d'une préférence. Contrairement à l'électrophorèse, le dosage colorimétrique ne permet pas de doser les estérases A et B séparément.

Le dosage colorimétrique nous permet donc d'évaluer les estérases totales des anophèles.

*K = cte
de
réaction
anaphyl*

Concernant les résultats obtenus, l'évaluation des estérases totales met en évidence une différence selon le sexe, et selon la qualité du repas sanguin pour les femelles.

Les taux d'estérases des mâles et les femelles NG sont inférieurs à ceux des femelles gorgées, depuis l'émergence jusqu'au vingtième jour. Bien sûr, ces derniers ont un poids inférieur (d'un facteur 2) à celui des femelles, mais si l'on rapporte la quantité d'estérase par milligramme de moustique, cette différence reste confirmée. On évalue, en moyenne, 0,181 μ M naphthol / mg mâle et 0,172 μ M naphthol / mg femelle NG pendant la période J1-J20.

Cette observation avait déjà été signalée chez *Anopheles stephensi*, en électrophorèse, (Freyvogel *et al.*, 1968 ; Berl, 1981 ; Villani *et al.*, 1986), alors qu'elle ne semble pas exister dans le genre *Culex* ou *Aedes* (Georghiou et Pasteur, 1978). Le zymogramme des mâles révèle la présence d'une bande supplémentaire par rapport à celui des femelles, alors que le dosage indique une activité estérasique plus faible.

L'activité des estérases est deux fois plus importante le jour de l'émergence, puis diminue et se stabilise au cours du temps. Ce phénomène se traduit, en électrophorèse, par une coloration plus intense des bandes lorsque les anophèles ont 24 heures par rapport à ceux qui sont plus âgés (Riandey, com. pers.).

L'émergence des adultes est une période très importante chez les insectes car elle entraîne des modifications physiologiques et morphologiques profondes. Les besoins énergétiques sont alors très importants, et les activités enzymatiques sont ainsi plus élevées. Nos résultats montrent que les estérases n'échappent pas à cette règle.

A ce même moment, nous avons également observé que la quantité d'hémolymphe était plus importante : 110 nl par moustique à J1 contre 80 nl 14 jours après, ainsi que Foley le montre (1978).

Les taux d'estérases de référence sont obtenus sur des moustiques entiers broyés. Les résultats se rapportent donc à l'activité des estérases totales présente dans tout le corps de l'anophèle.

Les études relatives à la localisation des estérases dans le moustique, et plus particulièrement au niveau du tube digestif et des glandes salivaires, organes impliqués dans la transmission du *Plasmodium*, indiquent que les glandes salivaires ont une activité estérasique faible alors qu'elle est très importante dans du tube digestif (Freyvogel *et al.*, 1968). Aucune mention particulière n'est faite pour l'hémolymphe, lieu de migration des sporozoïtes, alors que l'on y trouve des protéines enzymatiques (estérases, enzymes protéolytiques...) en forte

proportion (Powning et Davidson, 1973 ; 1976).

→ intérêt de la relation pour l'établissement des courbes standard.

Au moment du repas sanguin, nous avons mis en évidence une différence au niveau de la quantité du sang prélevée et du pic d'activité enzymatique. Les femelles qui se sont gorgées sur des souris impaludées ingèrent en moyenne moins de sang que les femelles saines. Il semblerait donc que la présence du *Plasmodium* soit à l'origine d'une certaine perturbation sur l'activité de prise de repas de sang des femelles.

Un phénomène similaire est décrit dans la littérature, mais à propos de deux souches d'*Anopheles atroparvus*, l'une sensible et l'autre résistante au développement du *Plasmodium* (Sluiters *et al.*, 1986 ; Switers *et al.*, 1986). Le volume de sang parasité ingéré par les femelles résistantes est sensiblement inférieur à celui ingéré par les femelles sensibles.

Le pic d'activité enzymatique faisant suite à l'ingestion de sang, pourrait être dû soit aux estérases du tube digestif, soit à celles du sang lui-même.

Nous avons prélevé du sang sur des souris saines et impaludées et dosé l'activité des estérases dans un volume correspondant à celui ingéré par les femelles. Dans les deux cas, celle-ci s'est avérée nulle. Nous pouvons dire que l'augmentation d'activité est bien due aux estérases présentes dans le tube digestif qui sont nécessaires à la digestion du sang (Freyvogel, 1980).

La chronologie des phases de la digestion chez des femelles *Aedes* indique que les estérases sont sécrétées dès 4 heures après l'ingestion du sang, et que leur activité est continue jusqu'à 24 heures puis diminue (Freyvogel, 1980). Nous savons, par ailleurs, que la digestion du sang est différente chez un moustique sensible et résistant au *Plasmodium* (Huff, 1934 ; Sluiters *et al.*, 1986). Cette différence serait la conséquence du développement parasitaire mais nous n'en connaissons pas la nature exacte.

l'effet est dépressif -

!

Les femelles infestées ont un maximum d'activité plus bas que celui des femelles saines, tout en ayant un volume de sang inférieur. Si l'on rapporte la quantité d'estérases par milligramme de moustique, la différence reste significative. On obtient 0,364 μM naph / mg pour les femelles saines et 0,307 μM naph / mg pour les femelles infestées. Ce résultat suggère une influence du *Plasmodium* sur l'équipement enzymatique du moustique. La même remarque peut être faite au moment de la migration des sporozoïtes, via l'hémolymph, vers les glandes salivaires. La baisse d'activité enzymatique des femelles infestées est significative.

Il semble exister un système complexe de régulation lié à la présence du *Plasmodium* dans le moustique. Les taux d'estérases sont plus bas chez les femelles gorgées sur une souris impaludée dans deux circonstances, au moment du repas sanguin lui-même et lors de la migration des sporozoïtes via l'hémolymph.

Ce phénomène rappelle également ce qui se produit lors du développement des oocystes chez l'anophèle. Tous les parasites sanguins sont ingérés au même moment, avec le repas de sang. Pourtant, les oocystes ne se développent pas de façon synchrone, traduisant sûrement un contrôle du développement du *Plasmodium* par le parasite lui-même.

Sachant que les estérases sont impliquées dans les phénomènes d'immunité humorale, ces observations peuvent pencher en faveur de l'hypothèse de la dépression du système immunitaire par *Plasmodium* (Foley, 1978 ; Bayne, 1984 ; Billingsley, 1990).

Le développement du *Plasmodium* dans le moustique entraîne visiblement d'autres perturbations (Hurd, 1990). Celui-ci serait responsable, chez les femelles infestées, de la baisse du volume hémolymphatique (Foley, 1978), de changements physico-chimiques dans l'hémolymphe (Mack *et al.*, 1979 a ; 1979 b), d'une réduction d'activité phénoloxidasique au niveau du tube digestif (Paskewitz *et al.*, 1989), d'une mortalité plus forte (Maier *et al.*, 1987), d'une capacité de vol diminuée (Maier *et al.*, 1987), d'une baisse de fertilité (Maier *et al.*, 1987) et d'une réduction d'activité générale (Kurihara *et al.*, 1992) voire d'une modification du comportement (Molyneux et Jefferies, 1986 ; Kurihara *et al.*, 1991).

Malheureusement, nos connaissances sur la pathologie des moustiques infestés sont encore trop limitées alors qu'elles sont indispensables à la compréhension des mécanismes régissant la compétence vectorielle et donc la transmission.

3. Le dosage des estérases totales après injections de corps étrangers.

L'encapsulation humorale se produit chez les moustiques dont le nombre de cellules immunitaires est faible, et sans leur participation apparente. Ce mode de réaction de défense entraîne le dépôt de mélanine autour du corps étranger par suite de l'activation des phénoloxydases de l'hémolymphe (Ratcliffe et Rowley, 1979 ; Kaaya, 1989).

Les estérases appartiennent aux nombreuses enzymes qui sont nécessaires à l'activation de la prophénoloxydase de l'hémolymphe en phénoloxydase (Ashida et Dohke, 1980). Nous venons de voir que les sporozoïtes induisaient une dépression des estérases chez les femelles au moment de leur passage dans l'hémolymphe. Partant de cette observation, nous avons choisi d'étudier l'influence des corps étrangers introduits dans l'hémolymphe sur les estérases du moustique.

D'autre part, l'absence de mélanisation au niveau de l'hémolymphe est rapportée chez des adultes (Ham *et al.*, 1988) et des larves (Poinar *et al.*, 1979) du genre *Simulium*, reflétant ainsi une déficience dans certains facteurs biochimiques impliqués dans la cascade phénoloxydasique. Ce phénomène provoque une sensibilité extrême de l'insecte vis-à-vis de corps étrangers.

Nous présentons, dans cette seconde partie, l'évaluation des estérases totales chez des femelles adultes inoculées avec des corps étrangers, *ie* des hématies, des billes de latex, des sporozoïtes immatures et du milieu de culture (RPMI). Tout comme précédemment, les résultats sont exprimés en micro moles de naphthol formé par individu (μM naph / fem).

3.1. Les résultats.

Les femelles inoculées sont dosées à différents temps après l'introduction des corps étrangers dans l'hémolymphe. Les profils enzymatiques obtenus sont présentés en figure 11, et sont comparés à celui des femelles avant la prise du repas de sang.

D'une façon générale, l'action d'introduire des corps étrangers dans l'hémolymphe des femelles provoque une réaction immédiate et détectable dans un délai de une heure.

Lorsque les femelles sont âgées de 24 heures, le taux d'estérases est évalué à $0,482 \mu\text{M}$ naph / femelle $\pm 0,072$. Ensuite, une augmentation significative des taux enzymatiques se produit, d'un facteur 3 pour l'injection d'hématies ($1,603 \mu\text{M}$ naph / fem, $t = 16,3$ pour $p = 0,001$), de sporozoïtes ($1,284 \mu\text{M}$ naph / fem, $t = 11,87$ pour $p = 0,001$) et de billes de latex ($1,281 \mu\text{M}$ naph / fem, $t = 7,83$ pour $p = 0,001$), et d'un facteur 1,5 pour l'injection du milieu de culture ($0,751 \mu\text{M}$ naph / fem, $t = 4,28$ pour $p = 0,001$).

6. 1. 1. 1.

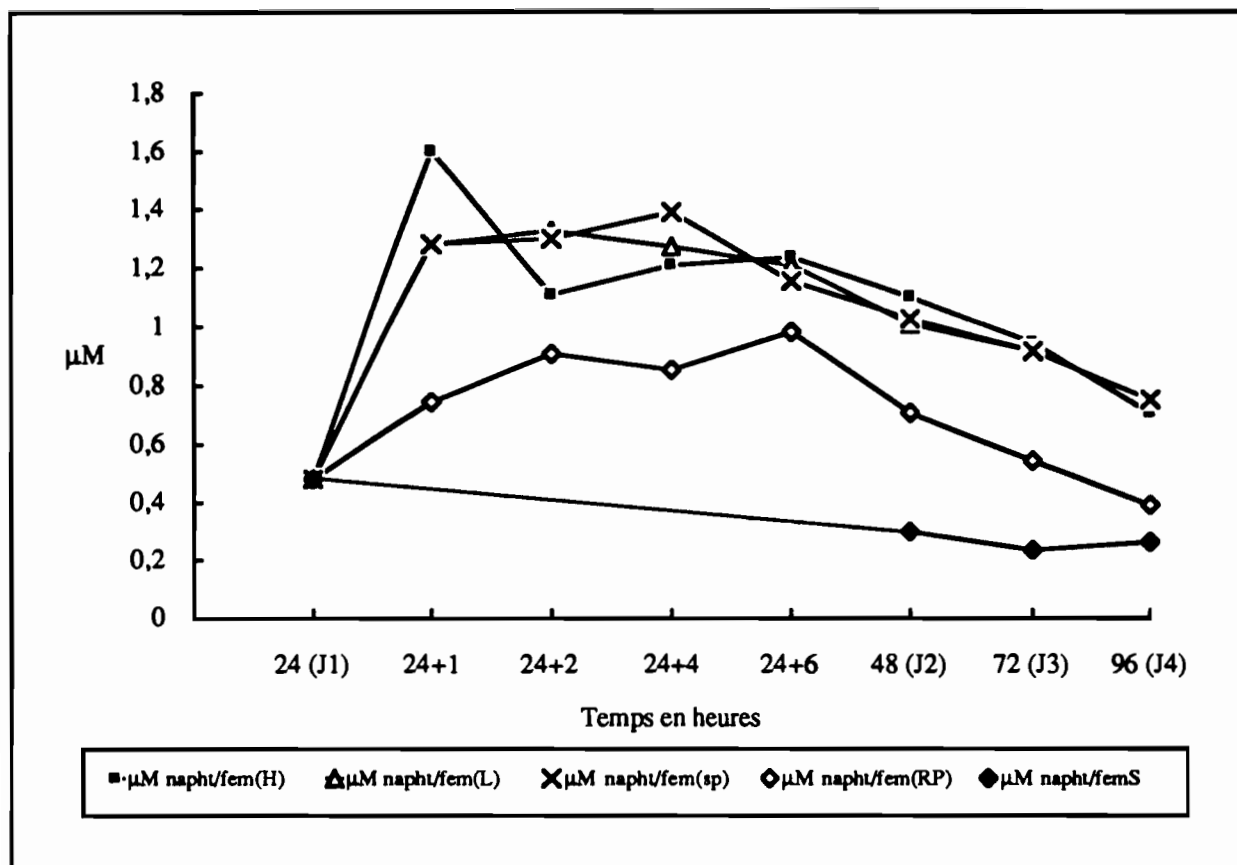


Figure 11 : Variation des taux d'estérase chez des femelles *A. stephensi* inoculées avec des corps étrangers de type hématies (H), latex (L), sporozoïtes immatures (sp), RMPI (RP). Les femelles saines (fem S) servent de témoin.

Cependant, on ne remarque aucune différence dans la réaction du moustique selon que l'on injecte des corps étrangers biologiques (hématies et sporozoïtes) ou inertes (billes de latex). L'activité des estérase augmentée se prolonge pendant 6 heures puis amorce une diminution. 96 heures après l'injection des corps étrangers, les taux d'estérase tendent vers la valeur des témoins (0,270 μM naph / fem) mais ne l'atteignent pas encore.

L'injection de milieu de culture provoque également une augmentation des taux enzymatiques, mais moindre par rapport à celle des corps étrangers. Les estérase retrouvent leur taux normal après 96 heures.

3.2. Discussion.

Le dépôt de mélanine, autour de parasites ou de pathogènes, est la principale réaction de défense visible chez les moustiques (Götz, 1986 ; Brey *et al.*, 1988). La mélanine et les enzymes impliquées dans sa synthèse, comme la phénoloxydase et les estérases, font partie intégrante du système immunitaire des insectes. Cependant, les études réalisées jusqu'alors sur l'activation de la cascade phénoloxydasique se rapportent à une seule enzyme, la prophénoloxydase, et aux insectes dont le volume hémolymphatique est important (Chadwick, 1966 ; Leonard *et al.*, 1985).

Par cette étude, nous montrons d'une part, que l'on peut appréhender la cascade d'enzymes du système phénoloxydase en dosant d'autres enzymes, en particulier les estérases, et d'autre part, que les difficultés de manipulations des insectes à faible volume hémolymphatique ne sont pas un obstacle aux expérimentations. De plus, il semble plus judicieux d'étudier les auteurs de la transmission d'agents pathogènes, plutôt que leurs stades larvaires ou des espèces voisines. L'extrapolation de tels résultats nous semble un exercice dangereux. x

4. Discussion, conclusion.

L'étude des estérases totales chez *Anopheles stephensi*, moustique sensible à *Plasmodium y. yoelii*, indique que le développement parasitaire perturbe l'activité de prise de repas sanguin et le fonctionnement enzymatique de son hôte.

Nous avons montré que les femelles prélevaient moins de sang lorsque celui-ci contenait des parasites. D'autre part, au moment du passage des sporozoïtes des oocystes du tube digestif vers les glandes salivaires, on observe une dépression des taux estérasiques chez les femelles infestées par rapport aux femelles témoins.

Ces perturbations, provoquées par le développement plasmodial, sont à ajouter à celles déjà observées chez les anophèles (Hurd, 1990).

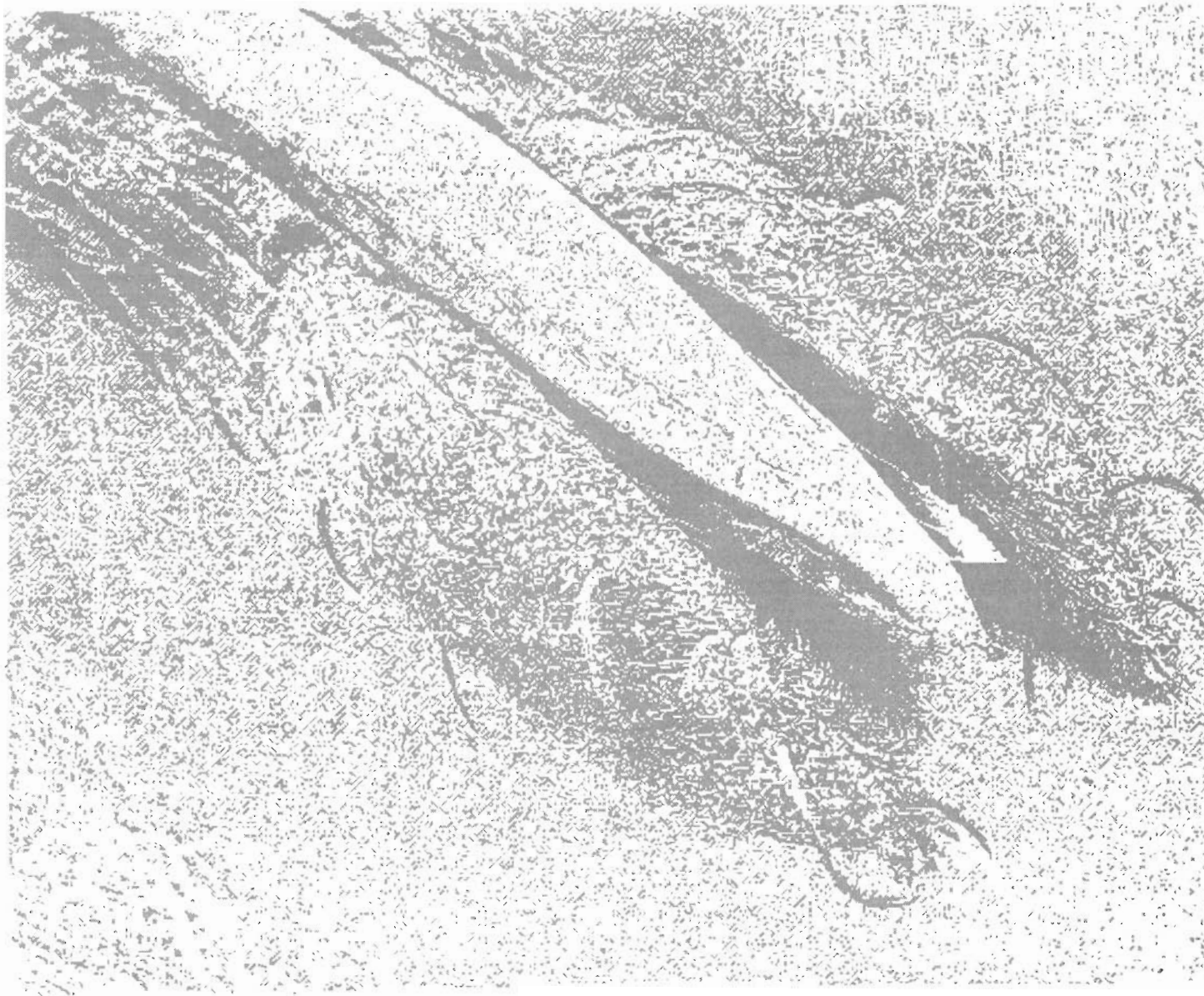
Mais le développement d'un parasite chez son vecteur est soupçonné d'avoir également une influence, au niveau des réactions de défense de l'hôte. L'hypothèse de dépression du système immunitaire a été émise pour plusieurs systèmes hôte-parasite, à savoir celui responsable de la maladie de Chagas (Bitkowska *et al.*, 1982), d'une filariose (Christensen *et*

Lafond, 1986) et bien sûr du paludisme (Billingsley, 1990).

Sachant que les estérases interviennent dans les phénomènes d'encapsulation humorale, la baisse des taux enzymatiques, à partir du quatorzième jour du développement plasmodial, est en fait en faveur de la dépression du système immunitaire. En effet, nos observations indiquent que l'introduction de corps étrangers dans l'hémolymphe des femelles déclenche immédiatement l'activation des estérases. Dans les conditions normales, les anophèles sont capables de réagir à un envahisseur au niveau de l'hémolymphe. Lorsque le *Plasmodium* effectue son développement complet chez une femelle, celle-ci semble incapable de réagir quand les sporozoïtes migrent, *via* l'hémolymphe, vers les glandes salivaires. ✓

L'étude cytologique de l'hémolymphe d'anophèles femelles inoculées avec des corps étrangers n'a pas permis de mettre en évidence une réaction immunitaire de type mélanisation. Cependant, nous pouvons conclure que les femelles saines sont capables de développer une réaction de défense face aux corps identifiés comme "non-soi". Celle-ci se traduit par une augmentation de l'activité des estérases lorsque les corps étrangers sont introduits dans l'hémolymphe. A l'inverse, lors de la migration des sporozoïtes dans l'hémolymphe, les femelles semblent incapables d'augmenter leur activité enzymatique. La dépression mise en évidence semble liée à la présence du parasite.

Les recherches doivent être poursuivies et étendues à toutes les enzymes constituant la cascade phénoloxydasique pour espérer obtenir des réponses. Cependant, il est regrettable × qu'aucune information ne soit disponible sur les estérases ou les autres enzymes de ce système phénoloxydasique. Si l'hypothèse de l'inactivation de la cascade enzymatique par le *Plasmodium* se confirme ultérieurement, nous pouvons déjà dire que les estérases semblent perturbées mais pas inhibées totalement.



CHAPITRE IV

**Détection des antigènes sporozoïtares chez
Anopheles stephensi par ELISA**

1. Introduction.

Ce chapitre est consacré à l'étude des antigènes sporozoïtaires de *P. y. yoelii* chez *A. stephensi*, par la technique ELISA en double sandwich.

Dans un premier chapitre, nous présentons les principaux résultats du calibrage de la méthode ELISA

Dans un second chapitre, nous avons évalué les différentes caractéristiques de cette technique ELISA utilisée au dépistage des moustiques infestés. La reproductibilité, la sensibilité, la fiabilité relative, la spécificité et les valeurs diagnostiques relatives au dosage immunoenzymatique sont définies.

Enfin, nous discutons de l'utilisation d'une telle méthode pour l'évaluation des charges sporozoïtaires d'anophèles femelles inoculées avec des sporozoïtes immatures et matures.

2. Le calibrage de l'épreuve ELISA en double sandwich.

Le calibrage du titrage immuno-enzymatique consiste à déterminer les concentrations des différents anticorps (anticorps lapin et souris) et antigènes pour lesquelles l'écart entre les moustiques positifs et négatifs est maximum et significatif.

Des essais préliminaires ont permis de préciser l'encadrement des dilutions pour les anticorps, entre 1/100 et 1/800, et pour les antigènes, entre 1/40 à 1/160. Les densités optiques obtenues permettent de distinguer les échantillons négatifs et positifs.

Le calibrage porte sur un échantillon de 176 moustiques femelles d'élevage, dont 88 saines et 88 infestées. Le détail des résultats est présenté en annexe 5.

2.1. L'anticorps lapin anti-sporozoïtes matures (AcL/GS).

Nous avons testé les anticorps lapin avec les anticorps souris AcS/TD et AcS/GS dilués de 1/100 à 1/800, et les échantillons de moustiques sains et infestés dilués de 1/40 à 1/160. Les meilleurs résultats sont obtenus avec les deux anticorps souris au 1/200.

Ainsi, nous présentons uniquement les résultats obtenus avec l'anticorps souris AcS/GS au 1/200 (figure 12), ceux obtenus lors du dosage l'anticorps souris AcS/TD étant similaires.

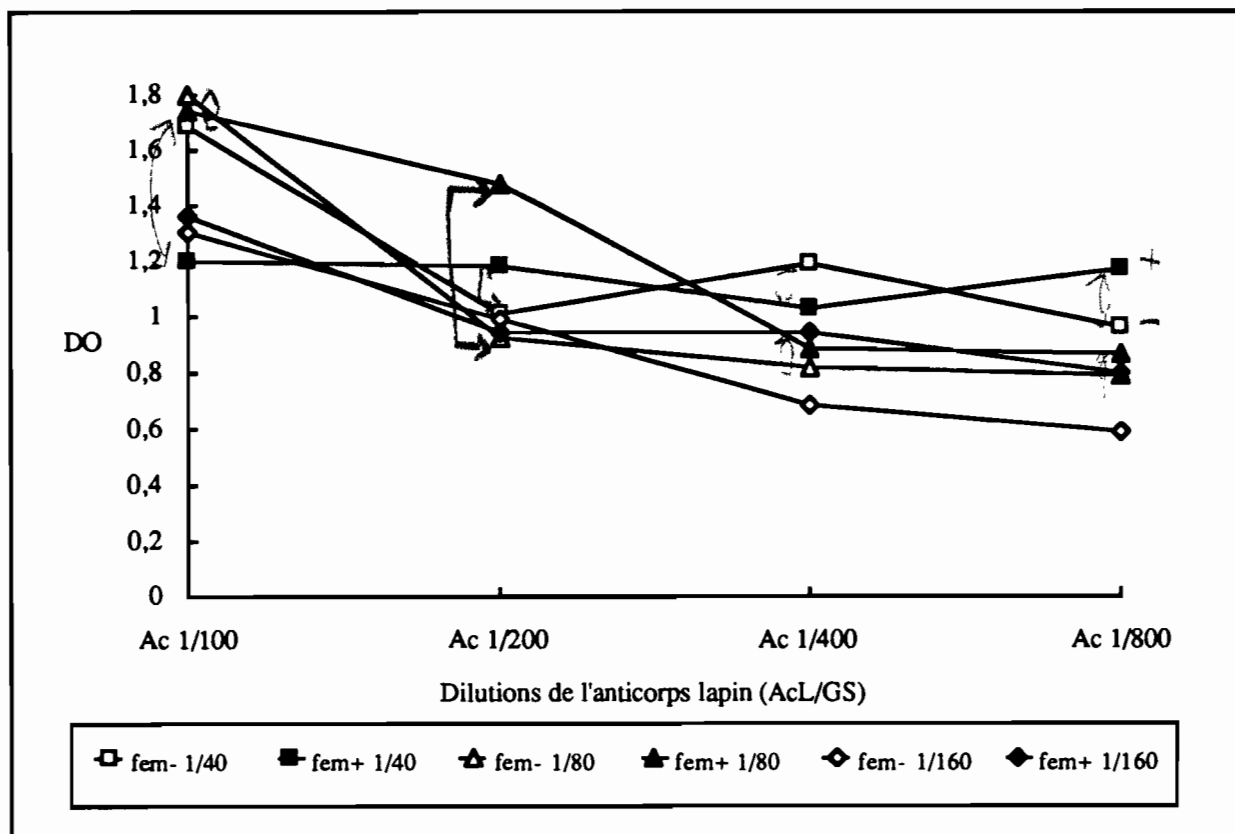


Figure 12 : Variation des densités optiques (DO) en fonction de différentes concentrations d'anticorps lapin et d'antigènes négatifs (fem-) et positifs (fem+), pour une concentration fixée d'anticorps souris, 1/200.

Les dilutions de l'anticorps lapin, 1/100 et 1/200, provoquent les écarts de densités optiques les plus importants entre les moustiques sains et infestés, dilués au 1/40 ou au 1/80.

2.2. Les anticorps souris anti-sporozoïtes immatures (AcS/TD) ou matures (AcS/GS).

En se référant aux résultats précédemment cités, le calibrage des deux anticorps souris est établi avec l'anticorps lapin dilué au 1/100 et 1/200, pour des antigènes dilués du 1/40 au 1/160.

Les meilleurs dosages immunoenzymatiques sont obtenus avec l'anticorps lapin dilué au 1/200. Nous présentons donc les courbes de variations des densités optiques obtenues avec

cette dilution d'anticorps lapin. La figure 13-1 présente les valeurs de densités optiques lors du dosage avec l'AcS/TD et la figure 13-2, celles obtenues avec l'AcS/GS.

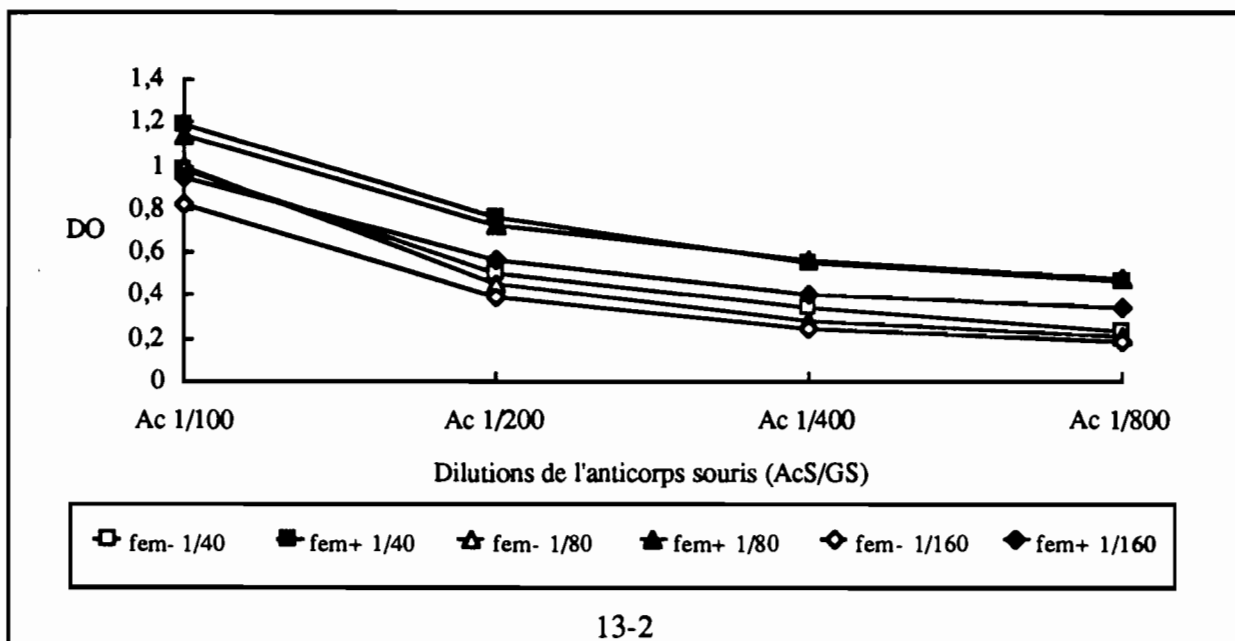
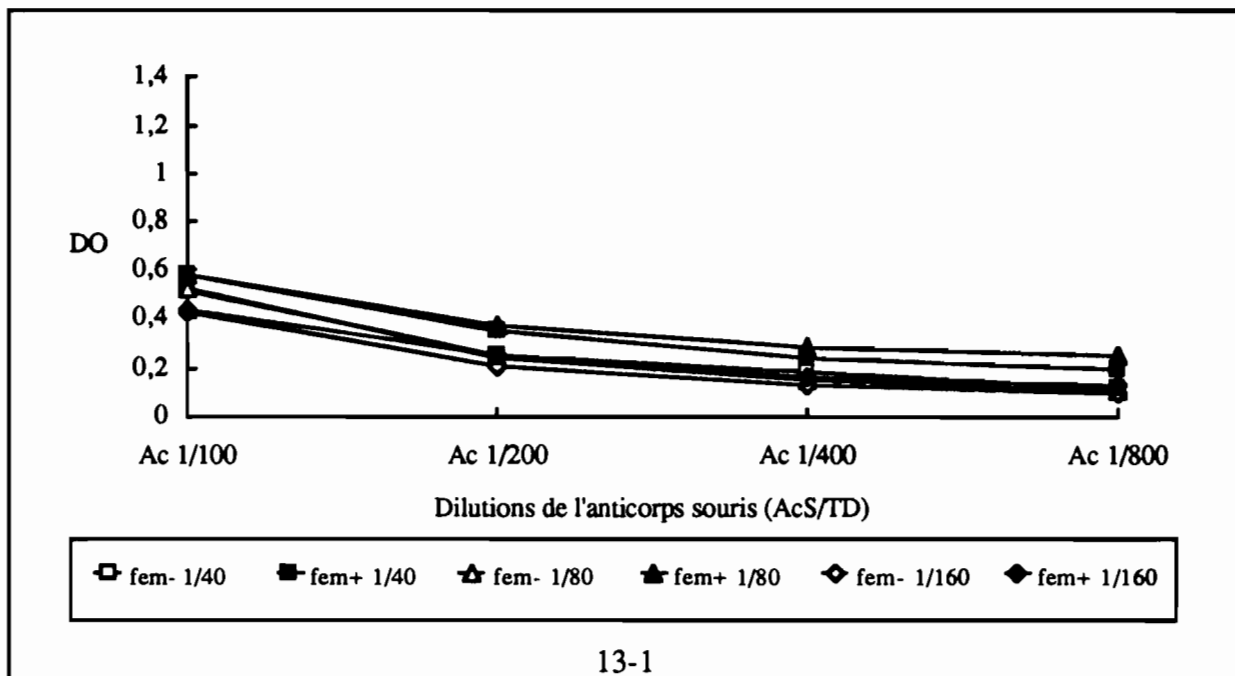


Figure 13 : Variations des densités optiques (DO) en fonction de différentes concentrations d'anticorps souris AcS/TD (13-1), d'anticorps souris AcS/GS (13-2) et d'antigènes négatifs (fem-) ou positifs (fem+), pour une concentration d'AcL/GS fixée à 1/200.

L'écart entre les réponses obtenues avec les moustiques sains et infestés est le plus important avec les dilutions 1/200 des anticorps souris et lapin.

2.3. Les antigènes.

Nous présentons les densités optiques obtenues avec différentes dilutions d'antigènes, pour les dilutions d'anticorps choisies précédemment, soit 1/200 (figure 14).

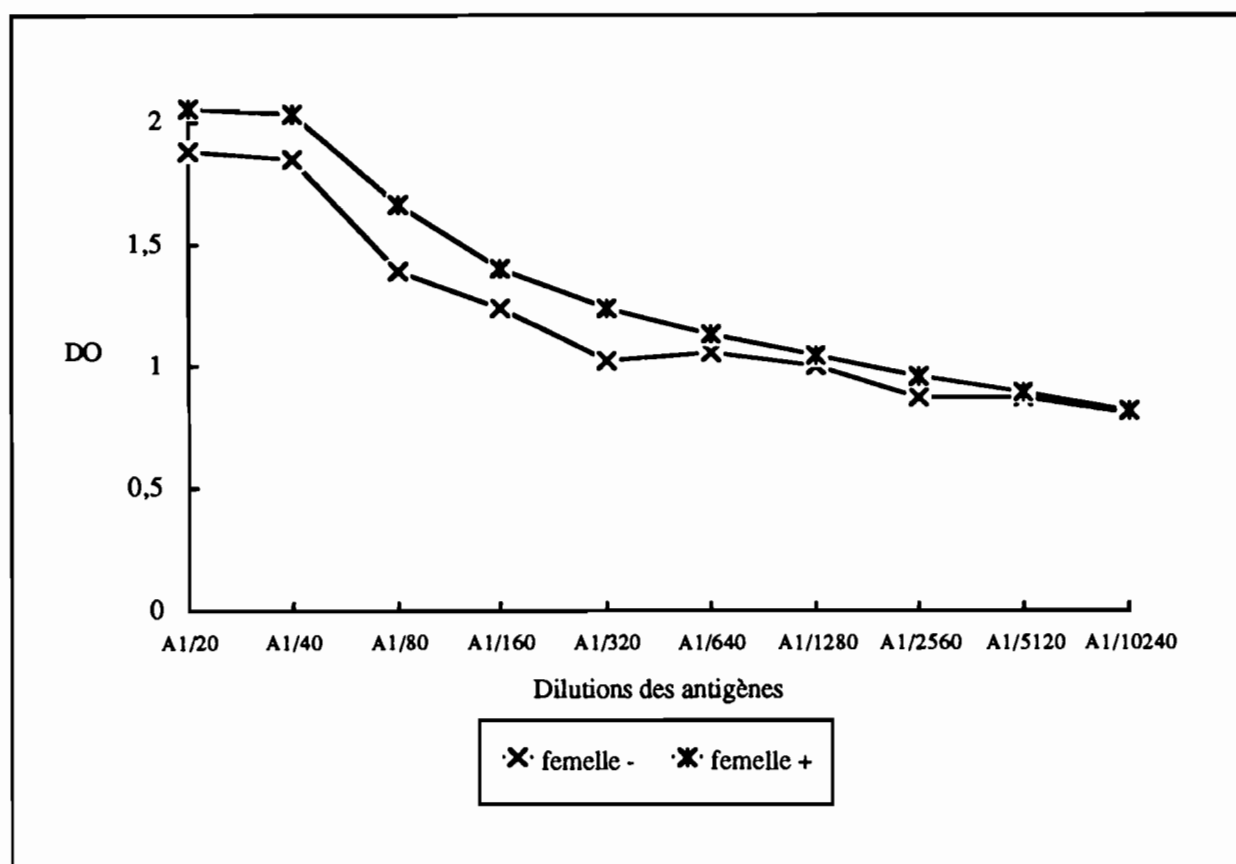


Figure 14 : Variation des densités optiques obtenues avec des dilutions différentes de femelles saines et infestées, pour des AcL/GS et AcS/GS au 1/200.

L'écart maximal entre les moustiques sains et infestés est obtenu avec la dilution des antigènes au 1/80.

2.4. Conclusion : le calibrage de l'épreuve ELISA.

Selon les résultats énoncés dans ce chapitre, le dosage immuno-enzymatique est calibré avec les dilutions suivantes :

- 1/200 pour les anticorps lapin et souris,
- 1/80 pour les antigènes.

3. Les caractéristiques du titrage immuno-enzymatique.

Les différentes caractéristiques du titrage immuno-enzymatique sont évaluées dans nos conditions expérimentales, avec des anticorps anti-sporozoïtes polyclonaux. Les résultats sont présentés pour les anticorps souris anti-sporozoïtes immatures (AcS/TD) et anti-sporozoïtes matures (AcS/GS).

3.1. La reproductibilité de la méthode ELISA.

L'évaluation de la reproductibilité de la réaction s'est faite sur 10 plaques, dont la moitié testée avec l'anticorps souris AcS/TD et l'autre moitié avec l'anticorps souris AcS/GS.

Chaque échantillon de moustique témoin, négatif ou positif, est déposé dans deux cupules successives. Une moyenne des deux valeurs de densités optiques est calculée pour chaque individu. Nous présentons, dans le tableau 1, les valeurs moyennes relatives aux moustiques négatifs et positifs, sur chacune des plaques.

Chaque dilution de la suspension standard de sporozoïte est également déposée dans deux cupules successives. Les moyennes de ces valeurs sont représentées en figures 15 et 16.

Le détail des valeurs obtenues par la gamme de sporozoïtes, sur chacune des plaques, est présenté en annexe 5.

Tableau 1 : Variation des densités optiques moyennes et de leur écart-type (σ) pour les solutions standards du témoin négatif (-) et positif (+) en ELISA, avec les anticorps souris AcS/TD et AcS/GS.

Témoin (-)		Témoin (+)	
AcS/TD ($\pm \sigma$)	AcS/GS ($\pm \sigma$)	AcS/TD ($\pm \sigma$)	AcS/GS ($\pm \sigma$)
0,111 ($\pm 0,016$)	0,318 ($\pm 0,032$)	0,396 ($\pm 0,030$)	0,603 ($\pm 0,073$)
0,173 ($\pm 0,052$)	0,210 ($\pm 0,059$)	0,310 ($\pm 0,010$)	0,653 ($\pm 0,055$)
0,152 ($\pm 0,093$)	0,215 ($\pm 0,053$)	0,369 ($\pm 0,052$)	0,531 ($\pm 0,082$)
0,176 ($\pm 0,020$)	0,382 ($\pm 0,027$)	0,426 ($\pm 0,073$)	0,647 ($\pm 0,047$)
0,183 ($\pm 0,073$)	0,269 ($\pm 0,035$)	0,456 ($\pm 0,052$)	0,697 ($\pm 0,066$)

Les différentes valeurs de densités optiques obtenues par les témoins négatifs, témoins positifs, et la gamme de sporozoïtes ne varient guère d'une plaque à l'autre. Dans ces conditions, nous pouvons conclure que la reproductibilité du dosage immuno-enzymatique en double sandwich est satisfaisante d'une plaque à l'autre. Les valeurs de densités optiques, pour un même échantillon, sont similaires et peuvent être comparées d'une plaque à l'autre. De ce fait, nous n'avons pas appliqué le coefficient K préconisé lors d'un manque de reproductibilité (Boudin *et al.*, 1988).

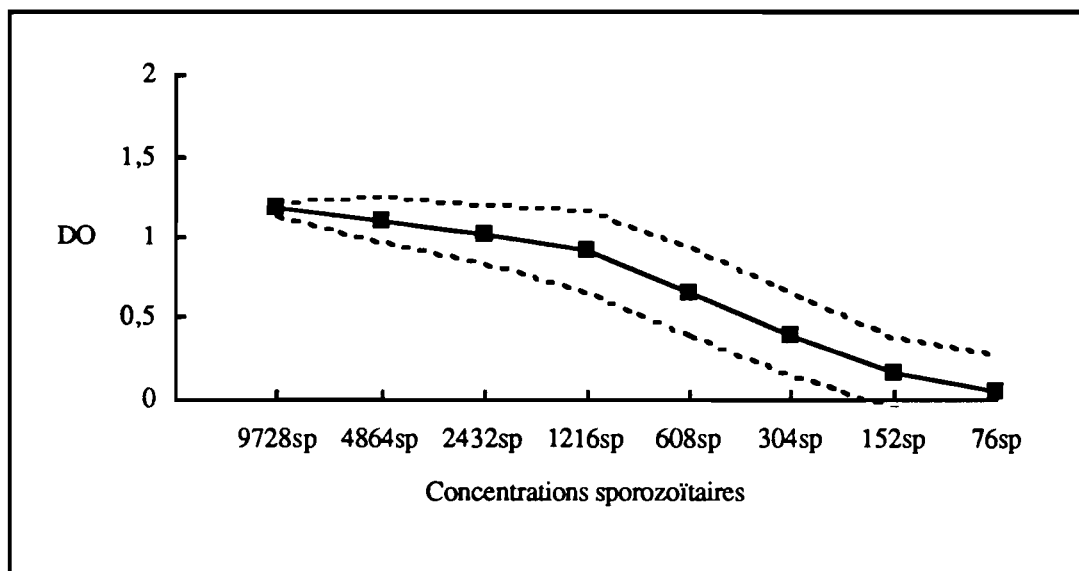


Figure 15 : Distribution des densités optiques moyennes (DO) et de leur écart-type obtenues sur l'ensemble des 5 plaques, pour des dilutions successives d'une suspension standard de sporozoïtes, avec l'anticorps souris AcS/GS. Les concentrations sporozoïtares (sp) sont calculées pour un volume de 200 μ l.

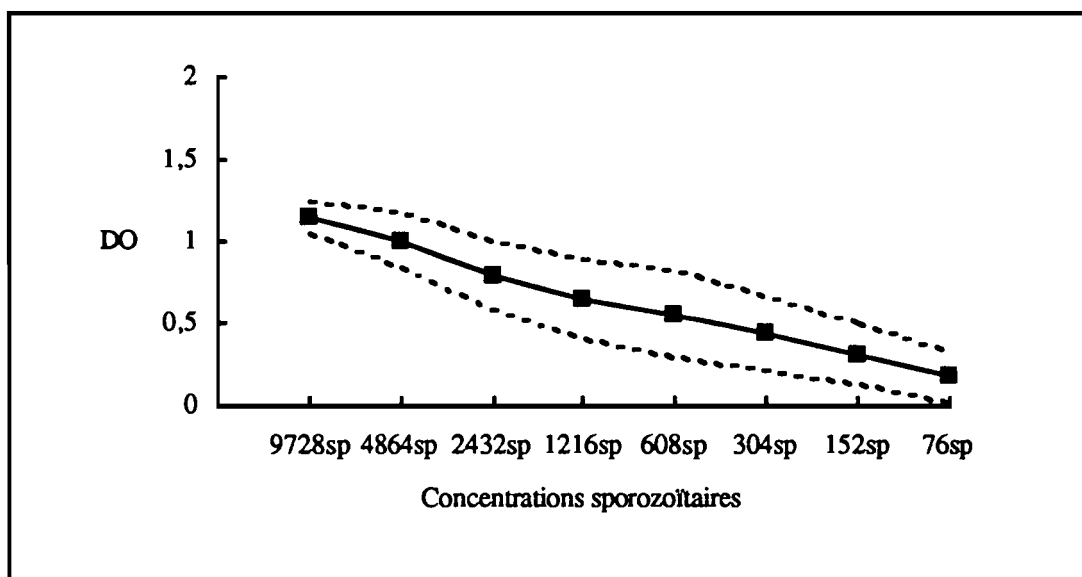


Figure 16 : Distribution des densités optiques moyennes (DO) et de leur écart-type obtenue sur l'ensemble des 5 plaques, pour des dilutions successives d'une suspension standard de sporozoïtes, avec l'anticorps souris AcS/TD. Les concentrations sporozoïtares (sp) sont calculées pour un volume de 200 μ l.

3.2. L'évaluation de la charge sporozoïtaire en ELISA.

Les solutions standard de sporozoïtes, de concentrations connues, sont diluées de 2 en 2 afin d'obtenir une gamme étalon. Ainsi, les différentes charges d'antigènes sporozoïtares sont évaluées par les valeurs de densités optiques obtenues à l'issue du dosage.

D'une façon générale, les dilutions successives de sporozoïtes induisent des densités optiques qui se répartissent selon une courbe sigmoïde (figures 15 et 16). Il n'y a de proportionnalité directe entre les concentrations sporozoïtares de la gamme et les densités optiques que dans l'intervalle 2 432-76 sporozoïtes dans 200 μ l. Pour des concentrations supérieures à 2 500 sporozoïtes / 200 μ l, le dosage ELISA sature, et pour des concentrations inférieures à 70 sporozoïtes / 200 μ l, il ne détecte plus les antigènes sporozoïtares.

Contrairement à Boudin et ses collègues (1988), nous avons défini la sensibilité de la méthode comme étant la plus petite quantité de sporozoïtes détectable par le titrage ELISA. Sachant que chacun des moustiques testés est dilué au 1/80, la gamme étalon de sporozoïtes nous permet d'approximer de façon fiable des charges sporozoïtares comprises entre 190 000 et 6 000 sporozoïtes par moustique.

La sensibilité est donc de 6 000 sporozoïtes / moustique. Il faut cependant garder à l'esprit que la gamme de sporozoïtes correspond à une solution de sporozoïtes. Elle permet

seulement d'établir une approximation des charges parasitaires dans les échantillons, ces derniers correspondant à des moustiques broyés.

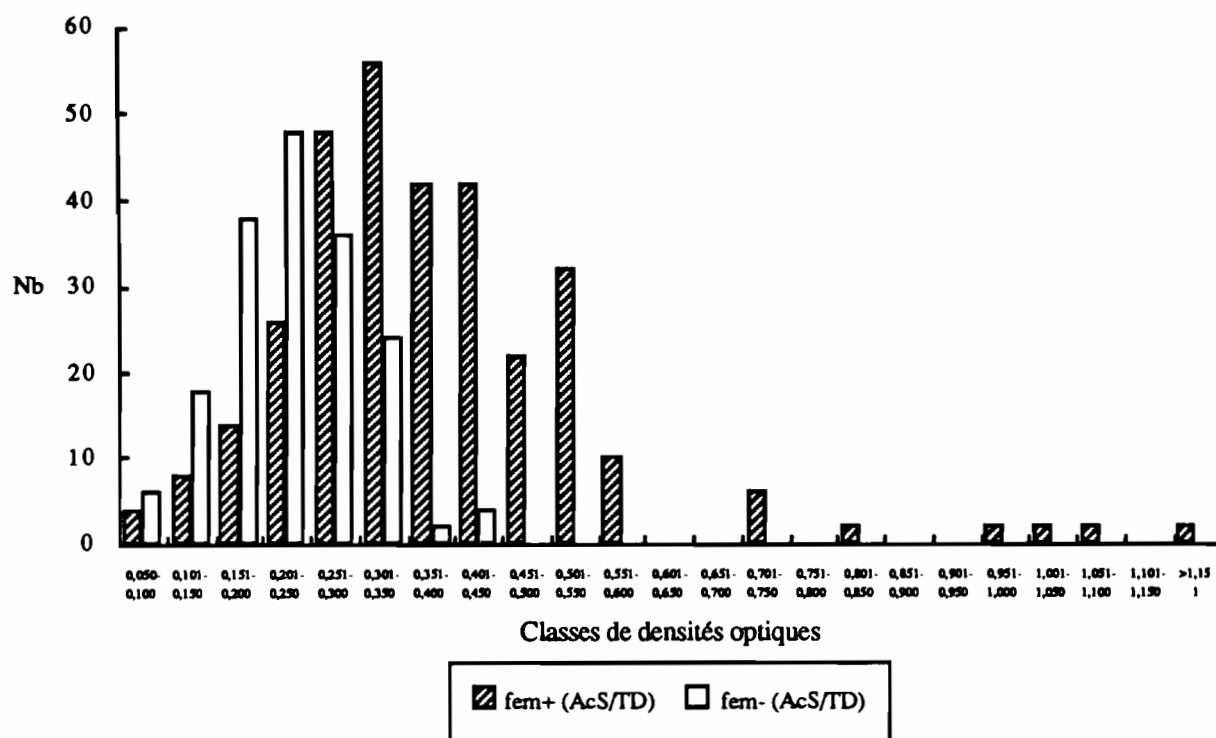
3.3. Le seuil de positivité de la réaction.

Les distributions de densités optiques sont analysées à partir d'anophèles d'élevages sains (176) et infestés par *P. y. yoelii* (320). Chaque échantillon est dosé avec les deux anticorps souris disponibles, soit l'anticorps AcS/TD et l'anticorps AcS/GS. L'échantillonnage des moustiques infestés est beaucoup plus important que celui des moustiques sains en raison des stades parasitaires différents choisis pour la détection des antigènes sporozoïtaires : infestation au niveau du tube digestif ou des glandes salivaires seules et infestation mixte tube digestif et glandes salivaires.

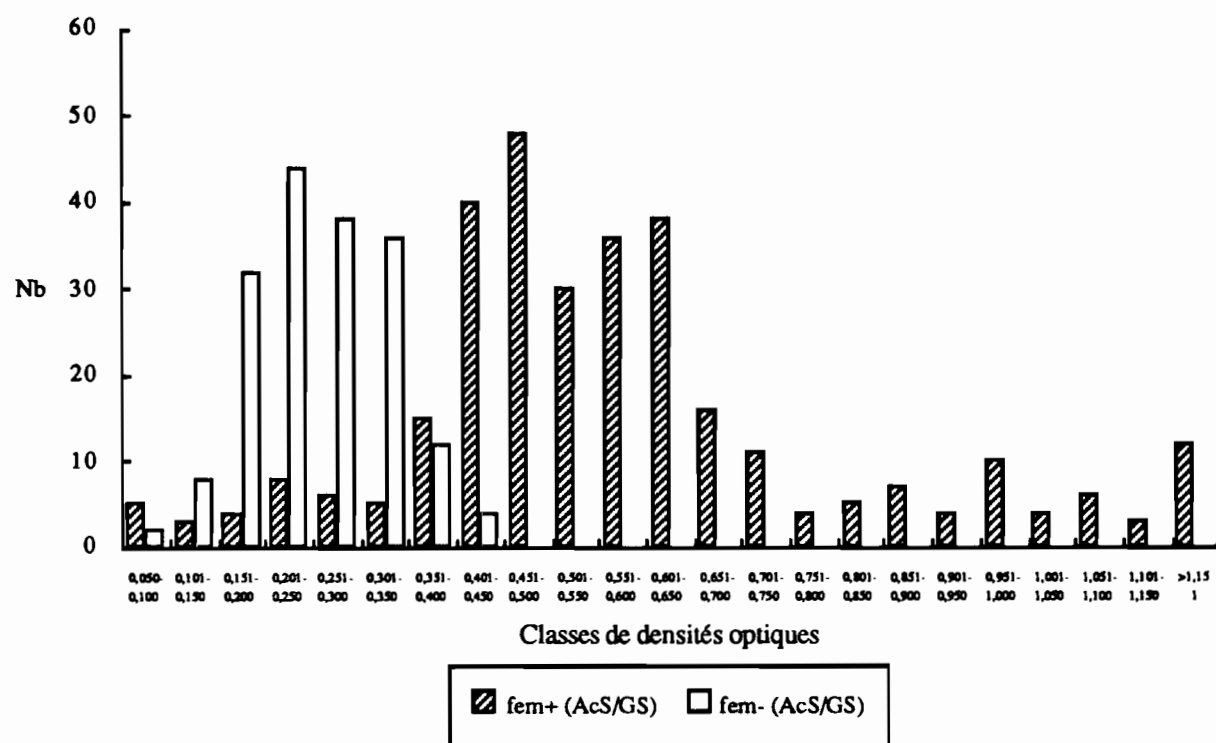
Nous présentons la répartition des femelles selon les densités optiques obtenues avec l'anticorps souris anti-sporozoïtes immatures (AcS/TD) (figure 17-1) et l'anticorps souris anti-sporozoïtes glande salivaire (AcS/GS) (figure 17-2).

D'une façon générale, nous pouvons dire que les moustiques négatifs et positifs s'individualisent moins bien avec l'AcS/TD qu'avec l'AcS/GS. Cette observation n'est pas la conséquence de la qualité des anticorps souris fabriqués, mais celle de la spécificité des anticorps lapin. En effet, ces derniers sont dirigés contre les antigènes matures des sporozoïtes. Le titrage effectué avec les AcL/GS et AcS/GS détecte principalement les antigènes matures des sporozoïtes. Celui effectué avec les AcL/GS et AcS/TD détecte la fraction antigénique commune aux stades parasitaires immatures et matures. Il faut donc garder à l'esprit que l'AcS/TD ne détecte pas les antigènes CS immatures de façon stricte dans les conditions de notre dosage.

ce alors il aurait fallu immuniser des
2^e lapins



17-1



17-2

Figure 17 : Distribution des moustiques d'élevage sains et infestés en fonction des densités optiques obtenues en ELISA : 17-1 : avec l'anticorps anti-sporozoïte tube digestif (AcS/TD), 17-2 : avec l'anticorps anti-sporozoïte glande salivaire (AcS/GS).

Nous abordons dans un premier temps la répartition des femelles selon les densités optiques obtenues avec l'anticorps souris anti-sporozoïte immatures (AcS/TD) (figure 17-1).

La densité optique moyenne calculée sur l'ensemble des femelles saines testées est de $0,227 \pm 0,072$ et celle de la totalité des femelles infestées, tous stades confondus est de $0,387 \pm 0,165$.

Les densités optiques observées sur des moustiques sains varient de 0,050 à 0,450 alors que celles des moustiques infestés ont une gamme plus étendue, allant jusqu'à 1,151. Ainsi, 83% des femelles saines se répartissent dans les valeurs de densités optiques inférieures ou égales à 0,300 contre 31% pour les infestées ($\chi^2 = 38,1$ pour 1 ddl). A l'inverse, on trouve 17% de femelles saines et 69% de femelles infestées avec des densités optiques supérieures à 0,300 ($\chi^2 = 45,8$ pour 1 ddl).

Le seuil en dessous duquel il faut considérer les moustiques comme négatifs, avec l'AcS/TD, correspond à la densité optique 0,300.

Avec l'anticorps souris anti-sporozoïte glande salivaire (AcS/GS), la répartition des moustiques selon les densités optiques est présentée figure 17-2.

les densités optiques moyennes des anophèles sains et des anophèles infestés sont respectivement de $0,257 \pm 0,070$ et $0,609 \pm 0,256$.

Les densités optiques des femelles saines varient de 0,050 à 0,450 alors que celles des femelles infestées varient de façon plus ample, jusqu'à 1,151. D'une façon générale, les valeurs obtenues lors du dosage des femelles infestées avec l'AcS/GS sont plus élevées qu'avec l'AcS/TD. 86% des anophèles infestés ont des DO supérieures à 0,400 contre 2% pour les moustiques sains ($\chi^2 = 115,7$ pour 1 ddl).

L'anticorps anti-sporozoïte glande salivaire nous permet ainsi de fixer un seuil de positivité au-dessous duquel les échantillons sont classés comme positifs. Celui-ci a été fixé à 0,400 de densité optique.

D'autre part, le dosage des antigènes sporozoïtaires sur des anophèles infestés, avec l'AcS/GS, met en évidence deux groupes. Le premier ayant des DO comprises entre 0,400 et 0,750 et le second de 0,751 à 1,151. Si l'on transforme ces valeurs par la gamme étalon de sporozoïtes, nous obtenons une estimation du nombre de sporozoïtes par femelle de 0 à 113 806 sp / fem. et de 114 179 à 263 433 sp / fem. Ces deux groupes peuvent être mis en relation avec le stade de développement de *P. y. yoelii* chez l'anophèle. Les fortes densités optiques, traduisant une forte charge parasitaire, indiquent que le parasite se trouve principalement dans les glandes salivaires. Les valeurs de densités optiques moyennes indiquent soit que les glandes

salivaires sont faiblement infestées, soit que le parasite se trouve encore au niveau du tube digestif.

3.4. La fiabilité relative et la spécificité de la réaction.

La fiabilité relative et la spécificité de l'épreuve ELISA en double sandwich sont évaluées à partir des moustiques d'élevages sains et infestés. Chaque échantillon est disséqué de façon à évaluer l'infestation au niveau du tube digestif et des glandes salivaires, puis dosé immunologiquement. Les résultats sont rapportés dans le tableau 2.

Nous avons défini la fiabilité relative de la méthode par rapport à la dissection, comme étant la proportion de moustiques positifs (F+) et négatifs (F-) correctement classés en ELISA rapportée à la totalité des moustiques. La spécificité correspond à la proportion de moustiques sains négatifs en ELISA rapportée à l'ensemble des moustiques sains à la dissection.

Ces paramètres servent à apprécier la corrélation entre les résultats parasitologiques, issus des dissections de moustiques, et immunologiques, grâce au dosage ELISA sur les mêmes échantillons.

Lors des dissections des 320 anophèles infestés, 240 présentaient des oocystes au niveau du tube digestif et 246 des sporozoïtes dans les glandes salivaires.

Parmi les 240 moustiques infestés en stade oocystes, 199 (83%) et 234 (97,5%) sont positifs en ELISA, avec respectivement l'AcS/TD et l'AcS/GS. Parmi ceux ayant des sporozoïtes dans les glandes salivaires, 174 (71%) et 212 (86%) sont positifs avec l'AcS/TD et l'AcS/GS.

La fiabilité de la technique ELISA avec l'AcS/TD est de 81% sur les sporozoïtes immatures (stades oocystes) et 71% sur les sporozoïtes matures (stades glandes salivaires). Avec l'AcS/GS, la fiabilité atteint de 86% pour des infestations par des sporozoïtes immatures et 88% pour des sporozoïtes matures. L'anticorps anti-sporozoïtes glandes salivaires apparaît donc le plus fiable, même sur les stades oocystes du *Plasmodium*, et sa spécificité pour les moustiques sains est proche de 100%.

Cette différence est la conséquence de l'utilisation combinée de l'AcL/GS et de l'AcS/TD.

Tableau 2 : Corrélation entre les résultats parasitologiques et immunologiques sur un même lot de moustiques (V+ : vrai positif, V- : vrai négatif, F+ : faux positif, F- : faux négatif, + : positif, - : négatif),

2-1 : dosage ELISA avec l'AcS/TD,

2-2 : dosage ELISA avec l'AcS/GS.

2-1	Dissection	Total	ELISA		Fiabilité (F) Spécificité (SP)
			+	-	
stade oocyste	+	240 (+)	199 (V+)	41 (F-)	F + = 80,6%
	-	80 (-)	21 (F+)	59 (V-)	F - = 19,4%
	Total	320	220	100	
stade glande salivaire	+	246 (+)	174 (V+)	72 (F-)	F + = 70,6%
	-	74 (-)	22 (F+)	52 (V-)	F - = 29,4%
	Total	320	196	124	
moustiques sains	-	176 (-)	30 (F+)	146 (V-)	SP = 82,95%

2-2	Dissection	Total	ELISA		Fiabilité (F) Spécificité (SP)
			+	-	
stade oocyste	+	240 (+)	234 (V+)	6 (F-)	F + = 85,6%
	-	80 (-)	40 (F+)	40 (V-)	F - = 14,4%
	Total	320	274	46	
stade glande salivaire	+	246 (+)	212 (V+)	34 (F-)	F + = 88,1%
	-	74 (-)	4 (F+)	70 (V-)	F - = 11,9%
	Total	320	216	104	
moustiques sains	-	176 (-)	4 (F+)	172 (V-)	SP = 97,73%

Le nombre de moustiques parasitologiquement positifs, soit au niveau du tube digestif (240/320), soit au niveau des glandes salivaires (246/320), est sensiblement identique au nombre de moustiques immunologiquement positifs au niveau de l'estomac (220/320 et 274/320) ou au niveau des glandes salivaires (196/320 et 216/320).

La dissection permet de détecter significativement plus de glandes salivaires infestées (246/320) que l'épreuve ELISA (174/320) avec l'AcS/TD ($\chi^2 = 7,49$ pour 1 ddl). Lors de l'utilisation de l'AcS/GS, la technique parasitologique et la technique immunologique (212/320) détectent autant d'infestation au niveau des glandes salivaires.

Les conclusions sont les mêmes sur les infestations parasitaires au niveau du tube digestif. L'AcS/GS apparaît plus fiable, par rapport à la dissection, que l'AcS/TD. Une fois encore, cette observation découle de l'utilisation de l'AcL/GS.

Les moustiques sains sont classés immunologiquement négatifs à 83% avec l'AcS/TD et 98% avec l'AcS/GS. Cette spécificité est donc proche de 100%, avec l'AcS/GS, aux seuils précédemment cités.

Il faut également noter que parmi les moustiques déterminés comme positifs lors des dissections, certains sont révélés négatifs en ELISA. Ces "faux négatifs" pourraient correspondre à des moustiques très faiblement infestés ou éventuellement à moustiques insuffisamment broyés. Inversement, des moustiques négatifs à la dissection se sont révélés immunologiquement positifs, laissant apparaître soit les limites de l'épreuve ELISA, soit des faiblesses de l'oeil humain lors de longues séances de dissection, ou l'apparition d'une protéine révélée par les anticorps.

3.5. Les valeurs diagnostiques.

L'efficacité du dosage ELISA en double sandwich est évaluée grâce à trois paramètres, la valeur prédictive d'un diagnostic positif (VPD+), la valeur prédictive d'un diagnostic négatif (VPD-) et la valeur globale (VG). Les résultats sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Les valeurs diagnostiques de l'épreuve ELISA selon les anticorps anti-sporozoïtes immatures (AcS/TD) ou anti-sporozoïtes matures (AcS/GS).

	AcS/TD		AcS/GS	
	oocystes	glandes salivaires	oocystes	glandes salivaires
VPD+	90,45%	88,78%	85,40%	98,15%
VG	80,63%	70,63%	85,63%	88,13%
VPD-	82,95%		97,73%	

La valeur prédictive du diagnostic positif est plus élevée avec les antigènes pour lesquels les anticorps souris sont spécifiques, à savoir les femelles infestées en stade oocystes pour l'AcS/TD et celles en stade glandes salivaires pour l'AcS/GS, tout comme l'étaient les valeurs de fiabilité et de spécificité. La valeur globale de notre méthode est plus fiable avec l'anticorps anti-sporozoïte mature, et dépend ainsi de la relation sensibilité-spécificité.

3.6. Discussion.

Au cours de la mise au point du titrage des antigènes de sporozoïtes par l'ELISA, nous avons obtenu une reproductibilité satisfaisante d'une plaque à l'autre. Burkot *et al.* (1984 a ; 1984 b) décrivent ce même phénomène lors du dosage des antigènes de sporozoïtes par la technique ELISA en double sandwich. Cependant, il est courant qu'une mauvaise reproductibilité soit observée lors de dosages immuno-enzymatiques (Boudin *et al.*, 1988) ou radio-immunologiques (Collins *et al.*, 1984 ; 1985) des antigènes sporozoïtaires.

Diverses solutions ont été proposées, à savoir l'utilisation d'agents couplants pour que les anticorps s'adsorbent mieux sur le plastique (Stocker et Heusser, 1979) ou l'application d'un coefficient de correction (Boudin *et al.*, 1988). Nous n'avons pas appliqué ce coefficient de correction lors du traitement des données préconisé pour pallier cet inconvénient.

Le seuil de détection de notre technique, ou sensibilité, a été fixé à 6 000 sporozoïtes / moustique. Les seuils de détection cités dans la littérature sont généralement variables, de 300 sporozoïtes / moustique (Burkot *et al.*, 1984 a ; 1984 b) à 1200 sporozoïtes / moustique (Boudin *et al.*, 1988) en ELISA à double sandwich, et de 500 à 1000 sporozoïtes / moustique en radio-immunologie (Collins *et al.*, 1984).

Notre seuil, six fois plus élevé, est essentiellement dû à la gamme de sporozoïtes et aux anticorps que nous avons utilisés.

Les sporozoïtes choisis pour établir la gamme de référence sont des sporozoïtes matures. La suspension standard de sporozoïtes contient des parasites isolés de femelles par centrifugation. La quantité de débris appartenant aux moustiques est ainsi limitée. Lors du dosage ELISA, les échantillons de moustiques contiennent non seulement des parasites mais également des débris cuticulaires ou autres provenant des anophèles. La gamme de référence des sporozoïtes permet donc une approximation de la quantité d'antigènes sporozoïtaires dans chaque échantillon. D'autre part, la même gamme de référence est utilisée lors des dosages avec l'AcS/TD et l'AcS/GS.

Les antigènes utilisés pour l'immunisation étaient composés non seulement de protéines de sporozoïtes et de moustiques. L'épuisement des anticorps avec des moustiques sains a amélioré leur spécificité mais cette dernière est loin d'être parfaite. Les anticorps ainsi fabriqués ont pour cible principale les sporozoïtes, mais aussi d'autres cibles qui diminuent la sensibilité du dosage.

En effet, les techniques ELISA actuellement développées pour le diagnostic des infestations parasitaires (Wijesundera *et al.*, 1990 ; Chardès *et al.*, 1991) ou à virus (Naot et Remington, 1981) sont basées sur l'utilisation des anticorps monoclonaux. Dans le cas du paludisme, la mise en évidence des sporozoïtes chez le moustique repose sur la détection de la protéine sporozoïtaire majoritaire, la "circum-sporozoite protein" (CSP). Cette protéine a été isolée, séquencée (Nardin *et al.*, 1982 ; Fine *et al.*, 1984 ; Nussenzweig et Nussenzweig, 1985 ; Golenda *et al.*, 1991) pour obtenir des anticorps monoclonaux (Zavala *et al.*, 1982 ; 1983 ; Wirtz *et al.*, 1987). Le gène codant pour la CSP d'espèces de *Plasmodium* humains ou murins a été cloné (Dame *et al.*, 1984 ; Enea *et al.*, 1984 ; Wortman *et al.*, 1989) et des peptides synthétiques permettent la fabrication d'anticorps encore plus sensibles (Zavala *et al.*, 1986).

De plus, la fiabilité relative de notre méthode a été déterminée par rapport à une méthode parasitologique (dissection) de référence. Il faut rester prudent lors de l'interprétation des divers résultats car les faibles infestations peuvent passer inaperçues au niveau du tube digestif ou des glandes salivaires, surtout lorsque ces dernières ne sont pas écrasées entre lame et lamelle. Si l'on considère par conséquent que les moustiques déterminés "faux positifs" en ELISA étaient en réalité infestés mais non détectés à la dissection, on améliore la fiabilité de l'épreuve : 92% pour l'AcS/TD sur les stades oocystes et 100% pour l'AcS/GS sur les stades glandes salivaires.

Ainsi, la fiabilité de l'épreuve ELISA nous paraît sous évaluée. La même remarque est faite par divers auteurs (Burkot *et al.*, 1984 a ; Boudin *et al.*, 1988).

La spécificité est proche de 100% mais ne l'atteint pas. Les densités optiques relatives aux moustiques sains sont inférieures à celles des moustiques infestés mais cette différence est beaucoup moins marquée que si nous avons utilisé des anticorps monoclonaux (Burkot *et al.*, 1984 a ; 1984 b). Ceci confirme la présence de protéines de moustiques reconnues par nos anticorps, moins importante avec l'AcS/GS, où la spécificité atteint 97,73% (contre 82,95% pour l'AcS/TD).

Les valeurs diagnostiques sont en rapport avec les valeurs de sensibilité et de fiabilité de notre titrage immuno-enzymatique.

La CSP mature apparaît, après l'ingestion de gamétocytes par les moustiques, au niveau du tube digestif car des femelles dépourvues de parasites dans les glandes salivaires sont immunologiquement positives avec l'AcS/TD et l'AcS/GS. L'intervalle de temps entre l'ingestion de gamétocytes et l'apparition de la CS protéine mature est de l'ordre de 10 à 12 jours (Burkot *et al.*, 1984 a ; 1984 b ; Boudin *et al.*, 1988). La quantité de CSP mature détectée au niveau des glandes salivaires est supérieure à celle au niveau du tube digestif, confirmant ainsi l'apparition de cette protéine avant que les sporozoïtes ne se trouvent dans les glandes salivaires (Aikawa *et al.*, 1981 ; Robert *et al.*, 1988 ; Golenda *et al.*, 1991). Cependant, il est

apparu que des thorax ne contenant plus les deux paires de glandes salivaires se révèlent positifs en IRMA (Lombardi *et al.*, 1987) ou en ELISA (Beier *et al.*, 1987 ; 1991 a), surestimant ainsi le nombre de moustiques épidémiologiquement dangereux. La présence de CSP libres dans l'hémolymph reste cependant un phénomène très controversé (Vanderberg *et al.*, 1972).

4. La détection des antigènes sporozoïtares chez les anophèles inoculés.

Des sporozoïtes immatures et matures ont été introduits artificiellement dans des femelles saines, dans le but d'étudier la capacité des sporozoïtes à migrer vers les glandes salivaires d'un hôte où ils n'ont pas débuté leur développement.

La méthode ELISA, malgré ses caractéristiques, nous a permis de suivre ces sporozoïtes et d'évaluer leur nombre à partir de la quantité d'antigènes de sporozoïtes détectés. Nous avons comparé ces résultats avec ceux obtenus par la dissection.

4.1. Les sporozoïtes immatures.

Les résultats portent sur un lot homogène de 157 femelles saines âgées de 24 heures (J1), et inoculées avec environ 200 sporozoïtes par femelle.

Les femelles sont gardées en observation, groupées par lot de 10. On procède régulièrement à des dissections, soit 48 heures, 3, 5 et 7 jours après l'injection des parasites. Chaque femelle disséquée est reprise dans un tube et congelée avant d'être dosée en ELISA (tableau 4).

Sept jours après l'injection des sporozoïtes, nous avons offert un repas de sang, sur des souris saines aux femelles, pour vérifier si les sporozoïtes avaient migré jusque dans les glandes salivaires.

Tableau 4 : Evolution au cours du temps des résultats parasitologiques et immunologiques des sporozoïtes immatures injectés chez des femelles saines.
(sp : nombre de sporozoïtes retrouvé par femelle, (+) : femelle immunologiquement positive, (-) : femelle immunologiquement négative).

	Dissection		ELISA	
	hémolymph	glandes salivaires	hémolymph AcS/TD	hémolymph AcS/GS
J1 (24h)	69 sp	0 sp	79 sp (+)	227 sp (+)
J2 (48H)	29 sp	0 sp	75 sp (+)	105 sp (-)
J3	2 sp	0 sp	63 sp (+)	72 sp (-)
J5	0 sp	0 sp	25 sp (-)	43 sp (-)
J7	0 sp	0 sp	25 sp (-)	46 sp (-)

De 24 heures à 7 jours après l'injection de sporozoïtes vivants dans l'hémolymph, aucun parasite n'est retrouvé dans les glandes salivaires des femelles.

Quelques sporozoïtes sont retrouvés vivants dans l'hémolymph 24 heures après leur injection, alors que 2 jours après, ils apparaissent morts. A partir du troisième jour, l'analyse microscopique ne permet plus de les visualiser.

L'examen immunologique de ces mêmes moustiques révèle la présence d'antigènes de sporozoïtes dans les femelles durant un intervalle de temps dépendant de l'anticorps anti-sporozoïte utilisé.

La parasitémie des souris sur lesquelles les femelles inoculées s'étaient gorgées a été négative cinq jours après. Cette absence d'infection confirme la non migration des sporozoïtes immatures dans les glandes salivaires.

4.2. Les sporozoïtes matures.

Les résultats portent sur un lot homogène de 134 femelles saines âgées de 24 heures et inoculées avec environ 200 sporozoïtes matures par femelle.

Les femelles sont gardées en observation par lots de 10, disséquées (48 heures, 3, 5 et 7 jours après), puis reprises dans des tubes et congelées avant d'être dosées en ELISA.

Sept jours après l'injection de parasites, nous avons offert des souris saines aux femelles pour vérifier, par l'infestation naturelle, la présence de sporozoïtes dans les glandes salivaires.

Les résultats parasitologiques et immunologiques figurent dans le tableau 5.

Tableau 5 : Evolution au cours du temps des résultats parasitologiques et immunologiques des sporozoïtes matures injectés chez des femelles saines.

(sp : nombre de sporozoïtes retrouvé par femelle, (+) : femelle immunologiquement positive, (-) : femelle immunologiquement négative).

	Dissection		ELISA	
	hémolymph	glandes salivaires	hémolymph AcS/TD	hémolymph AcS/GS
J1 (24h)	12 sp	0 sp	124 sp (+)	223 sp (+)
J2 (48H)	9 sp	0 sp	122 sp (+)	228 sp (+)
J3	9 sp	0 sp	103 sp (+)	223 sp (+)
J5	2 sp	0 sp	116 sp (+)	240 sp (+)
J7	0 sp	0 sp	106 sp (+)	223 sp (+)

Au cours du temps, de 24 heures à 7 jours après l'injection de parasites vivants, aucun sporozoïte n'est retrouvé dans les glandes salivaires des femelles.

Quelques sporozoïtes sont retrouvés vivants dans l'hémolymph 24 heures après leur injection, alors que 2 jours après, ils apparaissent morts. Contrairement aux sporozoïtes immatures, les sporozoïtes matures se retrouvent dans l'hémolymph jusqu'à la fin de l'expérience. Cette observation est confirmée la méthode ELISA. La présence d'antigènes de sporozoïtes dans l'hémolymph des femelles ne peut pas être mise en relation avec la présence des sporozoïtes dans les glandes salivaires.

La parasitémie des souris sur lesquelles les femelles inoculées s'étaient gorgées a été négative cinq jours après le repas de sang. Cette fois encore, les sporozoïtes ne semblent pas capables de migrer vers les glandes salivaires d'un hôte où ils n'ont pas effectué leur développement.

4.3. Discussion.

Les sporozoïtes, immatures ou matures, inoculés dans l'hémolymph de femelles saines n'ont jamais été retrouvés dans les glandes salivaires de ces moustiques. Cet état de fait a été doublement confirmé, grâce aux dissections et à l'analyse des frottis sanguins des souris sur lesquelles les femelles inoculées s'étaient gorgées.

Pt. knowlesi { *A. dirus* - *A. freeborni* }
non dans les GS : infecté
recouvert de GS : infecté

Nous avons obtenu des résultats semblables à ceux décrits avec *P. knowlesi* chez *A. freeborni* ; les sporozoïtes injectés ne migrent pas dans les glandes salivaires de cette espèce, alors qu'ils migrent chez *A. dirus* (Rosenberg, 1985).

La littérature rapporte également des observations contraires. *P. gallinaceum* et *P. fallax* se développent normalement chez *Aedes aegypti* et *A. albopictus* jusqu'à la formation de sporozoïtes et la migration dans les glandes salivaires, alors que le parasite est inoculé aux stades gamétocytes, oocystes ou sporozoïtes (Weathersby, 1952 ; 1960). Le passage au travers du tube digestif n'est donc pas obligatoire, et l'hémolymph ou divers organes (Weathersby, 1954) suffisent au développement du *Plasmodium*. Chez deux espèces de *Culex* réfractaires au *Plasmodium*, le développement parasitaire ne s'effectue pas, la barrière stomacale franchie (Weathersby, 1952 ; 1960). Weathersby conclut que les facteurs qui gouvernent la sensibilité d'une espèce sont systémiques et non restreints à un organe (Weathersby, 1960 ; Weathersby et McCall, 1968). Des essais ont même été réalisés en injectant des zygotes de *Plasmodium* chez des *A. aegypti* mâles : le développement des oocystes se produit, ainsi que la formation des sporozoïtes et leur migration dans les glandes salivaires (Rosenberg, 1984).

5. Discussion, conclusion.

En épidémiologie du paludisme, le facteur entomologique le plus important est l'indice sporozoïtaire, c'est-à-dire la proportion de moustiques porteurs de sporozoïtes infectants dans une population vectrice (in Danis et Mouchet, 1991). Cependant, ce facteur est très difficile à appréhender par les techniques parasitologiques classiques. Elles impliquent de toujours travailler sur du matériel frais, extraire les glandes salivaires et les analyser individuellement au microscope. C'est un travail laborieux qui demande énormément de temps, d'habileté et de patience car le taux d'infection des moustiques dans la nature est souvent très faible (Pampana, 1963).

La fabrication d'anticorps monoclonaux spécifiques des protéines de surface des sporozoïtes plasmodiaux a permis de développer des techniques immunologiques très sensibles (Zavala *et al.*, 1982). De par leur très haute spécificité et leur stabilité, les anticorps sont des outils puissants pour appréhender certains paramètres épidémiologiques dans le cas du paludisme ou d'autres maladies parasitaires. C'est ainsi que des anticorps monoclonaux sont produits pour détecter les espèces de plasmodies humaines, et certaines simiennes ou murines

(Yoshida *et al.*, 1980 ; Cochrane *et al.*, 1982 ; Nardin *et al.*, 1982).

Les techniques immunologiques, basées sur la détection de la CSP chez les *Anophelinae*, ont été adoptées par les entomologistes de terrain depuis le milieu des années 80 (Zavala *et al.*, 1982 ; Collins *et al.*, 1984 ; Beier *et al.*, 1988 a ; 1988 b). Elles permettent de mettre en évidence la présence de l'antigène CS chez le moustique, d'estimer ainsi la quantité de sporozoïtes et même d'identifier l'espèce de *Plasmodium* en cause. Ce type de résultats est d'autant plus fiable que l'anticorps utilisé pour le dosage immuno-enzymatique est monospécifique. L'anticorps monoclonal spécifique de la CSP de *Plasmodium yoelii yoelii* (NYS1) est fabriqué mais reste la propriété de l'armée américaine, et son utilisation nous a été refusée. Nous avons dû utiliser des anticorps polyclonaux pour tenter de mettre au point une épreuve de dosage immuno-enzymatique aussi performante que possible. Les résultats obtenus n'ont pas été à la hauteur de nos espérances. Ils restent cependant prometteurs et demandent à être complétés.

La technique ELISA en double sandwich apparaît comme un outil fiable pour détecter les antigènes de sporozoïtes, en particulier avec l'utilisation d'anticorps conjugués à la peroxydase et d'un substrat révélateur, l'orthotolidine (Bullock et Walls, 1977 ; Ambroise-Thomas et Desgeorges, 1978 ; Monget, 1978 ; Burkot *et al.*, 1984 b). Pourtant, il ne faut pas en attendre une quantification précise, surtout lors de faibles charges sporozoïtaires.

La présence de faux positifs et faux négatifs introduit un biais au niveau de l'interprétation, en ELISA comme en IRMA (Verhave *et al.*, 1988 ; Burkot *et al.*, 1984 b). Nous avons vu que l'apparition de l'antigène CS mature au niveau des sporozoïtes se produit dès 12 jours après l'ingestion de gamétocytes, c'est-à-dire avant la migration *via* l'hémolymph et la pénétration des sporozoïtes dans les glandes salivaires.

Ces observations démontrent que les moustiques immunologiquement positifs ne sont pas tous épidémiologiquement dangereux, soit porteurs de parasites dans les glandes salivaires. Le nombre de moustiques aptes à transmettre des sporozoïtes est donc surestimé en ELISA double sandwich (Robert *et al.*, 1988 ; Adungo *et al.*, 1991 ; Beier *et al.*, 1991 a ; 1991 b) comme en radio-immunologie (Collins *et al.*, 1984). Pour évaluer la charge sporozoïtaire d'un anophèle de façon plus juste, il est souhaitable de tester les parties tête-thorax et abdomen séparément, tout comme le préconisent d'autres auteurs (Beier *et al.*, 1988 a ; 1988 b ; Boudin *et al.*, 1988).

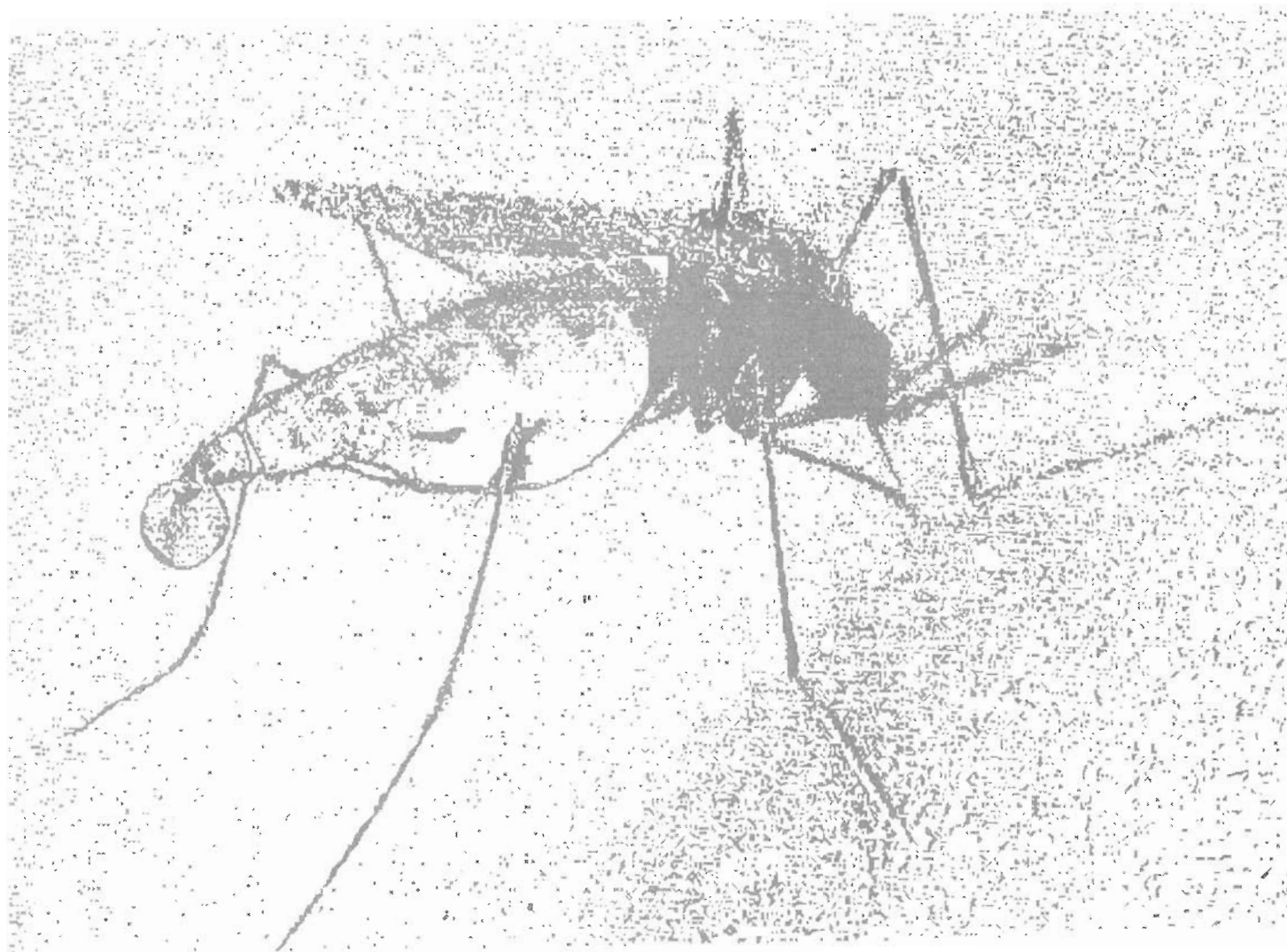
La CSP, protéine membranaire majoritaire à la surface des sporozoïtes (Fine *et al.*, 1984), fut décrite dans un premier temps comme caractéristique des sporozoïtes dans les glandes salivaires. Elle joue un rôle prépondérant lors de l'invasion des hépatocytes humains par les sporozoïtes (Vanderberg *et al.*, 1972 ; Sina et Hollingdale, 1991). Des travaux plus récents indiquent qu'il existe deux antigènes CS, l'un immature sur les sporozoïtes en formation dans les oocystes, et l'autre mature, principalement sur les sporozoïtes des glandes salivaires. La CSP mature apparaît en fait dès le stade oocyste (Aikawa *et al.*, 1981 ; Boulanger *et al.*, 1988 ; Golenda *et al.*, 1991) mais son rôle dans la physiologie et l'immunité du parasite n'est que supposé (Vanderberg *et al.*, 1972 ; Sina et Hollingdale, 1991). De plus, nous savons qu'environ 20% des sporozoïtes immatures émis par les oocystes se retrouvent dans les glandes salivaires (Rosenberg et Rungsiwongse, 1991). La synthèse des deux antigènes CS est donc excédentaire, mais néanmoins nécessaire au bon développement du parasite.

Nous avons entrepris ce travail car nous avons émis l'hypothèse que ces antigènes jouent un rôle au niveau de l'hémolymphe du moustique, soit pour déjouer le système immunitaire, soit pour le déprimer. Cependant, les résultats récoltés jusqu'alors ne permettent pas de vérifier cette hypothèse. Il serait donc utile de préciser le développement du *Plasmodium* chez l'anophèle, et ce par le biais de deux méthodes complémentaires. La méthode parasitologique (dissection) fixerait la charge parasitaire et le dosage immuno-enzymatique apporterait les informations nécessaires sur le passage des antigènes CS immatures aux matures. Les efforts devront se concentrer au niveau de l'hémolymphe, là où le parasite se retrouve au contact du système immunitaire de l'anophèle.

Les phénomènes qui aboutissent à la sensibilité d'un moustique vis-à-vis d'un parasite sont très complexes, et apparaissent différents d'une espèce à l'autre. Les lectines de plantes et d'invertébrés ont été utilisées ces dernières années comme marqueurs de résidus sucrés sur les surfaces cellulaires (Ingram et Molyneux, 1990). Chez l'anophèle, la composition membranaire en résidus sucrés des glandes salivaires varie d'une espèce à l'autre, mais aussi à l'intérieur d'une même espèce. C'est le cas pour *A. stephensi* (Mohamed *et al.*, 1991), chez lequel le développement de *P. yoelii* s'effectue en 14 jours (Coosemans *et al.*, 1981) et les sporozoïtes s'accumulent dans les parties distales des glandes salivaires (Sterling *et al.*, 1973).

Les liaisons entre résidus sucrés et lectines sont considérées comme partie intégrante des phénomènes par lesquels les sporozoïtes reconnaissent et s'attachent aux cellules de leur hôte avant de les envahir (Howard *et al.*, 1982 ; Jungery, 1985), et il semble qu'ils reconnaissent les résidus sucrés présents à la surface des glandes salivaires avant de les envahir (Perrone *et al.*, 1986). Pourtant, des études ont montré que les sporozoïtes, tout comme les ookinètes (Rudin et Hecker, 1989) sont incapables de se lier aux lectines par défaut de résidus sucrés à leur surface (Schulman *et al.*, 1980). De plus, la composition membranaire en sites récepteurs de lectines

des glandes salivaires d'une femelle saine ou infesté par *P. berghei* est la même (Mohamed *et al.*, 1991). Les sporozoïtes sont éliminés de l'hémolymph en 3 jours, sans participation apparente des hémocytes. Ces résultats vont dans le sens de ceux décrits chez *A. freeborni*. Les sporozoïtes inoculés à des hôtes sains n'ont jamais migré dans les glandes salivaires (Rosenberg, 1985). Malgré leur capacité à se mouvoir (Vanderberg, 1974), les sporozoïtes semblent incapables de migrer vers les glandes salivaires d'un hôte sensible et non infesté.



CONCLUSION GENERALE

En 1992, deux milliards d'individus vivent dans des zones où le paludisme sévit depuis des années ou réapparaît. Chaque année dans le monde on dénombre 100 millions de nouveaux cas (OMS, 1992 a ; 1992 b).

L'OMS, durant les années 60, a cru s'être donné les moyens d'éradiquer la maladie avec les insecticides de synthèse et les substances antimalariques. Malheureusement, on déplora très vite l'apparition des chimiorésistances des *Plasmodium*, l'extension de la résistance des anophèles aux insecticides, la résurgence du paludisme dans certaines régions et l'absence de stratégies de lutttes efficaces dans les zones hyperendémiques.

Depuis lors, les paludologues se sont fixés comme seul but de contrôler la malaria. Les programmes de lutte tentent donc de diminuer la densité et de réduire les taux d'infestations des populations vectrices.

Mais comment espérer contrôler le paludisme quand les firmes pharmaceutiques se détournent de la recherche de nouveaux antipaludiques, quand les programmes de lutte favorisent la résistance des vecteurs, des plasmodies et la recrudescence de la maladie, quand la vaccination promise est irréalisable dans l'état actuel de nos connaissances, et surtout quand les recherches parallèles entre le terrain et les laboratoires se heurtent à des conflits de personnes ?

Les travaux entrepris sur le modèle plasmodial pour l'élaboration d'un vaccin révèlent que la biochimie des *Plasmodium* est très complexe (Tibayrenc et Ayala, 1991). La simplicité des descriptions parasitologiques cachait en réalité la multiplicité des antigènes parasitaires, leurs associations complexes au cours des différentes phases évolutives des *Plasmodium*, et leurs subtiles implications dans les phénomènes de reconnaissance de l'hôte... (Jakstys *et al.*, 1974 ; Hollingdale *et al.*, 1990 ; Sina et Hollingdale, 1991).

Les recherches sur la compétence vectorielle commencent seulement à retenir l'attention du monde scientifique car à terme, elles peuvent aboutir à des nouvelles perspectives en matière de lutte contre le paludisme (Brey, 1991 ; Collins *et al.*, 1991). Cependant, les domaines de la physiologie, de la génétique et de l'immunité des relations *Anopheles-Plasmodium* restent encore très mal connus.

C'est dans un tel contexte que nous avons entrepris d'étudier certains aspects des relations hôte-parasite sur un des principaux vecteurs du paludisme humain dans les régions orientales, *Anopheles stephensi*. Cet anophèle, facilement élevé en laboratoire, est un très bon vecteur de plasmodies de rongeurs, et plus particulièrement de *Plasmodium yoelii yoelii*.

Les diverses méthodes utilisées pour la réalisation de ce travail ont été choisies dans l'optique d'obtenir des éléments d'informations sur les relations intimes entre le moustique et son parasite, pouvant déboucher à terme sur un espoir d'interrompre le développement parasitaire.

Comparées à d'autres espèces de *Culicidae* vectrices d'agents pathogènes, les espèces anophéliennes sont peu étudiées en laboratoire, sans doute à cause de leur fragilité et de leur petite taille, et avec toutes les difficultés de manipulations que cela entraîne.

Notre étude montre que malgré cela, les anophèles peuvent être utilisés comme support d'études sur la compétence vectorielle, au même titre que d'autres couples vecteurs-parasites. Certaines techniques histologiques, enzymatiques ou immunologiques peuvent être adaptées à de tels moustiques et permettre d'obtenir des résultats prometteurs.

L'étude cytologique de l'hémolymphe d'*Anopheles stephensi* adultes a été réalisée pour la première fois, à partir d'observations complémentaires en microscopie optique et électronique. Elle a permis de constater que ces moustiques ont une histologie sanguine comparable à celle décrite chez des larves ou des adultes de divers autres insectes.

Nous avons mis en évidence différentes catégories d'hémocytes, les cellules immunitaires de l'insecte, et étudié leur morphologie et leurs fonctions. Les hémocytes d'*A. stephensi* sont bien présents en circulation dans l'hémolymphe et peuvent être divisés en deux grandes catégories, les hémocytes sans granules et les hémocytes avec granules (Brehélin et Zachary, 1986). Ainsi, les prohémoscytes et les oenocytoïdes sont sans granules et les plasmatocytes macrophages sont classés parmi les hémocytes granuleux. De plus, l'hémolymphe d'*A. stephensi* présente une particularité avec la présence d'adipohémocytes. Leur existence en tant qu'hémocyte particulier est très controversée à l'heure actuelle (Amouriq, 1960 ; Bronskill, 1962 ; Foley, 1978).

Diverses autres cellules circulantes ont également été observées dans l'hémolymphe. L'étude ultrastructurale indique qu'elles ne correspondent pas à des types d'hémocytes décrits dans la littérature et qu'il s'agit en fait d'adipocytes et de cellules à "double membrane". Leur présence en circulation dans l'hémolymphe est un artéfact qui résulte des traumatismes subis par les tissus de l'insecte lors des manipulations de prélèvements d'hémolymphe. ×

Nous avons, ensuite, étudié le rôle des hémocytes dans les réactions de défense du moustique vis-à-vis de corps étrangers introduits artificiellement dans l'hémolymph. Les cellules sanguines, et en particulier les adipohémocytes, interviennent dans le processus de phagocytose. *A. stephensi*, considéré comme un insecte pauvre en hémocytes avec moins de 4000 cellules par mm³ d'hémolymph. Il doit donc réagir au "non-soi" par un encapsulement humoral (Götz *et al.*, 1977). Si cette réaction immunitaire est mise en évidence chez d'autres espèces de *Culicidae*, *Aedes* et *Culex* (Drif et Brehélin, 1983), il n'en est pas de même chez l'anophèle à partir de nos observations. Les corps étrangers, sporozoïtes et hématies, introduits dans l'hémolymph des femelles étaient sans doute en trop faible concentration. Il convient cependant de rester prudent car nous ne pouvons conclure à une absence de réaction immunitaire.

Les résultats recueillis lors du dosage colorimétrique des estérases totales montrent que les relations *Anopheles-Plasmodium* peuvent être appréhendées par le biais des réactions enzymatiques. De plus, la cascade phénoloxydasique, composante essentielle du phénomène d'encapsulation humorale chez les diptères, peut être étudiée à un autre niveau que celui de la prophénoloxydase.

Les taux d'estérases évalués au cours de la vie des anophèles mâles et femelles, dans les conditions d'élevage, servent d'image enzymatique de référence. Ils indiquent que les femelles ayant pris un repas de sang sur des souris impaludées présentent certaines "anomalies" par rapport aux femelles nourries sur une souris saine.

La présence du *Plasmodium* perturbe la prise du repas de sang, et semble influencer l'activité estérasique de l'hôte. Au cours du repas, les femelles prélèvent un volume de sang impaludé plus faible que lorsque ce dernier est sain. De plus, lors de la migration des sporozoïtes du tube digestif vers les glandes salivaires, *via* l'hémolymph, on observe une baisse significative dans la concentration d'estérases des femelles infestées.

L'introduction de corps étrangers, dans l'hémolymph des femelles saines, se traduit par une réaction immédiate de la part des moustiques adultes. Les taux d'estérases augmentent rapidement, dans un délai d'une heure après l'inoculation. Les anophèles sont donc capables de reconnaître le "soi" du "non-soi" et d'y répondre, en particulier, par une augmentation d'activité enzymatique.

L'étude cytologique n'a pas mis en évidence de dépôt mélanique autour des corps étrangers. Nous ne pouvons donc pas conclure, en l'état actuel de nos connaissances, à la présence ou la déficience d'encapsulation humorale chez *A. stephensi*.

Enfin, le dosage des antigènes sporozoïtaires de *Plasmodium yoelii yoelii* par une technique immuno-enzymatique (ELISA) indique^{g. n.} cet outil de travail peut être adapté à des systèmes hôte-parasite variés et apporter des éléments d'informations.

La technique ELISA en double sandwich, adaptée à la détection des antigènes de sporozoïtes dans le moustique, nous paraît une épreuve fiable et efficace à condition de ne pas attendre de résultats quantitatifs. Les anticorps anti-sporozoïtes fabriqués au laboratoire sont dirigés en majorité contre les antigènes de sporozoïtes mais aussi contre diverses protéines solubles de moustiques. Malgré l'épuisement de ces anticorps par des protéines de moustiques, ils restent polyclonaux. Cela implique que la spécificité (83% pour l'AcS/TD et 98% pour l'AcS/GS) et la fiabilité (71% et 81% pour l'AcS/TD et 88% et 86% pour l'AcS/GS) de notre titrage soient plus faibles que ce qu'elles devraient être (100%). Cela implique également que le seuil de détection minimal soit très élevé (6 000 sporozoïtes / moustique) par rapport à celui des auteurs qui ont utilisé des anticorps monoclonaux (Burkot *et al.*, 1984 ; Boudin *et al.*, 1988).

Néanmoins, les résultats recueillis permettent de confirmer que l'antigène CS mature, caractérisant la surface des sporozoïtes dans les glandes salivaires, se met en place bien avant, lorsque les sporozoïtes sont encore dans les oocystes, au niveau du tube digestif. Nous n'avons pas obtenu d'informations sur la présence de protéines CS dans l'hémolymph et leurs possibles relations avec le système immunitaire des anophèles. Le corps des moustiques dosés en ELISA a été séparé en deux, soit la partie tête-thorax avec les glandes salivaires, et la partie abdomen avec le tube digestif. Cette séparation n'apparaît pas suffisamment fine, et il aurait été souhaitable d'isoler l'hémolymph de chacun des moustiques et de la tester séparément.

La dissection classique des moustiques a permis de comparer les résultats avec les informations issues de l'épreuve ELISA. L'ELISA permet un gain de temps énorme car les moustiques peuvent être conservés congelés à -80°C et être dosés par grandes quantités. La dissection impose, quant à elle, d'avoir du matériel frais et de l'analyser sur le champ. En revanche, l'ELISA présente deux inconvénients majeurs, la présence de "faux positifs" et de "faux négatifs". De tels résultats correspondent à des moustiques identifiés différemment selon la technique employée, mais ils vont de pair avec les caractéristiques de notre titrage immuno-enzymatique. Il faut donc bien définir par avance ce que l'on souhaite obtenir comme résultat.

La technique ELISA devait également nous permettre de détecter et de suivre le devenir de sporozoïtes injectés dans un moustique différent de celui chez lequel ils effectuaient leur développement normal. Nous pouvons dire qu'aucun des sporozoïtes injectés au niveau de l'hémolymph n'a été retrouvé dans les glandes salivaires de son nouvel hôte. Il semble que

soit les sporozoïtes de *P. y. yoelii* ne sont pas capables de migrer vers les glandes salivaires d'un nouvel hôte, soit ils sont détruits par un "facteur anti-*plasmodium*" comme le pressentaient Weathersby et Mac Croddan (1982). Ils sont éliminés de l'hémolymphe en trois à quatre jours.

Les perspectives de recherches

Dans un premier temps, nous citerons l'importance des études cytologiques de l'hémolymphe des anophèles mais aussi d'autres insectes vecteurs d'agents pathogènes. Comment parvenir à interrompre le développement des parasites dans leurs hôtes alors que les connaissances acquises se bornent à des descriptions morphologiques ? Comment obtenir des informations sur les relations hôte-parasite en étudiant les larves alors que ce sont les adultes femelles et/ou mâles, selon l'espèce, qui véhiculent les agents pathogènes ?

La composition cellulaire du système immunitaire chez les femelles adultes d'*A. stephensi* étant maintenant définie, il est certain que les recherches dans le domaine des réactions immunitaires du moustique doivent être poursuivies afin de déterminer les types de réactions de défense impliqués.

Les adipohémocytes interviennent dans le phénomène de phagocytose, mais d'autres hémocytes, comme les plasmotocytes macrophages, pourraient également y participer. ✕

Il reste à déterminer, pour les corps étrangers de grande taille, le type d'encapsulation mise en jeu. Etant donnée la faible quantité d'hémocytes chez les *Culicidae*, l'encapsulation ne saurait être cellulaire mais plutôt humoral, c'est-à-dire sans participation apparente d'hémocytes. Les enzymes intervenant dans le métabolisme des substances mélaniques déposées autour des corps étrangers doivent toutes être identifiées puis étudiées.

Il est vraisemblable que des facteurs humoraux interviennent et contrôlent également le développement parasitaire, mais ils restent à déterminer.

La biologie moléculaire offre aujourd'hui des outils de travail performants. Nous avons vu que certaines méthodes immunologiques peuvent être adaptées à des systèmes vecteur-parasite autres que ceux décrits habituellement. Elles permettent d'approcher le *Plasmodium* au cours de son développement dans le moustique, par le biais des antigènes parasitaires.

L'épreuve ELISA mise au point pour cette étude a donné des résultats prometteurs mais non satisfaisants.

Nous proposons d'augmenter la sensibilité et la spécificité du titrage par diverses améliorations. Il serait souhaitable, dans un premier temps, de se donner les moyens de fabriquer des anticorps anti-sporozoïtes immatures et matures monoclonaux. De plus, le dosage en double sandwich avec deux anticorps dirigés contre les sporozoïtes immatures donnerait des informations quant à l'antigène CS immature.

Par ailleurs, il serait nécessaire de se fixer sur l'hémolymphe des anophèles, surtout lors de la migration des sporozoïtes. L'antigène CS mature est soupçonné d'avoir un rôle à ce niveau, mais la preuve n'est pas encore faite.

Les mécanismes physiologiques des relations *Anopheles-Plasmodium* décrits, la recherche pourra s'orienter vers la génétique, afin d'identifier les gènes impliqués dans les réactions de défense du moustique et dans leur sensibilité au développement plasmodial. Mais il faut surtout que la recherche se donne les moyens de ne pas privilégier tel ou tel programme, et c'est au prix d'une étroite complicité entre la recherche fondamentale et appliquée que la recherche pourra espérer vaincre un jour le paludisme.

↓
se limiter de manière efficace
à des cas sporadiques

BIBLIOGRAPHIE

ADAM (J.P.), BAILLY-CHOUMARA (H.) ET HAMON (J.) -1960- Analyse statistique de deux méthodes de recherche des sporozoïtes dans les glandes salivaires des Anophèles.

C. R. Acad. Sc. Paris, t. 250 : 4073-4075.

ADAM (J.P.), LANDAU (I.) ET CHABAUD (A.G.) -1966- Découverte dans la région de Brazzaville de rongeurs infectés par des *Plasmodium*.

C. R. Acad. Sc. Paris, série D, t. 263 : 140-141.

A DUNGO (N.I.), MAHADEVAN (S.), MULAYA (N.L.), SITUBI (A.P.) AND GITHURE (J.I.) -1991- Comparative determination of *Plasmodium falciparum* sporozoite rates in afrotropical *Anopheles* from Kenya by dissection and ELISA.

Ann. Trop. Med. Parasitol., 85, 4 : 387-394.

AIKAWA (M.), YOSHIDA (N.), NUSSENZWEIG (R.S.) AND NUSSENZWEIG (V.) -1981- The protective antigen of malarial sporozoite (*Plasmodium berghei*) is a differentiation antigen.

J. Immunol., 126, 6 : 2494-2495.

AKAI (H.) AND SATO (S.) -1973- Ultrastructure of the larval hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori* L. (*Lepidoptera : bombycidae*).

Int. J. Insect Morphol. Embryol., 2, 3 : 207-231.

AKRAM (M.) AND ASLAMKHAN (M.) -1975- Production of dominant lethal mutations by gamma-irradiation in the malaria mosquito, *Anopheles stephensi*.

Pakistan J. Zool., 7, 2 : 177-184.

AL-MASHHADANI (H.M.), DAVIDSON (G.) AND CURTIS (C.F.) -1980- A genetic study of the susceptibility of *Anopheles gambiae* to *Plasmodium berghei*.

Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 74, 5 : 585-594.

ALGER (N.E.) AND CABRERA (E.J.) -1972- An increase in death rate of *Anopheles stephensi* fed on rabbits immunized with mosquito antigen.

J. Econ. Entomol., 65 : 165-168.

ALGER (N.E.) AND HARANT (J.) -1976- *Plasmodium berghei* : sporozoite challenge, protection, and hypersensitivity in mice.

Exp. Parasitol., 40 : 273-280.

AMBROISE-THOMAS (P.), BILLIAULT (X.), DESGEORGES (P.T.) ET BOUTTAZ (M.) -1981- Mise en évidence, par une microméthode immuno-enzymologique (ELISA), d'antigènes métaboliques produits *in vitro* par *Plasmodium falciparum* en culture.

WHO / MAL., 930: 1-5.

AMBROISE-THOMAS (P.) ET DESGEORGES (P.T.) -1978- Diagnostic immuno-enzymologique (ELISA) des maladies parasitaires par une microméthode modifiée.

Bull. Org. Mond. Santé, 56, 4 : 609-613.

AMOURIQ (L.) -1960- Formules hémocytaires de la larve, de la nymphe et de l'adulte de *Culex hortensis* (Dipt. Culicidae).

Bull. Soc. Ent. France, 65 : 135-139.

ANDERSON (R.S.), DAY (N.K.B.) AND GOOD (R.A.) -1972- Specific hemagglutinin and a modulator of complement in Cockroach hemolymph.

Infect. Immun., 5, 1 : 55-59.

ANDREADIS (T.G.) AND HALL (D.W.) -1976- *Neoplectana carpocapsae* : encapsulation in *Aedes aegypti* and changes in host hemocytes and hemolymph proteins.

Exp. Parasit., 39 : 252-261.

ARNOLD (J.D.), BALCERZAK (S.P.) AND MARTIN (D.C.) -1969- Studies on the red cell-parasite relationship.

Military Medicine, Special Issue, 962-971.

ASHIDA (M.) AND DOHKE (K.) -1980- Activation of pro-phenoloxidase by the activating enzyme of the silkworm *Bombyx mori*.

Insect Biochem., 10 : 37-47.

ASHIDA (M.), KINOSHITA (K.) AND BREY (P.T.) -1990- Studies on prophenoloxidase activation in the mosquito *Aedes aegypti* L.

Europ. J. Biochem., 188 : 507-515.

ASLAMKHAN (M.), AAQIL (M.) AND HAFEEZ (M.) -1972- Genetical and morphological variations in a natural population of the malaria mosquito, *Anopheles stephensi*, from Karachi, Pakistan.

WHO / VBC, 337, WHO / MAL, 762 : 1-13.

ASPAN (A.), STURTEVANT (J.), SMITH (V.J.) AND SÖDERHÄLL (K.) -1990- Purification and characterization of a prophenoloxidase activating enzyme from crayfish blood cells.

Insect Biochem., 20, 7 : 709-718.

ASPEREN (K.V.) -1962- A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method.

J. Insect Physiol., 8 : 401-416.

BALL (G.H.) -1965- Adaptation of the malaria parasite, particularly to its insect host.

Host-Parasite relationships, Ed. Mc Cauley (J.E.), Oregon State University Press : 73-96.

BALLOU (W.R.), SHERWOOD (J.A.), NEVA (F.A.), GORDON (D.M.), WRTZ (R.A.), WASSERMAN (G.F.), DIGGS (C.L.), HOFFMAN (S.L.), HOLLINGDALE (M.R.), HOCKMEYER (W.T.), SCHNEIDER (I.), YOUNG (J.F.), REEVE (P.) AND CHULAY (J.D.) -1987- Safety and efficacy of a recombinant DNA *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine.

Lancet, 1277-1281.

BANG (F.B.) -1973- Immune reactions among marine and other invertebrates.

BioScience, 23, 10 : 584-589.

BANO (L.) -1958- Partial inhibitory effect of *Plistophora culicis* on the sporogonic cycle of *Plasmodium cynomolgi* in *Anopheles stephensi*.

Nature, 181 : 430.

BATRA (C.P.) AND REUBEN (R.) -1979- Breeding of *Anopheles stephensi* (Liston) in wells and cisterns in Salem, Tamil Nadu.

Indian J. Med. Res., 70 : 114-122.

BAYNE (C.J.) -1984- Immunoparasitology : invertebrates.

Dev. Comp. Immunol., 3 : 197-204.

BAYNE (C.J.) AND YOSHINO (T.P.) -1989- Determinants of compatibility in mollusc-trematode parasitism.

Am. Zool., 29 : 399-407.

BEAUDOIN (R.L.) AND STROME (C.P.A.) -1973- *Plasmodium lophurae* : the ultrastructure of the exoerythrocytic stages.

Exp. Parasitol., 34 : 313-336.

BEAUDOIN (R.L.), STROME (C.P.A.) AND TUBERGEN (T.A.) -1974- *Plasmodium berghei berghei* : ectopic development of the ANKA strain in *Anopheles stephensi*.

Exp. Parasitol., 36 : 189-201.

BEAULATON (J.) -1979- Hemocytes and hemocytopoiesis in silkworms.

Biochimie, 61 : 157-164.

BEIER (J.C.), ASIAGO (C.M.), ONYANGO (F.K.) AND KOROS (J.K.) -1988 a- Elisa absorbance cut-off method affects malaria sporozoite rate determination in wild Afrotropical *Anopheles*.

Med. Vet. Entomol., 2 : 259-264.

BEIER (J.C.), COPELAND (R.S.), ONYANGO (F.K.), ASIAGO (C.M.), RAMADHAN (M.), KOECH (D.K.) AND ROBERTS (C.R.) -1991 a- *Plasmodium* species identification by ELISA for sporozoites removed from dried dissection slides.

J. Med. Entomol., 28, 4 : 533-536.

BEIER (J.C.), DAVIS (J.R.), VAUGHAN (J.A.), NODEN (B.H.) AND BEIER (M.S.) -1991 b- Quantitation of *Plasmodium falciparum* sporozoites transmitted *in vitro* by experimentally infected *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi*.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 44, 5 : 564-570.

BEIER (J.C.), OSTER (C.N.), KOROS (J.K.), ONYANGO (F.K.), GITHEKO (A.K.), ROWTON (E.), KOECH (D.K.) AND ROBERTS (C.R.) -1989- Effect of human circumsporozoite antibodies in *Plasmodium*-infected *Anopheles* (Diptera : Culicidae).

J. Med. Entomol., 26, 6 : 547-553.

BEIER (J.C.), PERKINS (P.V.), KOROS (J.K.), ONYANGO (F.), GARGAN (T.P.), WIRTZ (R.), KOECH (D.K.) AND ROBERTS (C.R.) -1990- Malaria sporozoite detection by dissection and ELISA to assess infectivity of afrotropical *Anopheles* (Diptera : Culicidae).

J. Med. Entomol., 27, 3 : 377-384.

BEIER (J.C.), PERKINS (P.V.), WIRTZ (R.A.), WHITMIRE (R.E.), MUGAMBI (M.) AND HOCKMEYER (W.T.) -1987- Field evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) for *Plasmodium falciparum* sporozoite detection in Anopheline mosquitoes from Kenya.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 36, 3 : 459-468.

BEIER (M.S.), SCHWARTZ (I.K.), BEIER (J.C.), PERKINS (P.V.), ONYANGO (F.), KOROS (J.K.), CAMPBELL (G.H.), ANDRYSIAK (P.M.) AND BRANDLING-BENNETT (A.D.) -1988 b- Identification of malaria species by ELISA in sporozoite and oocyst infected *Anopheles* from western Kenya.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 39, 4 : 323-327.

BENEX (J.) AND MATRICON-GONDRAN (M.) -1981- Les mécanismes de défense des mollusques vis à vis des trématodes : point des connaissances actuelles.

Halotiss, 11 : 47-62.

BERENDT (A.R.), FERGUSON (D.J.P.) AND NEWBOLD (C.I.) -1990- Sequestration in *Plasmodium falciparum* malaria : sticky cells and sticky problems.

Parasitology Today, 6, 8 : 247-254.

BERL (D.) -1981- Etude des estérases de deux souches d'*Anopheles stephensi* Liston, une sensible aux organochlorés et l'autre résistante.

Cah. ORSTOM, sér. Ent. Méd. et Parasitol., XIX, 1 : 23-32.

BERMEJO (A.) ET VEEKEN (H.) -1992- Intérêt des moustiquaires imprégnées d'insecticides dans la lutte antipaludique : où en sont les essais sur le terrain ?

Bull. Org. Mond. Santé, 70, 4 : 415-419.

BERNER (R.), RUDIN (W.) AND HECKER (H.) -1983- Peritrophic membranes and protease activity in the midgut of the malaria mosquito, *Anopheles stephensi* (Liston) (Insecta : Diptera) under normal and experimental conditions.

J. Ultrast. Res., 83 : 195-204.

- BERNHEIMER (A.W.)** -1952- Hemagglutinins in caterpillar bloods.
Science, 115 : 150-151.
- BILLINGSLEY (P.F.)** -1990 a- Blood digestion in the mosquito *Anopheles stephensi* Liston (*Diptera : Culicidae*) : partial characterization and post-feeding activity of midgut aminopeptidases.
Arch. Insect Biochem. Physiol., 15 : 149-163.
- BILLINGSLEY (P.F.)** -1990 b- The midgut ultrastructure of hematophagous insects.
Annu. Rev. Entomol., 35 : 219-248.
- BILLINGSLEY (P.F.), HODIVALA (K.J.), WINGER (L.A.) AND SINDEN (R.E.)** -1991- Detection of mature malaria infections in live mosquitoes.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 85 : 450-453.
- BITKOWSKA (E.), DZBENSKI (T.H.), SZADZIEWSKA (M.) AND WEGNER (Z.)** -1982- Inhibition of xenograft rejection reaction in the bug *Triatoma infestans* during infection with a protozoan, *Trypanosoma cruzi*.
J. Invert. Pathol., 40 : 186-189.
- BOMAN (H.G.), BOMAN (A.) AND PIGON (A.)** -1981- Immune and injury responses in *Cecropia* pupae. RNA isolation and comparison of protein synthesis *in vivo* and *in vitro*.
Insect Biochem., 11 : 33-42.
- BOUDIN (C.), LYANNAZ (J.), BOSSENO (M.F.), CHAIZE (J.) AND CARNEVALE (P.)** -1989- Production de sporozoïtes de *Plasmodium* humains à Bobo-Dioulasso (Burkina faso).
Ann. Soc. belge Méd. Trop., 69 : 3-23.
- BOUDIN (C.), ROBERT (V.), VERHAVE (J.P.), CARNEVALE (P.) ET MEUWISSEN (J.H.E.T.)** -1988- Utilisation de la technique ELISA dans le dépistage des moustiques infectés par *Plasmodium falciparum*.
Bull. Org. Mond. Santé, 66, 1 : 87-97.
- BOULANGER (N.), MATILE (H.) AND BETSCHART (B.)** -1988- Formation of the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* in *Anopheles stephensi*.
Acta Tropica, 45 : 55-65.
- BRAMHALL (S.), NOACK (N.), WU (M.) AND LOEWENBERG (J.R.)** -1969- A simple colorimetric method for determination of protein.
Analytical biochemistry, 31 : 146-148.
- BREHELIN (M.)** -1977- Etude morphologique et fonctionnelle des hémocytes d'insectes.
Thèse d'état de l'Université Louis Pasteur, Strasbourg, 149p.
- BREHELIN (M.)** -1982- Comparative study of structure and function of blood cells from two *Drosophila* species.
Cell Tissue Res., 221 : 607-615.

- BREHELIN (M.)** -1986- Immunity in invertebrates.
Springer-Verlag Press, Berlin Heidelberg New York Tokyo, 233p.
- BREHELIN (M.)** -1990- Immunologie des invertébrés.
dans Immunologie Animale, Ed. Pastoret (P.P.), Govaerts (A.) et Bazin (H.), Médecine-
Sciences, Flammarion, Paris : 429-432.
- BREHELIN (M.) , DRIF (L.), BAUD (L.) AND BOEMARE (N.)** -1989- Insect
haemolymph : cooperation between humoral and cellular factors in *Locusta migratoria*.
Insect Biochem., 19, 3 : 301-307.
- BREHELIN (M.) AND HOFFMANN (J.A.)** 1980- Phagocytosis of inert particles in
Locusta migratoria and *Galleria mellonella* : study of ultrastructure and clearance.
J. Insect Physiol., 26 : 103-111.
- BREHELIN (M.) , HOFFMANN (J.A.), MATZ (G.) AND PORTE (A.)** -1975-
Encapsulation of implanted foreign bodies by hemocytes in *Locusta migratoria* and *Melolontha
melolontha*.
Cell Tissue Res., 160 : 283-289.
- BREHELIN (M.) AND ZACHARY (D.)** -1983- About insect plasmatocytes and granular
cells.
Dev. Comp. Immunol., 7 : 683-686.
- BREHELIN (M.) AND ZACHARY (D.)** -1986- Insect haemocytes : a new classification to
rule out the controversy.
in Immunity in Invertebrates, Ed. Brehélin (M.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg
: 36-48.
- BRENGUES (J.) ET BAIN (O.)** -1972- Passage des microfilaires de l'estomac vers
l'hémocèle du vecteur, dans les couples *Wuchereria bancrofti*-*Anopheles gambiae* A, *W.
bancrofti* -*Aedes aegypti* et *Setaria labiatopapillosa* -*A. aegypti*.
Cah. ORSTOM, sér. Ent. Méd. et Parasitol., X, 3 : 233-247.
- BRENNAN (M.D.), ROWAN (R.G.) AND DICKINSON (W.J.)** -1984- Introduction of a
functional P element into the germ line of *Drosophila hawaiiensis*.
Cell, 38 : 147-151.
- BREY (P.T.)** -1991- "The taming of the *Anopheles*" : current trends in malaria vector
research.
Annales de l'institut Pasteur, 142, 8 : 711-738.
- BREY (P.T.), LEBRUN (R.A.), PAPIEROK (B.), OHAYON (H.), VENNAVALLI (S.)
AND HAFEZ (J.)** -1988- Defense reactions by larvae of *Aedes aegypti* during infection by the
aquatic fungus *Lagenidium giganteum* (Oomycete).
Cell Tissue Res., 253 : 245-250.

BRIEGEL (H.) AND REZZONICO (L.) -1985- Concentration of blood protein during feeding by *anophelinae* mosquitoes (*Diptera : Culicidae*).

J. Med. Entomol., 22, 6 : 612-618.

BRIGGS (J.D.) -1958- Humoral immunity in lepidopterous larvae

J. Exp. zool. 138 : 155-188.

BRONSKILL (J.F.) -1962- Encapsulation of rhabditoid nematodes in mosquitoes.

Canad. J. Zool., 40 : 1269-1275.

BRUCE (M.C.), ALANO (P.) AND CARTER (R.C.) -1990- Cloning of the *P. falciparum* gene encoding a 17 kd sexual stage specific surface antigen.

VII International Congress of Parasitology, Paris, abstract S1.D 5.

BRUCE-CHWATT (L.J.) -1980- La lutte contre le paludisme. Cent ans après Laveran.

Cah. ORSTOM, sér. Ent. Méd. et Parasitol., XVIII, 2 : 149-186.

BRUNHES (M.J.) ET BRUNHES (J.) -1972- Etude histologique, chez *Mansonia uniformis* Theobald et *Anopheles gambiae* B Giles, de l'évolution de *Wuchereria bancrofti* Cobbold et des interactions entre la filaire et ces deux hôtes.

Cah. ORSTOM, sér. Ent. Méd. et Parasitol., X, 3 : 217-233.

BULLOCK (S.L.) AND WALLS (K.W.) -1977- Evaluation of some parameters of the enzyme-linked immunospecific assay.

J. Infect. Dis., 136 : S279-S285.

BURKOT (T.R.), WILLIAMS (J.L.) AND SCHNEIDER (I.) -1984 a- Identification of *Plasmodium falciparum*-infected mosquitoes by a double antibody enzyme-linked immunosorbent assay.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 33, 5 : 783-788.

BURKOT (T.R.), ZAVALA (F.), GWADZ (R.W.), COLLINS (F.H.), NUSSENZWEIG (R.S.) AND ROBERTS (D.R.) -1984 b- Identification of malaria-infected mosquitoes by a two-site enzyme-linked immunosorbent assay.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 33, 2 : 227-231.

CAMERON (G.R.) -1934- Inflammation in the caterpillars of *Lepidoptera*.

J. Pathol. Bacterial., 38 : 441-466.

CARNEVALE (P.), ROBERT (V.), LE GOFF (G.), FONDJO (E.) ET MOUCHET (J.) -1992- L'apport des moustiquaires imprégnées dans la lutte contre le paludisme.

Bull. liais. doc. OCEAC, 99 : 5-11.

CARTER (R.), GWADZ (R.W.) AND MC AULIFFE (F.M.) -1979- *Plasmodium gallinaceum* : transmission-blocking immunity in chickens. I. Comparative immunogenicity of gametocyte- and gamete-containing preparations.

Exp. Parasitol., 47 : 185-193.

CHADWICK (J.S.) -1966- The occurrence of polyphenoloxidase in the hemocytes of actively immunized larvae of the greater wax moth, *Galleria mellonella*.

J. Invert. Path., 8 : 126-127.

CHAGOT (D.), BOULO (V.), HERVIO (D.), MIALHE (E.), BACHERE (E.), MOURTON (C.) AND GRIZEL (H.) -1992- Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa : *Aschetospora*) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca : Bivalvia) : entry mechanisms.

J. Invert. Path., 59 : 241-249.

CHARDES (T.), BOURGUIN (I.), MEVELEC (M.N.), DUBREMETZ (J.F.) AND BOUT (D.) -1991- Antibody responses to *Toxoplasma gondii* in sera, intestinal secretions, and milk from orally infected mice and characterization of target antigens.

Infection and Immunity, 58, 5 : 1240-1246.

CHEN (C.C.) AND LAURENCE (B.R.) -1985- An ultrastructural study on the encapsulation of microfilariae of *Brugia pahangi* in the haemocoel of *Anopheles quadrimaculatus*.

Int. J. Parasitol., 15, 4 : 421-428.

CHERFAS (J.) -1990- Malaria vaccines : the failed promise.

Science, 247 : 402-403.

CHOUDHURY (D.S.) AND GHOSH (S.K.) -1982- Staining of sporozoites from infected mosquitoes.

Indian J. Malariol., 19 : 143-144.

CHOWDAIAH (B.N.) AND SEETHARAM (P.L.) -1975- Chromosome studies of oriental Anophelines. IV. Polytene chromosomes of *Anopheles fluviatilis*.

Mosquito News, 35, 4 : 495-500.

CHRISTENSEN (B.M.) AND FORTON (K.F.) -1986- Hemocyte-mediated melanization of microfilariae in *Aedes aegypti*.

J. Parasitol., 72 : 220-225.

CHRISTENSEN (B.M.) AND LAFOND (M.M.) -1986- Parasite-induced suppression of the immune response in *Aedes aegypti* by *Brugia pahangi*.

J. Parasitol., 72, 2 : 216-219.

CHRISTENSEN (B.M.), LAFOND (M.M.) AND CHRISTENSEN (L.A.) -1986- Defense reactions of mosquitoes to filarial worms : effect of host age on the immune response to *Dirofilaria immitis* microfilariae.

J. Parasitol., 72, 2 : 212-215.

CHRISTENSEN (B.M.), SUTHERLAND (D.R.) AND GLEASON (L.N.) -1984- Defense reactions of mosquitoes to filarial worms : comparative studies on the response of three different mosquitoes to inoculated *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* microfilariae.

J. Invert. Pathol., 44 : 267-274.

CLAMAN (H.N.) -1973- The new cellular immunology.

BioScience, 23, 10 : 576-581.

COCHRANE (A.H.) AND RICHMOND (R.C.) -1979- Studies of esterase-6 in *Drosophila melanogaster*. II. The genetics and frequency distributions of naturally occurring variants studied by electrophoretic and heat stability criteria.

Genetics, 93 : 461-478.

COCHRANE (B.J.), SANTORO (F.), NUSSENZWEIG (V.), GWADZ (R.W.) AND NUSSENZWEIG (R.S.) -1982- Monoclonal antibodies identify to protective antigens of sporozoites of *Plasmodium knowlesi*.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79 : 5651-5655.

COLLINS (F.H.), GWADZ (R.W.), KOONTZ (L.C.), ZAVALA (F.) AND NUSSENZWEIG (R.S.) -1985- Laboratory assessment of a species-specific radioimmunoassay for the detection of malaria sporozoites in mosquitoes (*Diptera : Culicidae*).

J. Med. Entomol., 22, 2 : 121-129.

COLLINS (F.H.), PASKEWITZ (S.M.) AND CREWS-OYEN (A.E.) -1991- A genetic study of *Plasmodium* susceptibility in the african malaria vector *Anopheles gambiae*.

An. Soc. Belge Méd. Trop., 71 (suppl. 1) : 225-232.

COLLINS (F.H.), PROCELL (P.M.), CAMPBELL (G.H.) AND COLLINS (W.E.) -1988- Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of *Plasmodium malariae* sporozoite in mosquitoes.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 38 : 87-91.

COLLINS (F.H.), SAKAI (R.K.), VERNICK (K.D.), PASKEWITZ (S.), SEELEY (D.C.), MILLER (L.H.), COLLINS (W.E.), CAMPBELL (C.C.) AND GWADZ (R.W.) -1986- Genetic selection of a *Plasmodium*-refractory strain of a malaria vector *Anopheles gambiae*.

Science, 234 : 607-610.

COLLINS (F.H.), ZAVALA (F.), GRAVES (P.M.), COCHRANE (A.H.), GWADZ (R.W.), AKOH (J.) AND NUSSENZWEIG (R.S.) -1984- First field trial of an immunoradiometric assay for the detection of malaria sporozoites in mosquitoes.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 33, 4 : 538-543.

CONTRERAS (C.E.) AND BEIER (J.C.) -1992- Detection of human antibodies against *Plasmodium falciparum* antigens in blood meals of anopheline mosquitoes.

J. Am. Mosq. Control Assoc., 8, 3 : 252-255.

COOSEMANS (M.) -1991- En attendant le XXI^{ème} siècle : faut-il rêver ou agir ?

Ann. Soc. belge Méd. Trop., 71, suppl. 1 : 7-16.

COOSEMANS (M.), WERY (M.), VAN MARCK (E.) AND TIMPERMAN (G.) -1981- Studies on the infectivity of *Plasmodium berghei* sporozoites in experimental hosts.

Ann. Soc. belge Méd. Trop., 61 : 349-368.

- COX (F.E.G.)** -1992- Getting into the liver.
Nature, 359 : 361-362.
- COX (F.E.G.)** -1993- That vaccine passes a trial.
Nature, 362 : 410.
- CRAMPTON (J.), MORRIS (A.), LYCETT (G.), WARREN (A.) AND EGGLESTON (P.)** -1990 a- Transgenic mosquitoes : a future vector control strategy ?
Parasitol. Today, 6, 2 : 31-36.
- CRAMPTON (J.), MORRIS (A.), LYCETT (G.), WARREN (A.) AND EGGLESTON (P.)** -1990 b- Molecular characterization and genome manipulation of the mosquito, *Aedes aegypti*.
in Molecular Insect Science, Ed. Hagedorn (H.H.), Plenum Press, New York, 1-11.
- CROSSLEY (A.C.)** -1972- The ultrastructure and function of pericardiacal cells and other nephrocytes in an insect : *Calliphora erythrocephala*.
Tissue Cell, 4, 3 : 529-560.
- DAME (J.B.), WILLIAMS (J.L.), MC CUTCHAN (T.F.), WEBER (J.L.), WIRTZ (R.A.), HOCKMEYER (W.T.) LEE MALOY (W.), HAYNES (J.D.), SCHNEIDER (I.), ROBERTS (D.), SANDERS (G.S.), REDDY (E.P.), DIGGS (C.L.) AND MILLER (L.H.)** -1984- Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*.
Science, 225 : 593-599.
- DANIS (M.) ET MOUCHET (J.)** -1991- Paludisme.
Ed. Marketing / Ellipses, Paris : 240p.
- DAVIES (E.E.), HOWELLS (R.E.) AND VENTERS (D.)** -1971- Microbial infections associated with plasmodial development in *Anopheles stephensi*.
Ann. Trop. Med. Parasit., 65, 3 : 403-408.
- DENHOLM (I.) AND ROWLAND (M.W.)** -1992- Tactics for managing pesticide resistance in Arthropods : theory and practice.
Annu. Rev. Entomol., 37 : 91-112.
- DESCHIENS (R.) AND LAMY (L.)** -1965- Aspects de l'immunité dans les infestations à *Plasmodium berghei*.
Ann. Soc. belge Méd. Trop., 45, 4 : 427-434.
- DEVONSHIRE (A.L.) AND FIELD (L.M.)** -1991- Gene amplification and insecticide resistance.
Annu. rev. Entomol., 36 : 1-23.
- DOBROKHOTOV (B.)** -1991- Alternatives to chemical methods for vector control.
Ann. Soc. belge Méd. Trop., 71, suppl. 1 : 27-33.

DORVAL (C.) AND BROWN (A.W.A.) -1970- Inheritance of resistance to fenthion in *Culex pipiens fatigans* Wied.

Bull. Org. Mond. santé, 43 : 727-734.

DRIF (L.) -1983- Etude des cellules circulantes d'insectes hématophages : ultrastructure et fonctions.

Thèse d'état de l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, 138p.

DRIF (L.) AND BREHELIN (M.) -1983- The circulating hemocytes of *Culex pipiens* and *Aedes aegypti* : cytology, histochemistry, hemograms and functions.

Dev. Comp. Immunol., 7 : 687-690.

ENEA (V.), ELLIS (J.), ZAVALA (F.), ARNOT (D.E.), ASAVANICH (A.), MASUDA (A.), QUAKYI (I.) AND NUSSENZWEIG (R.S.) -1984- DNA cloning of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite gene : amino acid sequence of repetitive epitope.

Science, 225 : 628-630.

ESSAWY (M.), MALEVILLE (A.) AND BREHELIN (M.) -1985- The hemocytes of *Heliotis armigera* : ultrastructure, functions, and evolution in the course of larval development.

J. Morphol., 186 : 255-264.

ESSLINGER (J.H.Y.) -1962- Behaviour of microfilariae of *Brugia pahangi* in *Anopheles quadrimaculatus*.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 1 : 749-758.

ETLINGER (H.M.), FELIX (A.M.), GILLESSEN (D.), HEIMER (E.P.), JUST (M.), PINK (J.R.L.), SINIGAGLIA (F.), STÜRCHLER (D.), TAKACS (B.), TRZECIAK (A.) AND MATILE (H.) -1988- Assessment in humans of a synthetic peptide-based vaccine against the sporozoite stage of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*.

J. Immunol., 140, 2 : 626-633.

FAYE (I.) -1978- Insect immunity, early fate of bacteria injected in Saturniid pupae.

J. Invert. Pathol., 31 : 19-26.

FINE (E.), AIKAWA (M.), COCHRANE (A.H.) AND NUSSENZWEIG (R.S.) -1984- Immuno-electron microscopic observations on *Plasmodium knowlesi* sporozoites : localization of protective antigen and its precursors.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 33, 2 : 220-226.

FOLEY (D.A.) -1978- Innate cellular defense by mosquito hemocytes.

in Comparative Pathobiology, Ed. Bulla (L.A.) and Cheng (T.C.), Plenum Press, New York and London, vol. 4 : 113-144.

FORTON (K.F.), CHRISTENSEN (B.M.) AND SUTHERLAND (D.R.) -1985- Ultrastructure of the melanization response of *Aedes trivittatus* against inoculated *Dirofilaria immitis* microfilaria.

J. Parasitol., 71, 3 : 331-341.

FRANCOIS (J.) -1975- L'encapsulation hémocytaire expérimentale chez le lépisme *Thermobia domestica*.

J. Insect. Physiol., 21 : 1535-1546.

FREYVOGEL (T.A.) -1980- A propos des relations hôte parasites entre moustiques et *Plasmodium*.

Cah. ORSTOM, sér. Ent. Méd. Parasitol., XVIII, 2 : 149-186.

FREYVOGEL (T.A.), HUNTER (R.L.) AND SMITH (E.M.) -1968- Nonspecific esterases in mosquitoes.

J. Histochem. Cytochem., 16, 12 : 765-790.

FREYVOGEL (T.A.) AND STAÜBLI (W.) -1965- The formation of the peritrophic membrane in *Culicidae*.

Acta Tropica, XXII, 2 : 119-147.

FRIZZI (G.), RINALDI (A.) AND BIANCHI (U.) -1975- Genetic studies on mechanisms influencing the susceptibility of anopheline mosquitoes to plasmodial infection.

Mosquito News, 35, 4 : 505-508.

FRONTALI (C.) AND PIZZI (E.) -1991- Conservation and divergence of repeated structures in *Plasmodium* genomes : the molecular drift.

Acta Leid., 60, 1 : 69-81.

GABALDON (A.) -1951- Global eradication of malaria. Changes of strategy and future outlooks.

Am.J.Trop.Med.Hyg., 10 : 124-141.

GABALDON (A.) AND ULLOA (G.) -1978- A quick and easy method to determine the sporozoite index in mosquitoes.

Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 72, 3 : 311-312.

GARNHAM (P.C.C.) -1966- Malaria parasites and other *haemosporidia*.

Blackwell scientific publications, Oxford, 431-475.

GARNHAM (P.C.C.), BIRD (R.G.) AND BAKER (J.R.) -1963- Electron microscope studies of motile stages of malaria parasites. IV. The fine structure of the sporozoites of four species of *Plasmodium*.

Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 57, 1 : 27-31.

- GARNHAM (P.C.C.), BIRD (R.G.), BAKER (J.R.), DESSER (S.S.) AND EL-NAHAL (H.M.S.)** -1969- Electron microscope studies on motile stages of malaria parasites. VI. The ookinete of *Plasmodium berghei yoelii* and its transformation into the early oöcyst.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 63, 2 : 187-194.
- GARRETT-JONES (C.)** -1964- Prognosis for interruption of malaria transmission through assessment of the mosquito's vectorial capacity.
Nature, 4964 : 1173-1175.
- GASS (R.F.)** -1977- Influences of blood digestion on the development of *Plasmodium gallinaceum* (Brumpt) in the midgut of *Aedes aegypti* (L.).
Acta Trop., 34 : 127-140.
- GENTILINI (M.), MOUCHET (J.) ET DRUILHE (P.)** -1984- Actualité du paludisme.
Pathologie Tropicale R. P., 34, 37 : 1957-1970.
- GEORGHIOU (G.P.) AND PASTEUR (N.)** -1978- Electrophoretic esterase patterns in insecticide-resistance and susceptible mosquitoes.
Entomol. Soc. Amer., 71, 2 : 201-205.
- GEORGHIOU (G.P.), PASTEUR (N.) AND HAWLEY (M.K.)** -1980- Linkage relationships between organophosphate resistance and a highly active esterase-B in *Culex quinquefasciatus* from California.
J. Econ. Ent., 73 : 301-305.
- GILL (C.A.)** -1921- The influence of humidity on the life history of moquitoes and on their power to transmit infection.
Proc. Meet. Soc., 77-87.
- GILLIAM (M.) AND SHIMANUKI (H.)** -1967- *In vitro* phagocytosis of *Nosema apis* spores by honey-bee hemocytes.
J. Invert. Path., 9 : 387-389.
- GOBERT (J.G.), POINDRON (P.), GERMAN (A.) ET SAVEL (J.)** -1972- Recherche sur le mécanisme d'action d'un inducteur viral de l'interféron dans la protection de la souris contre l'infestation massive par des formes endoérythrocytaires de *Plasmodium berghei*.
C. R. Acad. Sc. Paris, t. 274, série D, 1226-1229.
- GODSON (N.)** -1985- A la recherche d'un vaccin antipaludique.
Pour la Science, 24-31.
- GOFFINET (G.) AND GREGOIRE (C.)** -1975- Coagulocyte alterations in clotting hemolymph of *Carausius morosius* (L.).
Arch. Int. Physiol. Bioch., 83 : 707-722.
- GOLENDA (C.F.), STARKWEATHER (W.H.) AND WIRTZ (R.A.)** -1991- The distribution of circumsporozoite protein (CS) in *Anopheles stephensi* mosquitoes infected with *Plasmodium falciparum* malariae.
J. Histochem. cytochem., 38, 4 : 475-481.

- GOMORI (G.)** -1955- Preparation of buffers for use in enzyme studies.
in *Methods in Enzymology*, vol. I, Academic press, New York.
- GÖTZ (P.)** -1969- Die einkapselung von parasiten in der hämolymph von *Chironomus*-larven (*Diptera*).
Zool. Anz., suppl. 33, Verh. Zool. Ges., 610-617.
- GÖTZ (P.)** -1986- Mechanisms of encapsulation in *Diptera* hosts.
in *Immune Mechanisms in Invertebrate Vectors*, Ed. Lackie (A.M.), Oxford Science Publications, Oxford, 1-19.
- GÖTZ (P.), ENDERLEIN (G.) AND ROETTGEN (I.)** -1987- Immune reactions of *Chironomus* larvae (*Insecta : Diptera*) against bacteria.
J. Insect. Physiol., 33, 12 : 993-1004.
- GÖTZ (P.), ROETTGEN (I.) AND LINGG (W.)** -1977- Encapsulement humoral en tant que réaction de défense chez les Diptères.
Ann. Parasitol. Hum. Comp., 52, 1 : 95-97.
- GÖTZ (P.) AND VEY (A.)** -1974- Humoral encapsulation in *Diptera (Insecta)* : defense reaction of *Chironomus* larvae against fungi.
Parasitology, 68 : 193-205.
- GRAHAM (H.A.), PALCZUK (N.C.) AND STAUBER (L.A.)** -1973 a- Immunity to exoerythrocytic forms of malaria. II. passive transfer of immunity to exoerythrocytic forms.
Exp. Parasitol., 34 : 372-381.
- GRAHAM (H.A.), STAUBER (L.A.), PALCZUK (N.C.) AND BARNES (W.D.)** -1973 b- Immunity to exoerythrocytic forms of malaria. I. course of infection of *Plasmodium fallax* in turkeys.
Exp. Parasitol., 34 : 364-371.
- GRAVES (P.M.), CARTER (R.), KEYSTONE (J.S.) AND SEELEY (D.C.)** -1984- Drug sensitivity and isoenzyme type in cloned lines of *Plasmodium falciparum*.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 33, 2 : 212-219.
- GRIMSTONE (A.V), ROTHERAM (S.) AND SALT (G.)** -1967- An electron-microscope study of capsule formation by insect blood cells.
J. Cell Sci. 2, 281-292.
- GUERIN-MARCHAND (C.), DRUILHE (P.), GALEY (B.), LONDONO (A.), PATARAPOTIKUL (J.), BEAUDOIN (R.L.), DUBEAUX (C.), TARTAR (A.), MERCEREAU-PUJALON (O.) AND LANGSLEY (G.)** -1987- A liver-stage-specific antigen of *Plasmodium falciparum* characterized by gene cloning.
Nature, 329 : 164-167.
- GUPTA (A.P.)** -1991- Immunology of insects and other arthropods.
CRC Press Series in, London, 508p.

GWADZ (R.W.) -1976- Malaria : successful immunization against sexual stages of *Plasmodium gallinaceum*.

Science, 193 : 1150-1151.

GWADZ (R.W.), KASLOW (D.), LEE (J.Y.), MALOY (W.L.), ZASLOFF (M.) AND MILLER (L.H.) -1989- Effects of magainins and cecropins on the sporogonic development of malaria parasites in mosquitoes.

Infect. Immun., 57 : 2628-2633.

HAGOPIAN (M.) -1971- Unique structures in the insect granular hemocytes.

J. Ultrastructure Research, 36 : 646-658.

HAM (P.J.), ZULU (M.B.) AND ZAHEDI (M.) -1988- *In vitro* haemagglutination and attenuation of microfilaria motility by haemolymph from blackflies (*Simulium ornatum*) infected with *Onchocerca lienalis*.

Med. Vet. Entomol., 2 : 7-18.

HAPNER (K.D.) AND JERMYN (M.A.) -1981- Haemagglutinin activity in the haemolymph of *Teleogryllus commodus* (Walker).

Insect Biochem., 11, 3 : 287-295.

HARBACH (R.E.), TANG (D.B.), WIRTZ (R.A.) AND GINGRICH (J.B.) -1990- Relative repellency of two formulations of N,N-diethyl-3-methylbenzamide (deet) and permethrin-treated clothing against *Culex sitiens* and *Aedes vigilax* in thailand.

J. Am. Mosq. Control Ass., 6, 4 : 641-644.

HARPAZ (I.), KISLEV (N.) AND ZELCER (A.) -1969- Electron microscopic studies on hemocytes of the Egyptian cottonworm, *Spodoptera littoralis* (Boisduval) infected with a nuclear polyhedrosis virus, as compared to noninfected hemocytes I. noninfected hemocytes.

J. Invert. Pathol., 14 : 175-185.

HARRIS (K.L.), CHRISTENSEN (B.M.) AND MIRANPURI (G.S.) -1986- Comparative studies on the melanization response of male and female mosquitoes against microfilariae.

Dev. Comp. Immunol., 10 : 305-310.

HAWKING (F.), MELLANBY (H.), TERRY (R.J.) AND WEBBER (W.A.F.) -1957- Transmission of *Plasmodium knowlesi* by *Anopheles stephensi*.

Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 51, 5 : 397-402.

HAWORTH (J.) -1991- Malaria in man : its epidemiology, clinical aspects and control.

Trop. Diseases Bull., 88, 10 : 1-80.

HERATH (P.R.J.) AND DAVIDSON (G.) -1981- Studies on the nature of malathion resistance in a population of *Anopheles stephensi* from southern iran.

Mosq. News, 41, 3 : 531-534.

HERRINGTON (D.A.), CLYDE (D.F.), LOSONSKY (G.), CORTESIA (M.), MURPHY (J.R.), DAVIS (J.), BAQER (S.), FELIX (A.M.), HEIMER (E.P.), GILLESSEN (D.), NARDIN (E.), NUSSENZWEIG (R.S.), NUSSENZWEIG (V.), HOLLINGDALE (M.R.) AND LEVINE (M.M.) -1987- Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* sporozoites.

Nature, 328 : 257-259.

HERRINGTON (D.A.), NARDIN (E.H.), LOSONSKY (G.), BATHURST (I.C.), BARR (P.J.), HOLLINGDALE (M.R.), EDELMAN (R.) AND LEVINE (M.M.) -1991- Safety and immunogenicity of a recombinant sporozoite malaria vaccine against *Plasmodium vivax*.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 45, 6 : 695-701.

HO (B.C.), YAP (E.H.) AND SINGH (M.) -1982- Melanization and encapsulation in *Aedes aegypti* and *Aedes togoi* in response to parasitization by a filarioid nematode (*Breinlia booliati*).

Parasitol., 85 : 567-575.

HOFFMANN (D.) -1980- Induction of antibacterial activity in the blood of the migratory locust *Locusta migratoria* L.

J. Insect Physiol., 26 : 539-549.

HOFFMANN (J.A.) -1968- Sur les modifications ultrastructurales des coagulocytes au cours de la coagulation de l'hémolymph chez *Locusta migratoria*.

C. R. Soc. Biol., 162 : 2257-2259.

HOLLINGDALE (M.R.), AIKAWA (M.), ATKINSON (C.T.), BALLOU (W.R.), CHEN (G.), LI (J.), MEIS (J.), SINA (B.), WRIGHT (C.) AND (ZHU (J.) -1990- Non-CS pre-erythrocytic protective antigens.

Immunol. Letters, 25 : 71-76.

HOLLINGDALE (M.R.), LELAND (P.), LEEF (J.L.), LEEF (M.F.) AND BEAUDOIN (R.L.) -1983- Serological reactivity of in vitro cultured exoerythrocytic stages of *Plasmodium berghei* in indirect immunofluorescent or immunoperoxidase antibody tests.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 32, 1 : 24-30.

HORIO (M.) AND TSUKAMOTO (M.) -1985- Successful laboratory colonization of 3 Japanese species of *Toxorhynchites* mosquitoes.

Jpn. J. Sanit. Zool., 36, 2 : 97-93.

HOWARD (R.J.), HAYNES (J.D.), MCGINNISS (M.H.) AND MILLER (L.H.) -1982- Studies on the role of red cell glycoproteins as receptors for invasion by *Plasmodium falciparum* merozoites.

Mol. Biochem. Parasit., 6 : 303-315.

HUBER (M.), CABIB (E.) AND MILLER (L.H.) -1991- Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88 : 2807-2810.

HUFF (C.G.) -1934- Comparative studies on susceptible and insusceptible *Culex pipiens* in relation to infections with *Plasmodium cathemerium* and *P. relictum*.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 19 : 123-147.

HURD (H.) -1990- Physiological and behavioural interactions between parasites and invertebrate hosts.

Adv. Parasitol., 29 : 271-318.

HYMAN (B.C.) AND MACINNIS (A.J.) -1979- Rapid detection of malaria and other bloodstream parasites by fluorescence microscopy with 4'6 diamidino-2-phenylindole (DAPI).

J. Parasit., 65, 3 : 421-425.

IBRAHIM (E.A.R.), INGRAM (G.A.) AND M OLYNEUX (D.H.) -1984- Haemagglutinins and parasite agglutinins in haemolymph and gut of *Glossina*.

Tropenmed. Parasit., 35 : 151-156.

INGRAM (G.A.), EAST (J.) AND M OLYNEUX (D.H.) -1984- Naturally occurring agglutinins against trypanosomatid flagellates in the haemolymph of insects.

Parasitology, 89 : 435-451.

INGRAM (G.A.) AND M OLYNEUX (D.H.) -1990- Lectins (haemagglutinins) in the haemolymph of *Glossina fuscipes fuscipes* : isolation, partial characterization, selected physico-chemical properties and carbohydrate-binding specificities.

Insect Biochem., 20, 1 : 13-27.

IWANA (R.) AND ASHIDA (M.) -1986- Biosynthesis of prophenoloxidase in hemocytes of larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*.

Insect Biochem., 16, 3 : 547-555.

JADIN (J.) -1967- Du rôle des bactéries dans le tube digestif des insectes vecteurs des *Plasmodidae* et des *trypanosomatidae*.

Ann. Soc. belge Méd. Trop., 47, 4 : 331-342.

JADIN (J.), VINCKE (I.H.), DUNJIC (A.), DELVILLE (J.P.), WERY (M.), BAFORT (J.) ET SCHEEPERS-BIVA (M.) -1966- Rôle des pseudomonas dans la sporogonie de l'hématozoaire du paludisme chez le moustique.

Bull. Soc. Path. Exot., 4 : 514-525.

JAKSTYS (B.P.), ALGER (N.E.), HARANT (J.A.) AND SILVERMAN (P.) -1974- Ultrastructural analysis of *Plasmodium berghei* sporozoite antigens prepared by freeze thawing and heat inactivation.

J. Protozool., 21, 2 : 344-348.

JEFFERY (G.M.) AND RENDTORF (R.C.) -1955- Preservation of viable human malaria sporozoites by low-temperature freezing.

Experimental Parasitology, IV, 5 : 445-454.

JONES (J.C.) -1953 a- On the heart in relation to circulation of hemocytes in insects.

Ann. Entomol. Soc. Am., 46 : 366-372.

JONES (J.C.) -1953 b- Some biometrical constants for *Anopheles quadrimaculatus* Say larvae in relation to the age within stadia.

Mosq. News, 13, 4 : 243-247.

JONES (J.C.) -1958- Heat fixation and blood cells of *Aedes aegypti* larvae.

Anat. Records, 132 : 461-

JONES (J.C.) -1962- Current concepts concerning insect haemocytes.

Amer. Zool., 2 : 209-246.

JOST (E.) AND MAMELI (M.) -1972- DNA content in nine species of *Nematocera* with special reference to the sibling species of the *Anopheles maculipennis* group and the *Culex pipiens* group.

Chromosoma (Berl.), 37 : 201-208.

JUNGERY (M.) -1985- Studies on the biochemical basis of the interaction of the merozoites of *Plasmodium falciparum* and the human red cell.

Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 79 : 591-597.

KAAYA (G.P.) -1989- A review of the progress made in recent years on research and understanding of immunity in insect vectors of human and animal diseases.

Insect Sci. Applic., 10, 6 : 751-769.

KAAYA (G.P.) AND RATCLIFFE (N.A.) -1982- Comparative study of hemocytes and associated cells of some medically important dipterans.

J. Morphology, 173 : 351-365.

KAAYA (G.P.), RATCLIFFE (N.A.) AND ALEMU (P.) -1986- Cellular and humoral defenses of *Glossina* (Diptera : Glossinidae) : reactions against bacteria, trypanosomes, and experimental implants.

J. Med. Entomol., 23, 1 : 30-43.

KILLICK-KENDRICK (R.) AND PETERS (W.) -1978- Rodent malaria.

Academic Press, London New York San Francisco, 406p.

KITZMILLER (J.B.) AND MASSON (G.F.) -1967- Formal genetics of Anophelines.

in Genetics of Insect vectors of disease, Elsevier Publ. Co., Amsterdam, 3-15.

KNOWLES (G.), DAVIDSON (W.L.), MC BRIDE (J.S.) AND JOLLEY (D.) -1984- Antigenic diversity found in isolates of *Plasmodium falciparum* from papua new guinea by using monoclonal antibodies.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 33, 2 : 204-211.

- KNUDSEN (A.B.) AND SLOOFF (R.)** -1992- Vector-borne disease problems in rapid urbanization : new approaches to vector control.
Bull. Org. Mond. Santé, 70, 1 : 1-6.
- KOLOTA (G.)** -1984- The search for a malaria vaccine.
Science, 226 : 679-682.
- KOMANO (H.), MIZUNO (D.) AND NATORI (S.)** -1980- Purification of lectin induced in the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* larvae on injury.
J. Biol. Chem., 255, 7 : 2919-2924.
- KOMANO (H.), MIZUNO (D.) AND NATORI (S.)** -1981- A possible mechanism of induction of insect lectins.
J. Biol. Chem., 256, 14 : 7087-7089.
- KONISHI (E.) AND YAMAOKA (M.)** -1982 a- Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to japanese encephalitis virus in swine sera.
Kobe J. Med. Sci., 28 : 7-17.
- KONISHI (E.) AND YAMAOKA (M.)** -1982 b- Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of antibodies to japanese encephalitis virus in swine sera.
J. Virol. Methods, 5 : 1-7.
- KUBO (T.) AND NATORI (S.)** -1987- Purification and some properties of a lectin from hemolymph of *Periplaneta americana* (American cockroach).
Eur. J. Biochem., 168 : 75-82.
- KURIHARA (T.), KIKUCHI (T.) AND ICHIMORI (K.)** -1991- Effects of malaria infection in *Anopheles stephensi* mosquitoes on passage through a wide-mesh net.
Jpn. J. Sanit. Zool., 42, 2 : 141-146.
- KURIHARA (T.), KIKUCHI (T.) AND YAMAOKA (K.)** -1992- Effects of *Plasmodium yoelii nigeriensis* infection on fluctuations in blood-feeding activity of *Anopheles stephensi*.
Jpn. J. Sanit. Zool., 43, 2 : 113-116.
- LACKIE (A.M.)** -1980- Invertebrate immunity.
Parasitology, 80 : 393-412.
- LACKIE (A.M.)** -1981- The specificity of the serum agglutinins of *Periplaneta americana* and *Schistocerca gregaria* and its relationship to the insects' immune response.
J. Insect Physiol., 27 : 139-143.
- LACKIE (A.M.)** -1986- Immune mechanisms in invertebrate vectors.
Clarendon Press, Oxford, 285p.
- LACKIE (A.M.)** -1988- Immune mechanisms in insects.
Parasitology Today, 4, 4 : 98-107.

LAFOND (M.M.), CHRISTENSEN (B.M.) AND LASEE (B.A.) -1985- Defense reactions of mosquitoes to filarial worms : potential mechanism for avoidance of the response by *Brugia pahangi* microfilariae.

J. Invert. Pathol., 46 : 26-30.

LAGARDERE (B.) -1991- Vaccins du futur en parasitologie.

Bull. Soc. Path. Ex., 84 : 926-934.

LAMBROS (C.) AND VANDERBERG (J.P.) -1979- Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture.

J. Parasitol., 65, 3 : 418-420.

LANDAU (I.) ET CHABAUD (A.G.) -1965- Infection naturelle par deux *Plasmodium* du rongeur *Thamnomys rutilans* en République Centre Africaine.

C. R. Acad. Sc. Paris, t. 261, groupe 12 : 230-232.

LANDAU (I.) AND KILLICK-KENDRICK (R.) -1966- Rodent plasmodia of the Republique Centrafricaine : the sporogony and tissue stages of *Plasmodium chabaudi* and *P. berghei yoelii*.

Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 60, 5 : 633-649.

LANDAU (I.), MILTGEN (F.), BOULARD (Y.), CHABAUD (A.G.) ET BACCAM (D.) -1979- Etudes sur les gamétocytes des *Plasmodium* du groupe "vivax" : morphologie, évolution prise par les Anophèles et infectivité des microgamétocytes de *Plasmodium yoelii*.

Annales de Parasitologie, t. 54, 2 : 145-161.

LANDAU (I.), MILTGEN (F.) ET CHABAUD (A.G.)-1976- Les différents types de gamétocytes chez les hémospories de mammifères. Corrélation avec la morphologie des schizontes tissulaires. Hypothèses sur l'évolution du groupe.

Annales de Parasitologie, t. 51, 2 : 175-187.

LANGSLEY (G.) -1988- Paludisme : vers un vaccin multivalent.

Biofutur, 23-30.

LASKI (F.A.), RIO (D.C.) AND RUBIN (G.M.) -1986- Tissue specificity of *Drosophila* P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing.

Cell, 44 : 7-19.

LE BERRE (R.) -1967- Les membranes périthrophiennes chez les arthropodes. Leur rôle dans la digestion et leur intervention dans l'évolution d'organismes parasites.

Cah. ORSTOM, sér. Ent. Méd., V, 3 : 147-204.

LEONARD (C.), SÖDERHÄLL (K.) AND RATCLIFFE (N.A.) -1985- Studies on prophenoloxidase and protease activity of *Blaberus craniifer* haemocytes.

Insect Biochem., 15, 6 : 803-810.

LISTON (W.G.) -1901- A year's experience of the habits of *Anopheles* in Ellichpur.

Indian Med. Gaz., 441-443.

LOMBARDI (S.), ESPOSITO (F.), ZAVALA (F.), LAMIZANA (L.), ROSSI (P.), SABATINELLI (G.), NUSSENZWEIG (R.) AND COLUZZI (M.) -1987- Detection and anatomical localization of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein and sporozoites in the afrotropical malaria vector *Anopheles gambiae* s. l.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 37, 3 : 491-494.

LU BAO LIN -1988- Control of exophilic malariavectors with deltamethrin treated mosquito nets in china RU India .

Proc. Symp. Delhi, 45-53.

M C CARTHY (V.C.) AND CLYDE (D.F.) -1973- Influence of sulfalene upon gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* and subsequent infection patterns in *Anopheles stephensi*.

Exp. Parasitol., 33 : 73-78.

M C GRANE (V.), CARLSON (J.O.), MILLER (B.R.) AND BEATTY (B.J.) -1988- Microinjection of DNA into *Aedes triseriatus* ova and detection of integration.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 39 : 502-510.

MC GREGOR (I.A.) -1965- Consideration of some aspects of human malaria.

Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 59, 2 : 145-152.

MACK (S.R.), SAMUELS (S.) AND VANDERBERG (J.P.) -1979 a- Hemolymph of *Anopheles stephensi* from uninfected and *Plasmodium berghei*-infected mosquitoes. 2. Free amino acids.

J. Parasitol., 65, 1 : 130-136.

MACK (S.R.), SAMUELS (S.) AND VANDERBERG (J.P.) -1979 b- Hemolymph of *Anopheles stephensi* from uninfected and *Plasmodium berghei*-infected mosquitoes. 3. Carbohydrates.

J. Parasitol., 65, 2 : 217-221.

MACK (S.R.) AND VANDERBERG (J.P.) -1978- Hemolymph of *Anopheles stephensi* from noninfected and *Plasmodium berghei*-infected mosquitoes. I. Collection procedure and physical characteristics.

J. Parasitol., 64, 5 : 918-923.

MAIER (W.A.) -1980- Le parasite *Plasmodium* est-il pathogène pour le moustique ?

Cah. ORSTOM, sér. Ent. Méd. Parasitol., XVIII, 2 : 149-186.

MAIER (W.A.), BECKER-FELDMAN (H.) AND SEITZ (H.M.) -1987- Pathology of malaria-infected mosquitoes.

Parasitol. Today, 3, 7 : 216-218.

MARSHALL (E.) -1990- Malaria research - what next ?

Science, 247 : 399-402.

MARUYAMA (Y.), YASUTOMI (K.) AND OGITA (Z.I.) -1984- Electrophoretic analysis of esterase isozymes in organophosphate-resistant mosquitoes (*Culex pipiens*).

Insect Biochem., 14, 2 : 181-188.

MAUDLIN (I.) AND WELBURN (S.C.) -1987- Lectin mediated establishment of midgut infections of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* in *Glossina morsitans*.

Trop. Med. Parasitol., 38 : 167-170.

MAUDLIN (I.) AND WELBURN (S.C.)-1988 a- Tsetse immunity and the transmission of trypanosomiasis.

Parasitology Today, 4, 4 : 109-111.

MAUDLIN (I.) AND WELBURN (S.C.) -1988 b- The role of lectins and trypanosome genotype in the maturation of midgut infections in *Glossina morsitans*.

Trop. Med. Parasitol., 39 : 56-58.

MELLOUK (S.), MAHESHWARI (R.K.), RHODES-FEUILLETTE (A.), BEAUDOIN (R.L.), BERBIGUIER (N.), MATILE (H.), MILTGEN (F.), LANDAU (I.), PIED (S.), CHIGOT (J.P.), FRIEDMAN (R.M.) AND MAZIER (D.) -1987- Inhibitory activity of interferons and interleukin 1 on the development of *Plasmodium falciparum* in human hepatocyte cultures.

J. Immunol., 139, 12 : 4192-4195.

MENDIS (K.), PIEIRIS (J.S.M.), PREWAMANSA (S.), UDAGAMA (P.V.), MUNESINGHE (Y.), RANAWAKA (M.), CARTER (R.) AND DAVID (P.H.) -1987- Immune modulation of parasite transmission in *Plasmodium vivax* malaria. Anti-gamete antibodies can both block and enhanced transmission.

in Molecular Strategies of Parasitic Invasion, Ed. Agabian (N.), Goodman (H.) and Nogueira (N.), New York : 417-426.

MENON (P.K.B.) AND RAJAGOPALAN (P.K.) -1979- Seasonal changes in the density and natural mortality of immature stages of the urban malaria vector, *Anopheles stephensi* (Liston) in wells in Pondicherry.

Indian J. Med. Res., 70 : 123-127.

MERRYWEATHER (A.T.), CRAMPTON (J.M.) AND TOWNSON (H.) -1990- Purification and properties of an esterase from organophosphate-resistant strain of the mosquito *Culex quinquefasciatus*.

Biochem. J., 266 : 83-90.

METCHNIKOFF (E.) -1884- Über eine sprosspilzerkrankung der Daphnien. Beitrag zur lehre über den Kampf der phagocyten gegen krankheitserreger.

Virchows Arch., 96 : 177-195.

MIEGEVILLE (M.), ROBERT (R.), BOUILLARD (C.) ET AVRANCHE (P.) -1987- Utilisation de billes de latex marquées par des lectines dans la mise en évidence des sites récepteurs salmonelles *Schistosoma mansoni*.

C. R. Acad. Sci. Paris, t. 305, série III : 255-258.

MILLER (L.H.) -1991- The mosquito gut wall stage of Plasmodia.

in WHO / World Bank / Tropical Diseases Research Program scientific Working Group on Biological Control of Vectors, Tucson (USA).

MILLER (L.H.), SAKAI (R.K.), ROMANS (P.), GWADZ (R.W.), KANTOFF (P.) AND COON (H.G.) -1987- Stable integration and expression of a bacterial gene in the mosquito *Anopheles gambiae*.

Science, 237 : 779-781.

MINNICK (M.F.), RUPP (R.A.) AND SPENCE (K.D.) -1986- A bacterial-induced lectin which triggers hemocyte coagulation in *Manduca sexta*.

Biochem. Biophys. Research Comm., 137, 2 : 729-735.

MOHAMED (H.A.), INGRAM (G.A.), MOLYNEUX (D.H.) AND SAWYER (B.V.) -1991- Use of fluorescein-labelled lectin binding of salivary glands to distinguish between *Anopheles stephensi* and *An. albimanus* species and strains.

Insect Biochem., 21, 7 : 767-773.

MOHRIG (W.) AND MESSNER (B.) -1968 a- Immunreaktionen bei insekten. I. Lysozym als grundlegender antibakterieller faktor im humoralen abwehrmechanismus der insekten.

Biol. Zbl., 87 : 439-470.

MOHRIG (W.) AND MESSNER (B.) -1968 b- Immunreaktionen bei insekten. II. Lysozym als antimikrobielles agens im darmtrakt von insekten.

Biol. Zbl., 87 : 705-718.

MOLINARI (V.) -1961- The action of low temperatures on *Plasmodium*.

Trop. Med. Hyg., 225-232.

MOLYNEUX (D.H.) AND JEFFERIES (D.) -1986- Feeding behaviour of pathogen-infected vectors.

Parasitol., 92 : 721-736.

MONGET (D.) -1978- L'ortho-tolidine : un révélateur plus sensible de la peroxydase dans la méthode immunoenzymatique ELISA.

Ann. Biol. Clin., 36 : 527-528.

MOORE (C.A.), BECKMANN (N.) AND MORSE (M.P.) -1992- Cytoskeletal structure of diseased and normal hemocytes of *Mya arenaria*.

J. Invert. Pathol., 60 : 141-147.

MORRIS (A.C.), EGGLESTON (P.) AND CRAMPTON (J.M.) -1989- Genetic transformation of the mosquito, *Aedes aegypti* by micro-injection of DAN.

Med. Vet. Ent., 3 : 1-7.

MOUCHES (C.), PASTEUR (N.), BERGE (J.B.), HYRIEN (O.), RAYMOND (M.), DE ST VINCENT (B.R.), DE SILVESTRI (M.) AND GEORGHIOU (G.P.) -1986- Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in a californian *Culex* mosquito.

Science, 233 : 778-780.

MOUCHET (J.), ROBERT (V.), CARNEVALE (P.), RAVAONJANAHARY (C.), COOSEMABS (M.), FONTENILLE (D.) ET LOCHOUARN (L.) -1991- Le défi de la lutte contre le paludisme en Afrique tropicale : place et limite de la lutte antivectorielle.

Cah. Santé, 1 : 277-288.

MOURTON (C.), BOULO (V.), CHAGOT (D.), HERVIO (D.), BACHERE (E.), MIALHE (E.) AND GRIZEL (H.) -1992- Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa : *Aschetospora*) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca : Bivalvia) : *in vitro* system establishment.

J. Invert. Pathol., 59 : 235-240.

MULLAINADHAN (P.) AND RENWRANDT (L.) -1986- Lectin-dependent recognition of foreign cells by hemocytes of the mussel, *Mytilus edulis*.

Immunobiol., 171 : 263-273.

NAKANE (P.K.) AND PIERCE (G.B.) -1967- Enzyme-labeled antibodies preparation and application for the localization of antigens.

J. Histochem. Cytochem., 14, 12 : 929-931.

NAOT (Y.) AND REMINGTON (J.S.) -1981- Use of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for detection of monoclonal antibodies : experience with antigens of *Toxoplasma gondii*.

J. Immunol. Methods, 43 : 333-341.

NARDIN (E.H.), NUSSENZWEIG (V.), NUSSENZWEIG (R.S.), COLLINS (W.E.), HARINASUTA (K.T.), TAPCHASRI (P.) AND CHOMCHARN (Y.) -1982- Circumsporozoite proteins of human malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*.

J. Exp. Med., 156 : 20-30.

NATORI (S.) -1987- Hemolymph proteins participating in the defense system of *Sarcophaga peregrina*.

Molecular Entomology, 369-378.

NIJHOUT (M.M.) -1979- *Plasmodium gallinaceum* : exflagellation stimulated by a mosquito factor.

Exp. Parasitol., 48 : 75-80.

NOBLET (R.) AND WEATHERSBY (A.B.) -1973- *Plasmodium gallinaceum* : effects of various compounds on immunity of susceptible *Aedes aegypti* and refractory *Culex pipiens pipiens*.

Exp. Parasitol., 34 : 417-425.

NOGGE (G.) -1978- Aposymbiotic tsetse flies, *Glossina morsitans* obtained by feeding on rabbits immunized specifically with symbionts.

J. Insect Physiol., 24 : 299-304.

NUSSENZWEIG (R.) -1990- Immunology and chemotherapy of *Plasmodium*.

Zoological science, 7 supplement : 125-128.

NUSSENZWEIG (V.) AND NUSSENZWEIG (R.S.) -1985- Circumsporozoite proteins of malaria parasites.

Cell, 42 : 401-403.

NUSSENZWEIG (R.S.), VANDERBERG (J.P.), MOST (H.) AND ORTON (C.) -1969- Specificity of protective immunity produced by X-irradiated *Plasmodium berghei* sporozoites.

Nature, 222 : 488-489.

NUSSENZWEIG (R.S.), VANDERBERG (J.), SPITALNY (G.L.), RIVERA (C.I.O.), ORTON (C.) AND MOST (H.) -1972- Sporozoite-induced immunity in mammalian malaria.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 21, 5 : 722-728.

OZAKI (L.S.), GWADZ (R.W.) AND GODSON (G.N.) -1984- Simple centrifugation method for rapid separation of sporozoites from mosquitoes.

J. Parasitol., 70, 5 : 831-833.

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE -1977- Le titrage avec immunoadsorbant lié à une enzyme (ELISA).

Bull. Org. Mond. Santé, 55, 5 : 557-568.

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE -1985 a- World malaria situation 1983.

World Health Statist. Quart., 38 : 193-231.

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE -1985 b- Data sheet for the biological control agent : *Lagenidium giganteum*.

WHO / VBC, 753 : first revised edition.

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE -1990- World malaria situation 1988.

Weekly Epid. Rec., 65 : 189-196.

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE -1991 a- World malaria situation 1989.

Weekly Epid. Rec., 66 : 157-164.

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE -1991 b- Report on the meeting "prospects for malaria control by genetic manipulation of its vectors".

TDR / BCV / MAL-ENT, 3: 1-68.

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE -1991 c- Review of central nervous system adverse events related to the antimalarial drug, mefloquine (1985-1990).

WHO / MAL, 1063 : 1-31.

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE -1992 a- Résistance des vecteurs aux pesticides.

Série des rapports techniques, 818 : 70pp.

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE -1992 b- Stratégie mondiale de lutte antipaludique.

Conférence ministérielle sur le paludisme, Amsterdam, Pays-Bas : 1-26.

PACHECO (N.D.), STROME (C.P.A.), MITCHELL (F.), BAWDEN (M.P.) AND BEAUDOIN (R.L.) -1979- Rapid, large-scale isolation of *Plasmodium berghei* sporozoites from infected mosquitoes.

J. Parasitol., 65, 3 : 414-417.

PAMPANA (E.) -1963- A textbook of malaria eradication.

Oxford Univ Press, London, 508p.

PASKEWITZ (S.M.), BROWN (M.R.), COLLINS (F.H.) AND LEA (A.O.) -1989- Ultrastructural localization of phenoloxidase in the midgut of refractory *Anopheles gambiae* and association of the enzyme with encapsulated *Plasmodium cynomolgi*.

J. Parasitol., 75, 4 : 594-600.

PASKEWITZ (S.M.), BROWN (M.R.), LEA (A.O.) AND COLLINS (F.H.) -1988- Ultrastructure of the encapsulation of *Plasmodium cynomolgi* (B strain) on the midgut of a refractory strain of *Anopheles gambiae*.

J. Parasitol., 74, 3 : 432-439.

PATARROYO (M.E.), AMADOR (R.), CLAVIJO (P.), MORENO (A.), GUZMAN (F.), ROMERO (P.), TASCÓN (R.), FRANCO (A.), MURILLO (L.A.), PONTÓN (G.) AND TRUJILLO (G.) -1988- A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria.

Nature, 332 : 158-161.

PEIRIS (J.S.M.), PREMAWANSA (S.), RANAWAKA (M.B.R.), UDUGAMA (P.V.), MUNASINGHE (Y.D.), NANAYAKKARA (M.V.), GAMAGE (C.P.), CARTER (R.), DAVID (P.H.) AND MENDIS (K.N.) -1988- Monoclonal and polyclonal antibodies both block and enhance transmission of human *Plasmodium vivax* malaria.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 39, 1 : 26-32.

PENDLAND (J.C.) AND BOUCIAS (D.G.) -1985- Hemagglutinin activity in the hemolymph of *Anticarsia gemmatilis* larvae infected with the fungus *Nomuraea riveyi*.

Dev. Comp. Immunol., 9 : 21-30.

PEREIRA (M.E.A.), ANDRADE (A.F.B.) AND RIBEIRO (J.M.C.) -1981- Lectins of distinct specificity in *Rhodnius prolixus* interact selectively with *Trypanosoma cruzi*.

Science, 211 : 597-600.

PERRONE (J.B.), DE MAIO (J.) AND SPIELMAN (A.) -1986- Regions of mosquito salivary glands distinguished by surface lectin-binding characteristics.

Insect Biochem., 16, 2 : 313-318.

PETERS (W.), KOLB (H.) AND KOLB-BACHOFEN (V.) -1983- Evidence for a sugar receptor (lectin) in the peritrophic membrane of the blowfly larva, *Calliphora erythrocephala* Mg. (*Diptera*).

J. Insect Physiol., 29, 3 : 275-280.

PETERS (W.) AND RAMKARAN (A.E.) -1980- The influence of p-aminobenzoic acid on the transmission of *Plasmodium yoelii* and *P. berghei* by *Anopheles stephensi*.

Ann. Trop. Med. Parasitol., 74, 3 : 275-282.

PETIT (G.), CAMUS (D.), DEI-CAS (E.) ET LANDAU (I.) -1982- Inhibition immédiate de l'infectivité des gamétocytes de *Plasmodium yoelii nigeriensis* par le sérum de rongeurs infectés depuis 5 jours.

Ann. Parasitol., t. 57, 5 : 507-508.

PICHON (G.) ET RIVIERE (F.) -1979- Observations sur la biologie préimaginale du moustique prédateur *Toxorhynchites amboinensis* (*Diptera, Culicidae*).

Cah. ORSTOM, sér. Ent. Méd. et Parasitol., XVII, 4 : 221-224.

PIETRA (Y.), PROCACCI (P.G.), SABATINELLI (G.), KUMLIEN (S.), LAMIZANA (L.) ET ROTIGLIANO (G.) -1991- Impact de l'utilisation des rideaux imprégnés de perméthrine sur le paludisme dans une zone rurale de haute transmission au Burkina faso.

Bull. Soc. Path. Ex., 84 : 375-385.

POINAR (G.O.), HESS (R.T.), HANSEN (E.) AND HANSEN (J.W.) -1979- Laboratory infection of blackflies (*Simuliidae*) and midges (*Chironomidae*) by the mosquito mermithid, *Romanomermis culicivorax*.

J. Parasitol., 64 : 613-615.

POINAR (G.O.) AND LEUTENEGGER (R.) -1971- Ultrastructural investigation of the melanization process in *Culex pipiens* (*Culicidae*) in response to a nematode.

J. Ultrastructure Research, 36 : 149-158.

POIRIE (M.) ET PASTEUR (N.) -1991- La résistance des insectes aux insecticides.

La Recherche, 234, 22 : 874-882.

PONNUDURAI (T.), LENSEN (A.H.W.), VAN GERMERT (G.J.A.), BOLMER (M.G.) AND MEUWISSEN (J.H.E.) -1991- Feeding behaviour and sporozoite ejection by infected *Anopheles stephensi*.

Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 85 : 175-180.

POTOCNJACK (P.), YOSHIDA (N.), NUSSENZWEIG (R.S.) AND NUSSENZWEIG (V.) -1980- Monovalent fragments (Fab) of monoclonal antibodies to a sporozoite surface antigen (Pb44) protect mice against infection.

J. Exp. Med., 151 : 1504-1513.

POWNING (R.F.) AND DAVIDSON (W.J.) -1973- Studies on insect bacteriolytic enzymes. I. Lysozyme in haemolymph of *Galleria mellonella* and *Bombyx mori*.

Comp. Biochem. Physiol., 45B : 669-686.

POWNING (R.F.) AND DAVIDSON (W.J.) -1976- Studies on insect bacteriolytic enzymes. II. Some physical and enzymatic properties of lysozyme from haemolymph of *Galleria mellonella*.

Comp. Biochem. Physiol., 55B : 221-228.

PRICE (C.D.) AND RATCLIFFE (N.A.) -1974- A reappraisal of insect haemocytes classification by the examination of blood from 15 insect order.

Z. Zellforsch., 147 : 537-549.

PRINGLE (G.) -1965- Account of the sporozoites in an oocyst of *Plasmodium falciparum*.

Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 59, 3 : 289-290.

PRINGLE (G.) -1966- A quantitative study of naturally-acquired malaria infections in *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus* in highly malarious area of east africa.

Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 60, 5 : 626-632.

QU (X.M.), ZHANG (C.F.), KOMANO (H.) AND NATORI (S.) -1987- Purification of a lectin from the hemolymph of chinese oak silk moth *Antheraea pernyi* pupae.

J. Biochem., 101 : 545-551.

RAFANOMEZANTSOA-RANDRIAMBOLOLONA (B.), AVE (P.) ET PAPIEROK (B.) -1992- Histologie de l'infection des insectes par les champignons entomopathogènes : intérêt d'une nouvelle procédure pour l'étude des phases précoces.

Bull. Soc. Path. Ex., 85 : 69-75.

RAHMET-ALLA (M.) AND ROWLEY (A.F.) -1989- Studies on the cellular defense reactions of the madeira cockroach, *Leucophaea maderae* : nodule formation in response to injected bacteria.

J. Invert. Pathol., 54 : 200-207.

RAMASAMY (M.S.) AND RAMASAMY (R.) -1990 a- Effect of anti-mosquito antibodies on the infectivity on the infectivity on the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei* to *Anopheles farauti*.

Med. Vet. Entomol., 4 : 161-166.

RAMASAMY (R.) AND RAMASAMY (M.S.)-1990 b- The role of host immunity to arthropod vectors in regulating the transmission of vector borne diseases.

Insect Sci. Applic., 11, 6 : 845-850.

RAMASAMY (M.S.), RAMASAMY (R.) , KAY (B.H.) AND KIDSON (C.) -1988- Anti-mosquito antibodies decrease the reproductive capacity of *Aedes aegypti*.

Med. Vet. Entomol., 2 : 87-93.

RAMASAMY (M.S.), SANDS (M.), KAY (B.H.), FANNING (I.D.), LAWRENCE (G.W.) AND RAMASAMY (R.) -1990- Anti-mosquito antibodies reduce the susceptibility of *Aedes aegypti* to arbovirus infection.

Med. Vet. Entomol., 4 : 49-56.

RASMUSON (T.) AND BOMAN (H.G.) -1979- Insect immunity. V. Purification and some properties of immune protein P4 from haemolymph of *Hyalophora cecropia* pupae.

Insect Biochem., 9 : 259-264.

RATCLIFFE (N.A.) -1986- Insect cellular immunity and the recognition of foreignness.

in Immune Mechanisms in Invertebrate Vectors, Ed. Lackie (A.M.), Clarendon Press, Oxford : 21-43.

RATCLIFFE (N.A.), LEONARD (C.) AND ROWLEY (A.F.) -1984- Prophenoloxidase activation : nonself recognition and cell cooperation in insect immunity.

Science, 226 : 557-559.

RATCLIFFE (N.A.) AND ROWLEY (A.F.) -1979- Role of hemocyte in defense against biological agents.

in Insect hemocytes. Ed. Gupta (A.P.), Cambridge University Press, Cambridge : 331-414.

RATCLIFFE (N.A.) AND ROWLEY (A.F.) -1981- Insects.

in Invertebrate blood cells, Ed Ratcliffe (N.A.) and Rowley (A.F.), Academic Press, London : pp

RAYMOND (M.), FOURNIER (D.), BERGE (J.), CUANY (A.), BRIDE (J.M.) AND PASTEUR (N.) -1985- Single-mosquito test to determine genotypes with an acetylcholinesterase insensitive to inhibition to propoxur insecticide.

J. Am. Mosq. Control Assoc., 1, 4 : 425-427.

REISEN (W.K.) -1975- Intraspecific competition in *Anopheles stephensi* Liston.

Mosquito News, 35, 4 : 473-482.

REISEN (W.K.) AND ASLAMKHAN (M.) -1979- A release-recapture experiment with the malaria vector, *Anopheles stephensi* Liston, with observations on dispersal, survivorship, population size, gonotrophic rhythm and mating behaviour.

Ann. Trop. Med. Parasitol., 73, 3 : 251-269.

RICHARDS (A.G.) -1978- The biochemistry of insect cuticle.

In Biochemistry of insects. Edited by M. Rockstein, 205-232, Academic Press, New York.

RICHARDS (E.H.), RATCLIFFE (N.A.) AND RENWRANTZ (L.) -1988- Isolation and characterization of a serum lectin from the giant stick insect *Extatosoma tiaratum*.

Insect Biochem., 18, 7 : 691-700.

RICKMAN (L.S.), JONES (T.R.), LONG (G.W.), PAPARELLO (S.), SCHNEIDER (I.), PAUL (C.F.), BEAUDOIN (R.L.) AND HOFFMAN (S.L.) -1990- *Plasmodium falciparum*-infected *Anopheles stephensi* inconsistently transmit malaria to humans.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 43, 5 : 441-445.

RIO (D.C.), LASKI (F.A.) AND RUBIN (G.M.) -1986- Identification and immunochemical analysis of biologically active *Drosophila* P element transposase.

Cell, 44 : 21-32.

RIZKI (M.T.M.) -1957- Alterations in the haemocyte population of *Drosophila melanogaster*.

J. Morphol., 100 : 437-458.

RIZKI (M.T.M.) AND RIZKI (R.M.) -1959- Functional significance of the crystal cells in the larva of *Drosophila melanogaster*.

J. Biophys. Biochem. Cytol., 5, 2 : 235-239.

ROBERT (V.), BARATHE (J.), SANNIER (C.) ET COZ (J.) -1983- Comparaison du développement larvaire et des stades tueurs de *Toxorhynchites brevipalpis* et de *T. amboinensis* (Diptera : Culicidae).

Cah. ORSTOM, sér. Ent. Méd. et Parasitol., XXI, 1 : 13-18.

ROBERT (V.), VERHAVE (J.P.), PONNUDURAI (T.), LOUWE (L.), SCHOLTENS (P.) AND CARNEVALE (P.) -1988- Study of the distribution of circumsporozoite antigen in *Anopheles gambiae* infected with *Plasmodium falciparum*, using the enzyme-linked immunosorbent assay.

Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 82 : 389-391.

RODHAIN (J.), WANSON (M.) AND VINCKE (I.) -1955- Essai de transmission cyclique de *Plasmodium berghei*.

Ann. Soc. belge Méd. Trop., 35 : 219-224.

ROSEN (L.) -1984- Use of mosquitoes to detect and propagate viruses.

in Methods in virology, Academic Press, vol. VIII : 281-292.

ROSEN (L.) AND GUBLER (D.) -1974- The use of mosquitoes to detect and propagate dengue viruses.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 23, 6 : 1153-1160.

ROSENBERG (R.) -1984- Susceptibility of a male mosquito to malaria.

J. Parasitol., 70, 5 : 827.

ROSENBERG (R.) -1985- Inability of *Plasmodium knowlesi* sporozoites to invade *Anopheles freeborni* salivary glands.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 34, 4 : 687-691.

ROSENBERG (R.) , KOONTZ (L.C.), ALSTON (K.) AND FRIEDMAN (F.K.) -1984- *Plasmodium gallinaceum* : erythrocyte factor essential for zygote infection of *Aedes aegypti*.

Exp. Parasitol., 57 : 158-164.

ROSENBERG (R.) AND RUNGSIWONGSE (J.) -1991- The number of sporozoites produced by individual malaria oocysts.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 45, 5 : 574-577.

ROSS (R.) -1898- Report on the cultivation of *Proteosoma*, Labbé, in grey mosquitoes.

The Indian Medical Gazette, 401-451.

ROWLEY (A.F.) -1977- The role of the haemocytes of *Clitumnus extradentatus* in the haemolymph coagulation.

Cell Tissue Res., 182 : 513-524.

ROWLEY (A.F.) AND RATCLIFFE (N.A.) -1976- An ultrastructural study of the *in vitro* phagocytosis of *Escherichia coli* by the haemocytes of *Calliphora erythrocephala*.

J. Ultrastruct. Res., 55 : 193-202.

RUBIN (G.M.) AND SPRADLING (A.C.) -1982- Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors.

Science, 218 : 348-353.

RUDIN (W.) AND HECKER (H.) -1989- Lectin-binding sites in the midgut of the mosquitoes *Anopheles stephensi* Liston and *Aedes aegypti* L. (Diptera : Culicidae).

Parasitol. Res., 75 : 268-279.

RUITENBERG (E.J.) AND BUYS (J.) -1977- Application of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of human African trypanosomiasis (sleeping sickness).

Am. J. Trop. Med. Hyg., 26, 1 : 31-36.

RUITENBERG (E.J.) AND VAN KNAPEN (F.) -1977- The enzyme-linked immunosorbent assay and its application to parasitic infections.

J. Infect. Dis., 136 : S267-S273.

RYAN (M.) AND NICHOLAS (W.L.) -1972- The reaction of the cockroach *Periplaneta americana* to the injection of foreign particulate material.

J. Invert. Pathology, 19 : 299-307.

SALT (G.) -1960- Experimental studies in insect parasitism. XI. The haemocytic reaction of a caterpillar under varied conditions.

Proc. R. Soc. Lond. B151 : 446-467.

- SALT (G.)** -1963- The defense reactions of insects to metazoan parasites.
Parasitology, 53 : 527-642.
- SAMISH (M.), YANO (K.), KOZLOWSKA (A.) AND MARAMOROSCHK (K.)** -1991-
The effect of defined media, additive nutrients and metabolites on the development of the sporogony cycle of *Plasmodium berghei* in *Anopheles stephensi*.
Ann. Trop. Med. Parasitol., 85, 4 : 395-400.
- SARTORRELLI (A.C.), FISCHER (D.S.) AND DOWNS (W.G.)** -1966- Use of sarcoma 180/TG to prepare hyperimmune ascitic fluid in the mouse.
J. Immunol., 96, 4 : 676-682.
- SCANLON (J.E.), REID (J.A.) AND CHEONG (W.H.)** -1968- Ecology of *Anopheles* vectors of malaria in the oriental region.
Cah. ORSTOM, sér. Ent. Méd., VI, 3-4 : 237-246.
- SCHNEIDER (M.D.)** -1970- Sem studies of malaria (*Plasmodium berghei yoelii*) in mice.
Scanning Electron microscopy, 257-264.
- SCHULMAN (S.), OPPENHEIM (J.D.) AND VANDERBERG (J.P.)** -1980- *Plasmodium berghei* and *Plasmodium knowlesi* : serum binding to sporozoites.
Exp. Parasit., 49 : 420-429.
- SCHWARTZ (D.)** -1981- Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes.
Flammarion Médecine Sciances, Paris, 318p.
- SEAMAN (G.R.) AND ROBERT (N.L.)** -1968- Immunological response of male cockroaches to injection of *Tetrahymena pyriformis*.
Science, 161 : 1359-1361.
- SHUTE (P.G.)** -1945- An investigation into the number of sporozoites found in the salivary glands of *Anopheles* mosquitoes.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., XXXVIII, 6 : 493-498.
- SIEBER (K.P.), HUBER (M.), KASLOW (D.), BANKS (S.M.), TORII (M.), AIKAWA (M.) AND MILLER (L.H.)** -1991- The peritrophic membrane as a barrier : its penetration by *Plasmodium gallinaceum* and the effect of a monoclonal antibody to ookinetes.
Exp. Parasit., 72 : 145-156.
- SINA (B.) AND HOLLINGDALE (M.R.)** -1991- Stage specificity of expression malaria antigens.
Acta Leidensia, 60, 1 : 49-55.
- SINDEN (R.E.)** -1984- The biology of *Plasmodium* in the mosquito.
Experientia, 40 : 1330-1343.
- SINDEN (R.E.)** -1985- A cell biologist's view of host cell recognition and invasion by malarial parasites.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 79 : 598-605.

SINDEN (R.E.) -1991- Asexual blood stages of malaria modulate gametocyte infectivity to the mosquito vector - possible implications for control strategies.

Parsitol., 103 : 191-196.

SINDEN (R.E.) AND KAWAMOTO (H.) -1991- Factors affecting *Plasmodium* exflagellation and syngamy.

in Prospects for malaria control by genetic manipulation of its vectors, WHO / World Bank/Tropical Diseases Research Program Scientific Working Group on Biological Control of Vectors, Tucson.

SLUITERS (J.F.), VISSER (P.E.) AND VAN DER KAAJ (H.J.) -1986- The establishment of *Plasmodium berghei* in mosquitoes of a refractory and susceptible line of *Anopheles atroparvus*.

Z. Parasitenkd, 72 : 313-322.

SODEMAN (W.A.) AND JEFFERY (G.M.) -1964- Immunofluorescent staining of sporozoites of *Plasmodium gallinaceum*.

J. Parasitol., 50, 3 : 477-478.

SÖDERHÄLL (K.) -1982- Prophenoloxidase activating system and melanization-A recognition mechanism of arthropods. A review.

Dev. Comp. Immun., 6 : 601-611.

SÖDERHÄLL (K.) AND SMITH (V.J.) -1984- The prophenoloxidase activating system. A complement like pathway in arthropods.

in Infection Processes of Fungi, Ed. Aist (J.) and Roberts (D.W.), Rockefeller Foundation Press, New York : 160-167.

SPRADLING (A.C.) AND RUBIN (G.M.) -1982- Transposition of cloned P element into *Drosophila* germ line chromosomes.

Science, 218 : 341-347.

SPRAY (F.J.) AND CHRISTENSEN (B.M.) -1991- *Aedes aegypti* : characterization of hemocyte polypeptide synthesis during wound healing and immune response to inoculated microfilariae.

Exp. Parasitol., 73 : 481-488.

STEPHENS (J.M.) -1959- Immune responses of some insects to some bacterial antigens.

Can. J. Microbiol. 5 : 203-228

STERLING (C.R.), AIKAWA (M.) AND VANDERBERG (J.P.) -1973- The passage of *Plasmodium berghei* sporozoites through the salivary glands of *Anopheles stephensi* : an electron microscope study.

J. Parasitol., 59, 4 : 593-605.

STILES (B.), BRADLEY (R.S.), STUART (G.S.) AND HAPNER (K.D.) -1988- Site of synthesis of the haemolymph agglutinin of *Melanoplus differentialis* (Acrididae : Orthoptera).

J. Insect Physiol., 34, 2 : 1077-1085.

STOCKER (J.W.) AND HEUSSER (C.H.) -1979- Methods for binding cells to plastic : application to a solid-phase radioimmunoassay for cell-surface antigens.

J. Immunol. Methods, 26 : 87-95.

STROME (C.P.A.) AND BEAUDOIN (R.L.) -1974- The surface of the malaria parasite. I. Scanning electron microscopy of the oocyst.

Exp. Parasitol., 36 : 131-142.

STYNEN (D.), PEFEEROEN (M.) AND DE LOOF (A.) -1982- Proteins with haemagglutinin activity in larvae of the colorado beetle, *Leptinotarsa decemlineata*.

Comp. Biochem. Physiol., 81 : 171-175.

STYNEN (D.), VANSTEENWEGEN (K.) AND DE LOOF (A.) -1985- Anti-galactose lectins in the haemolymph of *Sarcophaga bullata* and three other calliphorid flies.

Comp. Biochem. Physiol., 81B, 1 : 171-175.

SUTHERLAND (G.B.) AND EWEN (A.B.) -1974- Fecundity decrease in mosquitoes ingesting blood from specifically sensitized mammals.

J. Insect Physiol., 20 : 655-660.

SWITERS (J.F.), VISSER (P.E.) AND VAN DER KAAY (H.J.) -1986- The establishment of *Plasmodium berghei* in mosquitoes of a refractory and a susceptible line of *Anopheles atroparvus*.

Z. Parasitenkd., 72 : 313-322.

SYAFRUDDIN, ARAKAWA (R.), KAMIMURA (K.) AND KAWAMOTO (F.) -1991- Penetration of the mosquito midgut wall by the ookinetes of *Plasmodium yoelii nigeriensis*.

Parasitol. Res., 77 : 230-236.

TADANO (T.) AND BROWN (A.W.A.) -1966- Development of resistance to various insecticides in *Culex pipiens fatigans* Wiedemann.

Bull. Org. Mond. Santé, 35 : 189-201.

TAPCHAISRI (P.), CHOMCHARN (Y.), POONTHONG (C.), ASAVANICH (A.), LIMSUWAN (S.), MALEEVAN (O.), THARAVANIJ (S.) AND HARINASUTA (T.) -1983- Anti-sporozoite antibodies induced by natural infection.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 32, 6 : 1203-1208.

TARGETT (G.A.T.) -1991- Waiting for the vaccine.

London School Hyg. Trop. Med., first annual public health forum, 1-224.

TAYLOR (R.L.) -1969- A suggested role for the polyphenol-phenoloxidase system in invertebrate immunity.

J. Invert. Pathol., 14 : 427-428.

THOMPSON (E.G.) AND BELL (L.H.) -1968- Laboratory studies on the biology of *Anopheles stephensi* Liston.

Mosquito news, 28, 4 : 639-642.

- TIBAYRENC (M.)** -1979- Les enzymes de l'entomologie médicale.
Cah. ORSTOM, sér. Ent. Méd. et Parasitol., XX, 4 : 319-320.
- TIBAYRENC (M.) AND AYALA (F.J.)** -1991- Towards a population genetics of microorganisms : the clonal theory of parasitic protozoa.
Parasitol. Today, 7, 9 : 228-232.
- TRAGER (W.) AND JENSEN (J.B.)** -1976- Human malaria parasites in continuous culture.
Science, 193 : 673-675.
- TRIPP (M.R.)** -1992- Agglutinins in the hemolymph of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*.
J. Invert. Pathol., 59 : 228-234.
- UNGUREANU (E.), MARINOV (R.), STRATULAT (C.), TEODORESCU (C.), MIHAI (M.), BORNUIZ (M.) AND TUDOSE (M.)** -1980- The value and limits of homologous and heterologous antigens of human *Plasmodium* species for evaluating the immune response in malaria by the indirect fluorescent antibody test.
WHO / MAL, 920 : 1-5.
- VAN DEN BERGHE (L.)** -1948- The newer medical research in the tropics.
Fourth International Congress Tropical Medicine and Malaria, 1 : 1436-1438.
- VAN DEN BERGHE (L.), VINCKE (I.) ET CHARDOME (M.)** -1950- La phase tissulaire de *Plasmodium berghei*.
Ann. Soc. belge Méd. Trop., 30 : 79-85.
- VAN DER KAAJ (H.J.)** -1991- Malaria control during the nineties : what is to be expected ?
Acta Leidensia, 60, 1 : 191-206.
- VAN KESSEL (R.P.M.) AND LELIJVELD (J.L.M.)** -1992- Compliance with preventive measures against malaria by visitors to the vaccination centre of the utrecht municipal health service.
WHO / MAL, 1066 : 1-8.
- VANDERBERG (J.P.)** -1974- Studies on the motility of *Plasmodium* sporozoites.
J. Protozool., 21, 4 : 527-537.
- VANDERBERG (J.P.)** -1975- Development of infectivity by the *Plasmodium berghei* sporozoite.
J. Parasitol., 61, 1 : 43-50.
- VANDERBERG (J.P.), NUSSENZWEIG (R.S.) AND MOST (H.)** -1968- Further studies on the *Plasmodium berghei*-*Anopheles stephensi*-rodent system of mammalian malaria.
J. Parasitol., 54, 5 : 1009-1016.

VANDERBERG (J.P.), NUSSENZWEIG (R.S.), SANABRIA (Y.), NAWROT (R.) AND MOST (H.) -1972- Stage specificity of anti-sporozoite antibodies in rodent malaria and its relationship to protective immunity.

Proc. Helmint. Soc. Wash., 39 : 514-525.

VANDERBERG (J.P.), RDODIN (J.) AND YOELI (M.) -1967- Electron microscopic and histochemical studies of sporozoite formation in *Plasmodium berghei*.

J. Protozool., 14, 1 : 82-103.

VANDERBERG (J.P.) AND YOELI (M.) -1966- Effects of temperature on sporogonic development of *Plasmodium berghei*.

J. Parasitol., 52, 3 : 559-564.

VAUGHAN (J.A.) AND AZAD (A.F.) -1988- Passage of host immunoglobulin G from blood meal into hemolymph of selected mosquito species (*Diptera* : *Culicidae*).

J. Med. Entomol., 25, 6 : 472-474.

VAUGHAN (J.A.), DO ROSARIO (V.), LELAND (P.), ADJEPONG (A.), LIGHT (J.), WOOLLETT (G.R.), HOLLINGDALE (M.R.) AND AZAD (A.F.) -1988- *Plasmodium falciparum* : ingested anti-sporozoite antibodies affect sporogony in *Anopheles stephensi* mosquitoes.

Exp. Parasitol., 66 : 171-182.

VAVRA (J.) AND UNDEEN (A.H.) -1970- *Nosema algerae* n. sp. (*Cnidospora*, *Microsporidia*) a pathogen in a laboratory colony of *Anopheles stephensi* Liston (*Diptera*, *Culicidae*).

J. Protozool., 17, 2 : 240-249.

VERHAVE (J.P.), LEEUWENBERG (A.D.E.M.), PONNUDURAI (T.), MEUWISSEN (J.H.E.T.) AND VAN DRUTEN (J.A.M.) -1988- The biotin streptavidin system in a two-site ELISA for the detection of plasmodial sporozoite antigen in mosquitoes.

Parasite Immunology, 10 : 17-31.

VERMEULEN (A.N.), PONNUDURAI (T.), BECKERS (P.J.A.), VERHAVE (J.P.), SMITS (M.A.) AND MEUWISSEN (J.H.E.T.) -1985- Sequential expression of antigens on sexual stages of *Plasmodium falciparum* accessible to transmission-blocking antibodies in mosquitoes.

J. Exp. Med., 162 : 1460-1476.

VERNES (A.), HAYNES (J.D.), TAPCHAI SRI (P.), WILLIAMS (J.L.), DUTOIT (E.) AND DIGGS (C.L.) -1984- *Plasmodium falciparum* strain-specific human antibody inhibits merozoite invasion of erythrocytes.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 33, 2 : 197-203.

VERNICK (K.D.) AND COLLINS (F.H.) -1989- Association of a *Plasmodium*-refractory phenotype with an esterase locus in *Anopheles gambiae*.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 40, 6 : 593-597.

VERNICK (K.D.), COLLINS (F.H.) AND GWADZ (R.W.) -1989- A general system of resistance to malaria infection in *Anopheles gambiae* controlled by two main genetic loci.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 40, 6 : 585-592.

VEY (A.) AND GÖTZ (P.) -1975- Humoral encapsulation in *Diptera (Insecta)* : comparative studies *in vitro*.

Parasitol., 70 : 77-86.

VILLANI (F.), WHITE (G.B.), CURTIS (C.F.) AND MILES (S.J.) -1983- Inheritance and activity of some esterases associated with organophosphate resistance in mosquitoes of the complex of *Culex pipiens* L. (*Diptera : Culicidae*).

Bull. Ent. Res., 73 : 153-170.

VOLLER (A.) -1964- Fluorescent antibody methods and their use in malaria research.

Bull. Org. Mond. Santé, 30 : 343-354.

VOLLER (A.), BIDWELL (D.E.) AND BARTLETT (A.) -1976- Enzyme immunoassays in diagnostic medicine.

Bull. Org. Mond. Santé, 53 : 55-65.

VOLLER (A.), DRAPER (C.), BIDWELL (D.E.) AND BARTLETT (A.) -1975- Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas' disease.

The lancet, 22 : 426-428.

VREDEN (S.G.S.), VERHAVE (J.P.), OETTINGER (T.), SAUERWEIN (R.W.) AND MEUWISSEN (J.H.E.T.) -1991- Phase I clinical trial of a recombinant malaria vaccine consisting of the circumsporozoite repeat region of *Plasmodium falciparum* coupled to hepatitis B surface antigen.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 45, 5 : 533-538.

WAGO (H.) -1980 a- Absence of a receptor site for chicken immunoglobulin on the surfaces of *Bombyx mori* hemocytes.

Appl. Ent. Zool., 15, 2 : 180-182.

WAGO (H.) -1980 b- Observation of the early processes of phagocytosis by the granular cells of the silkworm, *Bombyx mori*.

Appl. Ent. Zool., 15, 4 : 489-491.

WAGO (H.) -1980 c- Humoral factors promoting the adhesive properties of the granular cells and plasmatocytes of the silkworm, *Bombyx mori*, and their possible role in the initial cellular reactions to foreignness.

Cellular immunology, 54 : 155-169.

WAGO (H.) -1981- The role of hemolymph in the initial cellular attachment to foreign cells by the hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori*.

Dev. Comp. Immunol., 5 : 217-227.

WAGO (H.) -1982 a- Regulatory effects of temperature and hemolymph on inhibition and enhancement of attachment and filopodia function of phagocytic granular cells of the silkworm, *Bombyx mori*.

Dev. Comp. Immunol., 6 : 231-241.

WAGO (H.) -1982 b- Cellular recognition of foreign materials by *Bombyx mori* phagocytes. I. Immunocompetent cells.

Dev. Comp. Immunol., 6 : 591-599.

WAGO (H.) -1982 c- Involvement of microfilaments in filopodial function of phagocytic granular cells of the silkworm, *Bombyx mori*.

Dev. Comp. Immunol., 6 : 655-664.

WAGO (H.) -1983- The important significance of filopodial elongation of phagocytic granular cells of the silkworm, *Bombyx mori*, in recognition of foreignness.

Dev. Comp. Immunol., 7 : 445-453.

WAGO (H.) -1984- *In vitro* evidence for the requirement of filopodial elongation for the progress of phagocytosis by phagocytic granular cells of the silkworm, *Bombyx mori*.

Dev. Comp. Immunol., 8 : 7-14.

WAGO (H.) AND ICHIKAWA (Y.) -1979 a- Hemocytic reactions to foreign cells in the silkworm, *Bombyx mori*, during post-embryonic development.

Appl. Ent. Zool., 14, 1 : 36-43.

WAGO (H.) AND ICHIKAWA (Y.) -1979 b- *In vitro* analyses of Cyto-adherence phenomenon between *Bombyx mori* hemocytes and goose erythrocytes in the relation to the larval development.

Appl. Ent. Zool., 14, 3 : 256-263.

WAGO (H.) AND ICHIKAWA (Y.) -1979 c- Changes in the phagocytic rate during the larval development and manner of hemocytic reactions to foreign cells in *Bombyx mori*.

Appl. Ent. Zool., 14, 4 : 397-403.

WALKER (V.K.) -1989- Gene transfer in insects.

Advanc. Cell Culture, 7 : 87-124.

WALLBANKS (K.R.), INGRAM (G.A.) AND M OLYNEUX (D.H.) -1986- The agglutination of erythrocytes and *Leishmania* parasites by sandfly gut extracts : evidence for lectin activity.

Trop. Med. Parasit., 37 : 409-413.

WALTERS (L.L.), IRONS (K.P.), MODI (B.G.) AND TESH (R.B.) -1992- Refractory barriers in the sand fly *Plebotomus papatasi* (Diptera : Psychodidae) to infection with *Leishmania panamensis*.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 46, 2 : 221-228.

WARBURG (A.) AND MILLER (L.H.) -1991- Critical stages in the development of *Plasmodium* in mosquitoes.

Parasitol. Today, 7, 7 : 179-181.

WARR (G.W.) -1981- Immunity in invertebrates.

J. Invert. Pathol., 38 : 311-314.

WATANABE (H.) -1967- Electrophoretic separation of the hemolymph proteins in the fall webworm, *Hyphantria cunea*, infected with a nuclear-polyhedrosis virus.

J. Invert. Path., 9 : 570-571.

WEATHERSBY (A.B.) -1952- The role of the stomach wall in the exogenous development of *Plasmodium gallinaceum* as studied by means of haemocoel injections of susceptible and refractory mosquitoes.

J. Infectious Diseases, 91 : 198-205.

WEATHERSBY (A.B.) -1954- The ectopic development of malaria oocysts.

Exp. Parasitol., 3 : 538-543.

WEATHERSBY (A.B.) -1960- Further studies on exogenous development of malaria in the haemocoel of mosquitoes.

Exp. Parasitol., 10 : 211-213.

WEATHERSBY (A.B.) AND MC CALL (J.W.) -1968- The development of *Plasmodium gallinaceum* Brumpt in the hemocoels of refractory *Culex pipiens* Linn. and susceptible *Aedes aegypti* (Linn.).

J. Parasit., 54, 5 : 1017-1022.

WEATHERSBY (A.B.) AND MC CRODDAN (D.) -1982- The effects of parabiotic twinning of susceptible and refractory mosquitoes on the development of *Plasmodium gallinaceum*.

J. Parasitol., 68, 6 : 1081-1084.

WEATHERSBY (A.B.) AND NOBLET (R.) -1973- *Plasmodium gallinaceum* : development in *Aedes aegypti* maintained on various carbohydrate diets.

Exp. Parasitol., 34 : 426-431.

WERY (M.) -1966- Etude du cycle de *Plasmodium berghei yoelii* en vue de la production massive de sporozoïtes viables et de la production massive de formes exo-érythrocytaires.

Ann. Soc. belge Méd. Trop., 46, 6 : 755-788.

WIGGLESWORTH (V.B.) -1959- Insect blood cells.

A. Rev. Ent., 4 : 1-16.

WIGGLESWORTH (V.B.) -1973- Haemocytes and basement membrane formation in *Rhodnius*.

J. Insect Physiol., 19: 831-844.

WIJESUNDERA (M.), PEIRIS (J.M.S.), ARIYARATNE (Y.G.), VERDINI (A.S.), PESSI (A.) AND DEL GIUDICE (G.) -1990- Antibodies to *Plasmodium falciparum* sporozoites following a malarial outbreak in a non-endemic area of Sri-Lanka.

Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 84 : 35-39.

WIKEL (S.K.) -1982- Host resistance to tick-borne pathogens by virtue of resistance to thick infestation.

Ann. Trop. Med. Parasitol., 74 : 103-104.

WILLIAMS (C.B.) -1973- The use of logarithms in the interpretation of certain entomological problems.

Ann. Appl. Biol., 24 : 404-414.

WILLIAMS (J.F.) -1979- Recent advances in the immunology of cestode infections.

J. Parasitol., 65, 3 : 337-349.

WIRTZ (R.A.), BURKOT (T.R.), ANDRE (R.G.), ROSENBERG (W.E.), COLLINS (W.E.) AND ROBERTS (D.R.) -1985- Identification of *Plasmodium vivax* sporozoite in mosquitoes using an enzyme-linked immunosorbent assay.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 34 : 1048-1054.

WIRTZ (R.A.), ZAVALA (F.), CHAROENVIT (Y.), CAMPBELL (G.H.), BURKOT (T.R.), SCHNEIDER (I.), ESSER (K.M.), BEAUDOIN (R.L.) AND ANDRE (R.G.) -1987- Comparative testing of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoites for ELISA development.

Bull. World health Organization, 65, 1 : 39-45.

WORTMAN (A.), ROGERS (P.), CHAROENVIT (Y.), MC DERMOTT (A.), LEEF (M.), SEDEGAH (M.) AND BEAUDOIN (R.L.) -1989- Cloning of *Plasmodium yoelii* genes expressing three different sporozoite-specific antigens.

Microb. Pathogen., 6 : 227-231.

WRIGHT (K.A.) -1969- The anatomy of salivary glands of *Anopheles stephensi* Liston.

Canadian J. Zoology, 47 : 579-587.

YOELI (M.) -1973- *Plasmodium berghei* : mechanisms and sites of resistance to sporogonic development in different mosquitoes.

Exp. Parasitol., 34 : 448-458.

YOELI (M.) AND MOST (H.) -1960- The biology of a newly isolated strain of *Plasmodium berghei* in a rodent host and in experimental mosquito vectors.

Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 54, 6 : 549-555.

YOELI (M.) , MOST (H.) AND BONE (G.) -1964- *Plasmodium berghei* : cyclical transmissions by experimentally infected *Anopheles quadrimaculatus*.

Science, 144 : 1580-1581.

YOELI (M.) AND WALL (W.J.) -1951- Complete sporogonic development of *Plasmodium berghei* in experimentally infested *Anopheles spp.*

Nature, 168 : 1078-1080.

YOELI (M.) AND WALL (W.J.) -1952- Cyclical transmission of *Plasmodium berghei* in the laboratory.

Nature, 4308 : 881.

YOSHIDA (N.) AND ASHIDA (M.) -1986- Microbial activation of two serine enzymes and prophenoloxidase in the plasma fraction of hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*.

Insect Biochem., 16, 3 : 539-545.

YOSHIDA (N.), NUSSENZWEIG (R.S.), POTOCNJAK (P.), NUSSENZWEIG (V.) AND AIKAWA (M.) -1980- Hybridoma produces protective antibodies directed against the sporozoite stage of malaria parasite.

Science, 207 : 71-73.

ZACHARY (D.) -1978- Evolution des cellules sanguines et de la musculature au cours de la métamorphose chez le diptère *Calliphora erythrocephala* : aspects cytologiques et neuroendocrines.

Thèse université L. Pasteur, Strasbourg.

ZACHARY (D.), BREHELIN (M.) AND HOFFMANN (J.A.) -1975- Role of the thrombocytoids in capsule formation in the dipteran *Calliphora erythrocephala*.

Cell Tissue Res., 162 : 343-348.

ZACHARY (D.) AND HOFFMANN (D.) -1975- The haemocytes of *Calliphora erythrocephala*.

Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat., 141 : 55-73.

ZACHARY (D.) AND HOFFMANN (D.) -1984- Lysozyme is stored in the granules of certain haemocyte types in *Locusta*.

J. Insect Physiol., 30, 5 : 405-411.

ZAHEDI (M.), DENHAM (D.A.) AND HAM (P.J.) -1992- Encapsulation and melanization responses of *Armigeres subalbatus* against inoculated sephadex beads.

J. Invert. Pathol., 59 : 258-263.

ZARITSKY (A.), BEN-DOV (E.), ZALKINDER (V.) AND BARAK (Z.) -1992- Digestibility by and pathogenicity of the protozoa *Tetrahymena pyriformis* to larvae of *Aedes aegypti*.

J. Invert. Pathol., 59 : 332-334.

ZAVALA (F.), COCHRANE (A.H.), NARDIN (E.H.), NUSSENZWEIG (R.S.) AND NUSSENZWEIG (V.) -1983- Circumsporozoite proteins of malaria parasite contain a single immunodominant region with two or more identical epitopes.

J. Exp. Med., 157 : 1947-1957.

ZAVALA (F.), GWADZ (R.W.), COLLINS (F.H.), NUSSENZWEIG (R.S.) AND NUSSENZWEIG (V.) -1982- Monoclonal antibodies to circumsporozoite proteins identify the species of malaria parasite in infected mosquitoes.

Nature, 299 : 737-738.

ZAVALA (F.), MASUDA (A.), GRAVES (P.M.), NUSSENZWEIG (V.) AND NUSSENZWEIG (R.S.) -1985- Ubiquity of the repetitive epitope of the CS protein in different isolates of human malaria parasites.

J. Immunol., 135, 4 : 2790-2793.

ZAVALA (F.), TAM (J.P.) AND MASUDA (A.) -1986- Synthetic peptides as antigens for the detection of humoral immunity to *Plasmodium falciparum* sporozoites.

J. Immunol. Methods, 93 : 55-61.

ZHENG (L.), SAUNDERS (R.D.C.), FORTINI (D.), DELLA TORRE (A.), COLUZZI (M.), GLOVER (D.M.) AND KAFATOS (F.C.) -1991- Low-resolution genome map of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88 : 11187-11191.

ANNEXE 1

Le protocole pour la microscopie électronique

1. Les solutions nécessaires à l'inclusion de l'hémolymph.

Fixateur :

Glutaraldéhyde 25%	10,0 ml
Tampon phosphate 0,1M (Gomori, 1955)	40,0 ml

Post-fixateur :

Tampon phosphate 0,2M (Gomori, 1955)	5,0 ml
H ₂ O bipermutée	2,5 ml
OsO ₄ 4%	2,5 ml

Résine d'inclusion :

Epon 812 (résine)	9,24 g
DDSA (durcisseur)	4,65 g
MNA (plastifiant)	4,65 g
DMP 30 (accélérateur)	0,22 g

2. Les solutions pour la coloration des coupes.

Colorant pour coupes semi-fines :

Bleu de toluidine	1 g
Borate de sodium	1 g
H ₂ O bipermutée	100 ml

Colorant pour coupes ultra-fines : acétate d'uranyle

Acétate d'uranyle à 5%	13 ml
HCl 0,1N	7 ml

Colorant pour coupes ultra-fines : citrate de plomb

Nitrate de plomb	2 ml
Citrate de sodium	3 ml
NaOH N	4 ml
H ₂ O bipermutée	16 ml

ANNEXE 2

**Le protocole du dosage colorimétrique des
estérases totales chez *Anopheles stephensi***

1. Le schéma d'une plaque de dosage colorimétrique.

La plaque obtenue est schématisée selon le modèle ci-dessous :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blanc	1/8										
B	blanc	1/8										
C	1	1/16										
D	1	1/16										
E	1/2	1/32										
F	1/2	1/32										
G	1/4											
H	1/4											

avec :

Puits A1 et B1 "blanc" : 175 μ l de substrat + 25 μ l colorant,

Puits C1 à F2 : 25 μ l d'une suspension de naphthol (0,1 μ M naph/25 μ l à 0,003125 μ M naph/25 μ l) + 150 μ l tampon phosphate + 25 μ l colorant,

Puits G2 à H12 : 150 μ l substrat + 25 μ l d'échantillon à tester + 25 μ l colorant.

2. Les solutions du dosage enzymatique.

Substrat :

α -Naphthylacétate 0,03 M	1 ml
β -Naphthylacétate 0,03 M	1 ml
Tampon phosphate 0,04 M, pH 7,0 (Gomori, 1955)	98 ml

Colorant :

SDS ¹ à 5%	50 ml
Fast garnet GBC à 1%	20 ml

¹ Dodécylsulfate sel de sodium (MERCK 12012)

ANNEXE 3

Le protocole du dosage des antigènes sporozoïtaires par la méthode ELISA

1. Le schéma d'une plaque ELISA.

La plaque obtenue est décrite comme suit :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blanc	1	1/16									
B	blanc	1	1/16									
C	F	1/2	1/32									
D	F	1/2	1/32									
E	T-	1/4	1/64									
F	T-	1/4	1/64									
G	T+	1/8	1/128									
H	T+	1/8	1/128									

avec :

Puits A1 et B1 "blanc" : 200 µl de chromogène,

Puits C1 et D1 "F" (bruit de fond) : AcL/GS + AcS/TD ou GS + conjugué peroxydase + chromogène,

Puits E1 et F1 "T-" (témoin négatif) : témoin - + AcS/TD ou AcS/GS + conjugué peroxydase + chromogène,

Puits G1 et H1 "T+" (témoin positif) : témoin + + AcS/TD ou AcS/GS + conjugué peroxydase + chromogène,

Puits A2 à H3 : suspension de sporozoïtes (concentrations comprises entre 4651 sp / 200µl et 36 sp / 200µl) + AcS/TD ou AcS/GS + conjugué peroxydase + chromogène,

Puits A4 à H12 : échantillon à tester + AcS/TD ou AcS/GS + conjugué peroxydase + chromogène.

2. Les solutions du dosage immuno-enzymatique.

Tampon de dilution :

Tampon phosphate 0,04 M (Gomori, 1955)	1 l
Albumine bovine	10 g

Tampon de lavage :

Tampon phosphate 0,04 M (Gomori, 1955)	1 l
Tween 20	1 ml

Chromogène :

o-Tolidine ¹	5 mg
N,N-Diméthylformamide ²	250 ml
Tampon pH 4,00 ³	30 ml
H ₂ O ₂ 10 %	12 µl

¹ O-Tolidine (SIGMA T-6269)

² N,N-Diméthylformamide (SIGMA D-4254)

³ Tampon titrisol (MERCK 9884.0001)

ANNEXE 4

Le dosage des estérases totales chez *Anopheles stephensi*

1. Le dosage des estérases totales chez *Anopheles stephensi* adulte.

Tableau 6 : Variation des taux moyens d'estérases totales, au cours des 20 premiers jours, chez les adultes *Anopheles stephensi*. Les concentrations enzymatiques sont exprimées en μM de naphthol formées par adulte \pm écart-type (σ).
(fem S : femelle saine, fem NG : femelle non gorgée, fem I : femelle infestée).

Ages	mâle ($\pm \sigma$)	fem S ($\pm \sigma$)	fem NG ($\pm \sigma$)	fem I ($\pm \sigma$)
J1	0,249 ($\pm 0,058$)	0,482 ($\pm 0,072$)	0,482 ($\pm 0,072$)	0,482 ($\pm 0,072$)
J2	0,239 ($\pm 0,044$)	0,307 ($\pm 0,084$)	0,307 ($\pm 0,084$)	0,307 ($\pm 0,084$)
J3	0,169 ($\pm 0,026$)	0,241 ($\pm 0,060$)	0,241 ($\pm 0,060$)	0,241 ($\pm 0,060$)
J4	0,155 ($\pm 0,030$)	0,270 ($\pm 0,042$)	0,270 ($\pm 0,042$)	0,270 ($\pm 0,042$)
J5	0,176 ($\pm 0,043$)	0,969 ($\pm 0,148$)	0,345 ($\pm 0,071$)	0,773 ($\pm 0,077$)
J6	0,204 ($\pm 0,048$)	0,692 ($\pm 0,044$)	0,355 ($\pm 0,069$)	0,683 ($\pm 0,119$)
J7	0,164 ($\pm 0,034$)	0,418 ($\pm 0,069$)	0,209 ($\pm 0,057$)	0,355 ($\pm 0,059$)
J8	0,173 ($\pm 0,050$)	0,395 ($\pm 0,089$)	0,244 ($\pm 0,040$)	0,322 ($\pm 0,028$)
J9	0,117 ($\pm 0,016$)	0,390 ($\pm 0,095$)	0,254 ($\pm 0,065$)	0,229 ($\pm 0,026$)
J10	0,103 ($\pm 0,029$)	0,241 ($\pm 0,041$)	0,176 ($\pm 0,043$)	0,207 ($\pm 0,049$)
J11	0,170 ($\pm 0,020$)	0,311 ($\pm 0,042$)	0,166 ($\pm 0,049$)	0,278 ($\pm 0,067$)
J12	0,150 ($\pm 0,028$)	0,310 ($\pm 0,035$)	0,255 ($\pm 0,034$)	0,251 ($\pm 0,049$)
J13	0,192 ($\pm 0,027$)	0,269 ($\pm 0,041$)	0,238 ($\pm 0,020$)	0,265 ($\pm 0,038$)
J14	0,134 ($\pm 0,041$)	0,269 ($\pm 0,075$)	0,175 ($\pm 0,040$)	0,241 ($\pm 0,035$)
J15	0,145 ($\pm 0,027$)	0,305 ($\pm 0,050$)	0,195 ($\pm 0,034$)	0,233 ($\pm 0,034$)
J16	0,070 ($\pm 0,034$)	0,209 ($\pm 0,031$)	0,142 ($\pm 0,027$)	0,247 ($\pm 0,033$)
J17	0,094 ($\pm 0,024$)	0,273 ($\pm 0,059$)	0,148 ($\pm 0,039$)	0,171 ($\pm 0,033$)
J18	0,159 ($\pm 0,022$)	0,264 ($\pm 0,030$)	0,245 ($\pm 0,034$)	0,228 ($\pm 0,031$)
J19	0,089 ($\pm 0,036$)	0,265 ($\pm 0,049$)	0,141 ($\pm 0,022$)	0,188 ($\pm 0,060$)
J20	0,132 ($\pm 0,035$)	0,278 ($\pm 0,058$)	0,211 ($\pm 0,029$)	0,210 ($\pm 0,031$)

2. Les mesures du poids chez *Anopheles stephensi* adultes.

Tableau 7 : Evolution du poids, au cours des 20 premiers jours, chez les adultes *Anopheles stephensi*. Les poids sont exprimés en gramme par adulte \pm écart-type (σ).
(fem S : femelle saine, fem NG : femelle non gorgée, fem I : femelle infestée)

Ages	mâle ($\pm \sigma$)	fem S ($\pm \sigma$)	fem NG ($\pm \sigma$)	fem I ($\pm \sigma$)
J1	0,0010 ($\pm 0,0002$)	0,0014 ($\pm 0,0003$)	0,0014 ($\pm 0,0003$)	0,0014 ($\pm 0,0003$)
J2	0,0008 ($\pm 0,0001$)	0,0014 ($\pm 0,0002$)	0,0014 ($\pm 0,0002$)	0,0014 ($\pm 0,0002$)
J3	0,0009 ($\pm 0,0001$)	0,0016 ($\pm 0,0002$)	0,0016 ($\pm 0,0002$)	0,0016 ($\pm 0,0002$)
J4	0,0008 ($\pm 0,0001$)	0,0015 ($\pm 0,0002$)	0,0015 ($\pm 0,0002$)	0,0015 ($\pm 0,0002$)
J5	0,0009 ($\pm 0,0001$)	0,0027 ($\pm 0,0003$)	0,0016 ($\pm 0,0002$)	0,0024 ($\pm 0,0003$)
J6	0,0009 ($\pm 0,0001$)	0,0024 ($\pm 0,0002$)	0,0015 ($\pm 0,0002$)	0,0021 ($\pm 0,0003$)
J7	0,0008 ($\pm 0,0001$)	0,0018 ($\pm 0,0003$)	0,0014 ($\pm 0,0002$)	0,0016 ($\pm 0,0004$)
J8	0,0008 ($\pm 0,0001$)	0,0017 ($\pm 0,0002$)	0,0013 ($\pm 0,0001$)	0,0015 ($\pm 0,0002$)
J9	0,0007 ($\pm 0,0001$)	0,0015 ($\pm 0,0002$)	0,0013 ($\pm 0,0002$)	0,0015 ($\pm 0,0001$)
J10	0,0008 ($\pm 0,0001$)	0,0016 ($\pm 0,0002$)	0,0014 ($\pm 0,0002$)	0,0015 ($\pm 0,0002$)
J11	0,0009 ($\pm 0,0001$)	0,0016 ($\pm 0,0003$)	0,0013 ($\pm 0,0001$)	0,0016 ($\pm 0,0003$)
J12	0,0009 ($\pm 0,0001$)	0,0017 ($\pm 0,0002$)	0,0016 ($\pm 0,0001$)	0,0015 ($\pm 0,0002$)
J13	0,0009 ($\pm 0,0001$)	0,0017 ($\pm 0,0003$)	0,0014 ($\pm 0,0002$)	0,0015 ($\pm 0,0002$)
J14	0,0009 ($\pm 0,0001$)	0,0015 ($\pm 0,0003$)	0,0013 ($\pm 0,0002$)	0,0015 ($\pm 0,0001$)
J15	0,0008 ($\pm 0,0001$)	0,0015 ($\pm 0,0002$)	0,0012 ($\pm 0,0002$)	0,0014 ($\pm 0,0002$)
J16	0,0007 ($\pm 0,0001$)	0,0013 ($\pm 0,0001$)	0,0012 ($\pm 0,0001$)	0,0014 ($\pm 0,0001$)
J17	0,0009 ($\pm 0,0001$)	0,0015 ($\pm 0,0001$)	0,0013 ($\pm 0,0001$)	0,0014 ($\pm 0,0001$)
J18	0,0008 ($\pm 0,0001$)	0,0015 ($\pm 0,0002$)	0,0014 ($\pm 0,0002$)	0,0015 ($\pm 0,0002$)
J19	0,0009 ($\pm 0,0001$)	0,0016 ($\pm 0,0001$)	0,0013 ($\pm 0,0001$)	0,0015 ($\pm 0,0002$)
J20	0,0009 ($\pm 0,0001$)	0,0016 ($\pm 0,0001$)	0,0013 ($\pm 0,0002$)	0,0016 ($\pm 0,0001$)

3. Le dosage des estérases totales chez *Anopheles stephensi* après injection de corps étrangers.

Tableau 8 : Variation des taux moyens d'estérases totales chez des femelles *Anopheles stephensi* inoculées avec des corps étrangers (hématies (H), latex (L), sporozoïtes (sp) et RPMI (RP)). Les concentrations sont exprimées en μM de naphthol formées par adulte \pm écart-type (σ).

Temps (h)	fem (H) ($\pm \sigma$)	fem (L) ($\pm \sigma$)	fem (sp) ($\pm \sigma$)	fem (RP) ($\pm \sigma$)	fem S ($\pm \sigma$)
24 (J1)	0,482 (\pm 0,072)	0,482 (\pm 0,072)	0,482 (\pm 0,072)	0,482 (\pm 0,072)	0,482 (\pm 0,072)
24+1	1,603 (\pm 0,215)	1,281 (\pm 0,323)	1,284 (\pm 0,211)	0,751 (\pm 0,200)	
24+2	1,107 (\pm 0,318)	1,330 (\pm 0,342)	1,298 (\pm 0,185)	0,910 (\pm 0,185)	
24+4	1,210 (\pm 0,283)	1,276 (\pm 0,366)	1,387 (\pm 0,249)	0,853 (\pm 0,162)	
24+6	1,241 (\pm 0,283)	1,210 (\pm 0,301)	1,156 (\pm 0,203)	0,981 (\pm 0,216)	
48 (J2)	1,100 (\pm 0,278)	1,008 (\pm 0,250)	1,024 (\pm 0,515)	0,396 (\pm 0,170)	0,307 (\pm 0,084)
72 (J3)	0,950 (\pm 0,136)	0,916 (\pm 0,160)	0,923 (\pm 0,142)	0,549 (\pm 0,123)	0,241 (\pm 0,060)
96 (J4)	0,712 (\pm 0,165)	0,757 (\pm 0,160)	0,756 (\pm 0,152)	0,711 (\pm 0,142)	0,270 (\pm 0,042)

ANNEXE 5

Le calibrage du dosage des antigènes sporozoïtaïres par l'ELISA

1. Le calibrage de l'épreuve en double sandwich.

Tableau 9 : Variation des densités optiques chez les femelles saines (-) et infestées (+) pour différentes concentrations (Ac 1/100 à Ac 1/800) d'anticorps lapin anti-sporozoïtes matures (AcL/GS). Le dosage est effectué avec l'AcS/GS au 1/200.

AcL/GS	Dilutions femelles -			Dilutions femelles +		
	- 1/40	- 1/80	- 1/160	+ 1/40	+ 1/80	+ 1/160
Ac 1/100	1,685	1,799	1,306	1,203	1,748	1,362
Ac 1/200	1,013	0,925	0,990	1,184	1,473	0,942
Ac 1/400	1,189	0,818	0,687	1,031	0,888	0,939
Ac 1/800	0,965	0,788	0,590	1,171	0,871	0,799

Tableau 10 : Variation des densités optiques chez les femelles saines (-) et infestées (+) pour différentes concentrations (Ac 1/100 à Ac 1/800) d'anticorps souris anti-sporozoïtes matures (AcS/GS). Le dosage est effectué avec l'AcL/GS au 1/200.

AcS/GS	Dilutions femelles -			Dilutions femelles +		
	- 1/40	- 1/80	- 1/160	+ 1/40	+ 1/80	+ 1/160
Ac 1/100	0,980	0,991	0,827	1,189	1,137	0,941
Ac 1/200	0,499	0,449	0,394	0,764	0,721	0,569
Ac 1/400	0,349	0,287	0,249	0,557	0,560	0,406
Ac 1/800	0,234	0,214	0,181	0,470	0,475	0,339

Tableau 11 : Variation des densités optiques chez les femelles saines (-) et infestées (+) pour différentes concentrations (Ac 1/100 à Ac 1/800) d'anticorps souris anti-sporozoïtes immatures (AcS/TD). Le dosage est effectué avec l'AcL/GS au 1/200.

AcS/TD	Dilutions femelles -			Dilutions femelles +		
	- 1/40	- 1/80	- 1/160	+ 1/40	+ 1/80	+ 1/160
Ac 1/100	0,515	0,529	0,431	0,584	0,585	0,439
Ac 1/200	0,255	0,236	0,207	0,347	0,368	0,247
Ac 1/400	0,183	0,154	0,130	0,241	0,280	0,160
Ac 1/800	0,120	0,112	0,095	0,194	0,245	0,126

Tableau 12 : Variation des densités optiques pour différentes concentrations (A 1/20 à A 1/10240) de femelles saines (-) et infestées (+), avec l'AcS/GS et l'AcL/GS dilués au 1/200.

AcS/GS	femelles -	femelles +
A1/20	1,875	2,051
A1/40	1,848	2,029
A1/80	1,386	1,668
A1/160	1,242	1,405
A1/320	1,022	1,240
A1/640	1,054	1,125
A1/1280	0,995	1,040
A1/2560	0,872	0,954
A1/5120	0,867	0,892
A1/10240	0,802	0,819

2. La reproductibilité de la méthode ELISA.

Tableau 13 : Distribution des densités optiques pour la gamme de sporozoïtes, lors du dosage avec l'AcS/TD. La moyenne (Moy) et l'écart-type (σ) sont calculés sur l'ensemble des 5 plaques testées.

nb sporozoïtes	plaque 1	plaque 2	plaque 3	plaque 4	plaque 5	Moy \pm (σ)
9728sp	1,208	1,254	1,133	1,011	1,099	1,141 \pm (0,095)
4864sp	0,968	0,910	0,894	0,964	1,295	1,006 \pm (0,165)
2432sp	0,646	0,650	0,628	0,982	1,041	0,789 \pm (0,204)
1216sp	0,469	0,542	0,400	0,815	0,965	0,638 \pm (0,241)
608sp	0,333	0,419	0,321	0,773	0,897	0,549 \pm (0,268)
304sp	0,277	0,284	0,244	0,595	0,755	0,431 \pm (0,230)
152sp	0,157	0,171	0,201	0,445	0,584	0,312 \pm (0,192)
76sp	0,048	0,144	-0,018	0,308	0,353	0,167 \pm (0,161)

Tableau 14 : Distribution des densités optiques pour la gamme de sporozoïtes, lors du dosage avec l'AcS/GS. La moyenne (Moy) et l'écart-type (σ) sont calculés sur l'ensemble des 5 plaques testées.

nb sporozoïtes	plaque 1	plaque 2	plaque 3	plaque 4	plaque 5	Moy \pm (σ)
9728sp	1,141	1,131	1,161	1,209	1,234	1,175 \pm (0,045)
4864sp	1,125	1,131	1,020	0,924	1,300	1,100 \pm (0,140)
2432sp	1,037	1,128	0,919	0,768	1,244	1,019 \pm (0,185)
1216sp	0,769	0,871	0,947	0,647	1,310	0,909 \pm (0,251)
608sp	0,472	0,734	0,440	0,552	1,106	0,661 \pm (0,274)
304sp	0,240	0,338	0,203	0,375	0,827	0,396 \pm (0,251)
152sp	0,018	0,092	-0,051	0,261	0,469	0,158 \pm (0,209)
76sp	-0,108	-0,001	-0,222	0,201	0,353	0,045 \pm (0,232)

3. Le seuil de positivité du dosage ELISA.

Tableau 15 : Répartition des moustiques sains (-) et infestés (+) en fonction des densités optiques (DO), lors du dosage avec l'AcS/TD.

classes DO	fem+	% fem+	fem-	% fem-
0,050-0,100	4	1,25	6	3,41
0,101-0,150	8	2,50	18	10,23
0,151-0,200	14	4,38	38	21,59
0,201-0,250	26	8,13	48	27,27
0,251-0,300	48	15,00	36	20,45
0,301-0,350	56	17,50	24	13,64
0,351-0,400	42	13,13	2	1,14
0,401-0,450	42	13,13	4	2,27
0,451-0,500	22	6,88	0	0,00
0,501-0,550	32	10,00	0	0,00
0,551-0,600	10	3,13	0	0,00
0,601-0,650	0	0,00	0	0,00
0,651-0,700	0	0,00	0	0,00
0,701-0,750	6	1,88	0	0,00
0,751-0,800	0	0,00	0	0,00
0,801-0,850	2	0,63	0	0,00
0,851-0,900	0	0,00	0	0,00
0,901-0,950	0	0,00	0	0,00
0,951-1,000	2	0,63	0	0,00
1,001-1,050	2	0,63	0	0,00
1,051-1,100	2	0,63	0	0,00
1,101-1,150	0	0,00	0	0,00
>1,151	2	0,63	0	0,00

Tableau 16 : Répartition des moustiques sains (-) et infestés (+) en fonction des densités optiques (DO), lors du dosage avec l'AcS/GS.

classes DO	fem+	% fem+	fem-	% fem-
0,050-0,100	5	1,56	2	1,14
0,101-0,150	3	0,94	8	4,55
0,151-0,200	4	1,25	32	18,18
0,201-0,250	8	2,50	44	25,00
0,251-0,300	6	1,88	38	21,59
0,301-0,350	5	1,56	36	20,45
0,351-0,400	15	4,69	12	6,82
0,401-0,450	40	12,50	4	2,27
0,451-0,500	48	15,00	0	0,00
0,501-0,550	30	9,38	0	0,00
0,551-0,600	36	11,25	0	0,00
0,601-0,650	38	11,88	0	0,00
0,651-0,700	16	5,00	0	0,00
0,701-0,750	11	3,44	0	0,00
0,751-0,800	4	1,25	0	0,00
0,801-0,850	5	1,56	0	0,00
0,851-0,900	7	2,19	0	0,00
0,901-0,950	4	1,25	0	0,00
0,951-1,000	10	3,13	0	0,00
1,001-1,050	4	1,25	0	0,00
1,051-1,100	6	1,88	0	0,00
1,101-1,150	3	0,94	0	0,00
>1,151	12	3,75	0	0,00

Les recherches sur la compétence vectorielle ont retenu notre attention, car elles peuvent aboutir à de nouvelles perspectives en matière de lutte contre le paludisme. En effet, on déplore aujourd'hui la résurgence du paludisme dans certaines régions, l'extension de la chimiorésistance des *Plasmodium* et de la résistance des anophèles aux insecticides. L'absence de stratégies de lutte efficaces dans les zones hyperendémiques, et l'impossibilité d'obtenir la vaccination promise dans l'état actuel de nos connaissances accroissent les difficultés.

Nous avons entrepris d'étudier certains aspects des relations hôte-parasite sur un des principaux vecteurs du paludisme humain dans les régions orientales, *Anopheles stephensi*. En laboratoire, c'est un très bon vecteur d'une espèce de plasmodie de rongeurs, *P. y. yoelii*.

L'étude cytologique de l'hémolymphe d'*A. stephensi*, à l'état adulte, est réalisée pour la première fois, à partir d'observations en microscopie optique et électronique. Différentes cellules immunitaires, les hémocytes, sont mises en évidence et étudiées sur le plan morphologique et fonctionnel. Les hémocytes, en circulation dans l'hémolymphe, sont divisés en deux grandes catégories, les hémocytes sans granules (les prohémocytes et les oenocytoïdes) et les hémocytes avec granules (plasmatocytes macrophages). L'hémolymphe d'*A. stephensi*, comparée aux autres insectes, présente une particularité avec la présence d'adipohémocytes.

De plus, les adipohémocytes interviennent dans le processus de phagocytose des corps étrangers ; ils ont ainsi un rôle dans les réactions de défense du moustique.

La physiologie des relations *Anopheles-Plasmodium* et la cascade phénoloxydasique, composante essentielle du phénomène d'encapsulation humorale chez les diptères, sont appréhendées par le dosage colorimétrique des estérases. Les résultats indiquent que les femelles ayant pris un repas de sang sur des souris impaludées présentent certaines "anomalies" par rapport aux femelles nourries sur un vertébré sain : la présence du *Plasmodium* diminue le volume de sang prélevé par les femelles, et semble influencer leur équipement estérasique. Lors de la migration des sporozoïtes du tube digestif vers les glandes salivaires, via l'hémolymphe, on observe une baisse significative de la concentration d'estérases chez les femelles infestées. Les anophèles sont donc capables de reconnaître le "soi" du "non-soi" et d'y répondre, entre autre, par une augmentation d'activité enzymatique.

L'utilisation de la technique ELISA en double sandwich nous a permis de confirmer que l'antigène CS mature, caractéristique de la surface des sporozoïtes dans les glandes salivaires, se met en place alors que ces derniers sont dans les oocystes, c'est-à-dire au niveau du tube digestif.

Mots-clés : *Anopheles stephensi* - *Plasmodium y. yoelii* - paludisme - compétence vectorielle - hémocytes - estérases - ELISA

SUMMARY

Studies on vectorial capacity are interesting because they can lead to new perspectives in the fight against malaria. Effectively, chemical resistance of *Plasmodium* and resistance of *Anopheles* to insecticides are spreading, as well as reappearance of malaria in several countries, the lack of efficient methods of control in hyperendemic areas and the impossibility of obtaining the promise of vaccination with our present knowledges.

We undertook the study of certain aspects of host-parasite relationships on one of the main vector of human malaria in eastern areas, *Anopheles stephensi*. In the laboratory, *A. stephensi* is a very good vector of a rodent plasmodia, *Plasmodium yoelii yoelii*.

Cytological study of the adult *A. stephensi* hemolymph is made for the first time, from optic and electronic observations. Different immune cells, the hemocytes, are shown up and studied from morphological and functional aspects. The hemocytes, circulating in the hemolymph, are divided into two main classes, hemocytes without granules (prohemocytes, oenocytoids) and granular hemocytes (plasmotocytes, adipohemocytes). The presence of adipohemocytes gives a certain specificity to *A. stephensi* hemolymph. The reaction of blood cells in mosquito defense reaction indicates that adipohemocytes engulf foreign bodies.

Colorimetric dosage of esterases is useful to explain *Anopheles-Plasmodium* relationships and phenoloxidase cascade, which is an essential factor of dipteran humoral encapsulation. Female who took parasited blood from mice shows certain differences compared with female who took blood from healthy mice. Presence of *Plasmodium* decreases amount of ingested blood, and seems to affect esterases. During sporozoite migration from the midgut to salivary glands, via the hemolymph, a significant drop of esterases in infected females is noticed. The anophelids are therefore able to recognize "self" from "non-self" and to reply by an increase of enzymatic activity.

The double sandwich ELISA methods confirms that the mature CS antigen, characteristic of sporozoite in the salivary glands, is formed while sporozoites are in the oocysts of the midgut.

Key-words : *Anopheles stephensi* - *Plasmodium y. yoelii* - malaria - vectorial capacity - hemocytes - esterases - ELISA