Ann. Soc. belge Méd. trop.
1989, 69, 3-23

PRODUCTION DE SPOROZOITES DE *PLASMODIUM* HUMAINS A BOBO-DIOULASSO (BURKINA FASO)

par

C. BOUDIN[1], J. LYANNAZ[2], M.F. BOSSENO[3], J. CHAIZE[2] & P. CARNEVALE[3]
[1]*ORSTOM - Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Médecine, 38700 La Tronche, France*
[2]*Centre Muraz, B.P. 153, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso*
[3]*Antenne ORSTOM, B.P. 171, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso*

Résumé — La production massive de sporozoïtes de *Plasmodium* nécessite un élevage intensif du moustique vecteur et une infection expérimentale de ce vecteur. *A. gambiae* est responsable de la transmission de *P. falciparum P. malariae* et *P. ovale*, au Burkina.

Dans une première partie, nous avons étudié, le rôle de 3 paramètres intervenant sur le rendement de l'élevage. Il s'agit de la température, du type et du mode d'alimentation. Dans la deuxième partie, sont étudiés les différents facteurs intervenant sur le rendement des infections expérimentales, à partir de sujets porteurs de gamétocytes.

L'augmentation de température ambiante, au-dessus de 25 °C, augmente la pollution bactérienne ou mycosique de l'insectarium. Il en résulte une diminution de la survie du moustique.

L'alimentation naturelle sur lapin, donne de meilleurs résultats, sur la ponte et le taux de gorgement des moustiques, que l'alimentation artificielle par piqûre à travers une membrane artificielle. Cependant, elle est responsable d'une forte mortalité chez cet animal de laboratoire. Nous avons finalement adopté le compromis suivant: les 2 premiers repas sanguins sont donnés sur lapin, tandis que les suivants se font en artificiel sur sang de bœuf.

Il est nécessaire de donner aux femelles 2 repas consécutifs pour lancer le premier cycle gonotrophique et obtenir une ponte initiale maximale. La date idéale de ces 2 premiers repas est le 3ème - 4ème jour de la vie adulte du moustique. Avant, le rendement de gorgement est moins bon; après le rendement global de la ponte diminue.

Il existe une corrélation positive entre l'intensité de la ponte et la mortalité des moustiques.

En ce qui concerne les moustiques réservés ultérieurement à l'infection, il est impératif de les infecter tôt pour avoir un maximum de femelles positives survivantes à la fin du cycle sporogonique. Ces moustiques reçoivent donc leur premier et unique repas sanguin naturel au 3ème jour de vie adulte. Ils sont ensuite infectés artificiellement au 5ème jour.

Le pourcentage d'infection chez le moustique dépend de facteurs propres au parasite. Il est en relation avec la densité gamétocytaire, au moins pour des densités inférieures à 450 gamétocytes/mm^3. Au delà de ce seuil, le pourcentage d'infection semble diminuer quand la densité gamétocytaire augmente. Ni le sex-ratio, ni la maturité des gamétocytes jugée sur l'exflagellation des microgamètes, n'interviennent *in vivo*.

Le pourcentage d'infection chez le moustique dépend aussi de facteurs propres à l'hôte vertébré. Il semble exister une phagocytose spécifique des gamètes dans l'estomac du moustique et le pouvoir infectant des gamétocytes décroît avec l'âge des porteurs. Ces 2 observations peuvent résulter de la mise en jeu de mécanismes immunitaires antigamètes, aboutissant à une inhibition ou à une diminution du pouvoir infectant des porteurs de gamétocytes.

Enfin, le rendement de l'infection dépend de facteurs propres au moustique. La susceptibilité de la souche géographique, la longévité du vecteur, la quantité de sang ingéré au cours du gorgement artificiel et la charge parasitaire chez le moustique (au moins pour les fortes densités oocystiques), sont des facteurs limitants. Bien que l'alimentation sanguine soit importante pour la maturation parasitaire chez le moustique infecté, nous préférons ne donner qu'un seul repas sanguin au 5ème jour de l'infection, pour privilégier la survie du vecteur.

Cette étude a standardisé les conditions d'élevage, d'alimentation artificielle et d'infection expérimentale d'*A. gambiae*. Nous avons obtenu régulièrement 10.000 moustiques par jour et de grandes quantités de femelles infectées par *P. falciparum, P. malariae* et *P. ovale*. Ce travail ouvre des perspectives intéressantes sur l'étude du rôle de l'immunité antigamète.

KEYWORDS: *Anopheles gambiae;* Breeding, Artificial Feeding; *Plasmodium falciparum; Plasmodium malariae; Plasmodium ovale;* Sporozoïtes; Expérimental Infection.

ORSTOM Fonds Documentaire
N° : 26.551 ex1
Cote : B M P 138
30 JUIN 1989

Introduction

Une production intensive de sporozoïtes est nécessaire pour la réalisation *in vitro* du cycle exoérythrocytaire du *Plasmodium* (17) et pour les études immunologiques ou immunochimiques portant sur ce stade parasitaire. L'obtention *in vitro* de ces sporozoïtes n'est actuellement pas possible. Il est donc obligatoire de les obtenir *in vivo.* Dans les conditions naturelles, cette production passe par 2 phases:

— un élevage du moustique vecteur;

— et une infection expérimentale de ce moustique.

Le vecteur principal des 3 espèces plasmodiales *(P. falciparum, P. malariae* et *P. ovale),* rencontrées en zone de savane soudanienne, est *A. gambiae* (4 - 19 - 28).

Dans une première partie de l'étude, sont envisagées 3 paramètres de l'élevage des moustiques adultes: la température, le type et le mode d'alimentation. Ces 3 paramètres ont un rôle sur la survie, la ponte et le taux de gorgement d'*A. gambiae.*

Dans la deuxième partie, sont examinés les facteurs «parasitaires», «humains» et «moustiques», essentiels aux succès des infections expérimentales à partir du sang de porteurs de gamétocytes de *Plasmodium* humains.

1. Matériel et méthodes

1.1. *La souche locale d'*A. gambiae

Les moustiques d'élevage sont issus de femelles d'*A. gambiae,* cytotype Mopti (V. Robert, comm. pers.). Cette souche locale peut être nourrie artificiellement sur membrane selon la technique de Rutledge *et al.* (23).

1.2. *Technique d'élevage*

Les femelles pondent sur des disques de papier filtre humide. Ces pontes sont recueillies tous les jours et laissées en maturation pendant 24 heures (12).

Au 2ème jour, les œufs sont déposés dans des bacs remplis à moitié d'eau de rivière (1,5 litres). La concentration est d'environ 5000 œufs/bac.

Le lendemain, l'éclosion des larves de stade I est pratiquement complète et synchrone. Ces larves restent sans apport extérieur de nourriture pendant 24 heures.

Les larves de stade II sont ensuite réparties dans des bacs remplis d'eau de ville, à la concentration de 2500 larves/bac. Nous leur apportons, tous les jours, environ 300 mg de poudre nutritive par bac. Les larves de stade III, ont une concentration optimale de 1250 larves/bac et reçoivent environ 450 mg de poudre. Enfin celles du stade IV sont à 600 larves/bac et reçoivent aussi 450 mg.

La nourriture est constituée de 2/3 de farine de blé sucrée (blédine) et de 1/3 d'ultra-levure lyophilisée (vitalevure).

L'eau des bacs est changée tous les 2 jours. La synchronisation des différents stades larvaires est réalisée au moment de ces changements d'eau, par filtration à travers des tamis de mailles différentes (tulle moustiquaire).

Un développement larvaire correct d'*A. gambiae* en insectarium, se déroule en 6 à 10 jours. Tout retard de maturation signifie: soit un apport insuffisant de nourriture, soit un manque de synchronisation, soit une température incorrecte.

Le recueil des nymphes s'effectue à la pipette si elles sont peu nombreuses, ou par sédimentation différentielle. Le contenu des bacs est filtré. Les larves de stade IV et les nymphes sont déposées à la surface d'une eau à 5 °C dans une ampoule à décanter. Les larves anesthésiées par le froid tombent au fond et sont aisément recueillies, tandis que les nymphes surnagent en surface. Les larves de stade IV sont alors réparties dans de nouveaux plateaux propres et les nymphes sont distribuées à raison de 800 individus, dans de petits Becher plein d'eau. Ces Bécher sont introduits dans des cages de moustiquaire de 30 × 30 × 30 cm.

L'éclosion a lieu 12 à 24 heures après. Les adultes s'alimentent sur des tampons de coton imbibés d'eau glucosée à 10 %. Les femelles prennent 2 repas sanguins consécutifs sur lapin les 3ème et 4ème jours. Elles sont ensuite alimentées artificiellement tous les 3 jours, avec du sang de bœuf stérile et hépariné (héparine sans conservateur 1 ‰) déposé dans des cellules de gorgement (10), tendues de parafilm (R). Le cycle gonotrophique du moustique dure 2 jours, après l'alimentation sanguine. Les moustiques sont maintenus à 25 °C et 80 % d'humidité avec un éclairement artificiel de 6 heures par jour.

1.3. *Etude des conditions d'élevage d'*A. gambiae

L'influence des 3 paramètres: la température ambiante, le type et le mode d'alimentation, a été appréciée sur 3 indices: 1) la longevité, 2) le volume de la ponte, 3) le pourcentage de gorgement des femelles.

Ces indices ont permis de sélectionner les conditions optimales d'élevage et d'alimentation artificielle des moustiques adultes.

La longévité a été évaluée sur 2 indices:

— le «taux de survie», qui est le pourcentage de femelles survivantes au 20ème jour. Ces mesures n'ont été effectuées que jusqu'au 20ème jour. Au delà, l'effectif des femelles survivantes est trop faible pour pouvoir établir des moyennes interprétables.

— Le deuxième indice a été la mortalité relative journalière. C'est la moyenne du rapport: nombre de femelles mortes par le nombre total de femelles survivantes, chaque jour.

L'intensité de la ponte a été évaluée par la moyenne des œufs pondus par chaque femelle survivante, après chaque repas sanguin.

Le pourcentage de gorgement a été apprécié sur 2 indices: soit le «taux moyen de gorgement», soit le «taux initial de gorgement».

— Le «taux moyen de gorgement» est le pourcentage moyen de femelles gorgées à chaque repas.

— Le «taux initial de gorgement» est le pourcentage moyen de femelles nullipares gorgées lors du premier ou des 2 premiers repas.

100 femelles et 50 mâles néonates du même jour ont été répartis dans chaque cage expérimentale. Ces cages, après permutation aléatoire, ont été soumises à une alimentation, soit artificielle sur sang de bœuf, soit naturelle sur lapin, avec différentes modalités d'alimentation: 1 repas initiateur chez les nullipares, soit au 2ème soit au 3ème jour, ou 2 repas initiateurs consécutifs aux 2ème et 3ème jours ou au 3ème et 4ème jours. Ces expériences ont été menées à 2 températures différentes: 25 °C et 30 °C. Chaque jour, dans chaque cage, nous avons compté le nombre de femelles mortes, de femelles gorgées et d'œufs pondus. Cette expérimentation a été répétée 3 fois afin d'éliminer un éventuel «effet cage».

1.4. *Le dépistage des porteurs de gamétocytes*

Des gouttes épaisses ont été réalisées chez tous les sujets se présentant le soir de l'enquête dans différents villages de la région de Bobo-Dioulasso (Burkina Faso). Le lendemain matin, les prélèvements ont été simultanément déshémoglobinisés et colorés avec 15 % de Giemsa, pendant 15 minutes. Une première lecture des lames a été faite avec un objectif à immersion (× 50). Les lames positives en gamétocytes ont ensuite été reprises en comptant le nombre de gamétocytes rencontrés lors de la lecture de 1250 globules blancs. La densité gamétocytaire a été estimée par la formule suivante:

$$\text{nombre de gamétocytes/mm}^3 = \frac{\text{nombre de gamétocytes lus}}{\text{1250 globules blancs}} \times 7500$$

(7500 correspond au nombre moyen de globules blancs/mm^3 dans la population. Le seuil de détection a été d'environ 5 gamétocytes/mm^3.

1.5. *La technique d'infection expérimentale*

L'après-midi, certains porteurs de gamétocytes ont été retrouvés dans le village et amenés au laboratoire. Une ponction veineuse au pli du coude a été réalisée sur héparine sans conservateur. Le sang a été immédiatement distribué, à raison de 1 à 2 ml, dans des cellules d'alimentation artificielles. Ces cellules ont été maintenues à 37 °C par un courant d'eau chaude pendant toute la durée du repas sanguin (10 minutes) et ont été agitées de temps en temps pour homogénéiser la suspension de globules rouges et de parasites. Nous avons gorgé des nullipares de 3 jours et des primipares de 5 jours. 2 cages d'environ 500 femelles ont pu être gorgées à partir de chaque cellule avant que n'apparaissent, au contact de l'air, l'exflagellation des microgamétocytes.

Simultanément à l'infection artificielle, un nouveau contrôle de la densité gamétocytaire sur goutte épaisse, un test d'exflagellation entre lame et lamelle (24) et un frottis mince 1/2 heure après la distribution du sang ont été effectués. Ce frottis a servi à détecter des exflagellations passées

inaperçues à la lecture directe sur sang frais. Les femelles gorgées ont été séparées des autres moustiques et maintenues en insectarium à 25 °C. Un repas sanguin sur lapin, leur a été donné au 5ème jour après l'infection, pour faciliter la maturation des oocystes. Au 9ème jour, l'indice oocystique a été déterminé sur un échantillon de 10 femelles. Au 12ème jour (temps nécessaire au développement sporogonique de *P. falciparum),* un autre échantillon de femelles a été tué par congélation 30 minutes à – 20 °C. Les glandes salivaires ont été examinées à frais, au microscope, avec un objectif (× 10) afin de rechercher des sporozoïtes. Les moustiques survivants des cages positives ont alors été disséqués. Les moustiques des cages encore négatives n'ont été disséqués que 2 jours plus tard.

1.6. *Analyse des résultats*

Une éventuelle relation entre densité gamétocytaire et pourcentage d'infection chez le moustique a été recherchée de 2 manières différentes. Premièrement, les densités gamétocytaires et les pourcentages d'infection correspondants ont été groupés par classes. Deuxièmement, les courbes des moyennes mobiles de raison 5 de ces 2 paramètres ont été tracées.

Les pourcentages moyens d'infection ont été calculés et comparés, globalement, puis d'une classe à l'autre par le test du khy carré.

Pour éliminer une éventuelle intervention du facteur densité gamétocytaire sur le pouvoir infectant d'un porteur de gamétocytes et pour pouvoir aussi analyser l'intervention des autres facteurs associés, nous avons défini le « pouvoir infectant d'un gamétocyte ». Il s'agit du rapport entre le pourcentage d'infection observé et la densité gamétocytaire correspondante.

L'analyse du pouvoir infectant moyen d'un gamétocyte, en fonction des différents paramètres, a été faite par un test global d'analyse de variance, puis par une comparaison de moyennes 2 à 2.

2. **Résultats et commentaires**

2.1. *Etude des facteurs conditionnant l'élevage d'*A. gambiae

2.1.1. *La température*

Après alimentation artificielle, le taux moyen de gorgement, est de 30,9 % à 30 °C et de 31,5 % à 25 °C (tableau 1). Après alimentation naturelle, ce taux est respectivement de 53,9 % et de 57,1 % (tableau 1).

Avec une alimentation artificielle, le pourcentage des femelles survivantes est significativement plus grand à 25 °C (33 %) qu'à 30 °C (15,2 %) (tableau 1). Inversement, avec une alimentation naturelle, le pourcentage de survie est significativement plus grand à 30 °C (37,7 %) qu'à 25 °C (31,6 %) (tableau 1).

Chaque femelle nourrie artificiellement avec du sang de bœuf, pond en moyenne, 23,8 œufs par cycle gonotrophique à 25 °C et 22,7 œufs à 30 °C (tableau 1). La différence n'est pas significative. En alimentation naturelle sur

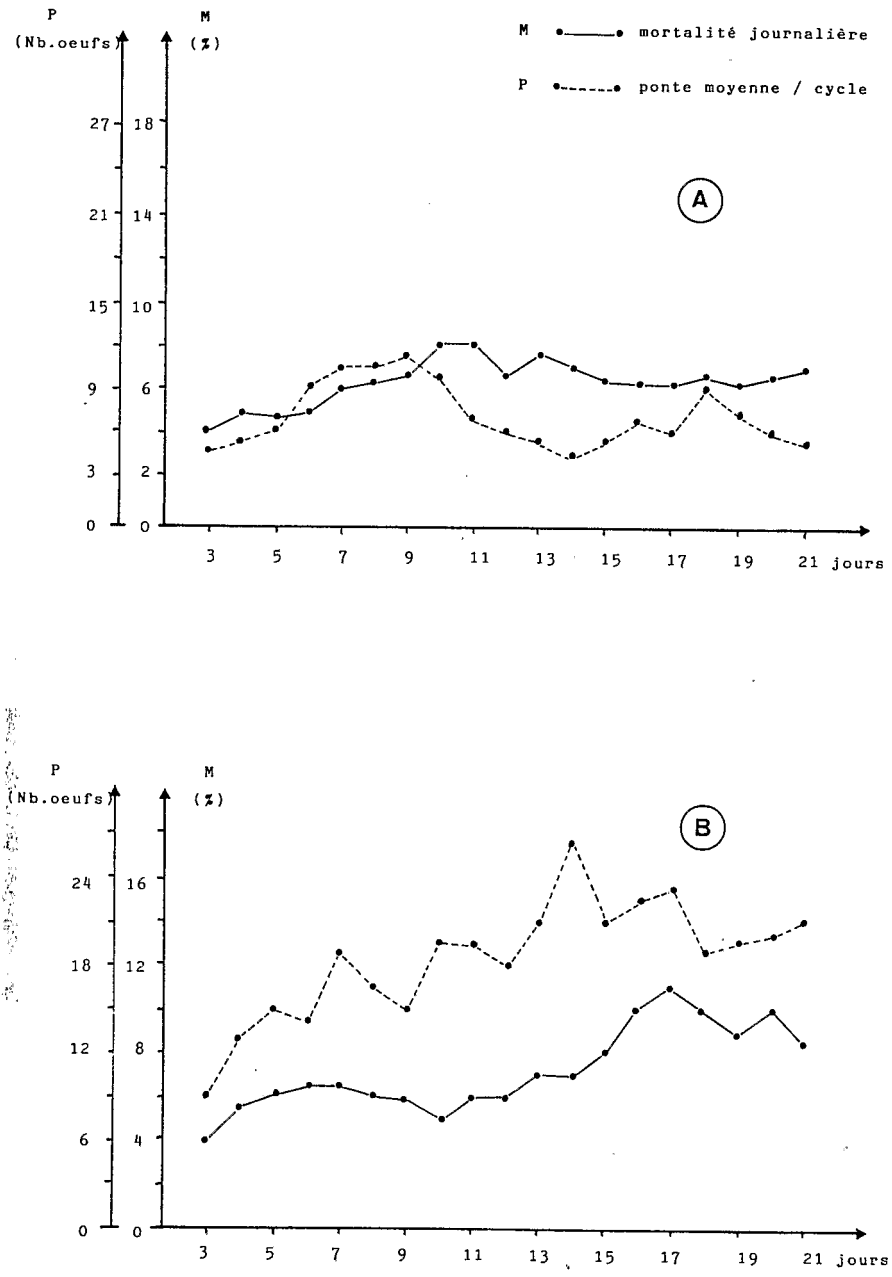

Figure 1.

Etude comparée de la mortalité et de la ponte chez *A. gambiae* élevé en insectarium et soumis: soit à une alimentation naturelle sur lapin (A), soit à une alimentation artificielle sur sang de bœuf (B).

— La mortalité journalière est la moyenne du rapport:

$$\frac{\text{Nb de femelles mortes}}{\text{Nb de femelles survivantes}} \text{ chaque jour.}$$

— La ponte moyenne par cycle gonotrophique est la moyenne des œufs pondus par chaque femelle survivante, au cours de chaque cycle gonotrophique.

lapin, la ponte moyenne par femelle et par cycle gonotrophique est de 42,4 œufs à 25 °C et de 65,9 œufs à 30 °C (tableau 1). La différence est ici significative.

L'augmentation de température ne semble pas améliorer le taux de gorgement, semble avoir un effet défavorable sur la survie des moustiques en alimentation artificielle et a un effet variable sur la ponte des femelles.

2.1.2. *Le type d'alimentation à 25 °C*

Le taux moyen de gorgement est de 31,5 % après alimentation artificielle et de 57,1 % après alimentation naturellle (tableau 1). La différence est très significative.

33 % des femmelles nourries artificiellement et 31,6 % des femelles nourries naturellement, sont encore vivantes au 20ème jour (tableau 1). La différence n'est pas significative.

La ponte moyenne par moustique et par cycle gonotrophique est de 23,8 œufs en alimentation artificielle et de 42,4 œufs en alimentation naturelle.

Les moustiques se gorgent mieux et pondent mieux en alimentation naturelle. La longévité est sensiblement la même quelque soit le type d'alimentation.

La nature du sang n'est pas en cause, comme l'ont montré des expériences croisées non rapportées ici. C'est bien le type d'alimentation, artificiel ou naturel, qui est responsable de ces différences.

Une alimentation naturelle intégrale exige un élevage parallèle de lapins. Nous avons finalement choisi une alimentation mixte. Les nullipares sont initiées avec un ou deux repas sanguins sur lapin ce qui donne une bonne première ponte, puis les alimentations ultérieures se font en artificiel, sur sang de bœuf, afin d'épargner les lapins.

2.1.3. *Le mode d'alimentation à 25 °C*

Le but est ici double: 1) déterminer la date du premier repas sanguin pour obtenir le meilleur gorgement des nullipares aussi bien en alimentation naturelle qu'artificielle; 2) déterminer si un seul ou 2 repas sanguins consécutifs sont nécessaires pour déclencher la première ponte de manière optimale.

2.1.3.1. *Influence de la date du premier repas sanguin*

En alimentation artificielle comme en alimentation naturelle:

— le taux de gorgement initial est plus grand au 3ème jour qu'au 2ème jour (respectivement 19,7 % contre 14,2 % et 36 % contre 23,7 %);

— le taux moyen de gorgement est plus grand avec une alimentation sanguine au 3ème jour plutôt qu'au 2ème jour (respectivement 36 % contre 27 % et 62 % contre 50 %);

— La ponte moyenne par femelle survivante et par cycle gonotrophique est plus élevée avec une alimentation au 3ème jour plutôt qu'au 2ème jour (respectivement 25,7 contre 22,6 œufs et 56,3 contre 29,2).

Un premier repas sanguin au 3ème jour de la vie adulte des femelles donne de meilleurs résultats qu'un premier repas sanguin au 2ème jour. Une

TABLEAU 1

Influence de la température, du type et du mode d'alimentation sur 3 paramètres de l'élevage des femelles d'*A. gambiae*.

Type d'alimentation	N° des cages	Taux moyen de gorgement M.G.				Survie à 20 jours M.G.			Ponte/♀/ cycles M.G.		
		Effectifs	(a)	(b)	(c)	Effectifs	(a)	(b)	Nombre	(b)	(c)
Alimentation artificielle 25 °C	1	1359	35,1	36	31,5	300	46	33	22,3	25,7	23,8
	2	918	37,9			300	15		30,5		
	3	1428	24,1	27		300	28		11,3	22,6	
	4	1227	31,3			300	42,6		27,9		
Alimentation artificielle 30 °C	1	882	24,8	26,6	30,9	300	16	15,2	14,3	18	22,7
	2	753	27,8			300	7		23		
	3	1485	28,6	36,2		300	24		14,9	24	
	4	849	43,8			300	14		33		
Alimentation naturelle 25 °C	1	1284	60,7	62	57,1	300	34	31,6	74,9	56,3	42,4
	2	1380	64,1			300	32		37,4		
	3	1020	50	50		300	31,6		37,3	29,2	
	4	1041	50,4			300	29		21,2		
Alimentation naturelle 30 °C	1	1245	47,4	57,5	53,9	300	24	37,7	61,7	69,4	65,9
	2	1272	68			300	39		70,6		
	3	1101	50,1	48,3		300	48		92,3	62,5	
	4	717	46			300	40		33,1		

Légendes.

— Alimentation naturelle: (piqûre de la peau d'un lapin). Alimentation artificielle: (piqûre à travers une membrane artificielle contenant du sang de bœuf.

— N° des cages:
- 1. alimentation sanguine les 3ème et 4ème jours, puis tous les 3 jours;
- 2. alimentation sanguine le 3ème jour puis tous les 3 jours;
- 3. alimentation sanguine les 2ème et 3ème jours, puis tous les 3 jours;
- 4. alimentation sanguine le 2ème jour puis tous les 3 jours.

— Taux moyen de gorgement = pourcentage moyen des femelles survivantes gorgées à chaque repas sanguin.

— Survie à 20 jours: pourcentage moyen des femelles survivantes au 20ème jour, par rapport au nombre de femelles initialement testées (3 cages de 100).

— Pontes/femelles/cycles gonotrophique: moyenne du nombre d'œufs pondus à chaque cycle gonotrophique et par femelles survivantes.

— M.G. = moyennes générales :
- (a) moyenne par cage;
- (b) moyenne observée sur les cages nourries à partir du 3ème jour de la vie des imagos;
- (c) moyenne observée sur l'ensemble des cages.

alimentation sanguine plus tardive (4-5ème jour), nuirait au rendement global de la ponte.

2.1.3.2. *Influence du nombre de repas sanguins initiaux à partir du 3ème jour*

Le taux de gorgement initial, en alimentation artificielle, est meilleur avec deux repas consécutifs plutôt qu'avec un seul repas (respectivement 24,4 % contre 11,7 %). En alimentation naturelle, il est comparable (respectivement 33 % et 38,9 %).

Le taux moyen de gorgement ne diffère pas significativement, qu'il y ait un seul ou 2 repas initiaux, aussi bien en alimentation artificielle que naturelle, (respectivement 37,9 % contre 35,1 % et 64,1 % contre 60,7 %).

La ponte moyenne par moustique survivant et par cycle gonotrophique est la même après alimentation artificielle, qu'il y ait eu 1 ou 2 repas initiaux (respectivement 22,3 ou 30,5 œufs). En alimentation naturelle, elle est meilleure avec 2 repas consécutifs (74,9 œufs contre 37,4).

Deux repas initiaux consécutifs semblent nécessaires à l'aboutissement du premier cycle gonotrophique, au moins en alimentation naturelle.

2.1.4. *Etude de la relation entre gorgement et longévité*

Il est important de recherher une éventuelle relation entre la mortalité des femelles et l'intensité de la ponte, pour savoir s'il est judicieux d'apporter une alimentation sanguine complémentaire aux moustiques infectés, chez qui la longévité est primordiale.

Les graphiques A et B de la figure 1 donnent l'évolution sur 20 jours, des moyennes mobiles (raison 5): de la ponte quotidienne moyenne par femelle et de la mortalité journalière relative, respectivement avec une alimentation artificielle et naturelle à 25 °C.

Les facteurs «ponte moyenne par femelle survivante» et «mortalité journalière relative» ont été précédemment définis (paragraphe 1.3).

Les graphiques A et B mettent en évidence une relation entre l'intensité de la ponte et le taux de mortalité. Cette relation est confirmée par le calcul du coefficient de corrélation entre ces 2 paramètres ($r = 0,273$ pour l'alimentation artificielle, ddl = 60 et $r = 0,331$ pour l'alimentation naturelle, ddl = 60).

Plus la ponte augmente, plus la mortalité croît.

2.2. *Etude des facteurs conditionnant le rendement des infections expérimentales d'*A. gambiae

2.2.1. *Les facteurs «parasite» de l'infectivité des gamétocytes du* Plasmodium

2.2.1.1. *Le facteur densité gamétocytaire*

72 infections avec des gamétocytes de *P. falciparum,* ont été réalisées.

Pour les 5 classes de gamétocytémies: 0-50, 50-100, 100-200, 200-450, et plus de 450 gamétocytes/mm^3, nous avons obtenu les moyennes d'infection suivantes: 8,5 %, 27 %, 37,5 %, 49 % et 44 %. Le pourcentage moyen

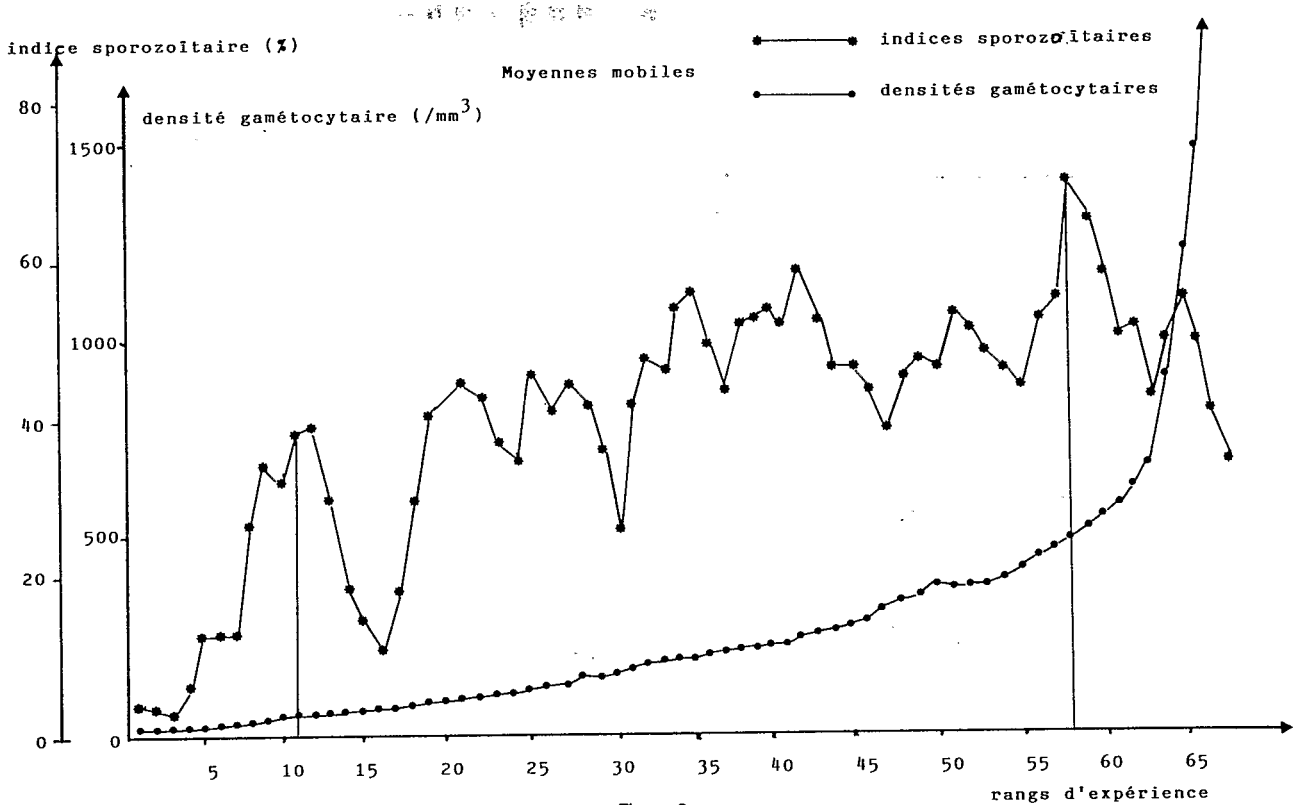

Figure 2.

Relation entre la moyenne mobile des densités gamétocytaires de *P. falciparum* et la moyenne mobile des indices sporozoïtaires chez *A. gambiae*.

— La moyenne mobile (de raison 5) est calculée sur les densités gamétocytaires classées par ordre croissant et sur les indices sporozoïtaires correspondants. Le groupe de 5 données constitue un rang d'expérience.

— Le 12ème rang d'expérience correspond à la densité gamétocytaire moyenne de 50 gamétocytes/mm^3.

— Le 57ème rang d'expérience correspond à la densité gamétocytaire moyenne de 450 gamétocytes/mm^3.

d'infection chez le moustique augmente significativement jusqu'à la classe de densité gamétocytaire 200-450. Il décroît significativement pour des densités supérieures à 450 gamétocytes/mm^3 (tableau 2).

TABLEAU 2

Relations entre le pourcentage d'infection chez le moustique *(A. gambiae)* et la densité gamétocytaire de *P. falciparum*

Densités gamétocytaires	0-50	50-100	100-200	200-450	+ de 450	Total
Nombre de sujets	9	17	13	22	11	72
Moyenne des densités gamétocytaires	10+/-10	68+/-10	147+/-31	318+/-83	1197+/-910	
Nombre de moustiques survivants	609	2047	1989	2584	947	8176
Nombre de moustiques infectés	52	553	746	1272	418	3041
Pourcentages d'infection	8,5	27	37,5	49	44	37,2
Khy carré	91,13 DS	50,89 DS	62,59 DS	7,17 DS		244,7 DS

Légendes: Densité gamétocytaire exprimée en nombre de gamétocytes/mm^3.
Pourcentage d'infection calculé après dissection des glandes salivaires des femelles survivantes.

Les courbes des moyennes mobiles de ces 2 paramètres (densité gamétocytaire et pourcentage d'infection correspondant) illustrent la même tendance (figure 2). Quand la gamétocytémie moyenne augmente, le pourcentage d'infection chez le moustique augmente parallèlement, jusqu'à, semble-t-il, un seuil d'environ 450 gamétocytes/mm^3; au-delà, le pourcentage d'infection diminue quand la gamétocytémie continue d'augmenter.

Pour des densités inférieures à 50 gamétocytes/mm^3 le pourcentage d'infection correspondant est généralement faible.

Pour obtenir un rendement optimal dans les infections expérimentales, il vaut mieux choisir des porteurs de 50 à 450 gamétocytes/mm^3.

2.2.1.2. *Le facteur maturité des gamétocytes*

La maturité des gamétocytes se juge sur des critères morphologiques difficiles à quantifier (25) et sur la capacité d'exflageller des microgamétocytes. Nous n'avons tenu compte que de la capacité d'exflageller des microgamétocytes.

Pour mieux définir le rôle de ce paramètre, sur le rendement de l'infection des moustiques, nous avons éliminé le facteur «densité», en raisonnant sur le «pouvoir infectant d'un gamétocyte» défini précédemment (paragraphe 1.6). Il n'y a pas de différence entre le pouvoir infectant moyen d'un gamétocyte exflagellant (0,16 %) et celui d'un gamétocyte qui parait non exflagellant (0,16 %).

Le paramètre «maturation» du gamétocyte ne semble pas important *in vivo.*

2.2.1.3. Le facteur sex-ratio

Une relation entre les pourcentages d'infection des moustiques et les proportions relatives de gamétocytes mâles et femelles, a été recherchée. La prépondérance des femelles est constante (1,7 à 5,6 fois plus que de mâles). Il n'y a pas de correlation entre le sex-ratio et la prévalence d'infection ($r = 0,21$, ddl 70).

Le facteur «sex-ratio» du gamétocyte ne semble pas intervenir *in vivo* sur le rendement des infections expérimentales.

2.2.2. *Les facteurs «hôte» de l'infectivité des gamétocytes du Plasmodium*

Sur les 72 infections d'*A. gambiae* par la souche locale de *P. falciparum*, nous avons observé 4 échecs, malgré des charges gamétocytaires suffisantes: (respectivement 20, 50, 190 et 2225 gamétocytes/mm^3). L'intervention d'un ou de plusieurs facteurs propres à l'hôte humain a été admise.

La prise d'antipaludéens inhibant l'infectivité des gamétocytes a pu être éliminée. En effet les sujets non infectants ne prenaient, occasionnellement et seulement, que de la chloroquine.

Il a été remarqué, sur le frottis, 1/2 heure après la ponction veineuse, chez l'adulte de 37 ans avec 2225 gamétocytes/mm^3, une phagocytose très intense des gamètes et non des gamétocytes, pouvant évoquer une phagocytose médiée par des anticorps anti-gamètes.

Afin de mettre en évidence une diminution du pouvoir infectant des gamétocytes en fonction de l'âge, due au développement progressif d'une immunité antigamète, nous avons comparé le pourcentage moyen d'infection pour différentes tranches d'âge. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 3.

TABLEAU 3

Relations entre le pourcentage d'infection chez le moustique *A. gambiae*, le pouvoir infectant moyen d'un gamétocyte et l'âge des porteurs de gamétocytes de *P. falciparum*

Tranches d'âge	0 - 2 ans	2 - 5 ans	5 - 10 ans	10 - 15 ans	+ de 15 ans
Effectifs	9	22	30	6	5
Moyenne de densités gamétocytaires	465 +/− 419	232 +/− 179	162 +/− 141	637 +/− 1238	983 +/− 1065
Nombre de moustiques survivants	2298	2411	2247	466	849
Nombre de moustiques infectés	1031	885	850	127	188
Pourcentage d'infection (*)	45 %	36,7 %	37,9 %	27 %	22 %
P.I.G. (**)	0,09 %	0,16 %	0,23 %	0,04 %	0,02 %

Légende:
— Densités gamétocytaires données en nombre de gamétocytes/mm^3.
— (*) Pourcentage de moustiques porteurs de sporozoïtes.
— (**) Pouvoir infectant moyen d'un gamétocyte = somme

$$\left[\frac{\text{\% d'infection}}{\text{densités gamétocytaires correspondantes}}\right] \times \frac{1}{\text{Nb de sujets}}$$

La prévalence d'infection dans le groupe des enfants de moins de 2 ans est de 45 % pour une densité moyenne de 465 gamétocytes/mm^3; ce qui correspond à un pouvoir infectant moyen de 0,09 % par gamétocyte. Chez les enfants de 2-5 ans, ces paramètres sont respectivement de 36 % pour 232 gamétocytes/mm^3, soit 0,16 % de pouvoir infectant moyen. Chez les enfants de 5-10 ans ils sont respectivement de 38 %, 162 gamétocytes/mm^3 et 0,23 %. Le pouvoir infectant moyen croît significativement en fonction de l'âge jusqu'à 10 ans. Chez les enfants de 10-15 ans et chez l'adulte (+ de 15 ans), les pourcentages d'infection sont faibles, malgré une forte densité gamétocytaire moyenne. Ce paradoxe peut être dû: soit à l'acquisition progressive d'une immunité inhibant l'infectivité des gamètes, soit au fait que les densités gamétocytaires sont au-delà du seuil précédemment défini dans le chapitre 2.2.1.1.

L'âge du porteur parait être un facteur déterminant dans l'infectivité des gamétocytes de *P. falciparum*. Il semble préférable d'infecter les moustiques vecteurs avec des sujets de moins de 10 ans.

2.2.3. *Les facteurs «moustiques» de l'infectivité des gamétocytes du* Plasmodium

2.2.3.1. *Le facteur «espèce» du complexe* A. gambiae

L'espèce est le premier facteur moustique déterminant la susceptibilité à l'infection plasmodiale. L'élevage est uniquement composé de l'espèce A du complexe *A. gambiae,* cytotype Mopti. Cette espèce est particulièrement réceptive à *P. falciparum,* comme le montrent les résultats des infections expérimentales. Des porteurs de moins de 5 gamétocytes/mm^3 sont capables d'infecter le moustique.

Ce vecteur est aussi sensible aux deux autres espèces plasmodiales *(P. malariae* et *P. ovale).* Onze infections expérimentales avec la souche locale de *P. malariae* et une avec un gros porteur de gamétocytes de *P. ovale* ont été réalisées. Un porteur à 5 gamétocytes/mm^3 de *P. malariae* a infecté le vecteur. Un porteur à moins de 5 gamétocytes/mm3 n'a donné aucune infection. Le seuil minimal de densité gamétocytaire est donc très faible. Il ne semble pas y avoir de proportionnalité entre la densité gamétocytaire et le taux d'infection. Mais la taille de l'échantillon est encore trop faible pour pouvoir mettre en évidence une éventuelle corrélation entre ces 2 paramètres. Comme dans les infections avec *P. falciparum,* des porteurs de gamétocytes de *P. malariae,* apparemment favorables, peuvent aussi ne pas infecter le vecteur.

Les infections expérimentales d'*A. gambiae* par *P. falciparum, P. Ovale* et *P. malariae* sont donc possibles.

2.2.3.2. *Le facteur longévité du moustique*

Il faut de 12 à 14 jours à 25 °C pour que le cycle sporogonique de *P. falciparum* puisse se dérouler complètement. Il faut 19 à 21 jours pour obtenir des sporozoïtes de *P. malariae* et 15 à 16 pour *P. ovale.* La souche locale d'*A. gambiae* a une demie vie de 16 jours en insectarium. Il reste en général 30 à 40 % de moustiques survivants 13 jours après l'infection par *P. falciparum* de primipares de 5 jours, donc 18 jours après l'éclosion du moustique. Il reste environ 10 à 20 % de femelles survivantes 20 jours après l'infection par *P. malariae* et 23 jours après l'éclosion (si on infecte des primipares de 3 jours). Dans la production de sporozoïtes de *P. malariae,* la longévité est un facteur primordial pour le rendement de l'infection. Les infections expérimentales d'*A. gambiae* par *P. malariae* sont possibles, mais le rendement est en général faible.

2.2.3.3. *Les facteurs «quantité du repas sanguin» et «taux de gorgement»*

Le taux de gorgement (pourcentage de femelles ayant pris un repas infectant) et la quantité moyenne de sang, absorbée par moustique, sont plus faibles chez des nullipares de 3 jours que chez des primipares de 5 jours, déjà initiées par un repas sanguin naturel sur lapin. Dans les infections avec *P. falciparum,* il est donc recommandé de gorger des femelles primipares de 5 jours. Avec *P. malariae,* la longévité étant essentielle, il semble préférable d'infecter des nullipares de 3 jours. Bien que le taux de gorgement soit moins bon, le nombre de femelles infectées survivantes est plus grand.

TABLEAU 4

Evaluation du rôle pathogène de *P. falciparum* chez le moustique *A. gambiae*

Densités gamétocytaires	8ème jour				9ème jour				10ème jour				11ème jour				12ème jour				13ème jour			
	E		G	%	E		G	%	E		G	%	E		G	%	E		G	%	E		G	%
	Nb	O			Nb	O			Nb	O			Nb	O			Nb	O			Nb	O		
3200	9	+100	0	60	9	+100	0	60	6	+100	1	40	4	+100	3	26	2	+100	3	20	1	87	2	13
1225	12	97	0	80	14	79	0	93	13	88	1	86	12	65	6	80	11	54	12	80	12	32	12	80
60	2	9	0	13	5	9	0	33	5	8	0	33	9	7	3	60	10	5	12	80	8	5	12	80

Légende: — Densités gamétocytaires en nombre de gamétocytes/mm^3.
— E: — Nb = nombre d'estomacs porteurs d'oocystes.
— O = charge oocystique moyenne/estomac.
— G = nombre de glandes salivaires infectées.
— % = prévalence globale d'infection.
Dissection d'un échantillon de 15 moustiques à différentes périodes du cycle sporogonique, après infection par différents porteurs de gamétocytes.

2.2.3.4. *Le facteur «âge du moustique»*

Nous avons comparé le rendement de l'infection par *P. falciparum,* entre des nullipares de 3 jours et des primipares de 5 jours. Les femelles nullipares ont des pourcentages d'infection en général identiques, à ceux observés chez les primipares; mais la charge oocystique est plus faible (d'environ 60 %), probablement en raison de la plus faible quantité de sang absorbée par les nullipares. Cette étude comparative n'a pas été faite avec *P. malariae.*

Il est préférable d'infecter des primipares de 5 jours avec *P. falciparum,* pour avoir une charge parasitaire optimale chez le moustique.

2.2.3.5. *Le facteur «température de l'insectarium»*

Une augmentation de température de l'insectarium augmente la vitesse de maturation des oocystes de *Plasmodium* (8). Des infections expérimentales avec *P. falciparum,* ont été réalisées chez des femelles maintenues soit à 25 °C (température classique de l'insectarium), soit à 30 °C. L'augmentation de température de l'insectarium ne retentit pas sur la proportion de moustiques infectés par *P. falciparum.* Le cycle sporogonique est accéléré (9 jours au lieu de 12 jours) mais, la survie du vecteur est moins bonne (12 jours de demi-vie au lieu des 16 jours habituels). Le gain de temps réalisé sur le cycle sporogonique est contrebalancé par un nombre de femelles infectées survivantes plus faible. Dans les infections à *P. falciparum,* il est préférable de maintenir les femelles infectées à 25 °C, le problème du choix de la température de l'insectarium se pose encore pour les infections avec *P. malariae.*

2.2.3.6. Relation entre charge parasitaire et longévité

Des infections expérimentales ont été faites à partir de porteurs de 3200, 1225 et 60 gamétocytes/mm^3. Un échantillon de 15 moustiques infectés a été prélevé chaque jour dans chacune des 3 cages à partir du 8ème jour, jusqu'au 13ème jour de la maturation parasitaire. Les estomacs et les glandes salivaires ont été examinés au microscope, à l'état frais avec un objectif (× 10) pour rechercher soit des oocystes, soit des sporozoïtes, témoins de l'infection (tableau 4).

Les moustiques infectés par 3200 gamétocytes ont donné une prévalence d'infection de 60 % au 8ème, 60 % au 9ème, 40 % au 10ème, 26 % au 11ème, 20 % au 12ème jour et 13 % au 13ème jour. La charge oocystique, très importante (plus de 100 oocystes par estomacs), n'a pas été évaluée. A partir du 10ème jour d'infection, le pourcentage de moustiques parasités par rapport aux moustiques survivants, diminue; ce qui semble montrer une mortalité accrue des moustiques parasités.

Les moustiques infectés par 1225 gamétocytes/mm^3 ont donné les prévalences respectives suivantes: 80 %, 93 %, 86 %; 80 %, 80 % et 80 %; la moyenne des charges oocystiques a été respectivement de 97,7/moustique infecté, puis 79,2 - 88,3 - 65,2 - 54,7 et 32,2. La charge oocystique va en diminuant à partir du 11ème jour, du fait de l'éclatement de certains oocystes mûrs. Le pourcentage de moustiques infectés par rapport aux moustiques survivants reste constant. Avec cette charge gamétocytaire il ne semble pas y avoir de mortalité accrue des moustiques parasités.

Les moustiques infectés par 60 gamétocytes/mm^3 ont donné les prévalences respectives suivantes: 13 %, 33 %, 33 %, 60 %, 80 %, et 80 %. Les charges oocystiques ont été respectivement de 9,1 - 9,5 - 8,8 - 7,3 - 5,6 - et 4,8. Elles vont aussi en décroissant à partir du 11ème jour et sont nettement plus faibles. Les pourcentages d'infection observés ne sont pas en faveur d'une mortalité accrue des moustiques infectés.

Seules les très grosses charges oocystiques et par conséquent gamétocytaires semblent défavoriser la survie du vecteur.

Les intervalles de confiance des charges parasitaires moyennes observées, sont importants, traduisant une grande disparité d'un moustique infecté à l'autre. Ceci résulte vraisemblablement d'une disparité dans la quantité de sang absorbé par moustique plutôt que d'une disparité dans la réceptivité individuelle des moustiques.

3. Discussion

Ces expérimentations ont mis en évidence plusieurs points importants concernant la conduite de l'élevage, la réalisation des infections artificielles et la conservation des moustiques infectés.

La souche locale d'*A. gambiae* semble avoir un meilleur développement quand elle est maintenue à 25 °C en alimentation artificielle. Le type d'alimentation étant finalement à prédominance artificielle, nous avons retenu la température classique de 25 °C, rejoignant les conclusions d'Armstrong *et al.* (1). Ce compromis a permis d'atteindre couramment une production de 10.000 moustiques par jour.

Dans les conditions optimales de l'élevage d'*A. gambiae,* il est préférable d'attendre le 3ème jour de la vie adulte du moustique pour commencer l'alimentation sanguine. Deux repas consécutifs sont nécessaires pour lancer le premier cycle gonotrophique.

Les observations sur moustiques sains, ont montré que plus les moustiques pondent et plus la mortalité semble importante. Bien qu'il soit recommandé de donner des repas sanguins aux moustiques infectés pour augmenter la proportion d'oocystes mûrs (7), nous préférons ne donner qu'un seul repas sanguin complémentaire, sur lapin, au 5ème jour de l'infection.

Nous avons observé une liaison entre densité gamétocytaire et rendement de l'infection chez le moustique. Il semble exister un seuil maximum au delà duquel le pourcentage d'infection chez le moustique diminue quand la densité gamétocytaire augmente. Ce seuil est de 450 gamétocytes/mm^3 dans la zone d'endémie de Bobo-Dioulasso. Cette observation a été précédemment faite par Rutledge *et al.* (23), en Asie du Sud-Est, oú le seuil semble plus élévé (1000 gamétocytes/mm^3).

Dans notre étude, le seuil minimum de densité gamétocytaire pouvant infecter le vecteur est très faible. Il est inférieur à 5 gamétocytes/mm^3 et confirme des résultats antérieurs (14 - 20).

Notre étude n'a pas montré de différence entre le pouvoir infectant moyen d'un gamétocyte, qu'il soit ou non exflagellant. La maturité des gamétocytes de *P. falciparum* est une condition importante *in vitro* pour la réussite du cycle

sporogonique, chez le moustique infecté à partir de cultures du parasite (21). Mais dans les conditions naturelles, la maturation n'est pas un facteur essentiel (2 - 23). En effet, dans les infections humaines à *P. falciparum,* la maturation gamétocytaire se déroule dans les organes profonds et seules les formes mûres apparaissent en principe, dans le sang périphérique (14).

Les travaux de Boyd *et al.* (3) ont montré que le sex-ratio affecte les résultats des infections chez le moustique. Dans notre étude, nous ne trouvons pas de relation entre le pouvoir infectant d'un gamétocyte et le sex-ratio. Nos résultats concordent avec ceux des travaux de Shute et Maryon (24) ou de Muirhead-Thomson et Mercier (20).

Au sein des espèces plasmodiales, les souches géographiques ont différents degrés de pouvoir infectant envers les espèces d'*Anopheles.* L'importance du facteur génétique dans le pouvoir infectant du parasite a été soulignée par Jeffrey (13) et Rutledge *et al.* (23). Nous avons démontré que la souche locale de *P. falciparum* était à la fois gamétocytogène et infectante, dans les conditions naturelles.

Finalement, le seul facteur parasitaire vraiment important dans les infections expérimentales semble être la densité gamétocytaire. Cependant, certains gros porteurs n'infectent pas les moustiques.

Il existe en effet des facteurs propres à l'hôte vertébré qui interviennent aussi sur le rendement des infections expérimentales. Ceux-ci sont plus difficiles à analyser et beaucoup moins connus.

Le premier facteur « hôte » pouvant éventuellement jouer un rôle sur le pouvoir infectant des gamétocytes est la prise d'antipaludéens. Dans la zone d'endémie de Bobo-Dioulasso, la chloroquine et la quinine sont les deux principaux antipaludéens utilisés. Ces médicaments ne sont pas gamétocytocides et n'ont pas d'action sur l'infectivité des gamètes (15). La prise d'antipaludéens n'explique donc pas certains de nos échecs lors des infections expérimentales.

Il est possible qu'intervienne une immunité antigamète. Des anticorps spécifiques de stade et d'espèce, inhibant l'infectivité des gamètes ont été démontrés dans le sang circulant de certains sujets vivant en zone d'endémie (18). Ces anticorps pourraient expliquer certaines discordances au cours des infections expérimentales. Rutledge *et al.,* (23) et Mac Carthy *et al.* (16) ont observé, comme nous, des discordances, principalement chez des sujets ayant une longue expérience palustre.

Dans l'estomac du moustique, le gamète est exposé à la phagocytose par des monocytes ou polynucléaires du sang ingéré (23 - 26). Ce phénomène de phagocytose se produit surtout *in vitro,* après exflagellation des microgamètes et nous l'avons observé chez un sujet n'ayant donné aucune infection malgré une densité gamétocytaire de 2225 gamétocytes/mm^3. En fait Rutledge *et al.* (23) et Sinden et Smalley (26) ne remarquent pas de relation entre l'importance de la phagocytose *in vitro* et la baisse du pouvoir infectant des gamétocytes.

Les facteurs « hôte » commencent à être mieux cernés mais ils sont encore hypothétiques. L'immunité humorale doit jouer un rôle non négligeable dans le rendement des infections, rôle qu'il reste à étudier de manière plus approfondie.

Si les facteurs « parasites » et « hôtes » contrôles le rendement des infections du moustique et sont difficilement influençables, il est possible

d'intervenir sur les facteurs « moustiques » pour tenter d'améliorer ce rendement.

Plusieurs facteurs propres au moustique interviennent dans le rendement des infections expérimentales. Ce sont: la susceptibilité, la longévité, la quantité du repas sanguin et l'âge des moustiques infectés.

La longévité est un paramètre capital, car il faut que le moustique survive assez longtemps pour permettre le développement intégral du cycle sporogonique du parasite. La demie vie d'*A. gambiae* en insectarium est insuffisante pour permettre un bon rendement dans les infections expérimentales à *P. malariae.* Plusieurs facteurs peuvent améliorer, directement ou indirectement la longévité des moustiques en insectarium.

C'est d'abord la température ambiante. Il est possible d'accélérer le cycle sporogonique en maintenant les femelles infectées à 30 °C (9). Ce gain de temps permet d'avoir un nombre plus important de femelles survivantes et infectées le jour de la dissection. En fait nous avons observé une mortalité accrue. En milieu tropical et à cette température, la pollution bactérienne et mycosique se développe et peut intervenir sur la mortalité des moustiques.

Le rôle pathogène de *Plasmodium* envers le moustique a été envisagé par différents auteurs (7 - 11). La mortalité accrue serait due à l'envahissement de la muqueuse intestinale. Nous n'avons retrouvé cet effet léthal que pour de très fortes charges gamétocytaires. Ce phénomène n'interviendrait qu'exceptionnellement dans le rendement des infections expérimentales à partir de porteurs humains, étant donné la rareté de telles densités gamétocytaires. Quoi qu'il en soit, il est préférable de ne pas infecter les moustiques à partir de très gros porteurs de gamétocytes.

Il est possible d'augmenter la proportion de femelles survivantes en infectant le vecteur plus tôt. Mais les nullipares de 3 jours se gorgent moins bien que les primipares de 5 jours. Collins *et al.* (5) ont montré que l'intensité de l'infection variait avec le volume de repas de sang ingéré. Nous avons trouvé un indice sporozoïtaire en moyenne identique après infection des nullipares de 3 jours ou des primipares de 5 jours, mais la charge parasitaire est moindre chez les nullipares. Notre but étant de produire le plus de sporozoïtes possible, il est préférable d'infecter des primipares. Le problème est différent avec *P. malariae.* Ou bien il faut choisir un vecteur à durée de vie plus longue, mais tout aussi susceptible; ou bien il faut accepter de diminuer la charge sporozoïtaire moyenne par moustique pour privilégier le nombre de moustiques survivants.

Il est enfin possible d'augmenter la maturation parasitaire, donc d'accroître le rendement des infections expérimentales en donnant un ou plusieurs repas sanguins espacés au cours du cycle sporogonique (6). Sinden et Strong (27) pensent que dans les fortes infections, il existe un phénomène de compétition entre les oocystes pour un approvisionnement limité en éléments nutritifs. Un certain nombre d'oocystes peuvent ainsi « avorter » et le rendement final de l'infection, malgré une densité gamétocytaire importante, peut être médiocre. Il semble donc préférable de continuer l'alimentation sanguine pendant la durée du cycle sporogonique. Mais plus les moustiques pondent, plus ils meurent. Nous avons décidé de ne donner qu'un seul repas sanguin 5 jours après l'infection pour apporter aux oocystes une partie des éléments indispensables à leur croissance, sans augmenter fortement la ponte et la mortalité du moustique hôte.

De très nombreux paramètres interviennent donc dans le rendement des infections de moustiques par *Plasmodium*. Ils sont plus ou moins connus et contrôlables et parfois antagonistes. Il faut les étudier pour chaque modèle parasite — vecteur afin de standardiser les conditions expérimentales. Nous l'avons fait pour *P. falciparum* et *A. gambiae*. Les données concernant *P. ovale* et *P. malariae* avec ce même vecteur sont encore insuffisantes pour en déduire une conduite pratique.

Des études complémentaires sont encore nécessaires pour mieux comprendre le rôle de l'immunité antigamète sur le pouvoir infectant des gamétocytes et pour mieux sélectionner les porteurs infectants de gamétocytes.

Production of human *Plasmodium* sporozoites in Bobo-Dioulasso (Burkina Faso).

Summary — Mass production of *P. falciparum* sporozoites requires an intensive production of mosquitoes and an experimental infection of this vector. *A. gambiae* is the main vector of *P. falciparum,* and *P. ovale* in Burkina. In the first part we study 3 factors interfering with breeding and experimental infection of this anopheline species. They are: insectarium temperature, pattern and rhythm of blood feeding. In the second part, we study «parasite», «host» and «mosquito» parameters which interfere with the yield of experimental infections.

The increase of temperature promotes growth of parasite, but it also enhances bacterial and mycosal pollution; and so, it reduces survival of mosquitoes.

Natural feeding on rabbit gives a better laying and a larger blood meal than experimental feeding through an artificial membrane. Meanwhile, it requires a rabbit rearing. We finally adopted the following compromise: the two first blood meals are taken on rabbit, the next are taken on membrane covered devices.

It is necessary to give non-parous females two consecutive blood meals that allow the first gonotrophic cycle. The optimal time is on the 3-4 day after emergence.

For the mosquitoes reserved for experimental infections, it is necessary to infect them very soon to have more surviving females at the end of the sporogonic cycle. These mosquitoes receive their first and single blood meal an day 2 and can be infected on day 5.

There is a positive correlation between the intensity of egg production and the mosquito mortality. Although blood meals are important for parasite development, we prefer to give only one blood meal on day 6 after infection to promote the vector survival rather than maturity of the parasite.

This study has allowed to standardize breeding conditions and to obtain regularly 10 000 mosquitoes per day.

The infection rate depends on parasite factors. *P. falciparum* gametocytes may be infectious to mosquitoes at densities as low as 5/mm^3 of blood. Maximum infectiousness is reached between 50 to 450/mm^3. At higher densities, infectiousness of gametocytes seems to decrease. In natural conditions, sex-ratio and maturity of gametocytes do not appear to interfer with infectiousness.

The infection rate also depends on host parameters. They are yet unknown. We saw a specific phagocytosis of sexual stages in mosquito midgut, after infection with a high density gametocyte carrier, without any infected mosquito. On the other hand, infectiousness of gametocytes seems to decrease with age of the gametocyte carrier. The role for immunity in modulating the infectivity of gametocytes cannot be excluded.

Finally, the infection rate depends on mosquito factors. Susceptibility of geographical strains, vector longevity, quantity of blood meal ingested and parasite load in infected mosquitoes, are other restricted factors.

The authors defined a standard protocol of experimental infection which allow them to obtain a lot of *P. falciparum* sporozoites and preleminary results on infections with *P. malariae* and *P. ovale.*

Productie van humane *Plasmodium* sporozoieten in Bobo-Dioulasso (Burkina Faso).

Samenvatting — Massa productie van sporozoieten van *P. falciparum* vereist een intensieve muggenkweek met experimentele infectie van deze vector. *A. gambiae* is de voornaamste vector van *P. falciparum, P. malariae* en *P. ovale* in Burkina Faso. In het eerste deel worden de drie factoren die tussenkomen bij de kweek en de experimentele infectie van deze *Anopheles* species bestudeerd. Deze zijn: de temperatuur van het insectarium, en patroon en ritme van het bloedmaal. In het tweede deel worden de «parasiet», «gastheer» en «mug» parameters bestudeerd die een rol spelen bij de oogst aan experimentele infecties.

Verhoging van de temperatuur is gunstig voor de ontwikkeling van de parasiet, doch werkt pollutie door bacteriën en schimmels in de hand waardoor de overleving van de muggen wordt verminderd.

Natuurlijke voeding op het konijn geeft betere leg en een degelijker bloedmaal dan experimentele voeding via een artificieël membraan. Zulks vereist evenwel het onderhouden van een konijnenkweek. Wij kozen uiteindelijk voor het volgende compromis: de twee eerste bloedmalen gebeuren op konijn en de volgende met membraantechnieken.

Het is noodzakelijk van niet-pare vrouwtjes twee opeenvolgende bloedmalen te geven die de eerste gonotrofe cyclus mogelijk maken. Het optimaal tijdstip hiervoor is op dag 3-4 na ontkieming.

Voor de muggen die werden gereserveerd voor experimentele infectie, blijkt het nodig hen zeer vroeg te infecteren ten einde meer overlevende vrouwtjes over te houden aan het einde van de sporogone cyclus. Deze muggen ontvangen hun eerste en enige bloedmaal op dag 2 en kunnen worden besmet op dag 5.

Er is een positieve correlatie tussen de intensiteit van eiproductie en mug-mortaliteit. Hoewel de bloedmalen belangrijk zijn voor de ontwikkeling van de parasiet, geven wij er de voorkeur aan slechts één bloedmaal te geven op dag 6 na infectie, ten einde de overleving van de vector te beogen eerder dan de maturiteit van de parasiet.

Deze studie liet toe de kweekvoorwaarden te standardizeren en regelmatig 10 000 muggen per dag te bekomen.

De infectiegraad hangt af van parasitaire factoren. Gametocyten van *P. falciparum* kunnen besmettelijk zijn voor muggen aan zo lage densiteiten als 5/mm^3 bloed. Maximale besmettelijkheid wordt bereikt tussen 50 en 450/mm^3. Aan hogere densiteiten lijkt de besmettelijkheid van de gametocyten af te nemen. In natuurlijke omstandigheden blijken de sex-ratio en de maturiteit van de gametocyten niet met de besmettelijkheid te interfereren.

De infectiegraad hangt ook af van de gastheer parameters. Deze zijn nog niet gekend. Wij zagen een specifieke fagocytose van sexuele stadia in de middendarm van de mug na infectie door een hoge densiteit gametocytendrager; na incubatie bleken deze muggen niet geïnfecteerd te zijn. Aan de andere kant lijkt de besmettelijkheid der gametocyten te verminderen met de leeftijd van de gametocytendrager. De rol van immuniteit bij het moduleren van de infectiviteit van gametocyten kan niet worden uitgesloten.

Tenslotte hangt de infectiegraad af van mugfactoren. Gevoeligheid van geografische stammen, levensduur van de vectoren, hoeveelheid aan ingenomen bloed en parasietenlast bij de besmette muggen, zijn andere belemmerende factoren.

De auteurs ontwikkelden een standaard protocol voor experimentele infectie die hen toelaat veel *P. falciparum* sporozoieten te bekomen en enkele voorlopige resultaten aangaande infecties met *P. malariae* en *P. ovale*.

Reçu pour publication le 23 juin 1988.

REFERENCES

1. Armstrong JA, Bransby-Williams WR: The maintenance of a colony of *Anopheles gambiae*, with observations on the effects of changes in temperature. Bull. WHO, 1961, **24**, 427-435.
2. Bishop A: Problems concerned with gametogenesis in haemosporidiidea, with particular reference to the genus *Plasmodium*. Parasitology, 1955, **45**, 163-185.
3. Boyd MF, Stratman-Thomas WK, Kitchen SF: On the relative susceptibility of *Anopheles quadrimaculatus* to *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. Amer. J. Trop. Med., 1935, **15**, 485-493.
4. Choumara R, Hamon J, Bailly H, Adam JP, Ricosse J: Le paludisme dans la zone pilote de Bobo-Dioulasso (Haute-Volta). Cah. ORSTOM Sér. Entomol. Méd. Parasitol., 1959, **1**, 125 p.
5. Collins WE, Jeffery GM, Skinner JC, Harrison AJ: Comparative infectivity of a strain of *Plasmodium falciparum* from Panama to three species of *Anopheles* as studies by membrane feeding. Mosq. News, 1964, **24**, 28-31.
6. Freyvogel TA: A propos des relations hôte/parasites entre moustiques et *plasmodium*. Cah. ORSTOM Sér. Entomol. Méd. Parasitol., 1980, **18**, 171-176.
7. Gad AM, Maier WA, Piekarski G: Pathology of *Anopheles stephensi* after infection with *Plasmodium berghei berghei;* I. mortality rate. Z. Parasitenk., 1979, **60**, 249-261.
8. Garnham PCC: Microsporidia in laboratory colonies of *Anopheles*. Bull. OMS, 1956, **15**, 845-847.
9. Garnham PCC: Malaria parasites and other haemosporidia. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1966.
10. Graves PM: Studies on the use of a membrane feeding technique for infecting *Anopheles gambiae* with *Plasmodium falciparum*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1980, **74**, 738-742.
11. Graves PM, Curtis CF: Susceptibility of *Anopheles gambiae* to *Plasmodium yoelli nigeriensis* and *Plasmodium falciparum*. Ann. Trop. Med. Parasitol., 1982, **76**, 633-639.

12. Haddow AJ, Ssenkubuge Y: Laboratory observations on the oviposition-cycle in the mosquito *Anopheles (cellia) gambiae* Giles. Ann. Trop. Med. Parasitol., 1962, **56**, 352-355.

13. Jeffery GM, Eyles DE: The duration in the human host of infections with a Panama strain of *Plasmodium falciparum*. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 1954, **3**, 219-224.

14. Jeffery, GM, Eyles DE: Infectivity to mosquitoes of *Plasmodium falciparum* as related to gametocyte density and duration of infection. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 1955, **4**, 781-789.

15. Jeffery GM, Young MD, Eyles DE: The treatment of *Plasmodium falciparum* infection with chloroquine, with a note on infectivity to mosquitoes of primaquine- and pyrimethamine-treated cases. Amer. J. Hyg., 1956, **64**, 1-11.

16. McCarthy VC, Clyde DF, Woodward WE: *Plasmodium falciparum:* responses of a semi-immune individual to homologous and heterologous challenges, and non-infectivity of gametocytes in *Anopheles stephensi*. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 1978, **27**, 6-8.

17. Mazier D, Beaudoin RL, Mellouk S *et al.*: Complete development of hepatic stages of *Plasmodium falciparum* in vitro. Science, 1985, **227**, 440-442.

18. Meuwissen JHTE: Developments in the field of transmission blocking malaria vaccines. 3rd Int. Conf. Palud. Babes. Annecy (France), 7-11 sept. 1987.

19. Molineaux L, Gramiccia G: Le projet Garki; recherches sur l'épidémiologie du paludisme et la lutte antipaludique dans la savane soudanienne de l'Afrique occidentale. Genève, Organisation Mondiale de la Santé, 1980.

20. Muirhead-Thomson RC, Mercier EC: Facrors in malaria transmission by *Anopheles albimanus* in Jamaica; part 1. Ann. Trop. Med. Parasitol., 1952, **46**, 103-116.

21. Ponnudurai T. Meuwissen JHETh, Leeuwenberg ADEM, Verhave JP, Lensen AHW: The production of mature gametocytes of *Plasmodium falciparum* in continuous cultures of different isolates infective to mosquitoes. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1982, **76**, 242-250.

22. Rutledge LC, Ward RA, Gould DJ: Studies in the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder. Mosq. News, 1964, **24**, 407-419.

23. Rutledge LC, Gould DJ, Tantichareon B: Factors affecting the infection of anophelines with human malaria in Thailand. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1969, **63**, 613-619.

24. Shute PG, Maryon MA: Study of gametocytes in a west african strain of *Plasmodium falciparum*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1951, **44**, 421-438.

25. Sinden RE: The cell biology of sexual development in *Plasmodium*. Parasitology, 1983, **86** (Pt 4), 7-28.

26. Sinden RE, Smalley ME: Gametocytes of *Plasmodium falciparum:* phagocytosis by leucocytes *in vivo* and *in vitro*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1976, **70**, 344-345.

27. Sinden RE, Strong K: An ultrastructural study of the sporogonic development of *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1978, **72**, 477-491.

28. Verhave JP, Janssen T, Oettinger C, Boudin C, Robert V, Carnevale P: Vectors and transmission dynamics of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium malariae* in Burkina Faso, studied with a two-site ELISA for detection of sporozoïtes. 3rd Int. Conf. Palud. Babes, Annecy (France) 7-11 Sept. 1987.