

INFECTIONS EXPERIMENTALES DE ANOPHELES GAMBIAE AVEC DIFFERENTES SOUCHES DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* ISSU DE PORTEURS DE GAMETOCYTES NATURELLEMENT INFECTES AU CAMEROUN: FACTEURS INFLUENCANT L'INFECTION DES MOUSTIQUES *

TCHUINKAM T.^{1,2}, MULDER B.^{2,3}, DECHERING K.², STOFFELS H.², VERHAVE J.-P.², COT M.¹, CARNEVALE P.¹, MEIJWISSEN J. H. E. TH.², ROBERT V.¹

RESUME

L'infektivité des porteurs de gamétocytes de *Plasmodium falciparum* présentant des symptômes palustres dans la ville de Yaoundé pour une souche d'*Anopheles gambiae* a été évaluée et les facteurs susceptibles d'influencer la réussite des infections expérimentales ont été recherchés. 139 infections expérimentales avec le sang de différents porteurs de gamétocytes ont été effectuées. Après dissection d'au moins 20 moustiques par expérimentation, 86 (62%) porteurs de gamétocytes ont donné au moins un moustique positif en oocyste. Parmi les infections réussies, le pourcentage moyen de moustiques infectés a été de 18,60% et la moyenne d'oocystes par estomac infesté de 2,56. La densité gamétocytaire seule a été identifiée comme facteur déterminant le succès et le taux d'infection des moustiques. Aucune influence significative n'a été trouvée pour le sexe et l'âge des porteurs de gamétocytes, la température corporelle, la présence et la densité des stades érythrocytaires asexués, le groupe sanguin, le facteur rhésus et la prise d'antimalariques (chloroquine et amodiaquine).

INTRODUCTION

Au cours d'une infection plasmodiale à *P. falciparum*, les gamétocytes n'apparaissent dans le sang périphérique que 10 jours au moins après la sortie des premiers mérozoïtes du foie (Smalley, 1976; Jensen, 1979). La demi-vie des générations successives de gamétocytes est estimée à 2,4 jours et leur infectivité pour les moustiques peut persister pendant 3 semaines (Smalley et Sinden, 1977).

La densité des gamétocytes de *Plasmodium falciparum* est variable au cours d'une infection et d'un individu à l'autre (Bruce-Chwatt, 1980). Dans les systèmes *in vivo* et *in vitro*, Muirhead-Thomson (1957) et Ponnudurai *et al.* (1989) ont respectivement constaté la difficulté de prévoir le devenir d'une infection en se basant sur la densité gamétocytaire. Cependant, Boudin *et al.* (1989) ont trouvé une relation entre le pourcentage de moustiques infestés et la densité gamétocytaire pour les parasitémies inférieures à

450 gamétocytes/ μ l. Une vaste étude en Thaïlande a aussi montré que dans les infections à *Plasmodium vivax*, il existe une faible relation entre la densité gamétocytaire et la prévalence de moustiques infestés (Sattabongkot *et al.*, 1991). Graves (1980) avait auparavant estimé le seuil de parasitémie pour de bonnes infections de moustiques à 300 gamétocytes/ μ l, mais il a récemment été démontré que les moustiques peuvent être expérimentalement infectés avec des gamétocytemies bien plus faibles (Boudin *et al.*, 1993).

Les parasites asexués semblent jouer un rôle inhibiteur sur l'infektivité. Rutledge *et al.* (1969) ont rapporté que les fortes parasitémies asexuées sont en général associées à une réduction de l'infektivité. Chez les rongeurs, la réponse humorale à l'accroissement des stades asexués de *P. berghei* réduit le potentiel infectant naturel des gamétocytes de 96% (Sinden, 1991). De même, les produits toxiques non spécifiques libérés dans le plasma lors des schizogonies érythrocytaires diminuent temporairement l'infektivité des gamétocytes des *Plasmodium* de rongeurs (Motard *et al.*, 1990).

Différents autres facteurs du sérum sont capables d'influencer l'infektivité. Baird *et al.* (1991) ont émis l'hypothèse que dans les infections à *P. falciparum*, certains anticorps spécifiques aux stades sexués

1 Département d'Entomologie Médicale, ORSTOM / OCEAC, Yaoundé, CAMEROUN

2 Département de Parasitologie Médicale, Université de Nimègue, LES PAYS-BAS

3 Faculté des Sciences, Université de Yaoundé I, CAMEROUN

Bull. liais. doc. - OCEAC Vol.27 N°2 Juin 1994

ISSN = 0255-5352

inhibent les gamétocytes indépendamment des stades asexués. Par ailleurs, Mendis et al. (1990) puis Naotunne et al. (1991) ont rapporté que les gamétocytes de *Plasmodium vivax* et de *Plasmodium cynomolgi* respectivement, sont tués et/ou perdent leur infectivité pendant les phases de crises aiguës, ceci étant dû à la présence de facteurs sériques non encore identifiés, probablement des cytokines (TNF et IFN γ).

Les médicaments antimalariques pourraient aussi moduler l'infectivité. Les sérums de volontaires soumis à une prophylaxie mixte de proguanil et de chloroquine, réduisent expérimentalement la transmission (Ponnudurai et al., 1989). Cependant, Chutmongkonkul et al. (1992) ont montré qu'après traitement à la pyriméthamine les gamétocytes sont plus infectants. On sait que le proguanil et la pyriméthamine ont une action sporontocide alors que la primaquine est gamétocytocide, en particulier dans le cas de *Plasmodium falciparum* (Bruce-Chwatt, 1980; Danis et Mouchet, 1991). Les sérums contenant seulement la chloroquine comme antimalarique n'ont pas d'influence sur la transmission (Wilkinson, 1976; Smalley, 1977; Chutmongkonkul et al., 1992). Cependant, la chloroquine pourrait dans certains cas relever indirectement l'infectivité des porteurs de gamétocytes, en particulier pendant les crises aiguës en supprimant les parasites asexués et donc en diminuant le titre des cytokines (Sinden, 1991).

Les globules blancs absorbés au cours du repas sanguin jouent un rôle non négligeable dans la transmission du parasite de l'homme au moustique. Par la phagocytose des gamétocytes activés et des gamètes, ils sont capables de réduire considérablement le rendement de la gamétogénèse et donc de la gamogonie. Sinden et Smalley (1976) ont montré par un vidéo film que les leucocytes sont attirés par les gamétocytes activés.

Peu de travaux de terrain ont à nos jours été menés en vue d'estimer le pouvoir infectant des porteurs de gamétocytes de *Plasmodium* au moustique vecteur. Ces recherches ont eu lieu dans diverses régions: Graves et al. (1988) à Papouasie en Nouvelle Guinée, Muirhead-Thomson (1957) et Boudin et al. (1993) en Afrique de l'Ouest, Lines et al. (1991) et Githeko et al. (1992) en Afrique de l'Est. Ces travaux ont montré une extrême variabilité de l'infectivité des gamétocytes en fonction des localités et du niveau

d'endémicité. Les infections expérimentales de moustiques avec des souches locales de *Plasmodium falciparum* constituent un modèle très utile pour l'estimation du niveau de transmission homme-vecteur et l'analyse des facteurs liés à l'hôte humain, susceptibles d'influencer l'infectivité des gamétocytes.

Dans cette étude, nous avons évalué l'infectivité des souches locales de *Plasmodium falciparum* pour une souche locale d'*Anopheles gambiae*, vecteur majeur du paludisme en Afrique Sub-saharienne. Les moustiques ont été expérimentalement infestés à travers une membrane parafilm avec du sang de porteurs de gamétocytes naturellement infectés. L'influence de la densité gamétocytaire a été analysée, de même que la présence et la densité des parasites asexués, le sexe, l'âge, le groupe sanguin (ABO), le facteur rhésus, la température corporelle des porteurs de gamétocytes et enfin la prise d'antimalariques.

MATERIEL ET METHODES

1° - Les moustiques

Une souche d'*A. gambiae* sensu stricto, capturée au quartier Essos à Yaoundé a été adaptée au gorgement sur membrane parafilm (Ponnudurai et al., 1989) et maintenue en élevage dans les conditions de laboratoire (Armstrong et Bransby-Williams, 1961). La photopériode est inversée avec obscurité entre 02h 00 et 15h 00. L'humidité relative est maintenue entre 70% et 90% dans tout l'insectarium, la température quant à elle est stabilisée entre 28 et 30°C au larvarium et entre 26 et 28°C à l'adultarium. Les moustiques imagos destinés au maintien de la colonie sont nourris au jus sucré constitué d'une solution de saccharose à 10% placée dans des pots où plonge du papier filtre. Pour maturer leurs ovocytes, les femelles prennent le repas de sang humain à travers une membrane parafilm attachée à une cellule de gorgement de taille moyenne telle que décrite par Ponnudurai et al. (1989). Les œufs déposés sur des pondoires faits de papier filtre mouillé sont récoltés tous les matins et incubés pendant 30 heures avant d'être trempés dans des bacs contenant de l'eau de source filtrée, ce qui ramène la différence d'âge entre les générations successives à 24 heures. Les larves issues de ces œufs sont nourries à la farine Tetra Baby Fish Food L® à raison de 150 mg par jour et par bac contenant environ 500 larves à une densité de 0,5 larve/cm². Huit à dix jours après la mise en eau, les

larves se nymphosent et sont récoltées par pipettage ou par sédimentation différentielle après anesthésie par refroidissement s'il y en a beaucoup (Boudin et al., 1989). L'émergence a lieu 24 à 48 heures plus tard. Chaque jour, une cage cubique plus petite de 20 cm de côté est apprêtée avec 500 nymphes en vue de l'infection des imagos à l'âge de 5 jours. Aucun repas de sang n'est donné au moustique avant l'infection expérimentale. Le jus sucré est retiré des cages 20 heures avant le repas infectant pour augmenter l'agressivité des femelles.

2° - Les porteurs de gamétocytes

Chaque matin entre 8H 00 et 9H 30, une trentaine de gouttes épaisses sont faites au dispensaire de Messa, un quartier central de Yaoundé, par prélèvement des patients présentant des symptômes palustres. Les lames sont colorées au Giemsa et examinées au laboratoire de l'OCEAC. Les résultats sont remis au dispensaire le même jour avant 11H 00, et des explications sur le protocole d'étude en cours sont données au porteur de gamétocytes éventuellement dépisté. Ce dernier est finalement invité à coopérer en nous fournissant un peu de son sang et en cas d'acceptation, il était pris en charge par l'OCEAC. Des données sur le passé clinique et sur les médicaments déjà absorbés par le malade sont recueillies, de même que le poids et la température corporelle. Tous les patients sont traités gratuitement avec 35 mg d'amodiaquine par kg de poids corporel et pendant 3 jours d'après un protocole thérapeutique précédemment établi par l'OCEAC (Louis et al., 1992).

3° - Le prélèvement de sang

Avant la prise de médicament, 2 tubes de sang intraveineux sont prélevés: l'un sec et l'autre avec anticoagulant. Le sang du tube hépariné est utilisé pour l'infection expérimentale, tandis que celui du tube sec est destiné à la détermination du groupe sanguin (système ABO), du facteur rhésus et de la densité parasitaire. Cette dernière est faite en comptant le nombre de gamétocytes par 1000 globules blancs et en admettant une moyenne de 8000 leucocytes/ μ l de sang.

4° - Les infections expérimentales

Toutes les expérimentations se font à 12H 00, c'est-à-dire 3 heures avant l'allumage des lampes à l'insectarium. Cette période a été rapportée par Gillies et al. (1968) comme correspondant au pic d'agressivité de *Anopheles gambiae*.

Le tube contenant le sang hépariné est soigneusement maintenu à 37°C pour éviter l'activation des gamétocytes. Deux ml de ce sang sont rapidement introduits à l'aide d'une seringue stérile préchauffée dans une cellule de gorgement ayant une surface de 1134 mm² (Ponnudurai et al., 1989). Les repas de sang infectant durent 15 mn puis les moustiques gorgés sont triés et placés dans une nouvelle cage avec du jus sucré. Sept jours plus tard, les moustiques survivants sont déséqués pour extraire les estomacs qui sont colorés au mercurochrome à 2% puis examinés pour la recherche et la numération des oocystes au microscope optique.

5° - Les critères d'inclusion

Seuls les patients âgés de 4 ans au moins et porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* exclusivement et donc négatif pour les autres espèces plasmodiales ont été retenus dans cette étude. En outre, un minimum de 20 moustiques devaient être examinés le septième jour pour que l'infection expérimentale soit incluse dans les analyses statistiques.

6° - Les analyses statistiques

Une analyse monofactorielle simple a été menée sur les variables suivantes: le sexe des porteurs de gamétocytes, la température corporelle au moment de la prise de sang pour l'infection expérimentale, le groupe sanguin, le facteur rhésus et la prise rapportée par le patient d'antimalarique et d'antipyrétique. Les différences entre les proportions ont été évaluées par le test du Khi carré ou de Fisher. Elles ont été considérées comme significatives pour $p < 0,05$. Une analyse multifactorielle par regression logistique a également été effectuée sur le succès des infections et par regression linéaire multiple sur le pourcentage de moustiques infestés, avec d'une part la densité gamétocytaire, la présence ou la densité des stades érythrocytaires asexués et l'âge des porteurs de gamétocytes comme variables indépendantes et d'autre part le succès des infections ou le pourcentage de moustiques infectés comme variables liées.

RESULTATS

1° - Les moustiques

Le pourcentage d'éclosion des œufs incubés a été de 42% et la mortalité larvaire journalière de 1,9%. La productivité de l'élevage était régulièrement supérieure à 5000 nymphes/jour, ce qui a largement

assuré la réalisation des infections expérimentales et le maintien en élevage continu de la souche d'anophèle. Pour chaque lot de 500 nymphes apprêté en vue de l'infection expérimentale des imagos, une moyenne de 52 est mort avant la date de l'expérimentation (5 jours après l'émergence) et une moyenne de 82 femelles se sont gorgées pendant le repas de sang infectant. L'agressivité de souche a ainsi été évaluée à 36,6%.

2° - Les porteurs de gamétocytes

L'examen parasitologique de 10781 gouttes épaisses de Octobre 1990 à Janvier 1993 a donné un indice plasmodial au dispensaire égale à $37,1 \pm 7,8\%$ avec une très faible variation saisonnière. La répartition plasmodiale a été de 90,5% pour *P. falciparum*, 13,0% pour *P. malariae*, 2,0% pour *P. ovale* et pas de *P. vivax*. Le taux des infections mixtes a été de 5,5%.

A l'exception de 4 patients qui portaient à la fois *P. malaria* et *P. ovale*, Ces infections mixtes ont consistées en une association de *P. falciparum* avec l'une des deux autres espèces présentes. L'association des trois espèces n'a jamais été observée au cours de cette enquête. L'indice gamétocytaire de *P. falciparum* a été de $5,4 \pm 1,8\%$ sans variation saisonnière. Cette stabilité de l'indice gamétocytaire a permis de mener sans interruption les expérimentations tout au long de l'année. Presque tous les porteurs retrouvés au dispensaire ont accepté de coopérer. Le sex

ratio était déséquilibré; 58,4% des patients qui se sont présentés au dispensaire et 64,0% parmi les porteurs de gamétocytes étaient de sexe masculin. Les données cliniques ont indiqué que les symptômes palustres rapportés par les patients (fièvre, froid, céphalés, asthénie...) étaient commun à tous les porteurs de gamétocytes (Tableau 1). L'âge moyen des porteurs de gamétocytes a été de 19,5 ans (extrêmes 4 et 60). Parmi eux, 68% ont eu des trophozoïtes. La densité parasitaire sexuée moyenne a été de 163 gametocytes/ml. Le tableau 2 indique la répartition des charges parasitaires moyennes en fonction de l'âge. Il y a eu une corrélation négative et significative entre l'âge des porteurs de gamétocytes et la charge parasitaire

asexuée ($r = -0,143$; $ddl = 138$ et $p = 0,047$). Il en a été de même entre l'âge et la densité gamétocytaire ($r = -0,141$; $ddl = 138$ et $p = 0,049$) puis entre la densité gamétocytaire et la parasitémie asexuée ($r = -0,247$; $ddl = 138$ et $p = 0,002$).

Tableau 1 : Prévalence des différents symptômes chez 248 porteurs de gamétocytes

Symptômes	Fièvre ou froid	Céphalées	Asthénies ou vertige	Douleurs abdominales	Courbatures	Prurits	Autres symptômes
Motif principal de la visite médicale (%)	35,5	18	15,3	6,9	4,8	2,8	14,6
Prévalence (%)	89,5	84	100	56,5	58,9	31	-

Tableau 2 : Répartition des charges parasitaires par tranche d'âge chez 139 porteurs de gamétocytes en relation avec leur infectivité

	Age				Total ou moyenne
	5-10	11-15	16-25	>25	±DS
Nombre de patients	26	33	51	29	139
Prévalence de trophozoïtes	69	85	63	59	68
Densité moyenne de trophozoïtes	6283 ±4174	6001 ±3336	5141 ±2417	3479 ±2043	5212 ±1478
Densité gamétocytaire moyenne	136.9 ±51.2	217.3 ±90.8	168.3 ±57.1	114.2 ±59.4	162.8 ±34.1
Pourcentage moyen de moustiques infectés	12.8 ±7.2	10.6 ±5.2	14.5 ±5.4	6.1 ±3.2	11.5 ±2.8

3° - Les infections expérimentales

Le sang de 171 porteurs de gamétocytes a été prélevé pour les infections. En se basant sur les critères d'inclusion, 139 expérimentations ont été retenues pour les analyses. Un total de 5149 moustiques ont été disséqués ce qui a fait une moyenne de 37 estomacs examinés par expérimentation (extrêmes 20 et 88). En moyenne 38% de moustiques gorgés sont morts avant le septième jour après l'infection expérimentale et n'ont donc pas été disséqués. Pour les 139 infections, le taux moyen de moustiques infestés a été de 11,5% et la charge moyenne d'oocystes par estomac de 1,59 (Tableau 3a). Les gamétocytes de

53 porteurs (38%) n'ont pas infecté de moustique, leurs densités variaient de 8 à 552/μl. En revanche, 86 (62%) porteurs de gamétocytes ont été infectants pour les anophèles. Pour ces infections positives, le pourcentage de moustiques infestés a été de 18,6% et le nombre moyen d'ocystes par estomac infesté de 2,56 (Tableau 3b). Le nombre des infections réussies augmente avec la densité gamétocytaire (Tableau 3b) et inversement, les infections négatives décroissent avec la parasitémie sexuée (Fig. 1). Il y a eu très peu d'anophèles avec de fortes charges oocystiques; par contre, la plupart des estomacs positifs avaient une très faible densité d'ocystes (Fig. 2). Le taux d'infection le plus élevé a été obtenu après alimentation des moustiques avec le sang d'un porteur de gamétocytes de sexe masculin et âgé de 24 ans: 72% d'anophèles

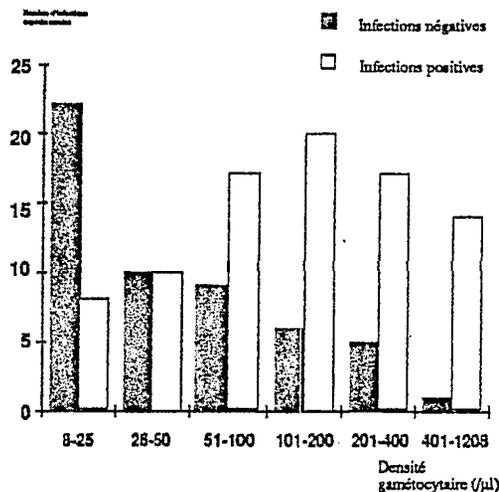


Fig. 1 : Relation entre la densité gamétocytaire et le devenir des infections de *A. gambiae* avec *P. falciparum* chez 139 porteurs de gamétocytes.

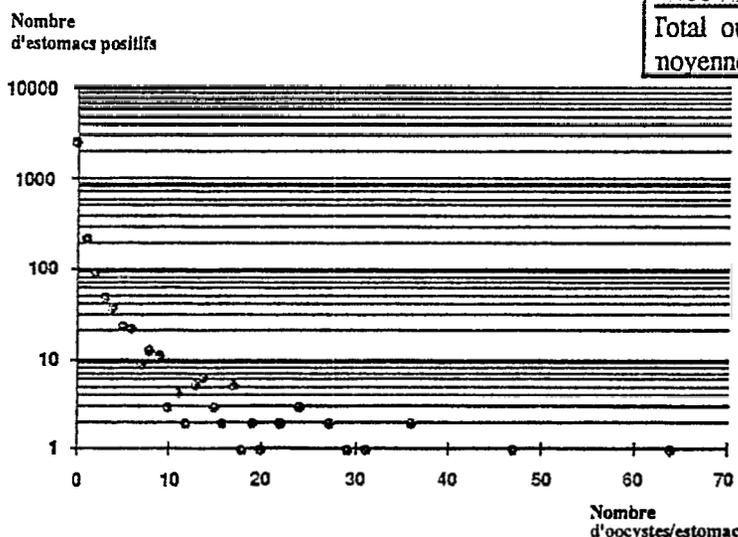


Fig. 2 : Distribution de fréquence des moustiques positifs en fonction des densités d'ocystes observés sur les estomacs de moustiques dans 86 infections expérimentales réussies de *A. gambiae* avec *P. falciparum*.

ont été infestés avec une charge moyenne d'ocystes par estomac de 4,14.

Table 3a : Relation entre densité gamétocytaire et infectivité dans les infections expérimentales de *Anopheles gambiae* avec *Plasmodium falciparum*

Densité gamétocytaire	Nombre sujets	Pourcentage moyen de moustiques infestés	Moyenne d'ocystes /estomac infesté
≤ 25	30	1.40±0.92	0.33±0.20
26-50	20	5.37±3.99	0.66±0.33
51-100	26	8.40±4.00	1.08 ± 0,36
101-200	26	13.28±6.55	1.32±0.75
201-400	22	21.61±9.20	2.33±0.91
> 400	15	27.38±11.03	4.72±2.25
Total ou moyenne ±DS	139	11.51±2.79	1.59±0.39

Table 3b : Relation entre densité gamétocytaire et infectivité dans les infections expérimentales pour lesquelles au moins un anophèle a été infesté

Densité gamétocytaire	% des infections positives (Nombre de sujets)	Pourcentage moyen de moustiques infestés	Moyenne d'ocystes/estomac infestés
≤ 25	26,7(8)	5.24±1.48	1.24±0.19
26-50	50(10)	10.73±6.53	1.32±0.31
51-100	65,4(17)	12.85±4.98	1.65±0.29
101-200	76,9(20)	17.26±7.71	2.37±0.33
201-400	93,3(17)	27.97±10.05	3.01±0.95
> 400	93,3(14)	29.34±11.11	5.06±2.31
Total ou moyenne ± DS	61,9(86)	18.60±3.80	2.56±0.53

4° - Les facteurs influençant le devenir d'une infection expérimentale

Le coefficient de corrélation entre la densité gamétocytaire et le pourcentage de moustiques infestés a été de 0,31 (Fig. 3) et de 0,66 entre la densité gamétocytaire et le nombre d'ocystes par estomac positif ($p < 0,001$ dans les 2 cas). L'analyse par regression logistique a montré que le succès de l'infection des moustiques dépend seulement de la densité gamétocytaire ($b = 0,0073$; $X^2 = 24,29$ et $p < 0,0001$). La regression linéaire multiple effectuée sur le pourcentage de moustiques infestés a donné des résultats similaires ($B = 0,045$; test $t = 7,83$ et $p < 0,0001$).

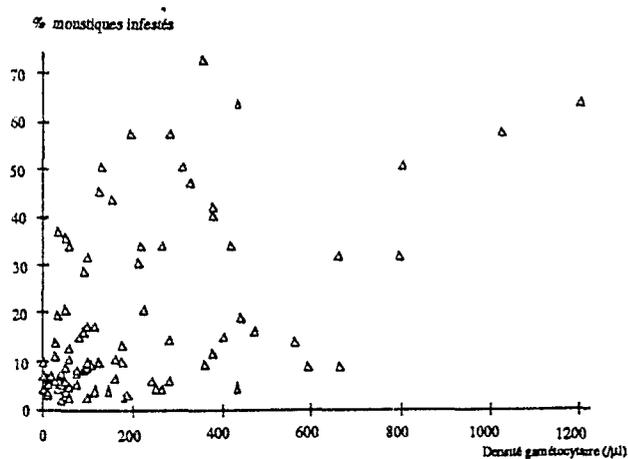


Fig. 3 : Relation entre le taux d'*A. gambiae* infestés et la densité gamétoocytaire dans 36 infections expérimentales positives avec *P. falciparum*

Les autres variables n'ont eu aucune influence significative.

5° - Les facteurs n'influençant pas le résultat d'une infection expérimentale

L'âge moyen des porteurs de gamétoocytes ayant infecté les moustiques (18,4 ans) a été comparable à celui des porteurs aux infections négatives (21,4 ans). Il en a été de même pour la parasitémie asexuée (5358

et 4976 trophozoïtes/ μ l respectivement). Aucun de ces deux facteurs de confusion n'a eu une influence significative lors de l'analyse par régression logistique ($p = 0,41$ et $p = 0,29$ respectivement), (Tableau 4a). Le devenir de l'infection expérimentale n'a pas été non plus influencé par le sexe des porteurs de gamétoocytes ($X^2 = 0,50$ et $p = 0,48$), le groupe sanguin ($X^2 = 4,65$ et $p = 0,10$) ou le facteur rhésus (test exact de Fisher, probabilité bilatérale $p = 0,21$), (Tableau 4b). La température axillaire du patient au moment de la prise de sang n'a eu aucune influence sur l'infectivité des gamétoocytes: la température moyenne a été de $37,2^\circ\text{C}$ pour les porteurs aux infections positives et de $37,3^\circ\text{C}$ chez les patients n'ayant pas infecté de moustique. Il y a eu 23 cas de fièvre (température $\geq 38^\circ\text{C}$) parmi lesquelles 13 infections ont été positives. La prise rapportée d'antimalariques tels que la chloroquine (24 cas) et l'amodiaquine (17 cas) et/ou l'aspirine (28 cas) pendant la semaine précédant le don de sang n'a eu aucun effet sur le succès des infections expérimentales.

Tableau 4a : Caractéristiques quantitatives des 139 porteurs de gamétoocytes en relation avec le devenir de l'infection expérimentale

	Gamétocytémie moyenne (μ l)	Parasitémie asexuée moyenne (μ l)	Température moyenne ($^\circ\text{C}$)	Age moyen (ans)	Nombre d'infections
Total	162,8 \pm 205,1	5211,9 \pm 8891,4	37,2 \pm 0,8	19,5 \pm 10,2	139
Infections positives	217,4 \pm 233,3	5357,6 \pm 8459,2	37,2 \pm 0,7	18,4 \pm 7,6	86
Infections négatives	74,1 \pm 98,5	4975,6 \pm 9630,4	37,3 \pm 0,8	21,3 \pm 13,2	53
p	10^{-6}	0,29	0,21	0,41	-

Tableau 4b : Caractéristiques qualitatives des 139 porteurs de gamétoocytes en relation avec le devenir de l'infection expérimentale

	Fièvre température $\geq 38^\circ\text{C}$		Sexe		Groupe sanguin					Facteur rhésus			Total
	oui	non	masculin	féminin	O	A	B	AB	non fait	+	-	non fait	
Total	23	116	89	50	68	37	25	7	2	130	6	3	139
Infections positives	13	73	57	29	48	21	12	3	2	81	2	3	86
Infections négatives	10	43	32	21	20	16	13	4	0	49	4	0	53
p	0,21		0,48		0,10* et 0,04**					0,21			-

* p (O, A, B, AB) ** p (O / (A,B,AB))

DISCUSSION

Dans cette étude, l'infectivité des gamétocytes a été définie comme leur capacité à infecter les moustiques; c'est-à-dire le taux de moustiques infectés qu'ils génèrent et non par rapport à la charge oocystique des estomacs infestés, cette dernière ayant un haut degré de variabilité. La densité oocystique est un critère moins approprié pour mesurer l'infectivité puisqu'un moustique ayant un seul oocyste sur son estomac est capable de transmettre la maladie (Ponnudurai et al., 1991). Ce paramètre suit donc la "loi du tout ou rien". Les infections expérimentales de moustiques avec le sang des porteurs de gamétocytes naturellement infectés ont montré que 62% d'entre eux ont été effectivement infectants aux moustiques. Cette valeur n'est pas différente de celle de Vanderberg et Gwatz (1980) et est comparable aux 45% obtenus en Papouasie par Graves et al. (1988), aux 62,5% de Sattabongkot et al. (1991) et enfin aux 48,4% de Boudin et al. (1993). Aucun repas infectant de moustiques n'a donné un taux d'infection de 100%. Ceci peut être dû au faible nombre de gamétocytes réellement ingérés par les anophèles ou à la variation interindividuelle de la vitesse de digestion du sang par les moustiques vecteurs (Ponnudurai et al., 1989).

La question de savoir pourquoi 38% des patients n'ont donné aucun moustique infesté reste posée. Le résultat de l'analyse par regression linéaire multiple indique que la densité gamétocytaire est l'un des facteurs déterminant la réussite de l'infection des moustiques. Boudin et al. (1989) ont trouvé une relation positive entre la gamétocytemie et le taux de moustiques positifs en sporozoïtes pour des densités comprises entre 50 et 450 gamétocytes/ μ l. Nos résultats confirment cette observation; seulement, aucune limite supérieure n'a été mise en évidence. Des résultats similaires ont récemment été obtenus avec *P. vivax* par Gamage-Mendis et al. (1993). Boyd (1949) avait déjà décrit des facteurs autres que la densité gamétocytaire qui selon lui co-détermineraient l'infectivité d'un porteur de gamétocytes. Il s'agit de la maturité et du sex ratio des gamétocytes eux même. La détermination de la densité par sexe gamétocytaire a été menée dans cette étude à partir des gouttes épaisses, mais les résultats n'ont pas été satisfaisants à cause de la forte prévalence des gamétocytes au sexe difficile à déterminer

(gamétocytes activés) surtout chez les porteurs ayant donné un taux élevé d'infection des moustiques.

Contrairement à nos observations, Ponnudurai et al. (1989) n'ont trouvé aucune relation entre la densité des gamétocytes cultivés et le taux d'infection des moustiques après infection expérimentale. Apparemment, le système *in vitro* est différent de la situation naturelle sur le terrain. En particulier, les densités gamétocytaires dans les cultures sont plus élevées que celles qui apparaissent naturellement au sein des populations en zones endémiques. Malgré la forte corrélation positive existant entre la densité gamétocytaire et la réussite des infections, ni la présence, ni la densité des stades asexués n'a eu une influence significative sur le taux d'infection des moustiques d'après nos analyses. Dans le paludisme à *P. falciparum* contrairement aux autres espèces, les stades asexués ne semblent avoir aucune influence sur la transmission du parasite au moustique; probablement parce que les gamétocytes matures apparaissent dans la circulation sanguine 10 jours au moins après la phase de crise (Smalley, 1976; Jensen, 1979) et donc bien longtemps après le pic de sécrétion des cytokines. Rutledge et al. (1969) ont pourtant suggéré que les fortes charges parasitaires asexuées seraient associées à une réduction de l'infectivité des gamétocytes, en particulier chez les enfants ayant plus de 103 parasites/mm³ de sang.

L'absorption de chloroquine n'a pas influencé l'infectivité des gamétocytes. Elle agit seulement sur les formes asexuées et sur les gamétocytes immatures jusqu'au stade III et n'interfère pas avec la transmission de *P. falciparum* une fois que le gamétocyte se retrouve dans la circulation sanguine. Cette observation s'accorde avec les publications de Rosario et al. (1988), Wilkinson et al. (1976) et Smalley (1977).

Les données cliniques sur le passé des patients ont montré que la majorité des porteurs de gamétocytes a précédemment souffert d'une attaque palustre. La faible densité relative des parasites sexués et asexués dans le groupe des individus âgés indique un certain degré de prémunition au sein de la population autochtone de Yaoundé. Dans une population récemment exposée à une épidémie de paludisme à *P. falciparum*, aucune relation n'a été trouvée entre l'âge et la gamétocytemie, pourtant cette relation existe avec *P. vivax* qui y circule de façon permanente depuis longtemps (Gamage-Mendis et al.,

1991). Baird et al. (1991) en comparant une population autochtone à une population nomade dans une situation d'épidémie a émis l'hypothèse d'une suppression spécifique à médiation humorale des gamétocytes indépendamment des stades asexués. Récemment, une étude sur une population en zone de paludisme holoendémique a montré la stabilité de la densité gamétocytaire dans toutes les tranches d'âges de la population en même temps que la décroissance de l'infectivité avec l'âge des porteurs de gamétocytes (Githeko et al., 1992). A partir de ces observations, des conclusions très intéressantes ont été tirées sur le réservoir humain du paludisme à *P. falciparum*. Cependant, notre étude ne nous permet pas de discuter sur le réservoir puisque notre échantillon de porteur de gamétocytes n'était pas représentatif de la population générale.

REMERCIEMENTS

Cette étude n'aurait jamais été possible n'eut été l'inspiration et la contribution du feu Dr. Thivi Ponnudurai. Les auteurs remercient le personnel du dispensaire de Messa ainsi que les patients pour leur coopération. Cette reconnaissance s'adresse également à Gerald de Haan, Isaac Tchikangwa, Roger Beyene, Dorothee Knobbout, Marc Desfontaine, Ernest Mooh, Julienne Essong et Ousmane Traore pour leur assistance technique; Mariel Droomers et Johan Velema pour leur appui en analyses statistiques; Ton Lensen et Christina Celluzzi pour les critiques apportées au manuscrit. Cette étude entièrement réalisée à l'OCEAC a été financée par le programme STD-3 de la CEE, le Ministère Français de la Recherche et de l'Environnement et par l'ORSTOM.

BIBLIOGRAPHIE

- Armstrong J. A., Bransby-Williams W. R. (1961). -The maintenance of a colony of *Anopheles gambiae* with observations on the effects of changes in temperature. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 24: 427-435.
- Baird J. K., Jones T. R., Purnomo S., Masbar S., Ratiwayanto S., Leksana B. (1991). -Evidence for specific suppression of gametocytemia by *Plasmodium falciparum* in residents of hyperendemic Irian Jaya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 44: 183-190.
- Boudin C., Lyannaz J., Bosseno M.F., Chaize J., Carnevale P. (1989). -Production de sporozoïtes de *Plasmodium falciparum* humains à Bobo-Dioulasso (Bourkina Faso). *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, 69: 3-23.
- Boudin C., Olivier M., Molez J. F., Chiron J. P., Ambroise-Thomas P. (1993). -High human malarial infectivity to laboratory-bred *Anopheles gambiae* in a village in Burkina Faso. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 48: 700-706.
- Boyd M. F. (1949). -Epidemiology of malaria: factors related to the intermediate host. In: *Malariaology*, Philadelphia: W. B. Saunders, Vol. I: 551-697.
- Bruce-Chwatt L. J. (1980). -*Essential Malariaology*. William hainemann Medical Books Ltd. London.
- Chutmongkonkul M., Maier W. A., Seitz H. M. (1992). -*Plasmodium falciparum*: effect of chloroquine, halofantrine and pyrimethamine on the infectivity of gametocytes for *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Ann. Trop. Med. Parasitology*, 86: 103-110.
- Danis M., Mouchet J. (1991). -Paludisme, UREF. Ed. *Ellipses/AUPELF*, 239 p.
- Gamage-Mendis A. C., Rajakaruna J., Carter R., Mendis K. N. (1991). -Infectious reservoir of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria in an endemic region of Sri Lanka. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 45: 479-487.
- Gamage-Mendis A. C., Rajakaruna J., Weerasinghe S., Mendis C., Carter R., Mendis K. N. (1993). -Infectivity of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* to *Anopheles tessellatus*; relationship between oocyst and sporozoite development. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 87: 3-6.
- Gillies M. T., Meillon de B. (1968). -*The Anophelinae of Africa South of the Sahara*. The South African Institut for medical research. second edition.
- Githeko A. K., Branding-Bennet A. D., Beier M., Atieli F., Owaga M., Collins F. H. (1992). -The reservoir of *Plasmodium falciparum* malaria in a holoendemic area of Western Kenya. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 86: 355-358.
- Graves P. M. (1980). -Studies on the use of a membrane feeding technique for infecting *Anopheles gambiae* with *Plasmodium falciparum*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 74: 738-742.

- Graves P. M., Burkot T. R., Carter R., Cattani J. A., Lagog M., Parker J., Brabin B. J., Gibson F. D., Bradley D. J., Alpers M. P. (1988). -Measurement of malarial infectivity of human populations to mosquitoes in the Madang area, Papua, New Guinea. *Parasitology*, 96: 251 - 263.
- Jensen J. B. (1979). -Observations on gametogenesis in *Plasmodium falciparum* from continuous culture. *J. Protozol.*, 26: 129-132.
- Lines J. D., Wilkes T. J., Lyimo E. O. (1991). -Human malaria infectiousness measured by age-specific sporozoites rates in *Anopheles gambiae* in Tanzania. *Parasitology*, 102: 167 - 177.
- Louis J. P., Hengy C., Louis F. J., Gazin P., Jambou R., Gardon J., Fadat G., Trebucq A. (1992). -Proposals for a new therapeutic strategy for simple *Plasmodium falciparum* malaria attacks in Cameroun. *Trop. Med. Parasitol.*, 43: 110-120.
- Mendis K. N., Naotunne T. De S., Karunaweera N. D., Del Giudice G., Grau G. E., Carter R. (1990). -Anti-parasites effects of cytokines in malaria. *Immunology Letters*, 25: 217-220.
- Motard A., Baccam D., Landau I. (1990). -Temporary loss of *Plasmodium* gametocytes infectivity during schizogony. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 65: 218-220.
- Muirhead-thomson R. C. (1957). -The malarial infectivity of an african village population to mosquitoes (*Anopheles gambiae*): A random xenodiagnostic survey. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 6: 971 - 979.
- Naotunne T. De S., Karunaweera N. D., Giudice G. Del, Kularatne M. U., Grau G. E., Carter R., Mendis K. N. (1991). -Cytokines kill malaria parasites during infection crisis: extracellular complementary factors are essential. *J. Exp. Med.*, 173: 523 - 529.
- Ponnudurai T., Lensen A. H. W., Van Gemert G. J. A., Bensink M. P. E., Bolmer M., Meuwissen J. H. E. Th. (1989). -Infectivity of cultured *Plasmodium falciparum* gametocytes to mosquitoes. *Parasitology*, 98: 165- 173.
- Ponnudurai T., Lensen A. H. W., Van Gemert G. J. A., Bensink M. G., Bolmer M., Meuwissen J. H. E. Th. (1991). -Feeding behaviour and sporozoite injection by infected *Anopheles stephensi*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 85: 175-180.
- Rosario V. E. do, Vaughan J. A., Murphy M., Harrod V., Coleman R. (1988). -Effect of chloroquine on the sporogonic cycle of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei*; in anopheline mosquitoes. *Acta Leidensia*, 57: 53-60.
- Rutledge L. C., Douglas J. G., Tantichareon B. (1969). -Factors affecting the infection of Anophelines with human malaria in Thailand. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 63: 613-619.
- Sattabongkot J., Maneechal N., Rosenberg R. (1991). -*Plasmodium vivax* gametocyte infectivity of naturally infected Thai adults. *Parasitology*, 102: 27-31.
- Sinden R. E. (1991). -Asexual blood stages of malaria modulate gametocyte infectivity to the mosquito vector. Possible implications for control strategies. *Parasitology*, 103: 191-196.
- Sinden R. E., Smalley M. E. (1976). -Gametocytes of *Plasmodium falciparum*: phagocytosis by leucocytes in vivo and in vitro. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 70: 344-345.
- Smalley (1976). -*Plasmodium falciparum* gametogenesis in vitro. *Nature*, 264: 271-272.
- Smalley M. E. (1977) -*Plasmodium falciparum* gametocytes: the effect of chloroquine on their development. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med Hyg.*, 71: 526-529.
- Smalley M. E., Sinden R. E. (1977). -*Plasmodium falciparum* gametocytes: Their longevity and infectivity. *Parasitology*, 74: 1-8.
- Vanderberg J. P., Gwadz R. (1980). -The transmission by mosquitoes of plasmodia in the laboratory. In Kreier J.-P. ed., *Malaria*, New York: *Academic press*, 2: 153-234.
- Wilkinson R. N., Noeypatimanondh S., Gould D. J. (1976). -Infectivity of falciparum malaria patients for anopheline mosquitoes before and after chloroquine treatment. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 70: 306-307. * Version anglaise dans *Tropical Medicine and Parasitology* (1993), 44 (4): 271-276.