

BURKINA FASO
UNITE-PROGRES-JUSTICE

MINISTRE DES ENSEIGNEMENTS SECONDAIRE,
SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE POLYTECHNIQUE DE BOBO-DIOULASSO

INSTITUT DU DEVELOPPEMENT RURAL



MEMOIRE

Présenté par :

YAO ADAMA FRANCK

Maître ès Sciences en Biochimie- Microbiologie Appliquée

Pour l'obtention du :

Diplôme d'Etudes Approfondies en
Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques

Sur le Thème :

*Etude de l'influence du génotype hémoglobinique sur la
transmission de Plasmodium aux moustiques*

Soutenu le Jeudi 11/06/09 devant le Jury :

Président : Prof. Georges A. OUEDRAOGO

Directeurs: Dr. Louis C. GOUAGNA/ Prof. Jean-Bosco OUEDRAOGO

Membre : Dr. Issa SIDIBE

N° d'ordre.....

DEDICACE

- ❖ **A mon père et à ma mère qui m'ont donné le jour,**
- ❖ **A mes frères et sœurs,**
- ❖ **Aux grands parents, oncles et tantes,**
- ❖ **A toute la famille pour leur soutien tant moral que financier,**
- ❖ **A mes ami (es) et camarades**

REMERCIEMENTS

Nous tenons à travers ces pages à marquer notre reconnaissance aux personnes suivantes, qui par leur action directe ou indirecte ont favorisé la conception et la finalisation de ce travail :

Je prie le **Dr Louis Clément GOUAGNA**, IRD/IRSS Bobo Dioulasso investigateur principal de ce projet, Directeur et encadreur de ce mémoire de trouver ici l'expression de ma profonde gratitude pour m'avoir guidé vers le laboratoire de l'IRSS/ Bobo Dioulasso pour la phase pratique de mon travail. Vous avez su me donner le goût à la science et je ne peux rester indifférent face à toutes ces connaissances que vous m'avez permis d'acquérir. Le bonheur que je ressens, je vous le dois. Merci infiniment.

Au professeur Jean Bosco OUEDRAOGO, Directeur Régional de l'IRSS/Bobo et coordonnateur de ce projet, je vous serai toujours reconnaissant pour m'avoir accueilli dans votre laboratoire. Malgré vos multiples occupations vous avez su nous encourager par vos conseils. Je vous remercie infiniment.

Au professeur Anicet Georges OUEDRAOGO, Responsable du 3^e cycle à l'UPB, je vous remercie sincèrement pour votre soutien administratif lors de mon inscription au troisième cycle et pour vos conseils.

Au professeur David MODIANO, Université de Rome, Italie, également coordonnateur de ce projet, je vous serai toujours reconnaissant pour m'avoir accueilli dans votre laboratoire, la SAPIENZA pour une partie de ma phase pratique et pour vos conseils. Je vous remercie infiniment.

Au Dr Germana BANCONE, Université de Rome, Italie, je vous remercie beaucoup pour votre franche collaboration, votre ardeur au travail qui m'ont permis d'apprendre beaucoup et pour votre soutien. "Gracia".

Au Dr Issiaka ZONGO, chercheur à l'IRSS-Bobo, vous avez contribué au déroulement de ce travail et particulièrement à son début. Merci infiniment.

Au Dr Hermann SORGHO, chercheur à l'IRSS-Bobo, vous avez su me reconforter sur le plan moral et vous avez été d'un grand apport sur le plan scientifique. Je ne sais comment vous remercier. Merci.

A l'ensemble des chercheurs de l'IRSS-Bobo, vous avez su me faire bénéficier du dynamisme scientifique et de la rigueur que vous faites régner au sein du laboratoire. Je vous remercie infiniment.

A tous mes enseignants, je présente mes sincères remerciements et ma profonde gratitude.
Vos conseils et vos enseignements ont été d'un apport pour la réussite de notre formation. Merci.

A Bienvenue YAMEOGO, Adama SANKARA, Souleymane TAMBOULA, Adama KONE, à tous les techniciens et étudiants de l'IRSS, trouvez ici mes remerciements pour votre franche collaboration.

A toute la section entomologie, chauffeurs et personnel de l'IRSS, trouvez ici mes sincères remerciements.

Je remercie en fin tous **mes parents, ami (es) et promotionnaires** qui m'ont soutenu dans mes études.

TABLE DES MATIERES

Remerciements.....	ii
Sigles et abréviations	vi
Liste des Tableaux et Figures	vii
Résumé	viii
I. INTRODUCTION	1
II. OBJECTIFS DE L'ETUDE	3
II.1. Objectif général	3
II.2. Objectifs spécifiques	3
III. GENERALITES SUR LE PALUDISME	4
III.1. Epidémiologie du paludisme.....	4
III.1.1. Ampleur du paludisme	4
III.1.2. Le parasite du paludisme humain	5
III.1.2.1. Cycle biologique de <i>Plasmodium falciparum</i>	6
III.1.3. Le vecteur du paludisme	8
III.1.3.1. Cycle biologique des anophèles	8
III.1.4. L'hôte	10
III.1.4.1. Facteurs influençant la maladie	10
III.2. Lutte contre le paludisme	12
III.2.1. Lutte antiparasitaire	13
III.2.2. Lutte antivectorielle	13
III.3. Les modalités de la transmission	14
III.3.1. Compétence et capacité vectorielle	14
III.3.2. Facteurs influençant la transmission.....	16
IV. METHODOLOGIE	19
IV.1. Site et population d'étude	19
IV.1.1. Sélection des participants à l'étude	19
IV.1.1.1. Enquête démographique	20
IV.1.1.2. Enquête parasitologique.....	21

A/ Confection goutte épaisse et frottis mince sur lames	22
B/ Coloration et lecture de lames	22
C/ Diagnostic clinique.....	22
IV.2. Caractéristiques sanguin des participants	23
A/ Mesure du taux d'hémoglobine	23
B/ Groupage sanguin	23
C/ Extraction d'ADN	23
D/ Génotypage	24
IV.3. Evaluation de l'effet du génotype hémoglobinique sur la transmission	27
IV.3.1. Méthodes d'évaluation de l'infectivité	28
IV.3.1.1. Xenodiagnostic en case d'habitation	28
IV.3.1.2. Infections expérimentales	29
IV.4. Considérations éthiques	32
IV.5. Analyse de données	33
V. RESULTATS	34
V.1. Les caractéristiques de la population d'étude	34
V.1.1. Données parasitologiques	35
V.2. Evaluation de l'infectivité chez les moustiques engagés à la recherche de l'hôte	36
V.2.1. Xenodiagnostic de l'infectivité de l'hôte pour les moustiques sauvages	36
V.2.2. Influence de l'allèle C sur les indices d'infectivités	38
V.3. Infections expérimentales	39
V.3.1. Variation du taux d'infection en fonction du génotype	39
V.3.2. Distribution de l'intensité de l'infection en fonction du génotype	40
VI. DISCUSSION.....	41
VII. CONCLUSION.....	45
VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	46

Sigles et abréviations

ARMS : Amplification Refractory Mutation System

ADN : Acide Désoxyribonucléique

Dde : Desulfovibrio desulfiricans

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane

dNTPs : dinucléotides Triphosphates

GE : Goutte épaisse

Hb : Hémoglobine

IRSS/DRO : Institut de Recherche en Science de la Santé/ Direction Régionale de l'Ouest

KDa : Kilodalton

MgCl₂ : Chlorure de Magnésium

mm : millimètre

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCR : Polymerase Chain Reaction

P. f : *Plasmodium falciparum*

rpm : rotation par minute

UV : Ultra Violet

µm : micromètre

µl : microlitre

WHO : World Health Organisation

Liste des Tableaux et Figures

Tableaux

Tableau 1 : distribution de la prévalence et densité parasitaire en fonction du génotype	36
Tableau 2 : Taux d'infection et densités oocystiques par moustique infecté à J3 en fonction du génotype	37
Tableau 3 : Taux d'infection et densités oocystiques par moustique infecté à J7 en fonction du génotype	38
Tableau 4 : influence de l'allèle C sur la prévalence de moustiques positifs	38
Tableau 5 : comparaison multiple entre les génotypes hémoglobiniques.....	40

Figures

Figure 1 : Répartition géographique du paludisme dans le monde [WHO, 2004].....	5
Figure 2 : Cycle biologique de <i>Plasmodium falciparum</i>	8
Figure 3 : Cycle biologique des anophèles (dessin j. Finot).	10
Figure 4 : Disposition des concessions et ménages dans la localité de soumousso.....	20
Figure 5 : Photographie illustrant des gamétocytes	22
Figure 6 : Schémas d'amplification de la ARMS tétraprimers	25
Figure 7 : Migration sur gel d'agarose 1,5%.....	26
Figure 8 : exemple d'un gel d'agarose après passage à l'ultraviolet (UV).....	27
Figure 9 : Prélèvement et introduction du sang dans les cellules de gorgement des moustiques	30
Figure 10 : Dispositif d'infection expérimentale (A) et gorgement des moustiques sur membrane (B).....	31
Figure 11 : Schéma montrant les étapes de la dissection et exemple d'un estomac de moustique infecté d'oocystes.....	32
Figure 12 : Répartition de la population par génotype.....	34
Figure 13 : Distribution de la moyenne oocystique par moustique infecté en fonction du génotype	40

Résumé

Dans le présent travail, nous avons étudié l'influence des facteurs génétiques de l'homme (notamment le polymorphisme de la chaîne bêta de l'hémoglobine) sur la transmission du *Plasmodium* de l'homme aux moustiques à Soumouso. Dans la population générale, l'hémoglobine A était majoritairement représenté par le génotype "AA" (71,9%) suivi du génotype "AC" (19%), "AS" (7,3%) et du génotype "CC" (1,6%) qui était très faiblement représenté. L'exploration des indices parasitaires sur l'examen microscopique des gouttes épaisses nous a révélé une relation, bien que faible, entre les prévalences parasitaires et le génotype de l'hémoglobine. Mais en dehors du génotype hémoglobinique, l'âge a une influence significative sur la prévalence et la parasitémie, mais surtout des gamétocytes. Soixante enfants de génotypes différents ont été sélectionnés puis répartis en groupes de 4 enfants selon leur âge (de 3-12 ans) et leur sexe. Ces enfants ont été ensuite invités à dormir dans les cases sentinelles pendant 4 nuits successives. Après chaque nuit, les moustiques présents dans chaque case étaient capturés à 6h du matin et gardés dans des cages jusqu'au septième jour avant d'être disséqués pour la recherche d'oocystes. Ce xenodiagnostic et les infections expérimentales complémentaires nous ont permis de démontrer que l'infectivité des individus pour les moustiques révélée par la présence d'oocystes dans l'estomac des moustiques était fonction du génotype ($P < 0,05$). En définitive, en plus des études précédentes démontrant une protection conférée par l'HbC et l'HbS contre le paludisme, notre étude souligne une co-évolution entre l'hôte humain et le parasite responsable du paludisme, *P falciparum*. Par de simples mutations de l'hémoglobine, un avantage mutuel s'est établi entre le couple hôte-parasite: une résistance plus élevée à la maladie pour l'hôte, et une transmissibilité accrue pour le parasite.

Mots clés : paludisme, gamétocytes, *Plasmodium falciparum*, moustiques, génotypes

Summary

The current study examined the influence of human genetic factors (in particular polymorphism of haemoglobin beta chain) on the transmission of *Plasmodium* from human to mosquitoes at Soumouso. Considering the whole population, Haemoglobin A was predominantly represented by the genotype "AA" (71, 9%) followed by genotype "AC" (19%), genotype "AS" (7, 3%) and genotype "CC" (1, 6%). Parasitological indices by microscopic examination of thick blood smear did not showed a significant relation, between parasites prevalence and haemoglobin genotype. However, beside the haemoglobin genotype, age significantly influenced the prevalence and parasites density, especially gametocytes prevalence was higher in children with C allele compared to other genotypes. Sixty children aged 3-12 years old were randomly selected according to their genotypes (AA, AS, AC, CC) and divided into 4 groups based on sex age category. They were invited to sleep in experimental huts for four consecutive nights, during which thick blood smears were performed everyday for malaria detection. At 6 am following each night, indoor resting *Anopheles* mosquitoes were caught from each hut and kept in cages for 7 days before being dissected in order to examine for oocysts. This xenodiagnostic and complementary experimental infections experiments showed that individual infectivity for mosquitoes provided evidence that the presence of oocysts within mosquito's was significantly influenced by haemoglobin genotype ($P < 0.05$). Whereas previous studies have demonstrated a protection conferred by haemoglobin C and S against malaria, our study indicates a co-evolution between human and *Plasmodium falciparum*. By 'simple' haemoglobin mutations, a mutual advantage was produce between the host-parasite couple: higher resistance more to infection for the host and increased transmissibility for the parasite.

Key words: malaria, gametocytes, *Plasmodium falciparum*, mosquitoes, genotype.

I. INTRODUCTION

Le Paludisme est une parasitose très répandue dans le monde tropical et intertropical ; c'est une maladie de la pauvreté et des pays sous développés (**Weatherall et al., 2002**). L'agent causal de cette parasitose endémo épidémique est un protozoaire du genre *Plasmodium* et transmis par un moustique du genre *Anopheles*. Parmi les 600 espèces d'anophèles décrites, moins de 70 espèces interviennent dans la transmission de la maladie ; une vingtaine seulement est responsable de la majorité des cas de paludisme avec chacune leurs particularités biologiques et écologiques qui déterminent en grande partie la distribution du paludisme. Au Burkina Faso (4) quatre vecteurs sont responsables du paludisme : *Anopheles gambiae s.s*, *Anopheles arabiensis*, *Anopheles funestus s.s* et *Anopheles nili*. Quatre espèces de *Plasmodium* sont également à l'origine du paludisme chez l'homme : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax* et *Plasmodium ovalae*. *Plasmodium falciparum* est l'espèce la plus redoutable car responsable des cas graves de paludisme.

Chaque année des millions d'enfants meurent de paludisme en Afrique (**Weatherall et al ., 2002**) avec près de 300 millions de cas dans le monde et plus d'un million de décès dont les 90% en zone SubSaharienne. L'ampleur des chiffres révèle à quel point le paludisme constitue un frein sensible au développement. Au Burkina Faso comme dans les autres pays d'Afrique, le paludisme constitue la première cause de morbidité et de mortalité particulièrement chez les enfants de moins de cinq (5) ans (<http://www.plan-burkina.org/spip.php?article178>)

La transmission des parasites responsables du paludisme dépend non seulement de la disponibilité des moustiques vecteurs mais aussi des gamétocytes dans le sang de l'homme. Les gamétocytes représentent l'étape du parasite qui se développe uniquement chez les moustiques et les personnes qui l'hébergent, généralement les enfants, sont considérés comme réservoir de l'infection et donc responsables de la diffusion de la maladie dans la population.

La prédominance des porteurs de gamétocytes de *Plasmodium falciparum* dans une zone peut entraîner une augmentation de la transmission du paludisme. Seuls les porteurs de gamétocytes matures de *Plasmodium falciparum* sont infectants pour les anophèles. Cependant, tout porteur de gamétocytes n'est pas nécessairement infectant. Ceci pourrait s'expliquer par de nombreuses considérations sur les facteurs limitants le développement sporogonique. Parmi ces facteurs il y a :

- le rôle inhibiteur de l'immunité naturelle bloquant la transmission chez certains porteurs,
- l'absence d'infectivité des gamétocytes de stade V encore trop jeunes,
- l'impact d'un traitement préalable du porteur de gamétocytes par un sporonticide (comme sulfadoxine + pyriméthamine),
- un grand déséquilibre du sex-ratio des gamètes (**Robert & Boulin, 2003**).

Il est également établi que certains facteurs liés à l'hôte peuvent influencer la gravité de la maladie. Les plus importants sont ceux de l'hôte dont l'âge, l'immunité (**Mouchet et al., 2004**), l'alpha et la bêta thalassémie (**Enevold, 2007**) mais aussi certaines hémoglobinopathies telles que l'hémoglobine S, l'hémoglobine C (**Itano, 1950**) etc. Plusieurs études récentes ont montré qu'il existe au sein des populations humaines d'Afrique de l'ouest une hétérogénéité génétique de l'hémoglobine (HB) (**Modiano et al., 2001**). Cette hétérogénéité serait responsable au niveau de la population d'une variation du risque de paludisme grave. Par ailleurs, des études récentes ont démontré que la fréquence de porteurs de gamétocytes de *Plasmodium falciparum* est très élevée chez les individus porteurs d'hémoglobines CC. Ceci indique que ces personnes, bien que moins nombreuses (environ 2% de la population) (**Modiano et al., 2001**), pourraient contribuer de manière significative à la transmission du paludisme. Cependant aucune étude n'a jusqu'à présent examiné l'effet de l'hémoglobine sur la transmission d'où l'intérêt de cette étude, qui vise à évaluer l'existence effective d'une corrélation entre la gravité de la maladie, la production de gamétocytes et la transmission du paludisme chez les individus porteurs de traits hémoglobiniques différents.

II. OBJECTIFS DE L'ETUDE

II.1. Objectif général

L'objectif général du présent travail est d'étudier dans un premier temps l'influence des facteurs génétiques de l'homme (notamment le polymorphisme de la chaîne bêta de l'hémoglobine) sur la transmission du *Plasmodium* de l'homme aux moustiques à Soumouso, village situé à environ 50 kilomètre au SUD-EST de Bobo Dioulasso et à terme de déterminer si la présence en proportion élevée des porteurs de gamétocytes de *Plasmodium falciparum* chez les sujets CC dans une zone pourrait entraîner une augmentation de la transmission du paludisme.

II.2. Objectifs spécifiques

Déterminer la fréquence des différents génotypes de l'hémoglobine au sein de la population

- Evaluer la relation entre le polymorphisme du génotype hémoglobinique et la prévalence de l'infection plasmodiale au sein de la population
- Comparer l'infectivité vis-à-vis des moustiques d'un échantillon de sujets ayant des caractéristiques hémoglobiniques différentes

III. GENERALITES SUR LE PALUDISME

III.1. Epidémiologie du paludisme

Le paludisme ou malaria est une maladie parasitaire causée par un hématozoaire du genre *Plasmodium* et est transmise à l'homme par des moustiques femelles du genre *Anopheles*. Le paludisme simple se caractérise par des accès palustres classiques sans aucun signe de malignité, mais pouvant à tout moment évoluer vers la forme grave, d'où l'importance d'un diagnostic et d'un traitement précoce (Gentilini, 1993). Il apparaît après une période d'incubation de 7 à 15 jours suivant la piqûre infectante. La phase d'invasion est caractérisée par une fièvre continue (39 à 40°C), accompagnée de céphalées, nausées ou vomissements. A la phase d'état, les accès prennent une évolution de type tierce (accès toutes les 48h si c'est *P. falciparum*). Ces accès sont typiques : fièvre de 39 à 40°C, frissons, sueurs, accompagnés de céphalées, de vomissements et d'une splénomégalie, parfois d'une hépatomégalie. Sans une prise en charge adéquat, il évolue vers une forme grave qui est le plus souvent mortelle surtout chez les enfants de moins de cinq ans. L'épidémiologie du paludisme est donc l'étude de l'ensemble des facteurs intervenant dans l'apparition des maladies (paludisme) et des différents phénomènes morbides, ainsi que leur fréquence, leur distribution géographique & socio-économique, leur évolution.

III.1.1. Ampleur du paludisme

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime qu'il y a 300-500 millions cas de paludisme avec plus d'un million de décès chaque année. Le paludisme sévit actuellement dans la ceinture de pauvreté du monde, mais l'impact de la maladie en terme de santé publique (mortalité, morbidité et impact socio-économique) varie considérablement d'une région à l'autre. En dehors de l'Afrique, 70% de cas mondiaux sont observés dans 6 pays (l'Inde, le Brésil, l'Afghanistan, le Vietnam, la Colombie et les Iles Salomon) (<http://astrium.Com/maladies:visa09-6.Html>).

Au Burkina Faso le paludisme représentait en 2005, 35% des motifs de consultation, 41% des motifs d'hospitalisation et 37,5% des causes de décès. *Plasmodium falciparum*, le germe redoutable est fréquent à environ 98% des infections au Burkina. En 2007, selon le

Programme national de lutte contre le paludisme du Burkina (PNLP), 5 438 787 cas de paludisme ont été enregistrés dans l'ensemble des formations sanitaires du pays, avec 11 955 cas de décès, soit un taux de létalité de 2, 014%. Les enfants de moins de cinq ans restent les plus touchés avec 45% des motifs de consultation, 55% des motifs d'hospitalisation et 57% des motifs de décès (<http://www.fasosante.net/sante/2007/04/24/>).

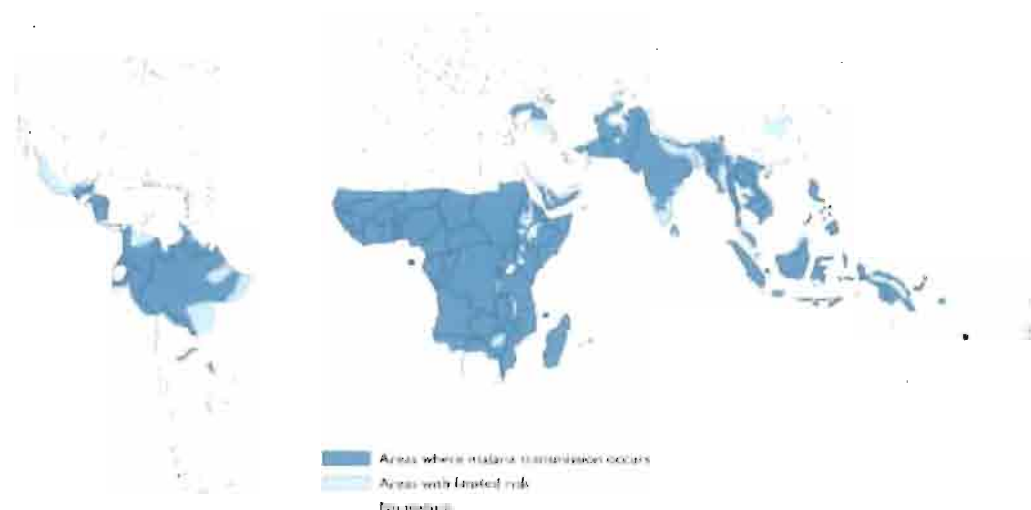


Figure 1 : Répartition géographique du paludisme dans le monde [WHO, 2004].

Source : <http://www.who.int/malaria/malariaendemiccountries.html>

III.1.2. Le parasite du paludisme humain

L'agent causal du paludisme est un sporozoaire sanguin du genre *Plasmodium*. C'est un parasite intracellulaire appartenant à l'embranchement des *Apicomplexa*, à la classe des *Haemosporidae*, à l'ordre des *Haemosporina*, à la famille des *Plasmodidae* et au genre *Plasmodium*. En 1880, Alphonse Laveran établit la responsabilité de *Plasmodium* dans la transmission du paludisme à l'homme. Plus de cent espèces plasmodiales ont été décrites mais seulement quatre espèces sont parasites de l'homme à savoir :

Plasmodium falciparum. (*P.f*). c'est l'espèce la plus redoutable, celle qui tue. Son cycle exoérythrocytaire dure seulement 7 à 15 jours. La longévité du parasite dans la circulation sanguine ne dépasse habituellement pas deux mois, mais peut atteindre six mois ou

même un an. *P.f* parasite toutes les hématies quel qu'en soit leur âge (jeune, âgée), si bien que plus de 10% des globules rouges peuvent être parasités.

Plasmodium vivax. (*P.v*). coexiste avec *P. falciparum* dans de nombreuses parties du monde mais moins répandu et est aussi présent dans certaines régions tempérées. La durée de son cycle exoérythrocytaire primaire varie de 15 jours à 9 mois avec des cas de reviviscences schizogonique (rechutes tardives) survenant à distance de l'infestation. *P.vivax* parasite surtout les hématies jeunes (réticulocytes) ; la parasitémie dépasse rarement 2% des hématies. La schizogonie érythrocytaire dure 48 heures, ce qui correspond au rythme de tierce des accès intermittents.

Plasmodium ovale. (*P.o*). principalement trouvé en Afrique de l'ouest, ne tue pas mais peut entraîner des rechutes tardives (4 à 5 ans). Son incubation varie de 15 jours à plusieurs mois ; sa longévité est importante. La schizogonie érythrocytaire dure 48 heures (fièvre tierce). *P.ovale* parasite les hématies jeunes.

Plasmodium malariae. (*P.m*). Il sévit en Afrique, de manière beaucoup plus sporadique. Son incubation est d'environ trois semaines. Des rechutes peuvent survenir pendant au moins trois ans, parfois vingt ans et même davantage : elles seraient dues à des formes érythrocytaires latentes et s'exprimeraient à l'occasion d'une agression (intervention abdominale, splénectomie) (Gentilini, 1993). La schizogonie érythrocytaire dure 72 heures (fièvre quarte). *P. malariae* parasite les hématies âgées.

III.1.2.1. Cycle biologique de *Plasmodium falciparum*

Le cycle du *Plasmodium* est complexe et exige pour sa transmission d'un hôte vertébré à l'autre, le passage par un moustique chez lequel a lieu la reproduction sexuée. Donc ce cycle comporte deux phases : une phase asexuée chez l'homme et une phase sexuée qui débute chez l'homme et se complète chez le moustique.

Phase asexuée chez l'homme. Le cycle débute par l'inoculation, lors de la piqûre du moustique, des sporozoïtes qui, en une heure, passent dans les cellules du foie où ils gardent le nom de cryptozoïtes. Après une phase de division dans les hépatocytes, ils produisent des schizontes hépatiques ou corps bleus, basophiles (40 à 100 µm); c'est la phase pré-érythrocytaire ou exo-érythrocytaire du parasite. Arrivés à maturité, après huit à dix jours, les schizontes éclatent, libérant plusieurs milliers de mérozoïtes dans le système circulatoire.

Chaque schizonte libère environ 40000 mérozoïtes pour *P. falciparum*, 15000 pour *P. ovale*, 10000 pour *P. vivax* et de l'ordre de 2000 pour *P. malariae*.

Ces mérozoïtes pénètrent dans les hématies où ils se transforment en trophozoïtes puis en schizontes érythrocytaires dont chacun comporte seize ou trente deux noyaux fils. Chaque noyau donne un mérozoïte lorsque le globule éclate. Ce mérozoïte va ensuite parasiter une hématie saine et le cycle schizogonique recommence. C'est la phase érythrocytaire du cycle qui dure 48 heures, d'où le nom de fièvre tierce maligne qui lui était donnée bien avant que ne fut découvert le parasite. Après neuf à onze jours, apparaissent dans le sang des formes sexuées non pathogènes, les gamétocytes, mâles et femelles. La gamétocytogenèse serait déclenchée par une contrainte environnementale, liée à l'état immunitaire de l'hôte (**Smalley & Brown, 1981**). Ces gamétocytes peuvent persister plusieurs mois dans le sang du malade après sa guérison et peuvent être infectant pour le vecteur (**Smalley & Sinden, 1977**).

Phase sexuée chez l'anophèle. Lors de son repas sanguin sur un hôte infecté, l'anophèle femelle absorbe des trophozoïtes, des schizontes, des rosaces, des gamétocytes. Les éléments asexués sont digérés et seuls les gamétocytes se transforment en gamètes dans son estomac. Le gamétocyte femelle ou macrogamétocyte produit un macrogamète par expulsion de corpuscules chromatiniens alors que le gamétocyte mâle (ou microgamétocyte) subit plusieurs mitoses et libère par ex flagellation huit microgamètes flagellés. Les gamètes mâles et femelles fusionnent dans l'estomac de l'anophèle pour former un zygote, qui s'allonge pour devenir l'ookinète mobile. L'ookinète traverse la membrane péritrophique (entourant le bol alimentaire) et la paroi stomacale et forme un oocyste qui se divise immédiatement. Les cellules dans l'oocyste prennent une forme allongée et se transforment en sporoblastes puis en sporozoïtes. Lorsque les sporozoïtes sont mûres, la paroi de l'oocyste se déchire et ils sont libérés dans la cavité générale de l'insecte où ils achèvent leur maturation, puis gagnent ses glandes salivaires ; chaque glande infectée peut héberger plusieurs centaines, voire plusieurs milliers de sporozoïtes, corpuscules en bâtonnets de 2 microns de long (**Mouchet et al., 2004**).

La durée du cycle sporogonique varie pour chaque parasite suivant la température (**Mouchet et al., 2004**). A 25°C, le cycle de *P. vivax* est de dix jours, celui de *P. falciparum* de treize jours. La durée de ces cycles s'allonge lorsque la température diminue. A 20°C, le cycle de *P. falciparum* dure trente jours et il n'est plus réalisé au-dessous de 18°C et 16°C pour *P. vivax* (**Mouchet et al., 2004**).

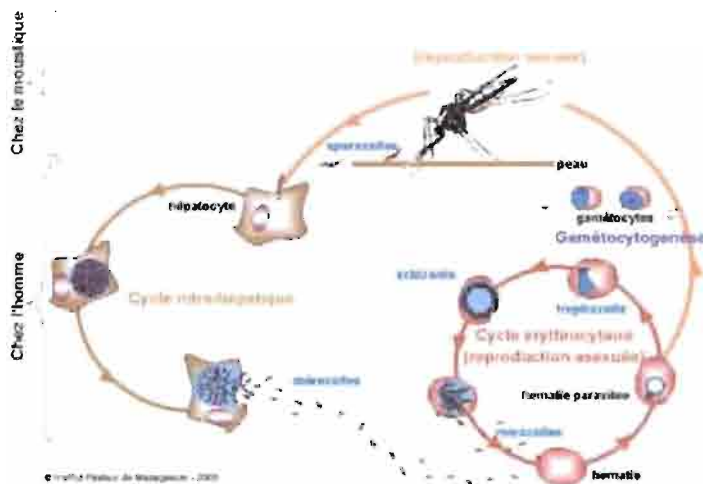


Figure 2 : Cycle biologique de *Plasmodium falciparum*

Source: Robert V & Boudin C. Bull Soc Path Exo 2003 ; 96 :6-2

III.1.3. Le vecteur du paludisme

Le vecteur, se dit d'un organisme (insecte) qui transmet un agent infectieux. Pour le paludisme, le vecteur est l'anophèle femelle. C'est un insecte appartenant à l'ordre des *Diptères* (à deux ailes) holométaboles (à métamorphose complète), au sous ordre des *Nématocères* et à la grande famille des *Culicidae*. Cette famille compte plus de 3450 espèces et sous-espèces regroupées en trois sous familles : la sous - famille des *Aedinae*, la sous-famille des *Anophelinae* et la sous - famille des *Culicinae* (**Chwatt et al., 1985**). Parmi ces sous-familles, celle des *Anophelinae* est constituée de 3 genres (*Bironella*, *Chagasia*, *Anopheles*). Le genre *Anopheles* est le plus important et regroupe plus de 450 espèces, mais seules 70 à 80 peuvent être considérées comme des vecteurs. (**Mouchet et al., 2004**). Les principales espèces d'anophèles vecteurs de paludisme humain sont : *Anopheles gambiae* s.s., *An. funestus*, *An. arabiensis*, *An. Moucheti*, *An. nili* s.l. (**Mouchet et al., 2004**). Au Burkina Faso les trois premières ci-dessus citées sont considérées comme les principaux vecteurs du paludisme (**Majori et al., 1987 ; Petrarca et al., 1996**).

III.1.3.1. Cycle biologique des anophèles

Le cycle de développement de l'anophèle se déroule en deux phases, une phase aquatique, pré imaginaire allant des œufs à la nymphe via les larves et une phase aérienne constituée par l'imago ou stade adulte.

Phase aquatique : au cours de celle-ci, la femelle pond séparément à la surface de l'eau, de 40 à 100 œufs de 0,5 mm de long, munis de flotteurs qui éclosent au bout de 24 à 48 heures selon la température. Chaque œuf donne naissance à une larve, sans syphon, qui se tient parallèle à la surface de l'eau contrairement aux *Aedes* et aux *Culex*. La larve se nourrit en surface, grossit et subit quatre mues successives pour donner la nymphe. Le stade nymphal dure en général moins de 48 heures et est le siège de profonds remaniements morphologiques, métamorphoses, aboutissant à l'imago qui émerge et gagne le milieu aérien.

Phase aérienne : dès l'émergence, l'adulte se repose sur un support émergé, durant 10 à 24 heures, pendant que sa cuticule durcit, que ses ailes se déploient et que l'appareil génital mâle soit fonctionnel. Après quoi, mâles et femelles s'accouplent, en vol pendant un essaimage. Les mâles s'accouplent plusieurs fois dans leur vie mais les femelles ne s'accouplent le plus souvent qu'une seule fois (Clément, 1992). Les femelles fécondées stockent le sperme dans la spermathèque, d'où elles relarguent les spermatozoïdes lors des pontes successives. La femelle, outre l'absorption de jus sucré, se met en quête d'un repas de sang qu'elle prélève tous les deux à trois jours sur un hôte vertébré. Elle trouve dans ce repas les éléments protéiques nécessaires au développement des ovocytes.

Après le repas de sang, le sang absorbé se concentre, alors qu'un liquide translucide est expulsé (diurèse) pendant 1 à 2 heures. L'anophèle est au repos pendant la digestion du repas sanguin et alors que les ovocytes grossissent, il passe successivement du stade gorgé à semi gravide, puis à gravide. A ce stade d'ovocyte mûre la femelle va activement rechercher un gîte propice pour déposer les œufs. C'est au cours de la ponte, lors de son passage dans l'oviducte, que les ovocytes sont fécondés individuellement par les spermatozoïdes stockés dans la spermathèque et deviennent des œufs. Après la ponte, l'anophèle part à la recherche d'un nouvel hôte pour prendre un autre repas de sang. La période s'écoulant entre le repas de sang et la ponte est appelée cycle gonotrophique.

Ce cycle dure de 48 à 72 heures selon les espèces et la température et est répétitif jusqu'à la fin de la vie de l'anophèle et est estimée à 2 à 4 semaines en région tropicale. En fonction de leur zone leur longévité peut augmenter.

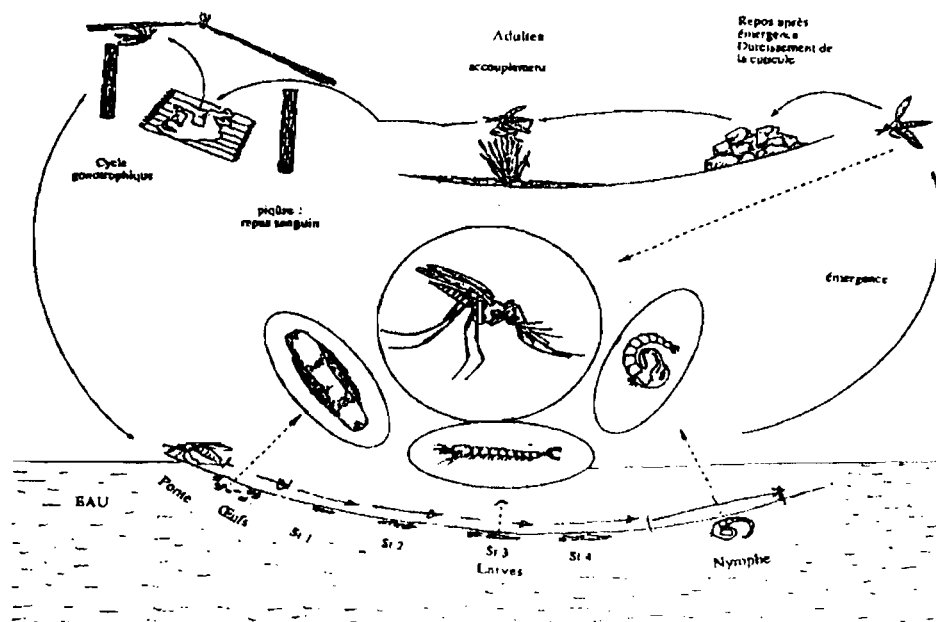


Figure 3 : Cycle biologique des anophèles (dessin j. Finot).

III.1.4. L'hôte

III.1.4.1. Facteurs influençant la maladie

Plusieurs facteurs influencent la gravité du paludisme humain, mais les plus importants sont ceux liés à l'hôte, à savoir l'immunité, l'âge, la génétique. Toutes les populations habitant dans les zones d'endémie développent, plus ou moins rapidement, une immunité à la fois progressive, éphémère et incomplète appelée « prémuniton » (Sergent, 1950). Cette immunité est toujours relative à une espèce plasmodiale précise et limite les effets pathogènes des plasmodiums. L'immunité acquise (active), ne prévient pas l'infection, mais en cas d'infection elle diminue le risque de maladie et en cas de maladie le risque de mort. L'immunité passive (transitoire) est conférée par les anticorps maternels dans les régions de transmission relativement intense et est perdue à l'âge de 6 mois ou même avant.

- Les sujets les plus fragiles développant les formes graves sont donc les enfants en bas âge (Babiker *et al.*, 2000 ; Theander, 1998)

Parmi les facteurs influençant la gravité de la maladie chez l'hôte il y a :

- **Le polymorphisme Fy du récepteur chimique de l'antigène Duffy** qui confère la résistance à *P. vivax* probablement un des plus anciens parasites à *Plasmodium* mais moins virulent que *P. falciparum* (Miller, 1976). Le polymorphisme de Duffy représente un exemple très intéressant de réussite de l'adaptation humaine aux *Plasmodium*, comme il est exprimé spécifiquement dans les hématies, il ne peut apporter des charges génétiques et il protège complètement des infections à *P. vivax*.

- **L'alpha et la bêta thalassémie**, sont causés par un large éventail de mutations (SNPs et délétions) sur les gènes de la globuline alpha et bêta. Ces mutations conduisent à l'accumulation des chaînes libres de la globuline alpha et bêta et sont dues à un déficit partiel ou total dans la synthèse de la globine ou dans la production des globines instables (Enevold, 2007). Quant à la résistance au paludisme, (Wambua, 2006) aucune association n'a été trouvée entre l' α -thalassémie et l'incidence des maladies à *P. falciparum* non compliquées et la densité parasitaire pendant les épisodes de paludisme moyen et grave. Le statut homozygote pour la β thalassémie conduit à un phénotype létal mais en dépit du coût génétique élevé, au moins 200 mutations existent et certaines sont trouvées à des fréquences extrêmement élevées (10%) en méditerranée et dans les populations ouest africaine. A présent le paludisme a été éradiqué dans la plus part des régions où les mutations de la β thalassémie sont communes, mais une enquête conduite au Libéria a montré que chez les enfants âgés de moins de 5 ans, les densités de *P. falciparum* sont faibles en présence des traits de β thalassémie comparé aux sujets non thalassémiques.

- **La déficience en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD)** est la première enzyme de la voie des pentoses phosphates. Le déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase, ou déficit en G6PD, est le déficit enzymatique le plus répandu dans le monde, se caractérisant par une destruction des globules rouges (hémolyse). Le gène pour G6PD se trouve dans la région télomérique du bras long du chromosome X (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=305900). Plusieurs mutations du gène *G6PD* ont été décrites, avec formation d'une protéine plus ou moins fonctionnelle expliquant la gravité diverse de la maladie. Les variants les plus fréquents sont le *G6PD A-* et le *G6PD méditerranéen*. Avoir un déficit en G6PD ne signifie pas forcément être malade. En effet sans accident particulier, la personne est bien portante, ne se plaignant de rien et avec une espérance de vie normale. Cependant, Le déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase peut être responsable d'anémie hémolytique congénitale d'origine enzymatique. Il est établi que le déficit en G6PD protège du paludisme en favorisant la phagocytose précoce des hématies parasitées. (Ruwende, 1995). Dans un grand échantillon d'enfants Kenyans et Gambiens, la protection permise par l'allèle A G6PD a été estimée être à 46% pour les femelles hétérozygotes et 58% pour les mâles hémizyotes. Le rôle protecteur

des allèles de l'enzyme du gène de G6PD de l'infection paludique doit être considéré comme une question ouverte et a besoin de plus d'investigations.

- **L'hémoglobine E** résulte d'un seul point de mutation (Glu-Lys) au 26^e codon du gène de la β globine et est commune en Asie du sud Est. Il semble démontré que l'hémoglobine E ne peut prévenir l'infection parasitaire mais est impliquée dans la protection contre les formes cliniques de la maladie, comparativement aux patients de génotype sauvage AA (Oo, 1995).

- **L'hémoglobine S** est diffusée en Afrique tropical et équatorial, Inde et Asie et les hétérozygotes sont protégés contre les manifestations cliniques du paludisme grave. L'hémoglobine S, est causée par la substitution de l'acide glutamique par la valine en position 6 de la chaîne bêta de l'hémoglobine. La désoxygénation de l'hémoglobine S entraîne un changement de conformation dans lequel le N-terminal de la valine mutant en chaîne bêta s'attache au site complémentaire hydrophobique résultant du remplacement de la valine, conduisant à la formation d'un polymère hémoglobinique. Les sujets AS sont cliniquement sains alors que les sujets homozygotes (SS) sont malades.

- **L'hémoglobine C** a été décrite pour la première fois par Itano (1950) chez des membres de familles afro-américains comme une nouvelle variante de l'hémoglobine électrophorétique ne causant pas la maladie. Ce génotype résulte de la substitution de l'acide glutamique par la lysine en position six de la chaîne bêta de l'hémoglobine. Les traits de l'hémoglobine C ne causent pas de manifestations cliniques évidentes ni chez un individu hétérozygote ni chez l'homozygote. Dans une longue enquête épidémiologique conduite au Burkina Faso en 2001, Modiano *et al.*, ont démontré que l'hémoglobine C protège fortement contre le paludisme clinique à *P. falciparum* chez les homozygotes et que l'allèle confère une certaine protection aussi chez les hétérozygotes.

- **Quand au groupe sanguin.** Le polymorphisme ABO du groupe histo-sanguin est causé par les mutations sur le gène ABO glycotransférase responsable de l'addition des résidus de sucre sur l'Antigène H sur les cellules de surfaces. Pendant un long temps, l'implication des Antigène ABO dans la formation des rosettes a été débattue Rowe (2007) démontrait que le groupe O est associé avec une réduction de 66% dans le risque de développer le paludisme grave comparé avec d'autres groupes sanguins ne possédant pas le O. Cette protection du groupe sanguin O contre la forme grave du paludisme a aussi été confirmée par Fry (2008).

III.2. Lutte contre le paludisme

En l'absence de vaccin, la stratégie mondiale de lutte contre le paludisme privilégie le contrôle de la maladie qui fait intervenir deux composantes : les actions contre le parasite et les actions contre les vecteurs.

III.2.1. Lutte antiparasitaire

Elle est basée sur la prévention et le traitement des cas. La lutte préventive peut se faire par chimioprophylaxie. Le traitement présomptif et systématique des fièvres par chimiothérapie (dérivés de la quinine et de l'artémisinine) empêche l'évolution d'un possible accès palustre vers le neuropaludisme souvent mortel. Des résistances de *Plasmodium* aux médicaments utilisés ont été observés (Tinto *et al.*, 2008). On utilise actuellement de plus en plus des associations de médicaments antipaludiques qui permettent d'éviter l'apparition de gènes résistants chez les parasites et d'augmenter l'efficacité du traitement dans les formes résistantes. Devant l'expansion des résistances des parasites aux antipaludiques, la lutte antivectorielle apparaît comme un outil supplémentaire de lutte contre le paludisme.

III.2.2. Lutte antivectorielle

L'établissement d'une stratégie de lutte contre les anophèles vecteurs de *Plasmodium sp.* est basé sur les données épidémiologiques, bioécologiques du vecteur et sur les conditions de transmission à l'homme. Les moyens de lutte antivectorielle peuvent être mécaniques, chimiques, biologiques et génétiques.

- **Méthodes de lutte mécaniques.** Elles consistent en l'aménagement du territoire afin d'éliminer les gîtes larvaires, entraînant ainsi une baisse des sources de vecteurs. L'amélioration de l'habitat peut entraîner les moustiques endophiles à devenir plus exophiles, ce qui peut diminuer leur espérance de vie.

- **Méthodes de lutte chimiques.** Elles utilisent des produits insecticides ou répulsifs. Il existe cinq familles d'insecticides ayant chacune un mode d'action particulier. Ce sont les organochlorés (D.D.T), les organophosphorés (Malathion, Témophos), les carbanates (Propoxur), les pyréthrinoïdes (Perméthrine) et les inhibiteurs de croissance des insectes (encore à l'état expérimental). On observe des phénomènes de résistances croisées qui s'expriment au niveau enzymatique (D.D.T) ou physiologique (pyréthrinoïdes).

- **Méthodes de lutte biologiques.** Il s'agit essentiellement de poissons larvivores et des bactéries comme *Bacillus thuringiensis*. En dehors des problèmes des doses d'épandage, ce dernier moyen de lutte est une bonne solution pour la sauvegarde de l'environnement.

- **Méthodes de lutte génétiques.** La publication des séquences complètes des génomes du moustique anophèle vecteur (*Anopheles gambiae*) et du parasite (*Plasmodium falciparum*) constitue une opportunité sans précédent permettant d'envisager des stratégies de lutte génétique (Holt *et al.*, 2002 ; Gardner *et al.*, 2002). Cette stratégie préconise la modification

génétique de l'aptitude des anophèles à permettre le développement et la transmission des *Plasmodium* humains. Pour être efficace, une telle approche nécessiterait, une fois les gènes d'intérêt identifiés et annotés, leur transgénèse et leur expression maîtrisées, d'une part que la modification ou l'introduction de ces gènes ne diminue pas la valeur adaptative des populations de moustiques rendues réfractaires et d'autre part que les gènes d'intérêt diffusent et se stabilisent dans les différentes populations naturelles (Collins *et al.*, 2000).

III.3. Les modalités de la transmission

La transmission du paludisme nécessite 3 acteurs : le parasite (*Plasmodium*), le moustique (l'anophèle femelle), et l'homme. Cette transmission suppose une double adaptation du parasite à son hôte vertébré (homme) et à son vecteur et une adaptation du vecteur au milieu dans lequel vit l'hôte (phénomène écologique). Le cycle s'enclenche lorsqu'un anophèle femelle dont les glandes salivaires contiennent les sporozoïtes pique l'homme et lui injecte quelques sporozoïtes. Ces sporozoïtes circulent au sein de l'organisme humain, passent dans le foie, le sang, se multiplient et évoluent vers une forme sexuellement prédéterminée : les gamétocytes mâles et femelles. Ces gamétocytes, présents dans la circulation sanguine de la personne infectée, sont infectieux pour le moustique qui viendra la piquer lors d'un prochain repas sanguin. Dès lors, au sein de l'organisme du moustique, un nouveau cycle de transformation s'effectue jusqu'à la constitution d'oocystes. Parvenus à maturité, ces oocystes libèrent des sporozoïtes qui migrent dans les glandes salivaires des moustiques. Ces sporozoïtes seront transmis à l'homme lors du prochain repas de l'insecte. A ce mode de transmission majoritaire s'ajoutent des transmissions exceptionnelles : le paludisme congénital, possible si la mère n'est pas immunisée et le paludisme transfusionnel ou du toxicomane, grave car les trophozoïtes transmis sont directement infectants.

III.3.1. Compétence et capacité vectorielle

La compétence vectorielle, est l'aptitude d'une espèce de moustique à assurer le cycle de l'agent pathogène et à transmettre l'infection. Toutes les espèces d'anophèles ne sont pas également efficaces en tant que vecteur du paludisme. Au cours de son développement sporogonique chez le moustique, le parasite franchit successivement deux barrières, la matrice pérित्रophique et l'épithélium intestinal. De plus, dans la lumière intestinale se produit une forte réduction parasitaire de telle sorte, que dans les conditions naturelles de transmission, seules une dizaine d'oocystes arrive à maturité. Le degré de compétence vectorielle d'un

moustique est déterminé par le fait qu'il permet le développement normal de *Plasmodium* du stade ookinète dans l'estomac moyen au stade oocyste dans l'épithélium et éventuellement au stade sporozoïte infectant dans les glandes salivaires. Dans les cas extrêmes, lorsque le moustique est réfractaire aucun des parasites n'arrive à compléter son cycle de développement.

La capacité vectorielle (CV) d'une population de vecteurs est le nombre de nouvelles inoculations attendues par jour, à partir d'un cas humain infectant (**Garrett et Shidrawi, 1969**), en contact avec une population anophélienne. Cette capacité vectorielle varie considérablement en fonction de l'espérance de vie des anophèles et de la durée du cycle sporogonique du parasite. C'est un indice essentiellement entomologique qui dépend beaucoup de la température et donc des saisons, des caractéristiques géographiques d'un site donné et de l'espèce plasmodiale considérée. La CV se calcule, pour chaque espèce anophélienne en un site ou pendant une période donnée par la formule suivante :

$$CV = ma^2 p^n / -\log_e p$$

m.a: taux de piqûres sur homme (nombre de piqûres par hôte par nuit)

a : habitude de piquer l'homme (indice de sang humain × fréquence des repas)

p : probabilité de survie journalière du vecteur

n : durée du développement du parasite chez le vecteur

1/-log_e p : espérance de vie des vecteurs femelles

b : compétence vectorielle

Les espèces de vecteurs diffèrent par le changement d'une seule des variables. Si plusieurs sont impliquées dans la transmission, les CV sont cumulées pour calculer la CV totale. Une description des composantes du modèle et un exemple sont présentés ci-dessous. Le nombre de vecteurs qui piquent l'hôte pendant une période donnée, comme le nombre de piqûres par homme par nuit est désigné par "ma". Il fournit une indication du risque pour un hôte d'être piqué par un vecteur portant le parasite. Les vecteurs ne sont pas tous spécifiques d'un hôte, et ils vont piquer d'autres hôtes parfois en fonction de leur disponibilité. Il y a donc des chances pour qu'un vecteur n'arrive pas aussi souvent en contact avec un hôte infecté que s'il était spécifique de cet hôte. La fréquence des repas chez les arthropodes qui se nourrissent de sang pour assurer le développement de leurs œufs sera équivalente à la période repas-

poste-repas. Cette durée dépend de l'espèce, de la température et de la disponibilité des gîtes larvaires (par exemple chez la plupart des moustiques, il est estimé à 2 à 3 jours). L'habitude trophique et la fréquence des repas par jour est désigné par (a). Le vecteur doit survivre assez longtemps pour obtenir une infection avec le parasite responsable de la maladie, car chez les arthropodes vecteurs, le parasite aura besoin de temps pour se développer dans le vecteur avant de pouvoir être transmis à un autre hôte. Cela peut prendre plusieurs jours ou semaines, dépendant du vecteur, de l'espèce de parasite et de la température. C'est presque toujours plus longtemps qu'il ne faut pour prendre un repas sanguin, pondre des œufs et chercher une nouvelle source de sang. Ainsi, un vecteur piquera plusieurs hôtes avant de devenir infectieux. La mesure de la longévité la plus employée est la probabilité de survie journalière du vecteur (p). Pour les moustiques et certains autres vecteurs l'estimation de la longévité est basée sur la détermination de l'âge ou la proportion de moustiques qui ont pondu une ou plusieurs fois et la connaissance de la durée du cycle gonadotrophique ou gonotrophique.

Comme mentionné ci-dessus, la durée du développement du parasite dans le vecteur (n) est aussi importante. La valeur "n" est en relation exponentielle avec le taux de survie journalière (p^n). La valeur de p^n est calculée en utilisant les valeurs de p et n dans la formule.

La dernière valeur d'importance dans le modèle de la capacité vectorielle est la durée de survie du vecteur après avoir vécu la durée du cycle extrinsèque du parasite (période d'incubation) ($1/(-\log_e p)$), où p est le taux de survie. Il peut aussi être considéré comme le nombre de jours de survie après la période d'incubation extrinsèque. Un paramètre de plus qui est parfois ajouté au dénominateur de l'équation est "b". Ce paramètre représente la proportion de vecteurs qui deviennent infectieux après avoir pris un repas sur hôte infecté.

Le point important est que la valeur de la capacité vectorielle n'est que le reflet des mesures prises, et beaucoup de paramètres ne sont pas faciles à mesurer avec précision. Cependant, elle donne une valeur qui permet une comparaison entre espèces de vecteurs et au cours du temps pour un vecteur donné. C'est une manière élégante d'exprimer le risque de transmission ou la réceptivité d'une région à une maladie à transmission vectorielle.

III.3.2. Facteurs influençant la transmission

Les facteurs influençant la transmission sont nombreux. Ils peuvent dépendre des conditions environnementales, du parasite, de l'hôte et du moustique. Les facteurs liés à l'hôte sont de natures sériques ou sanguines, existent naturellement chez l'homme sensibilisé vivant en zone d'endémie et peuvent être induits artificiellement par vaccination (**Robert & Boudin., 2003**). Les facteurs dépendant du parasite concernent :

- **La densité gaméocytaire.** Il est établi d'une part que seuls les gaméocytes matures sont capables d'infecter le moustique et que cette infectivité dépendrait plus ou moins de la densité gaméocytaire (Chwatt, 1980). En fait l'implication de la densité gaméocytaire dans l'infectivité est très controversée. Ponnudurai *et al.* (1989) a constaté qu'il est impossible de prévoir le devenir d'une infection en se basant sur la densité gaméocytaire. Cette constatation a été partiellement réfutée par les observations de Graves (1980), Boudin *et al.* (1989), et Tchuinkam, (1994). Ces auteurs trouvent une relation entre les fortes densités gaméocytaires et la réussite de l'infection. A partir d'un certain seuil de gaméocytemie, le nombre d'oocystes par moustique infecté est grossièrement proportionnel à la densité gaméocytaire (Boudin *et al.*, 1989).

- **La variation du sexe ratio.** Les populations de gaméocytes présentent une importante hétérogénéité liée au sexe ratio (Read *et al.*, 1992). Les disparités importantes entre les sexes influenceraient négativement le devenir d'une infection (Boyd, 1949). Le sexe ratio habituel présente une prédominance de femelles, un fait qui compense biologiquement la production de 8 microgamètes à partir d'un gaméocyte mâle. Une condition optimale d'infectivité serait celle d'un gaméocyte mâle pour deux à huit femelles.

En dehors de la différence génétique qui existe entre les espèces de moustiques, il existe des facteurs génétiques spécifiques (ou non) qui influencent les interactions vecteurs-parasites dès l'instant que le parasite est ingéré dans un repas de sang jusqu'à l'étape où les stades infectants du parasite sont transmis à l'homme. A un moment donné de leur cycle à l'intérieur du moustique, tous les parasites doivent migrer vers leur site de développement ou de transmission aux vertébrés. C'est dans l'hémolymphes que sont concentrés les composants de l'immunité primaire engagés dans la reconnaissance du non soi et dans l'initiation des mécanismes d'élimination des parasites (Robert & Boudin, 2003). L'intérêt qu'on accorde à l'"immunité" chez le moustique relève du fait qu'elle intervient naturellement dans la limitation du développement parasitaire chez le vecteur. Eventuellement si cette limitation est suffisamment efficace, elle peut rendre un moustique réfractaire vis-à-vis du *Plasmodium*. Ces dernières années, de nombreuses études visent de plus en plus à déterminer la nature et les mécanismes d'action d'une telle immunité qui, aujourd'hui, permet d'envisager le développement d'une stratégie de lutte contre le paludisme par les moustiques transgéniques.

Dans le cas de l'hôte, les facteurs les plus importants sont les suivants :

Les facteurs relevant de l'immunité bloquant la transmission sont d'ordre humoral ou

cellulaire, spécifiques ou non spécifiques dépendant du sang de l'hôte ingéré par le moustique au cours du repas sanguin. Dans le cas de *P. falciparum* les principaux antigènes cibles de l'immunité bloquant la transmission sont caractérisés par leur poids moléculaire qui permet de les désigner (Vermeulen *et al.*, 1985 ; Ponnudurai *et al.*, 1987; Carter *et al.*, 1988; Alano, 1991). On peut citer la protéine 2400 KDa qui est associée à la membrane externe de la vacuole parasitophore à l'intérieur des globules rouges infectés par des gamétocytes (Scherf *et al.*, 1992). La présence d'anticorps anti Pf 2400 chez des individus vivant en zone d'endémie indique une bonne immunogénicité naturelle de cet antigène et fait de lui une cible vaccinale potentielle (Feng *et al.*, 1993). Nous avons aussi les protéines 25 KDa, 48/45 KDa, 230 KDa qui jouent un rôle très important (Carter *et al.*, 1988; Alano, 1991).

Il existe une immunité humorale dite non spécifique dont le support est constitué par diverses substances présentes dans le sang de l'hôte. Ces substances sont capables d'influencer la transmission. On peut citer : les cytokines telles que le TNF et l'IFN-g qui sont responsables de l'inactivation des gamétocytes de *P. cynomolgi* (Naotunne *et al.*, 1993), et de *P. vivax* (Mendis *et al.*, 1990). Leur intervention nécessite la présence d'un facteur sérique complémentaire non encore identifié (Mendis *et al.*, 1990; Naotunne *et al.*, 1991; Naotunne *et al.*, 1993). Chez *P. falciparum*, les cytokines ne semblent pas intervenir de façon évidente dans la transmission, parce que les gamétocytes apparaissent plusieurs jours après la synthèse des cytokines contemporaines de la poussée de parasites asexués et que ces cytokines ont une demi-vie très courte de quelques heures. En plus des cytokines, il y a le complément, les facteurs nitrogénés qui interviennent dans l'immunité humorale non spécifique.

Alors qu'il est établi (paragraphe III.1.4.1) qu'un grand nombre de facteurs, notamment le polymorphisme de l'hémoglobine et les mutations sur les gènes de la globuline, sont susceptibles d'influencer la gravité de la maladie chez l'hôte, très peu d'études ont été consacrées à la compréhension de leur impact sur la transmission du paludisme de l'homme au moustique. Après les généralités sur le paludisme, nous allons aborder à présent le matériel et les méthodes utilisés pour atteindre nos objectifs.

IV. METHODOLOGIE

IV.1. Site et population d'étude

L'étude proposée était basée à Soumouso, localité située à environ 50 kilomètres au SUD-EST (11°00'46''N, 4°02'45''W) de Bobo-Dioulasso. Le village de Soumouso est caractérisé par des agrégations composites et plus ou moins étendues de groupes de familles. Le village est sillonné de quelques petits cours d'eau avec des zones marécageuses aménagées en champs de culture maraîchères. *An. gambiae s.s.*, *An. funestus* et *An. nili* sont les principaux vecteurs. Le taux d'inoculation entomologique annuel atteignant 64 voire 100pi/h/an, avec un maximum pendant la saison des pluies (Juillet à Novembre). A soumouso, *Plasmodium falciparum* est l'espèce dominante de parasites et fortement répandue avec une prévalence variant entre 40 et 58%, selon l'âge (Hamon, 1959 ; Robert *et al.*, 1985).

Le choix de ce site s'est imposé grâce à quelques critères majeurs :

1. une taille de population humaine relativement grande (approximativement) 3500 habitants selon le recensement récent)
2. une zone d'endémie palustre à *Plasmodium falciparum*, où il existe déjà une forte hétérogénéité génétique de l'hémoglobine au sein de la population hôte,
3. la présence de plusieurs groupes ethniques locaux, qui devraient permettre de recenser une fréquence assez élevée de sujets porteurs de génotype CC,
4. une plus grande diversité d'espèces de moustiques vecteurs de paludisme,
5. la disponibilité dans le village de plusieurs cases expérimentales pour les études de transmission dans les conditions naturelles,
6. l'accessibilité quotidienne du village en toute saison en partant du laboratoire de l'IRSS situé à Bobo Dioulasso.

IV.1.1. Sélection des participants à l'étude

Dans le souci d'obtenir des résultats fiables et interprétables nous avons conduit l'étude avec les sujets répondant aux critères suivants :

- **Critères d'inclusion** : Les personnes ayant participé à l'étude, étaient porteurs d'hémoglobines AA, AC, AS ou CC et asymptomatiques d'âge supérieur à 3 ans. Pour prendre part à l'étude les adultes ont donné leur consentement et pour les mineurs nous avons obtenu le consentement parental.

- **Critères d'exclusion** : Les personnes exclues de l'étude, étaient celles qui présentaient des maladies concomitantes exigeant une hospitalisation, les femmes enceintes, les enfants âgés de moins de 3 ans, les patients montrant des symptômes cliniques sévères et celles ayant refusé de signer le consentement éclairé.

Suite à la caractérisation du site, nous avons mené une enquête afin de recueillir certaines informations démographiques permettant de décrire la population d'étude

IV.1.1.1. Enquête démographique

Un recensement récent fait par l'I.N.S.D (Institut National de la Statistique et du Développement) en 2006 à Soumouso avait dénombré environ 6200 habitants. Parallèlement, nous avons effectué un recensement (janvier-février 2007) dans le but de connaître la taille de la population et de préciser les caractéristiques spécifiques de la population de Soumouso. Le village est organisé en concessions et ménages. Le ménage dans notre compréhension est l'unité socio-économique de base, au sein de laquelle les différents membres apparentés ou non vivent dans la même maison ou concession, mettent en commun leurs ressources et satisfont en commun à l'essentiel de leurs besoins alimentaires et autres besoins vitaux sous l'autorité d'une seule et même personne appelée chef de ménage. Dans une concession il peut y avoir un ou plusieurs ménages.

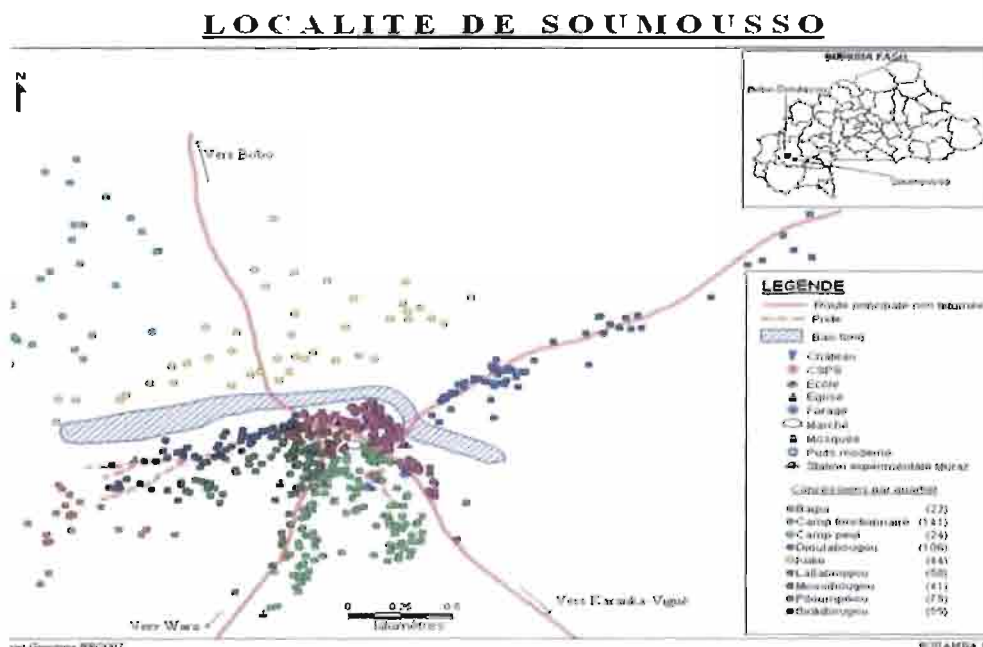


Figure 4 : Disposition des concessions et ménages dans la localité de Soumouso

Source C.M./Projet Génotype HB/2007. La carte a été générée à l'aide des coordonnées GPS (longitude, latitude) prise pour chaque concession dans différents quartiers.

L'enquête a été essentiellement quantitative et l'outil principal utilisé a été un questionnaire structuré. Nous avons utilisé deux fiches différentes : Une première pour l'énumération et le géo-référencement des concessions et une seconde pour l'enquête démographique proprement dite au sein des ménages. L'outil de la collecte des données est présent en annexe de ce rapport (Voir ANNEXE 1). Notre équipe en date avait recensé 3560 sujets repartis dans 566 concessions localisées par GPS dans les neufs (09) quartiers que compte le village. Les différents logements et hameaux d'habitations ont été localisés et cartographiés et des numéros d'identification uniques ont été assignés à chaque famille. La carte ci-dessus (Figure 4) illustre les différents quartiers et concessions du village. Au cours de cette enquête préliminaire, nous avons récolté des informations relatives à l'âge, le sexe et la filiation des membres de chaque famille. Les membres de chaque famille ont été regroupés par catégorie d'âge de 0-1 ; 2-5 ; 6-10 ; 11-15 et > 15 ans. Après cette phase, nous avons effectué une enquête parasitologique pour avoir une idée exacte des prévalences et densités parasitaires asexuées et sexuées au sein de la population.

IV.1.1.2. Enquête parasitologique

Nous ne disposons d'aucun paramètre parasitologique pouvant permettre de caractériser le niveau de l'infection palustre au niveau de Soumousso. L'étude de ce volet parasitologique avait pour but de donner une image exacte des prévalences et densités parasitaires asexuées et sexuées au sein de la population locale et par tranche d'âge, afin de déterminer s'il existe une variation de niveau d'infection entre les groupes de population de génotype Hb différents.

De mars à mai 2007, nous avons effectué 38 sorties dans la localité de Soumousso pour réaliser des prélèvements sanguins, afin d'évaluer les indices parasitaires classiques. Des prélèvements de sang ont été effectués chez 3079 sujets résidents dans le village au moment de l'enquête. L'accord de chaque individu a été préalablement sollicité. Pour prendre part à l'étude une fiche de consentement a été signée par chaque habitant ou par les parents ou tuteurs quand il s'agissait d'enfants mineurs. En plus de ces prélèvements, chaque habitant préalablement recensé a été renseigné par le biais des fiches individuelles fournissant les informations sur la localisation géographique, signes cliniques du paludisme. Les informations sur l'état de santé des habitants ont été alors recueillies par les enquêteurs ou par un médecin présent. Les signes et symptômes tels que céphalées (maux de tête), toux, vomissement, fièvre alors décelée par une prise de température axillaire ont été enregistrés. Nous avons aussi noté toute prise récente de médicaments anti-paludiques susceptibles

d'influer sur les résultats de l'examen parasitologique. Les questionnaires sont restés anonymes, de même que les résultats d'analyses parasitologiques et hématologiques.

L'exploration des indices parasitaires a reposé sur l'examen microscopique des gouttes épaisses et des frottis sanguins.

A/ Confection goutte épaisse et frottis mince sur lames. Des étalements de sang (GE et frottis) ont été réalisés afin de mettre en évidence la présence de *Plasmodium* chez chaque individu. Le diagnostic parasitologique s'est fait par la réalisation d'une goutte épaisse et de frottis sanguin. Ceci a consisté à un prélèvement de 2 ou 3 gouttes de sang capillaire au bout du doigt de chaque sujet. Ces gouttes ont été ensuite étalées sur des lames de verre. Après séchage, goutte épaisse et frottis ont été colorés au Giemsa 10% puis examinés au microscope pour la détection des stades sexués et asexués des parasites.

B/ Coloration et lecture de lames. La préparation était ensuite fixée avec le méthanol (30 secondes) et colorée au Giemsa dilué au 1/10 pendant 30mns. Nous avons évalué les densités de parasites asexués (trophozoïtes) et de gamétocytes de chaque individu en utilisant le seuil de lecture de 1000 globules blancs, correspondant à la lecture de 1 mm³ de sang. La parasitémie était donnée par rapport au nombre de leucocytes comptés. La goutte épaisse permet de détecter des parasitémies de l'ordre de 1 à 2 parasites par µl. Elle permet une lecture facile de *P. malariae* et des gamétocytes de *P. falciparum*. La figure 5 ci-contre montre des exemples de gamétocytes.

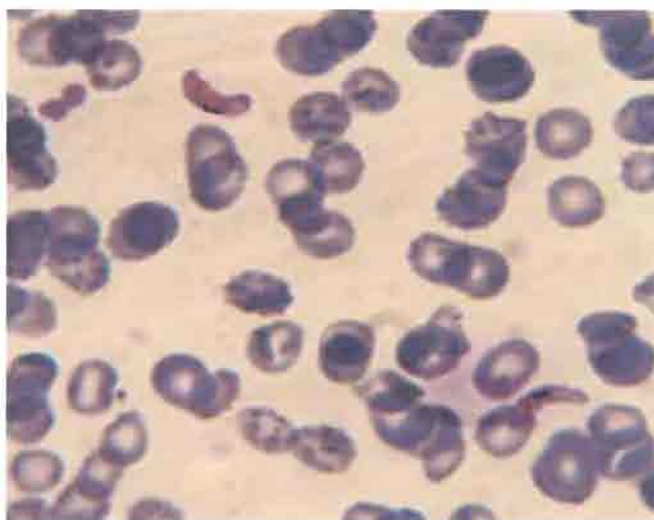


Figure 5 : Photographie illustrant des gamétocytes

C/ Diagnostic clinique. Le diagnostic d'accès palustre a reposé sur l'association de la fièvre (température corporelle supérieure ou égale à 38,5°C) et d'une parasitémie décelable au microscope ou d'une parasitémie seuil prédéfini. Dans la plupart de cas, seules des fortes parasitémies (1000 parasites/microlitre de sang et plus), symptomatiques ou non, étaient systématiquement traitées par la combinaison Amodiaquine + Sulfadoxine pyriméthamine.

IV.2. Caractéristiques sanguin des participants

Au cours de l'enquête parasitologique, d'autres échantillons de sang ont été également prélevés sur papier filtres (confettis) pour l'extraction de l'ADN et un aliquote de sang a servit pour la détermination du groupe sanguin ABO rhésus et l'analyse du taux d'hémoglobine de chaque participant.

A/ Mesure du taux d'hémoglobine. Elle a consisté à recueillir une goutte de sang capillaire, dans une micro cuvette. Cette micro cuvette était ensuite introduite dans un appareil de mesure (Hémocue), qui affichait le taux d'hémoglobine en g/dl sur l'écran de lecture. Ce taux d'hémoglobine nous renseignait sur l'état d'anémie ou pas de chaque participant.

B/ Groupage sanguin. La méthode utilisée était celle de Beth Vincent, par utilisation d'anticorps connus sur plaque d'opaline. Elle consiste à déposer quatre gouttes de sang différentes de la même personne sur la plaque. Ensuite, une goutte de chaque anticorps déjà connu (Ac) (A, B, AB, O) (SPINREACT,S.A.) a été déposée à côté de chaque goutte de sang et à l'aide d'une baguette propre ou du fond d'un tube à essai, puis mélangé soigneusement. Après 10 secondes, l'état d'agglutination de chaque goutte a été observé. Une réaction positive révélée par l'agglutination traduit une réaction entre l'anticorps et les hématies et indique la présence de l'antigène. En cas de non agglutination visible, il n'y a pas de réaction entre l'anticorps et les hématies et indique donc l'absence de l'antigène, la réaction est négative. Après la mesure du taux d'hémoglobine et la détermination du groupe sanguin, l'extraction d'ADN a été effectué au laboratoire de l'Institut de Recherche en Science de la Santé en vue du génotypage qui s'est déroulé à l'Université « La Sapienza » de Rome en Italie.

C/ Extraction d'ADN. Le but de cette manipulation a été de déterminer la fréquence de chaque génotype (CC, AA, AC, AS) dans la population de Soumouso. Nous avons d'abord obtenu l'ADN de l'échantillon sanguin de chaque participant afin de pouvoir caractériser le génotype plus tard par PCR. Donc à partir du sang recueilli sur papier filtre (confetti), nous avons procédé à l'extraction de l'ADN au chélex 100 (Walsh *et al.*, 1991). De manière pratique, 3 tubes pour chaque échantillon à tester ont été préalablement étiquetés. Les confettis sur papier filtre ont été découpés à l'aide d'une lame stérile tout en utilisant son étui comme appui, puis transféré dans le tube avec la pointe de la lame qui sera ensuite jetée. Un volume de 800µl-1µl de saponine a été ajouté dans chaque tube à l'aide d'une pipette

électronique, puis nous avons agité et laissé toute la nuit à 4°C. La solution marron de saponine et d'hémoglobine était ensuite éliminée délicatement avec une pipette avant d'ajouter 800µl-1µl de PBS. Après agitation avec une pipette électronique la préparation a été laissée à 4°C pendant 15-30 minutes au terme desquelles le PBS a été éliminé. Cette étape a été répétée pour s'assurer de l'élimination complète de la solution marron de saponine. Après avoir éliminé le PBS, 100µl de H₂O distillée et stérilisée a été ajouté en plus de 50µl d'une solution de chélex (20%) chaud et le mélange a été vortexé (agiter) pendant 30 secondes. Ensuite, les tubes de préparation ont été mis à 100°C pendant 5 minutes et le mélange a été homogénéisé avant d'être centrifugé pendant 3 minutes à 13.000 rpm. Par la suite le surnageant a été extrait puis mis dans deux tubes déjà étiquetés. Ces tubes ont été conservés à 4°C ou bien à -20°C.

D/ Géotypage. Le but de cette analyse était de déterminer la fréquence de chaque géotype (CC, AA, AC, A^S) dans la population de soumouso. La caractérisation des allèles A, C et S de l'hémoglobine (HB) a été effectuée en utilisant deux protocoles différents :

Protocole tétraprimers ARMS PCR. Pour la caractérisation des allèles C de l'hémoglobine nous avons mis au point et utilisé un nouveau protocole d'amplification qui permet une détermination rapide du géotype. Il s'agit d'une nouvelle adaptation de la technique d'amplification allèle spécifique décrit pour la première fois par *Ye et al., 2001* qui utilise deux couples de primers pour caractériser en même temps 2 allèles du même site polymorphique dans une réaction unique de PCR. On utilise 2 amorces allèle spécifiques et 2 amorces normales choisies de manière à donner des amplifications de différentes tailles (figure 6). Dans notre cas, comme il y avait trois allèles à géotyper, nous avons effectué deux réactions pour chaque échantillon et l'attribution finale du géotype a été effectuée par comparaison des deux patterns d'amplification. Comme chaque échantillon a été analysé deux fois, cette double amplification nous a permis aussi d'avoir une réplique de contrôle.

Pour le protocole d'analyse, la démarche suivante a été suivie : avant la manipulation, les échantillons étiquetés ont été rangés dans un portoir en suivant l'ordre établi dans le cahier de manipulation. Tout au long de la manipulation, l'ordre des échantillons a été sans cesse vérifié périodiquement afin d'éviter toute confusion ou une erreur d'identification. Après toutes ces mesures de précaution, nous avons préparé le mix dans un cône approprié de 1,5 ml en mélangeant les réactifs suivant l'ordre ci-après : Tampon (buffer), dNTPS, MgCl₂,

les 4 primers, l'H₂O ; enfin nous avons ajouté la Tag et mélangé soigneusement l'ensemble à l'aide d'une pipette de 1000 µl.

Remarque 1 : Tous ces réactifs ont été utilisés à des volumes préalablement bien calculés en fonction du volume final/tube et du nombre d'échantillon ($V_f/t_b=10\mu l$). Toutes les manipulations se sont réalisées dans la glace pour éviter la dénaturation des réactifs.

Le mix étant préparé, nous avons procédé immédiatement à sa distribution dans les puits des plaques ou dans des tubes bien numérotés (Vol mix = 8µl/tb). Ensuite nous avons ajouté 2µl d'ADN par puit, sauf dans les trois premiers puits qui ont servi de contrôle positif (c'est-à-dire contenant de l'ADN dont le génotype est déjà connu) et le dernier puit de contrôle négatif (puit contenant uniquement le mix). Les échantillons ont été ensuite bien fermés et placés dans le thermocycleur pour amplification. Après amplification, nous avons procédé au mélange de 5µl de bleu de charge à l'ADN avant le dépôt, suivant le même ordre de numérotation dans les différents puits du gel préalablement préparé. Le marqueur de poids a été déposé dans le dernier puit (2µl) et le gel a été porté à l'ultra violet (UV) pour la lecture, après migration.

Remarque 2 : Le contrôle négatif ne doit rien donner à l'UV, par contre les contrôles positifs doivent apparaître à l'endroit attendu, bien visibles avec des bandes de taille adéquates (433 bp pour le control, 292 bp pour l'allèle A et 183 bp pour l'allèle C).

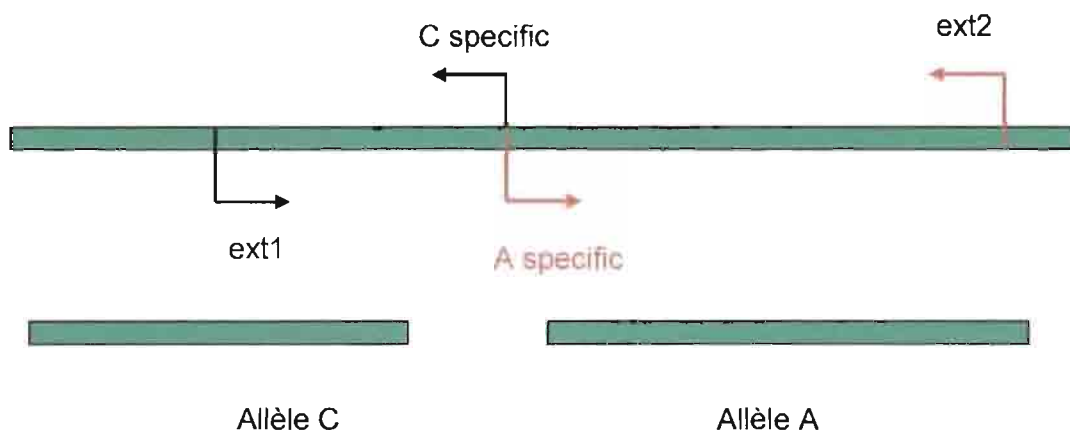


Figure 6 : Schémas d'amplification de la ARMS tétraprimers

La figure 7 montre un exemple de migration sur un gel d'agarose à 1,5%. L'interprétation est basée sur la visualisation des bandes correspondant à un allèle précis. Dans l'exemple de la figure 7, la première ligne de bandes du premier gel correspond à la bande de contrôle. L'apparition des bandes de l'allèle A et C indique que l'individu est du génotype AC. Par contre dans le 2^e cas la bande correspondant à l'allèle C apparaît indiquant

que l'individu est du génotype CC ou SC et dans le dernier cas nous avons une seule bande correspondant à celle de l'allèle A, donc l'individu est du génotype AA ou AS. L'interprétation est valable pour le 2^e gel. Les échantillons douteux sont repris dans une autre PCR avec l'allèle correspondant. Par exemple pour les échantillons douteux AA/AS, la PCR a été reprise avec l'allèle S pour déterminer les individus AA des individus AS. Un protocole décrit par Modiano *et al.*, (2001) a alors pour but de caractériser les allèles S de la chaîne bêta de l'hémoglobine (Voir les détails ci-dessous).

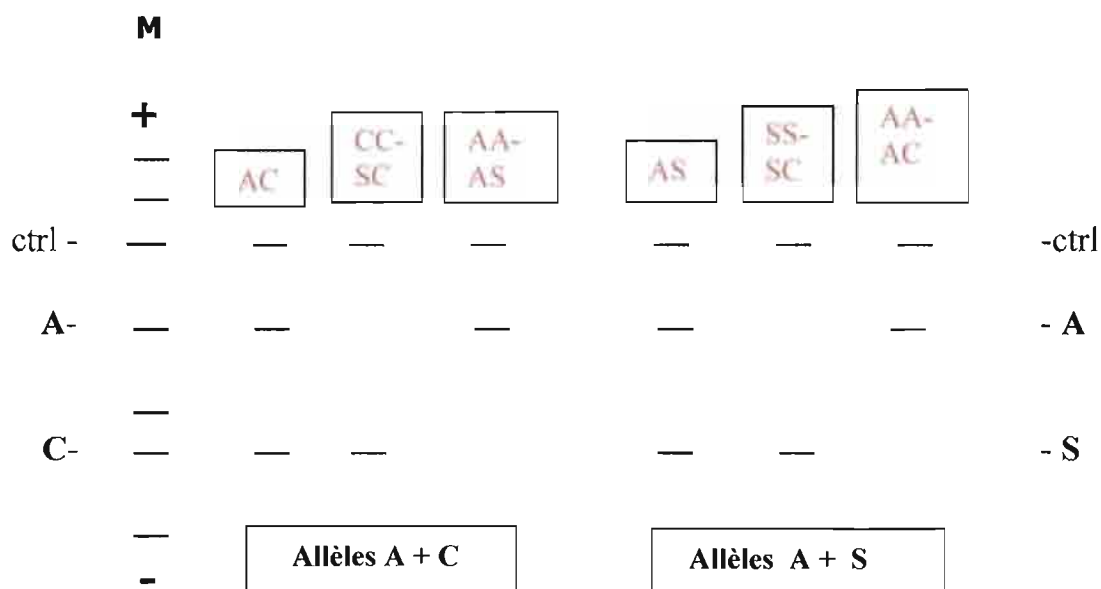


Figure 7 : Migration sur gel d'agarose 1,5%

Protocole de restriction (allèle S). Pour la caractérisation des allèles S de la chaîne bêta de l'hémoglobine, une modification du protocole décrit par Modiano *et al.*, (2001), a été utilisée. Le protocole est constitué par une PCR suivie par une restriction avec l'enzyme DdeI (*Desulfovibrio desulfuricans*) qui reconnaît de manière spécifique la mutation GAG—GTG (HBA—HBS) sur le 6^e codon de l'hémoglobine.

La démarche pour la préparation du mix, est identique à celle utilisée précédemment à la seule différence qu'il s'agit d'une PCR normale utilisant deux primers au lieu de quatre. Les volumes des différents réactifs, dépendent aussi du volume final et du nombre d'échantillons à analyser. Après la préparation du mix et sa distribution dans les puits, les échantillons sont amplifiés dans un thermocycleur et le contrôle est effectué sur un gel d'agarose 1,5%. La PCR a été suivie de la restriction enzymatique qui s'est déroulée à l'étuve (36°C) pendant quatre heures avec pour enzyme la DdeI. Après la restriction les échantillons

ont été distribués dans les puits du gel, ainsi que le bleu de charge et le marqueur de poids. Après un temps de migration nous avons effectué la lecture à l'UV et la figure 8 montre l'exemple d'un gel d'agarose après passage à l'ultra violet.

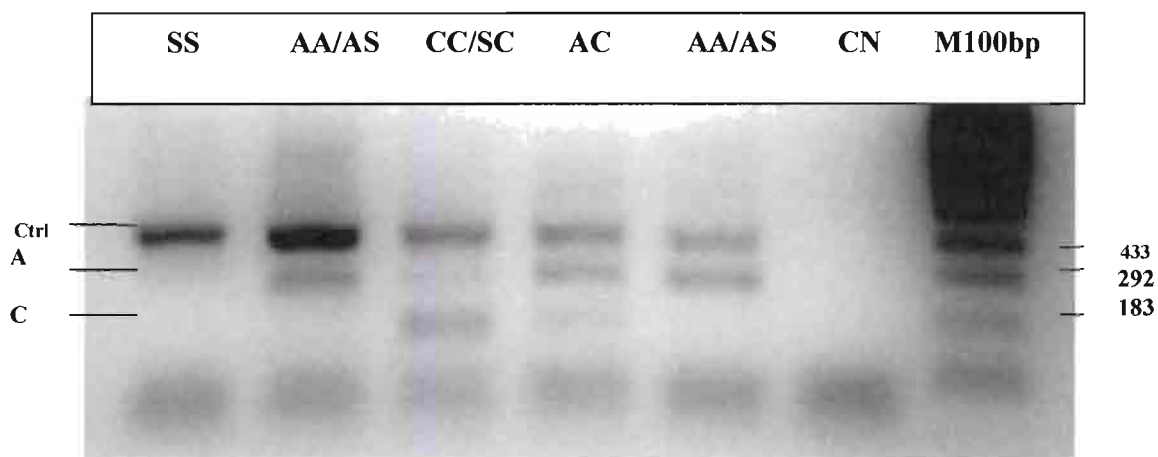


Figure 8 : exemple d'un gel d'agarose après passage à l'ultraviolet (UV)

Dans cette figure nous avons les bandes de contrôle qui apparaissent autour de 300 à 400 bp. Pour le premier cas, seule la bande de contrôle est apparue ce qui s'explique par l'absence des allèles A et C. L'individu est donc du génotype SS. Pour le second cas, seule la bande de l'allèle A est apparue autour de 200 bp indiquant que l'individu est du génotype AA ou AS. La dernière colonne correspond au marqueur de poids et est suivi du contrôle négatif. Pour les deux protocoles utilisés, les échantillons ont été amplifiés dans des plaques de 96 puits en incluant 3 contrôles positifs (homozygotes CC ou SS, homozygote AA, hétérozygotes AC ou AS) et un contrôle négatif. Afin de confirmer les résultats obtenus avec les deux protocoles précédents, sur les échantillons CC, nous avons effectué un génotypage avec le protocole classique décrit par **Modiano et al., 2001**. La détermination du génotype nous a permis d'évaluer les proportions des individus portant les génotypes de Hb AA, AC, CC au sein de la population de Soumouso. Par la suite nous avons sélectionné un certain nombre de participants sur la base de leurs traits génétiques pour l'étude de l'évaluation de la transmission.

IV.3. Evaluation de l'effet du génotype hémoglobinique sur la transmission

L'objectif principal de notre étude a été de comparer l'infectivité des individus par rapport aux génotypes de l'hémoglobine en particulier entre l'Hb CC, AC, AS et AA.

IV.3.1. Méthodes d'évaluation de l'infectivité

Des individus répondant aux critères d'inclusion décrits ci-dessus ont été classés par sexe et par âge, puis leur infectivité a été comparée en examinant leur capacité des sujets sélectionnés à infecter les moustiques suite à un repas de sang. La taille de notre échantillon était de 60 enfants âgés de 3-12 ans choisis parmi les 2465 personnes de la population dont le génotype a été préalablement déterminé, présentes durant la période d'étude - de Juillet à fin Novembre 2008.-L'étude expérimentale de l'infectivité de chaque participant s'est déroulée en deux phases : une phase de transmission naturelle et une phase de transmission artificielle. La participation de chaque volontaire a consisté d'abord à se laisser piquer par les moustiques en dormant dans les cases sentinelles choisies dans le village de Soumouso et à donner un échantillon de sang pour les infestations des anophèles élevés en laboratoire.

IV.3.1.1. Xenodiagnostic en case d'habitation

Le but de cette phase, était d'évaluer l'infectivité des groupes de sujets asymptomatiques AS, AA, AC et CC préalablement sélectionnés. Ici, des individus choisis sur la base du génotype hémoglobinique ont été classés par sexe, âge, puis placés individuellement à l'intérieur des cases sentinelles choisies aléatoirement parmi les habitations du village. Une combinaison d'individus, représentant chacun un génotype hémoglobinique, a été placée aléatoirement à l'intérieur de 4 cases d'habitation pendant 4 nuits successives. Au total 14 groupes d'enfants de même sexe et même âge (de 3-12 ans) ont été constitués. Dans chaque groupe les quatre types d'hémoglobine étaient représentés. Ces enfants dormaient individuellement dans les cases expérimentales pendant 4 nuits successives de 19h à 06h du matin.

	Génotype HB/Nº de case d'habitation			
Nuit de capture	Case A	Case B	Case C	Case D
1	AC	AS	CC	AA
2	AA	AC	AS	CC
3	CC	AA	AC	AS
4	AS	CC	AA	AC

Des moustiques sauvages peuvent ainsi être rassemblés après chaque nuit, juste après qu'ils aient pris le repas sanguin sur les participants présents. A chaque nuit les enfants

changeaient de case pour s'assurer que chaque participant reçoive la même exposition durant la période d'étude (de Juillet à fin Novembre 2008). Onze groupes ont effectué 3 passages de 4 nuits consécutives (c a d 12 nuits /enfant) alors que les 3 autres groupes n'ont effectué que 2 passages (c a d 8 nuits/enfant). Les participants exposés aux piqûres de moustiques ont été examinés régulièrement pour rechercher des parasites de paludisme. Après chaque nuit, tous les moustiques présents dans chaque case expérimentale ont été capturés au petit matin au moyen des aspirateurs, identifiés puis placés séparément dans de petites cages, chaque cage renfermant les moustiques gorgés ayant pris du sang sur chaque participant. Ces moustiques ont été mis ensuite dans une enceinte isotherme puis transportés vivants jusqu'au laboratoire. Les moustiques ont été différenciés par espèce en utilisant des critères morphologiques. Seuls les moustiques du genre *Anopheles* ont été maintenus au laboratoire. Ils étaient nourris avec une solution de jus sucré (5%) pour augmenter leur chance de survie quotidienne. Au septième jour ils étaient disséqués sous une loupe binoculaire et leur estomac trempé dans une solution de mercurochrome 2% pour faciliter la détection des oocystes à l'aide d'un microscope (objectif 10x). Les moustiques qui présentaient des oocystes au septième jour (J7) étaient considérés comme infectés et le nombre des oocystes (figure 9) déterminés.

Pour confirmer les résultats de terrain, nous avons infecté expérimentalement des *Anopheles gambiae*, souche de Soumouso, avec du sang prélevé chez les sujets ayant participé au volet d'étude de la transmission en condition naturelle.

IV.3.1.2. Infections expérimentales

En plus de la méthode naturelle d'infestation des moustiques, nous avons effectué des infections expérimentales périodiques pour évaluer l'infectivité des individus sélectionnés par rapport au génotype de leur Hémoglobine.

Parallèlement à l'évaluation de l'infectivité des participants en condition naturelle nous avons également fait des infections artificielles de moustiques, selon la technique précédemment décrite (Graves *et al.*, 1988 ; Tchuinkam *et al.*, 1993 ; Gouagna *et al.*, 2004). Pour cette phase expérimentale, des larves d'*Anopheles gambiae* étaient récoltées sur le terrain pour élevage. Ces larves étaient prélevées par la technique de « dipping » à partir des gîtes d'anophèles préalablement identifiés dans le village de soumouso. Elles ont été transportées au laboratoire où elles étaient triées en fonction de leur stade d'évolution (stade I à 4), puis placées dans des bacs contenant de l'eau de source où elles étaient élevées et nourries chaque jour avec des croquettes de chien ou avec du Tetramin®, nourriture pour alevins. Enfin, à la nymphose, les nymphes étaient prélevées à l'aide d'une pipette et mis dans

un gobelet contenant de l'eau. Ces gobelets étaient ensuite placés dans les cages jusqu'à l'émergence des moustiques adultes qui étaient exclusivement nourris au jus sucré avant l'infestation.

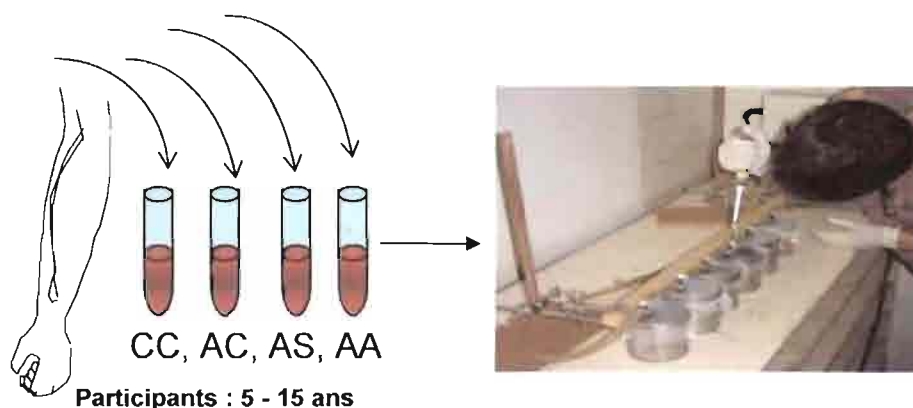


Figure 9 : Prélèvement et introduction du sang dans les cellules de gorgement des moustiques

Afin de confirmer les résultats observés sur le terrain par la méthode naturelle d'infestation des moustiques, des lots de 100 *Anopheles gambiae* d'élevage ont été infectés expérimentalement à travers une membrane artificielle. Cette procédure est connue sous le nom de « Direct Membrane feeding Assay » (Graves *et al.*, 1988 ; Tchuinkam *et al.*, 1993 ; Gouagna *et al.*, 2004), consiste à faire gorger des moustiques sur du sang contenu dans des cellules de gorgement (feeders) de 4 cm de diamètre reliées entre elles par un système de tuyau de circulation, connecté à un bain thermostaté permettant le maintien de la température du dispositif à 37°C. Le courant d'eau est maintenu à la température de 37°C pompé dans les cellules en suivant un circuit externe fermé. Une basse température (inférieure à la température corporelle aurait provoqué l'exflagellation des gamétocytes et les rendrait moins viable chez le moustique. La base de chaque cellule est préalablement recouverte d'une membrane de Parafilm® amincie à travers laquelle les moustiques vont se gorger de sang (figure 10). Cette membrane jouant le rôle de la peau va faciliter le gorgement des moustiques qui sont par nature des insectes « piqueur-suceurs ».

Chaque volontaire ayant participé à l'épreuve de transmission en case expérimentale, a donné 5 millilitres de sang veineux. Le sang recueilli dans un tube héparinisé préchauffé a été immédiatement introduit dans les cellules de gorgement à l'aide d'une seringue. Les gobelets contenant 50-100 moustiques femelles à jeun ont été mis au contact de la membrane

recouvrant la base de chaque cellule pendant une trentaine de minutes à 37°C, pour leur permettre de se gorger de sang.

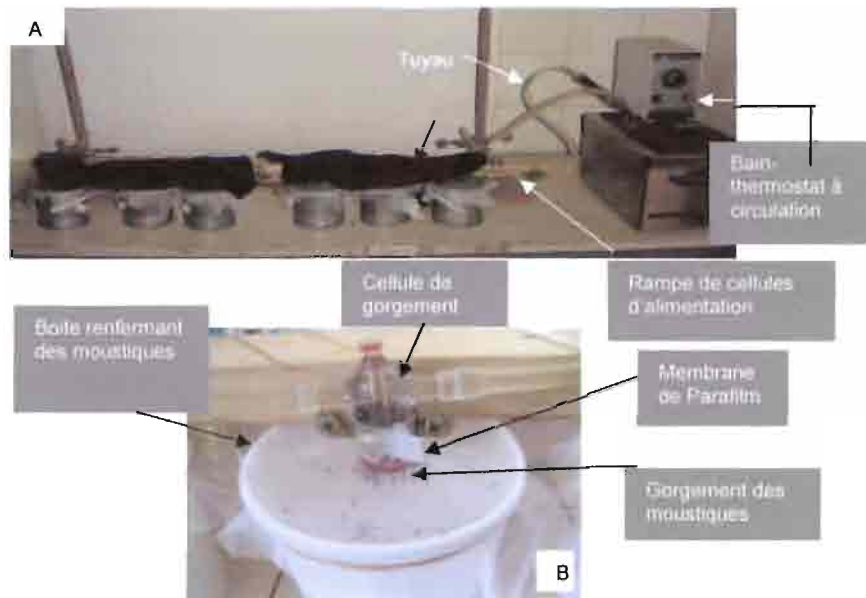


Figure 10 : Dispositif d'infection expérimentale (A) et gorgement des moustiques sur membrane (B)

A la fin du repas sanguin, les femelles non gorgées étaient séparées du reste à l'aide d'un aspirateur à bouche. Les femelles gorgées étaient désormais mis en cage et maintenues au laboratoire dans les conditions ambiantes jusqu'au jour de dissection. Pendant ce temps elles étaient nourries de solution sucrée (glucose à 8%) afin d'assurer la survie des moustiques.

Les moustiques vivants au septième jour après l'infection ont été placés au congélateur, le temps qu'ils s'engourdissent (5-10 minutes) ou immobilisés au chloroforme sur un morceau de coton afin de faciliter la dissection qui s'est effectuée sous un microscope binoculaire. Pour la dissection, le moustique est déposé sur la lame et immobilisé au niveau du thorax par un mandrin. A l'aide d'un autre mandrin, la partie terminale à partir de l'avant dernier segment est tiré pour faire sortir les ovaires, les tubes de Malpighi, et l'estomac. L'estomac est ensuite détaché du reste et observé (figure 11). Chaque moustique a été disséqué dans une solution de mercurochrome, servant à la coloration des tissus pour faciliter l'observation des oocystes au microscope.

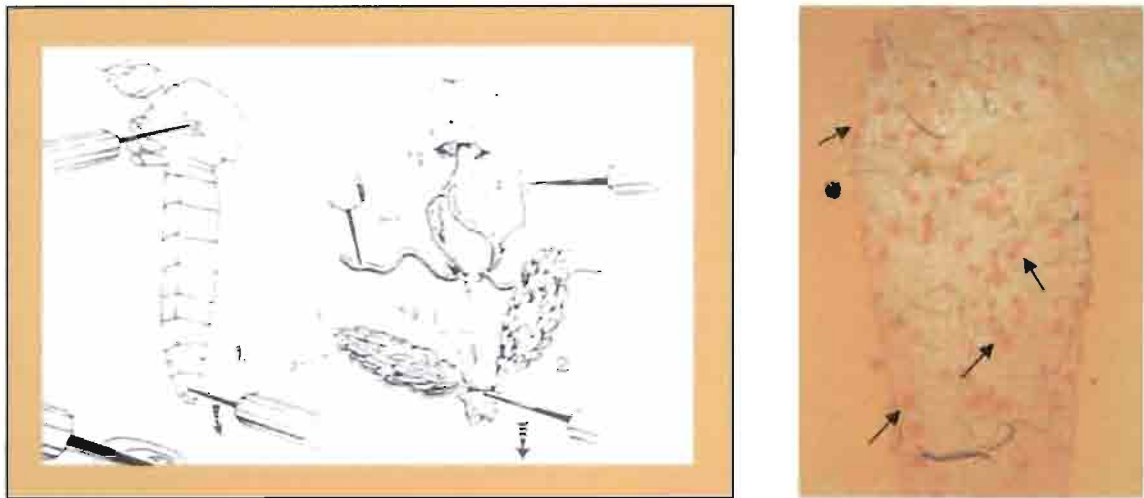


Figure 11 : Schéma montrant les étapes de la dissection et exemple d'un estomac de moustique infecté d'oocystes. Les moustiques infectés sont disséqués à J7 après l'infection et leurs estomacs examinés individuellement au microscope optique (objectif x10), pour la détection et le dénombrement des oocystes.

IV.4. Considérations éthiques

Les infections expérimentales des moustiques sains élevés au laboratoire sont souvent limitées dans la mesure où les résultats peuvent seulement être extrapolés pour avoir une idée approximative de la transmission du paludisme dans les conditions naturelles. Réciproquement, pour ces études effectuées en cases sentinelles, des moustiques sauvages sont récupérés à l'aide d'aspirateur, puis examinés au laboratoire pour déterminer s'ils sont infectés ou non. Ceci permet l'analyse de la transmission dans des conditions réelles mais ces investigations sont souvent difficiles à s'exécuter tant sur le plan logistique que de l'interprétation des résultats en raison de la nature non contrôlée de l'environnement et en raison des incertitudes dans l'échantillonnage des populations de moustiques. Dans le cadre de notre étude, nous avons employé ces deux méthodes, pour avoir un reflet précis de la relation entre le génotype des individus sélectionnés et leur infectivité vis à vis des moustiques.

Les deux approches ont exigé la participation des sujets humains, particulièrement des enfants de 5 à 15 ans, sélectionnés sur la base des caractéristiques de leur hémoglobine. En conséquence, notre étude comporte des aspects éthiques concernant la méthodologie. Plus précisément, le volet sur le terrain, bien qu'indispensable dans le contexte de ce projet, a soulevé des questions d'ordre éthique liées à l'exposition des participants aux piqûres de

moustiques. Bien que le degré d'exposition aux piqûres de moustiques ait été proche des conditions normalement rencontrées dans les habitations environnantes où vivent les participants, le risque d'infection de paludisme lié à la participation a été évidente. Toutefois, le présent travail a eu l'approbation du comité institutionnel d'éthique de l'IRSS/Muraz. Avant l'étude des séances d'information ont été menées au cours desquelles le protocole a été traduit en langue maternelle si nécessaire, afin que les personnes puissent comprendre et prendre la responsabilité de signer ou pas le consentement éclairé. Les sujets sollicités à participer à l'étude ont été inclus après obtention d'un consentement éclairé signé par leurs parents ou par leurs tuteurs. Une fiche d'information, destinée à expliquer les objectifs de l'étude et des détails sur le protocole employé, a été remise aux participants pour les informer de leur engagement dans l'étude. Tous les participants ont été examinés régulièrement (chaque semaine) pour rechercher des parasites de paludisme et ceux déclarés positifs à l'examen de la goutte épaisse ont bénéficié d'une prise en charge médicale gratuite et tous ont également bénéficié d'une compensation pour le dérangement et l'inconfort provoqué.

IV.5. Analyse de données

Les données collectées au cours de cette étude ont été saisies à l'aide du logiciel Epi info 6 version 6.04 et analysées avec le logiciel SPSS version 11 pour Windows. Deux paramètres dont la prévalence de moustiques infectés et la charge oocystique moyenne par moustique positif ont été considérés pour la comparaison entre l'infectivité avec les différents groupes. Les comparaisons de proportions de moustiques positifs chez les différents groupes de moustiques en fonction du génotype ont été effectuées par le test de Khi carré alors que pour les mesures quantitatives telles que la densité parasitaire, les groupes expérimentaux ont été comparés par (ANOVA). Cette comparaison des moyennes a été effectuée après normalisation (transformation logarithmique) des densités parasitaires. Toute différence qui avait un $p < 0,05$ était considérée comme significatif. Le logiciel Excel 2003 a été utilisé pour tracer les graphiques.

V. RESULTATS

Suite aux enquêtes sur le terrain et les analyses effectuées au laboratoire, nous sommes parvenu à des résultats nous renseignant sur le profil démographique et génétique de la population. En outre, nous avons obtenu une image plus ou moins précise des indices parasitaires classiques et l'infektivité des individus pour les moustiques en fonction du génotype de leur hémoglobine.

V.1. Les caractéristiques de la population d'étude

L'étude démographique a concernée au total 2465 (N= 2465) habitants dans la localité de Soumouso. La population avait une moyenne d'âge de 18,36(+/- 16,9) ans et les sujets d'âge compris entre 0-95 ans on été recensés. La population a été subdivisée ici en quatre tranches d'âge (0-5 ; 6-12 ; 13-25 et >26 ans) et la tranche d'âge majoritaire était celle comprise entre 6-12 ans. Nous avons également dénombré 1070 habitants du sexe masculin (soit un pourcentage de 43,4%) et 1389 du sexe féminin (soit un pourcentage de 56,3%) et 6 perdus de vue. A Soumouso, 70% de la population est constitué de mossi, groupe ethnique majoritaire, suivi par les peuhls (8,6%), les Bobo (4%). Les autres ethnies présentes pendant l'enquête (Samo, Dagari, Ashanti, Birifor, Bissa, Bwaba, Dafing, Dioula, Gan, Gouin, Gourounsi, Kou, Lobi, Marka, Nounouma, Samo, Senoufo, Tiefo, Zarma) ne représentent que 17,4%.

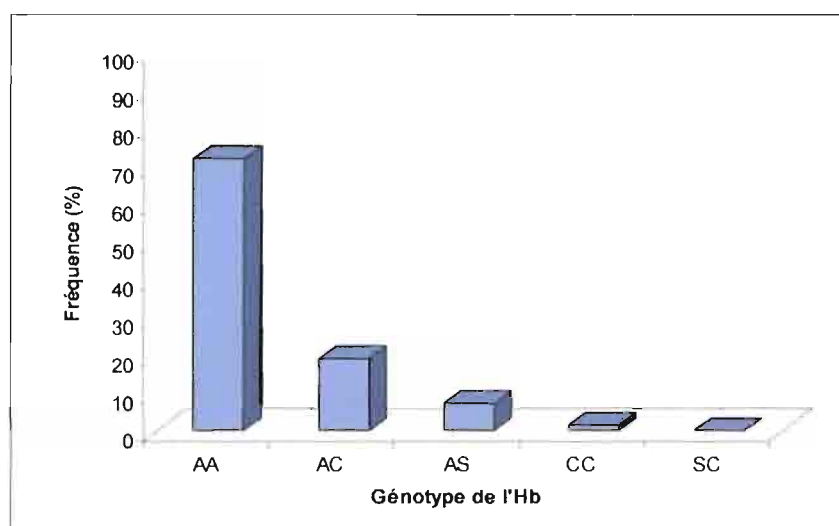


Figure 12 : Répartition de la population par génotype

Suite à l'évaluation de la fréquence des différents génotypes de l'hémoglobine (Hb) au sein de la population, nos résultats indiquent que l'HbA était majoritairement représentée par le génotype "AA" avec un pourcentage de 71,9% alors que le génotype "CC" était très faiblement représenté (1,6%) (Figure 12). D'autres génotypes identifiés sont AC et AS avec des fréquences variables en fonction des groupes ethniques.

V.1.1. Données parasitologiques. Après avoir déterminé la fréquence des différents génotypes de l'hémoglobine, nous avons évalué la relation entre le polymorphisme du génotype hémoglobinique et la prévalence de l'infection plasmodiale au sein de la population. Au total 2465 individus ont été examinés dans la population, dont 1077 étaient infectés par *Plasmodium falciparum*. Indépendamment du génotype hémoglobinique, la prévalence moyenne de *P. falciparum* chez les sujets âgés de moins de 10 ans est de 62,9%. Cette prévalence diminue avec l'âge, et est de 34,1% chez les sujets âgés de 13-25 ans. La densité moyenne des formes asexuées (moyenne arithmétique) est de 1457,9 (+/- 181,2) parasites/mL de sang chez les individus de moins de 10 ans et est faible 100,0 (+/- 15,4) p/mL chez les individus de plus de 10 ans. Ces résultats indiquent que les prévalences et les densités parasitaires varient en fonction de l'âge, avec des prévalences (Pearson $\chi^2 = 208,5$; $df = 3$; $p < 0,001$) et des densités parasitaires (ANOVA, $p < 0,001$) plus élevées chez les enfants âgés de moins de 10 ans que chez les sujets plus âgés. Le tableau (01) indique que les prévalences parasitaires ne varient pas significativement en fonction du génotype ($P > 0,5$).

Les indices gamétoctaires sont relativement faibles au sein de la population générale, malgré un seuil de lecture de l'ordre de 6-8 gamétoctes/mL (évalué sur 2000 globules blancs). La prévalence gamétoctaire chez les enfants âgés de plus de 10 ans, est en effet de 10,8%, légèrement inférieur à celle observée chez les individus plus âgés 3,4%. La densité gamétoctaire (moyenne arithmétique) de la population examinée est de 4 gamétoctes / μ L et ne semble pas varier en fonction de l'âge. Par contre nous avons observé que les sujets porteurs d'hémoglobine C avaient 3 à 4 fois plus de gamétoctes (sujets AC, $6,9 \pm 1,9$ gamétoctes/ μ l et sujets CC, $7,4 \pm 3,8$ gamétoctes/ μ l) que les (sujets AA, $2,5 \pm 0,25$ gamétoctes/ μ l et les sujets AS, $1,62 \pm 0,4$ gamétoctes/ μ l).

D'une manière générale les analyses multivariées, avec les densités parasitaires comme variables dépendantes et le génotype et l'âge comme co-variables, indiquent que le génotype ($F_{[2414, 5]} = 462,9$; $p = 0,0001$) et l'âge ($F_{[12414, 1]} = 622,5$; $p = 0,0001$) influence significativement les densités parasitaires.

Tableau 1: distribution de la prévalence et densité parasitaire en fonction du génotype

Indices parasitologiques	Catégories de génotypes			
	AA	AC	AS	CC
Examinés	1772	468	179	40
Positif <i>P. falciparum</i> (%)	771 (43,5)	221(47,2)	66 (36,9)	17 (42,5)
Densité <i>P. falciparum</i>	520,3 \pm 51,5	583,5 \pm 136,4	241,9 \pm 56,1	258,6 \pm 160,1
Positif <i>P. malariae</i> (%)	91 (5,1)	19 (4,1)	14 (7,8)	0
Densité <i>P. malariae</i>	6,7 \pm 1,5	3,2 \pm 1,7	10,2 \pm 5,4	0
Positif Gamétoocyte (%)	301 (17,0)	107 (22,9)	24 (13,4)	9 (22,5)
Densité gamétocytaire	2,5 \pm 0,25	6,9 \pm 1,9	1,62 \pm 0,4	7,4 \pm 3,8

V.2. Evaluation de l'infectivité chez les moustiques engagés à la recherche de l'hôte

Suite à l'évaluation de la relation entre le polymorphisme du génotype hémoglobinique et la prévalence de l'infection plasmodiale au sein de la population, nous avons procédé à des dissections pour comparer l'infectivité vis-à-vis des moustiques d'un échantillon de sujets ayant des caractéristiques hémoglobiniques différents.

V.2.1. Xenodiagnostic de l'infectivité de l'hôte pour les moustiques sauvages. Le protocole d'échantillonnage tel que décrit ci-dessus nous a permis d'obtenir des données relatives à la densité de moustiques capturés par personne et par case et de détecter les variations, lorsqu'elles existent, de l'infectivité entre les différents génotypes vis-à-vis des moustiques ainsi récoltés. Les moustiques gorgés de sang constituaient la majeure partie de la faune résiduelle capturée à l'intérieur des cases occupées par les participants. La dissection de moustiques pour la recherche des oocystes a été effectuée en deux phases : d'abord une dissection des moustiques a été effectuée au troisième jour après la capture (J3) pour essayer de déterminer le niveau d'infection des moustiques avant leur contact avec les participants, étant donné que certains moustiques entrant dans ces cases à la recherche de repas de sang pourraient avoir pris une infection lors d'un repas infectant antérieur. Ensuite un autre lot de moustiques a été disséqué au septième jour (J7) et la différence de prévalence par rapport à celle déterminée à J3 a permis de détecter une éventuelle relation entre les facteurs génétiques de l'Hb humain et l'infectivité.

Proportion de moustiques infectés d’oocyste pendant la recherche de l’hôte. A J3, au total 432 moustiques (en majorité *An. gambiae* 78,7%) ont été capturés dans les cases abritants les individus de génotype AA, AS, AC et CC. Sur les 432 moustiques examinés, seulement 60 ont été infectés d’oocystes. Les proportions moyennes de moustiques positifs et les densités moyennes d’oocystes par moustique infecté n’ont pas varié en fonction du génotype. En effet, la prévalence moyenne de moustiques infectés était de 23,3% pour AA & AS et de 26,7% pour AC & CC. La moyenne des parasites par moustique infecté à J3 était de 5,5 +/- 2,2 oocystes pour les moustiques capturés dans les cases occupées par les sujets CC et de 3,9 +/- 1,2 oocystes chez chaque moustique infecté sur les sujets AA et AC (Tableau 2).

Tableau 2 : Taux d’infection et densités oocystiques par moustique infecté à J3 en fonction du génotype

Indices d’infections	Catégories de génotypes			
	AA	AC	AS	CC
Taux d’infection (%)	23,3	26,7	23,3	26,7
Densités oocystiques	3,9 ± 1,2	3,9 ± 1,2	4,3 ± 1,7	5,5 ± 0,8

Comme on pouvait s’y attendre ces résultats indiquent que certains moustiques collectés sur le terrain avaient pris un repas de sang infectant avant d’entrer dans les cases occupées par les individus participants à l’étude. Aucune différence significative n’a été observée en comparant les indices d’infection par génotype, que ce soit pour les prévalences de moustiques infectés ($p = 0,95$) ou pour le nombre d’oocyste par moustique infecté ($p > 0,05$). Les précisions d’échantillonnage étaient donc comparables dans tous les groupes.

Variation du taux d’infection des moustiques en fonction du génotype à J7. Au total, 4190 moustiques ont été collectés dans les cases expérimentales, dont la majorité (94,4%) était *An. gambiae* .S.l. Les autres espèces représentées étaient *An. funestus* et *An. rufipes*. Aucune différence significative n’a été mise en évidence en comparant le nombre d’anophèles moustiques capturés par génotype : au total les estomacs de 902, 997, 1097, 1194 moustiques ont été examinés respectivement pour les sujets AA, AC, AS, CC. De tous les moustiques disséqués ($n = 4190$), la présence d’oocystes de *P. falciparum* a été détectée chez seulement 991 d’entre eux (tableau 3).

Contrairement aux résultats observés à J3, on observe une variation statistiquement significative du taux d’infection à J7 entre les différents génotypes hémoglobiniques ($\chi^2 = 20,9$, dl = 3 et $p = 0,0001$).

Tableau 3 : Taux d'infection et densités oocystiques par moustique infecté à J7 en fonction du génotype

Indices d'infections	Catégories de génotypes			
	AA	AC	AS	CC
Taux d'infection (%)	17,8	25,5	24,1	32,6
Densités oocystiques	7,7 ± 1,2	5,7 ± 0,6	9,03 ± 1,17	9,14 ± 0,6

Pour chaque moustique ayant pris un repas sanguin sur les sujets porteurs d'allèle C, la moyenne parasitaire était de 9,14 ± 0,6 oocystes pour le lot CC et de 5,7 ± 0,6 oocystes pour le lot AC. Cette densité oocystique variait de 7,7 ± 1,2 à 9,03 ± 1,17 oocystes chez les moustiques ayant pris du sang sur les sujets AA et AS respectivement (tableau 3). De façon générale, l'analyse statistique par le modèle univarié a indiqué que le nombre d'oocystes à J7 chez les moustiques infectés varie significativement en fonction de l'origine du repas sanguin, et par conséquent du génotype de l'hémoglobine ($F_{54,4} = 33,5$ et $P = 0,0001$).

V.2.2. Influence de l'allèle C sur les indices d'infectivités

Tableau 4 : influence de l'allèle C sur la prévalence de moustiques positifs

		Groupes		
		AA	AS	AC+CC
Négatif	Effectif	726	858	1615
	Prevooc(%)	80,4%	78,2%	73,8%
Positif	Effectif	176	239	576
	Prevooc(%)	19,5%	21,8%	26,2%
Total/génotype		902	1097	2191

Lorsqu'on s'intéresse à l'allèle C plus spécifiquement, la prévalence de moustiques positifs à J7 était statistiquement plus élevée chez l'allèle C (AC+CC) 26,2% par rapport au génotype AA (19,5%) [Comparaison AA vs. (AC+CC) : $\chi^2 = 15,9$; $df = 1$; $P = 0,001$] et AS (21,8%) [AS vs. (AC+CC), $\chi^2 = 7,9$; $df = 1$; $P = 0,005$] (tableau 4). Ces résultats indiquent que l'allèle C (AC+CC) a une influence significative sur la prévalence de moustiques positifs. Partant du nombre de moustiques positifs (991), la densité oocystique à J7 était plus élevée pour le génotype AS, 9,03 (17,812) que pour le génotype AA et l'allèle C (AC + CC) soit respectivement 7,72 (15,634) et 7,65 (11,047). Contrairement à la prévalence de moustiques positifs, l'allèle C n'influence pas la densité oocystique ($P > 0,05$). Pour confirmer les résultats

obtenus au cours de l'infestation naturelle des moustiques, nous avons également employé la technique d'infestation artificielle.

V.3. Infections expérimentales

Après avoir examiné le degré d'infection chez les moustiques sauvages ayant pris un repas sanguin directement sur les sujets porteurs de génotype CC, AC, AS et AA, nous avons effectué des infections expérimentales au cours desquelles 4 à 6 millilitres du sang de ces individus ont été donné aux moustiques à travers une membrane.

V.3.1. Variation du taux d'infection en fonction du génotype. Tous les moustiques examinés dans ce volet expérimental ne sont que des *Anopheles gambiae* élevés en insectarium et qui n'ont jamais été en contact avec l'homme. Au total 2172 moustiques ont été disséqués à J7 après l'infection. Le nombre de moustiques disséqués dans les quatre groupes (AA : 573, AC: 586; AS: 439 et CC : 574 moustiques disséqués) n'étaient pas significativement différents ($p= 0,76$). Donc la sensibilité de détection de l'infection et la précision des pourcentages de moustiques infectés ou des moyennes d'oocystes, étaient identique dans chaque groupe (AA, AC, AS ou CC).

Des moustiques disséqués, seulement 97 ont été positifs (présence d'oocystes) 7 jours après l'infestation. La prévalence moyenne de moustiques positifs était significativement plus faible pour le génotype AA (1,4% de moustiques infectés) par rapport aux moustiques ayant pris du sang prélevé chez les sujets de génotypes AC (5,5%) ($\chi^2 = 14.4$, $dl = 1$, $p < 0.01$), AS (6,2%) ($\chi^2 = 16.8$, $dl = 1$, $p < 0.01$) et CC (5,2%) ($\chi^2 = 13.2$, $dl = 1$, $p < 0.01$). En considérant uniquement les moustiques infectés à partir du sang des individus porteurs d'allèle C (AC+CC), la prévalence moyenne était de 5,3% de moustiques infectés. Aucune différence significative n'a été observée en comparant les moyennes de moustiques infectés entre les lots ayant pris du sang sur les porteurs d'Hb S et C (tableau 5). Ces résultats semblent indiqués que le génotype de l'hémoglobine pourrait influencer l'infectivité de l'hôte pour les moustiques. En effet, la comparaison de la prévalence de moustiques infectés entre les lots de moustiques gorgés sur du sang des sujets AA et la prévalence cumulée des lots infectés à partir du sang des autres génotypes montre que les mutations affectant la chaîne bêta de l'Hb augmenteraient significativement le taux d'infection en fonction du génotype ($P < 0,05$) (tableau 5). L'analyse statistique par le modèle de régression logistique montre que cette influence est significative (Odd ratio = 21,7 ; $ddl = 3$, $P < 0,05$).

Tableau 5 : comparaison multiple entre les génotypes hémoglobiques

Comparaisons	Khi carré (χ^2)	dl	P
AA vs AS	16,8	1	0,0001
AA vs AC	14,4	1	0,0001
AA vs CC	13,2	1	0,0001
AA vs (CC+AC)	15,4	1	0,0001
AC vs CC	0,31	1	0,89*
AS vs CC	0,4	1	0,58*
AS vs AC	0,22	1	0,68*
AS vs (CC+AC)	0,39	1	0,5*

* NS = Non Significatif

V.3.2. Distribution de l'intensité de l'infection en fonction du génotype. La moyenne des oocystes par moustique infecté par les sujets AS était supérieure (7,54 +/- 1,427) à la moyenne des oocystes par moustique infecté par les sujets AC (2,78 +/- 0,356), CC (2,73 +/- 0,412) et AA (1,13 +/- 0,125). La moyenne d'oocystes par moustique infecté sur les sujets AS était 5 fois supérieure à celle des moustiques infectés par les sujets AA et que celle des moustiques infectés par les sujets AC et CC était 2 fois supérieure à celle des moustiques infectés par les sujets AA (figure 13).

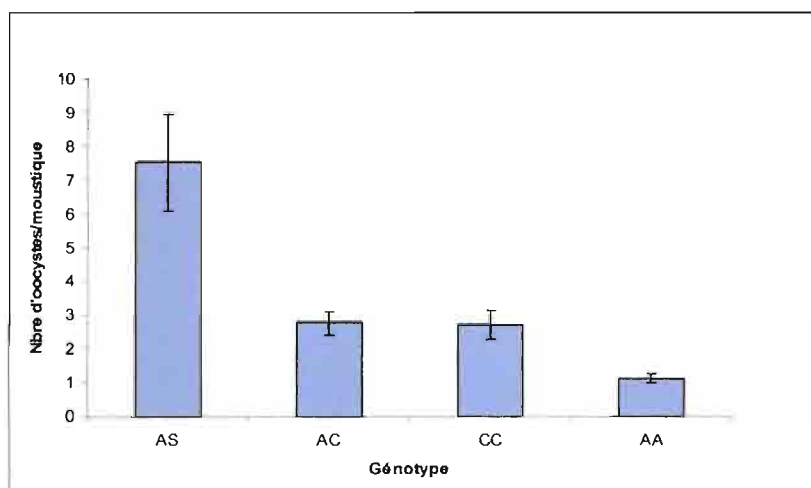


Figure 13 : Distribution de la moyenne oocystique par moustique infecté en fonction du génotype

D'une manière générale, la comparaison par le modèle général univarié avec l'intensité de l'infection comme variable dépendante et le génotype comme variable indépendante, a permis de mettre en évidence une variation statistiquement significative ($F_{2167,4} = 26,5$ et $P = 0,001$) de l'intensité de l'infection chez les moustiques ayant pris du sang issu des sujets de génotypes différents. Comme pour les taux d'infections (pourcentages moyens de moustiques infectés), ce résultat suggère que le génotype de l'hémoglobine influencerait les densités parasitaires (nombre moyen d'oocystes) par moustique infecté.

VI. DISCUSSION

Les facteurs génétiques humains jouent un rôle principal en déterminant la résistance/susceptibilité aux maladies infectieuses (Hill, 2006). Quant au paludisme qui représente une force sélective importante dans l'évolution récente de l'Homme, des variantes protectrices d'érythrocytes ont été décrites (Agarwal *et al.*, 2000), mais il est inconnu si le contexte génétique pourrait également influencer sur la capacité de l'hôte à transmettre des pathogènes. La présente étude a été effectuée dans la localité de Soumouso afin de déterminer si l'hémoglobine C ($\beta 6\text{Glu} \rightarrow \text{Lys}$) et l'hémoglobine S (HbS, $\beta 6\text{Glu} \rightarrow \text{Val}$), en plus de leur protection connue contre le paludisme (Modiano *et al.*, 2001; Allison, 1954; Hill *et al.*, 1991), influenceraient également la transmission du *Plasmodium* de l'homme aux moustiques, où le paludisme sévit de façon endémique.

Des investigations génétiques impliquant un total de 3739 habitants de Soumouso ont été effectuées. Une étude antérieure dans la même localité avait trouvé une proportion de sujets de génotypes "CC" de 2% (Devoucoux *et al.*, 1991). Comme on pouvait s'y attendre, nous avons observé que le génotype "CC" est faiblement représenté (1,6%), confirmant ainsi la rareté de ce génotype telle que observée également dans d'autres sites géographiquement distincts (Agarwal *et al.*, 2000 ; Modiano *et al.*, 2001).

Les résultats des enquêtes parasitologiques indiquent que *P. falciparum* et *P. malariae* sont les 2 principales espèces rencontrées à Soumouso. Les indices plasmodiques asexués de *P. falciparum* sont compatibles avec un niveau hyperendémique. En effet, la prévalence moyenne de *P. falciparum* chez les enfants de 0-10 ans est de 62,9% (tableau 2). Cette prévalence diminue avec l'âge, mais reste encore importante chez les sujets > 25 ans (34,1%). La densité moyenne des formes asexuées (trophozoïtes) est plus élevée chez les enfants de moins de 10 ans et diminue avec l'âge. Mais on observe encore une prévalence d'environ 5% de fortes charges parasitaires chez les sujets de plus de 25 ans. Les prévalences

et les densités parasitaires plus élevées chez les enfants en bas âge seraient dues à leur susceptibilité face aux épisodes palustres faisant d'eux la frange d'âge la plus vulnérable (Bonnet *et al.*, 2002). Cette susceptibilité pourrait s'expliquer par le fait que l'acquisition de l'immunité naturelle contre le paludisme est très lente chez les humains et s'acquiert avec le temps. Les prévalences et densités faibles chez les adultes s'expliqueraient par la présence d'une immunité acquise progressivement en situation d'exposition continue au *Plasmodium* (Happi *et al.*, 2004). Par ailleurs, la présence encore de fortes charges de l'infection chez les sujets âgés traduit une lente acquisition de l'immunité protectrice. L'indice gamétoctaire est de 10,2% chez les 2-9 ans, et diminue avec l'âge. Ceci est à mettre en relation avec les densités parasitaires asexuées, sources de gamétoctes.

Selon toute évidence pendant les mêmes enquêtes parasitologiques, nous avons observé des prévalences élevées de porteurs de gamétoctes chez les sujets portant l'allèle C de l'hémoglobine (CC ou AC). Contrairement aux sujets AS présents dans notre zone d'étude, nous avons en effet observé une forte prévalence de porteurs de gamétoctes chez l'HbC et 45% de ces individus avaient une densité gamétoctaire plus élevée comparée à ceux des génotypes de l'Hb AA ($P=0.008$) et de l'Hb AS ($P=0.031$) qui ont à peu près le même niveau d'exposition. Ceci indique clairement une tendance significative de la différenciation des parasites asexués/sexués en présence de l'HbC pendant les infections naturelles. Par ailleurs, il faut noter que les indices plasmodiques observés sont relativement plus faibles chez les sujets porteurs d'Hb C et S que chez le génotype AA. Cela laisse supposer une résistance plus élevée pour l'Hb C & S et une morbidité non négligeable pour l'Hb AA. Au sein de la population, nous n'avons pas mis en évidence une différence significative entre les prévalences parasitaires chez les sujets porteurs d'hémoglobines protectrices C et S. Ces résultats confirment les observations faites précédemment par Galaup *et al.* (1985) et par Modiano *et al.* dans la localité de Saponé au nord du Burkina Faso (Modiano, comm. personnel). Nous avons ainsi confirmé que les facteurs génétiques humains, notamment l'HbC jouent un rôle principal en limitant le risque de parasitémie élevée chez les sujets porteurs d'Hb mutante (Agarwal *et al.*, 2000 ; Hill, 2006).

Au cours des enquêtes entomologiques, les individus (tous asymptomatiques) de différents génotypes de l'hémoglobine, sélectionnés au sein des résidents de la zone d'étude, ont été comparés pour leur efficacité à transmettre le parasite de l'hôte vertébré aux vecteurs locaux. Afin d'évaluer l'efficacité de la transmission de parasites de l'hôte vertébré aux vecteurs selon le génotype hémoglobinique, deux approches complémentaires étaient appliquées: (1) une approche *in vivo* basée sur le xenodiagnostic en conditions naturelles à

partir de la faune sauvage d'*An. gambiae* capturée dans les cases abritant chacune soit des sujets d'Hb AA ou des sujets porteurs des variantes protectrices d'érythrocytes (AC, AS et CC) et une approche expérimentale (*in vitro*) qui a consisté à prélever du sang veineux des sujets de génotypes hémoglobiniques différents et à le donner immédiatement à gorger aux moustiques (Tchuinkam *et al.*, 1993, Gouagna *et al.*, 2004). Quant à la première approche, nous avons enregistré des taux d'infection plus élevés quand les moustiques étaient gorgés sur des sujets portant l'HbC (CC ou AC) par rapport à ceux gorgés sur des sujets de l'Hb AA (P=0.00002). Nous n'avons par contre observé aucune différence significative pour des moustiques ayant pris le repas de sang sur des sujets de l'Hb AS comparés à AA (P= 0.114). Ces résultats ont été considérés en tenant compte des moustiques qui auraient pris des parasites lors d'un repas sanguin récent et qui se seraient réfugiés dans les cases (moustiques endophiles). Il est apparu que le taux moyen d'infection et le nombre d'oocystes par moustique infecté ne varient pas en fonction du génotype de l'Hb. Donc on pouvait considérer que la population de moustiques examinés était relativement homogène et les différences observées 7 jours après l'infection étaient précisément dues à l'influence des facteurs génétiques de l'hôte.

En conformité avec les résultats obtenus avec la première approche, l'approche *in vitro* a révélé que les individus porteurs d'Hb C (CC+AC) ont une infectivité accrue comparée aux sujets de l'Hb AA. Par cette même approche, nous avons montré un potentiel nettement plus élevé de transmission également pour les sujets porteurs d'HbS. Collectivement, ces résultats démontrent clairement que les hémoglobines protectrices C sont associées non pas seulement à une grande capacité à héberger les gamétocytes (voir volet parasitologiques), mais qu'elles induisent également une augmentation *in vitro* (en infection expérimentale) et *in vivo* de la transmission de *P. falciparum* de l'hôte humain aux vecteurs. Ces résultats représentent la première démonstration que la variation génétique humaine peut également influencer la dynamique de transmission d'une maladie infectieuse. Quels peuvent être les mécanismes responsables de cette relation ?

Nous ignorons si les mêmes mécanismes génétiques régulant la susceptibilité, et/ou d'autres dispositions génétiques encore inconnues de l'hôte (Rihet *et al.*, 2004), pourraient également influencer la transmission des pathogènes de l'hôte aux moustiques. Si nous considérons que les mutations de l'hémoglobine modifient le milieu biochimique des érythrocytes humaines (Perutz & Lehmann, 1968), où les différentes étapes du cycle biologique de *Plasmodium* lié à la pathogénie et à la différenciation sexuelle ont lieu, il est possible que le même événement moléculaire puisse affecter simultanément les deux

phénomènes. Dans le cas spécifique de l'HbC et l'HbS, les études biochimiques approfondies ont clairement prouvé que ces mutations nécessitent des modifications profondes de l'érythrocyte infecté par *P. falciparum* (Fairhurst *et al.*, 2003 ; Ayi *et al.*, 2004 ; Arie *et al.*, 2005; Fairhurst *et al.*, 2005 ; Tokumasu *et al.*, 2005). Ces modifications ont été interprétées comme une conséquence possible des facteurs impliqués dans le cas de paludisme grave (Friedman, 1978; Pasvol *et al.*, 1978; Fairhurst *et al.*, 2003 ; Cholera *et al.*, 2008). Il est aussi possible que par les mêmes modifications affectant la pathogénie, ou par d'autres modifications encore inconnues des globules rouges infectées, que les mutations de l'Hb C ($\beta 6\text{Glu}\rightarrow\text{Lys}$) et S ($\beta 6\text{Glu}\rightarrow\text{Val}$) pourraient favoriser la différenciation sexuée du parasite. Des études *in vitro* réalisées précédemment à échelle réduite ont suggéré que la production des gamétocytes de *P. falciparum* était accrue pour les parasites à l'intérieur des cellules rouges anormales (Trager *et al.*, 1999). Une autre possibilité tiendrait du fait que l'HbC et l'HbS pourraient soit déclencher des réactions immunologiques particulières, augmentant l'efficacité de la transmission de parasites ou développer une immunité bloquant la transmission moins efficace (Vermeulen *et al.*, 1985).

Le fait que les caractéristiques génétiques humaines influencent l'efficacité de la transmission d'une maladie infectieuse est une nouvelle évidence avec des implications importantes. Sur la base des résultats actuels, on peut affirmer que la transmission du paludisme, sans compter qu'elle peut être déterminée par des caractéristiques écologiques et environnementales (ex. température, l'humidité), socioculturels et économiques, pourrait être également influencée par le contexte génétique de l'hôte. Si nous considérons: 1) la protection élevée de l'HbC contre le paludisme grave en l'absence de coût génétique évident ; 2) le fait que *Plasmodium falciparum* puisse normalement compléter son cycle biologique chez les sujets AC et CC (aucun impact sur les prévalences ou densités de parasites en présence de l'allèle de C) ; 3) la transmissibilité accrue du parasite en présence de l'allèle C; il est surprenant et fascinant en même temps de constater comment par une mutation, une telle évolution du rapport hôte - parasite a pu se mettre en place. Les mêmes hypothèses ne peuvent pas être vérifiées quant à l'adaptation de l'HbS (Modiano *et al.*, 2008), en raison à la fois de la charge génétique plus élevée pour l'hôte, due à la létalité du génotype homozygote SS, et de l'absence de l'impact de cette mutation sur la transmission *in vivo* de parasites.

VII. CONCLUSION

Au terme de cette étude, nous avons déterminé la variabilité de la chaîne bêta de l'Hb dans les différents groupes de familles de la population de Soumouso. Il est ressortit que dans la population de Soumouso l'hémoglobine A était majoritairement représenté par le génotype "AA" avec un pourcentage de 71,9%, suivi du génotype "AC" (19%), "AS" (7,3%) et du génotype "CC" qui était très faiblement représenté (1,6%). En ce qui concerne des études scientifiques sur l'impact du génotype hémoglobinique sur la présentation clinique du paludisme, on peut en attendre des progrès substantiels dans les différents domaines de la *compréhension*, du *diagnostic*, du *traitement* et de la *prévention* de la maladie. L'exploration des indices parasitaires sur l'examen microscopique des gouttes épaisses nous a révélé une relation, bien que faible, entre les prévalences parasitaires et le génotype de l'hémoglobine. Mais en dehors du génotype hémoglobinique l'âge (et donc l'immunité) a une influence significative sur la prévalence et la parasitémie, mais surtout des gamétocytes. Il faut souligner le rôle important que jouent les porteurs de gamétocytes infectant sur la dissémination du parasite de paludisme. Le xenodiagnostic et les infections expérimentales nous ont permis de démontrer que l'infectivité des individus pour les moustiques - révélée par la présence d'oocystes dans l'estomac des moustiques - était fonction du génotype. L'affirmation selon laquelle les individus porteurs d'Hb C (AC + CC), bien qu'étant protégés contre le paludisme grave, augmentent la transmission du paludisme reste à confirmer par des études plus poussées, même si nous avons établi que ces sujets sont dans la plupart des cas nettement plus infectant pour les moustiques par rapport à d'autres individus de génotype différent vivant dans les mêmes zones d'endémie. Les mécanismes susceptibles d'augmenter l'infectivité des gamétocytes en présence d'allèle C sont loin d'être claires ou même prouvés. En tout état de cause, la tranche de la population caractérisée par le génotype de l'HbC pourrait jouer un rôle déterminant, d'une part en favorisant la persistance et la stabilisation du parasite, d'autre part en augmentant le risque de transmission du paludisme au sein de la communauté. Cependant, le succès du passage du parasite chez le moustique étant "plurifactorielle" et très sensible aux variations climatiques et environnementales, la collecte de données environnementales permettra d'évaluer l'impact de facteurs environnementaux favorables sur la transmission homme-moustique du paludisme et d'appréhender l'évolution des maladies génétiques de l'Homme et la transmission du paludisme dans le contexte de son environnement.

En définitive, en plus des études précédentes démontrant une protection conférée par l'HbC et l'HbS contre le paludisme, notre étude souligne un fascinant scénario de co-

évolution entre les Homo sapiens et le parasite responsable du paludisme, *P falciparum*. Par des mutations de l'hémoglobine, un avantage mutuel s'est produit entre le couple hôte-parasite: une résistance plus élevée à la maladie pour l'hôte, et une transmissibilité accrue pour le parasite. Notre étude est une contribution à la compréhension du rôle des facteurs génétiques sur la transmission du paludisme et d'autres investigations futures seront de plus en plus nécessaires pour la détermination des paramètres encore inconnus qui sous-tendent cette relation, leur impact sur le risque et sur l'intensité de la transmission dans les zones où cette hémoglobinopathie est très importante. Ces études pourront permettre de disposer de marqueurs génétiques des populations modulant ou ayant une conséquence sur la transmission du *Plasmodium*.

VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agarwal A., Guindo A., Cissoko Y., Taylor J.G, Coulibaly D., Kone A., Kayentao K., Djimde A., Plowe C.V, Doumbo O., Wellems T.E and Diallo D. (2000). Hemoglobin C associated with protection from severe malaria in the Dogon of Mali, a West African population with a low prevalence of hemoglobin S. *Blood* **96** (7): 2358-2363.
- Alano P. (1991) - *Plasmodium* sexual stage antigens. - *Parasitol.Today* **8**: 199-203.
- Allison A.C. (1954). Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. *Br Med J* **1** (4857) : 290-294.
- Arie T., Fairhurst R.M., Brittain N.J., Wellems T.E. & Dvorak J.A. (2005). Hemoglobin C modulates the surface topography of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Struct Biol* **150** (2): 163-169.
- Ayi K., Turrini F., Piga A., & Arese P. (2004). Enhanced phagocytosis of ring-parasitized mutant erythrocytes: a common mechanism that may explain protection against *falciparum* malaria in sickle trait and beta-thalassemia trait. *Blood* **104** (10): 3364-3371.
- Babiker HA, Abdel-Muhsin AA, Hamad A., Mackinnon MJ, Hill WG, Walliker D. (2000). Population dynamics of *Plasmodium falciparum* in an unstable malaria area of eastern Sudan. *Parasitology* **120** (Pt 2): 105-111.
- Bonnet S., Paul RE, Gouagna C., Safeukui I., Meunier JY, Gounoue R., Boudin C. (2002). Level and dynamics of malaria transmission and morbidity in an equatorial area of South Cameroon. *Trop Med Int Health* **7** (3): 249-256.
- 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.

- Boyd M. F. (1949). Epidemiology of malaria: factors related to the intermediate host. In *Malariaology, Philadelphia*: W. B. Saunders (Editor), I: 551-697.
- Bruce-chwatt L.J. & De Julueta J. (1985). *Essential Malariaology. W. Heinemann med. Books Ltd, London 8*: 166-209.
- Bruce-Chwatt L. J. (1980). *Essential Malariaology. William hainemann Medical Books Ltd. London.*
- Carter R., Kumar N., Quakji I., Good M., Mendis K., Graves P., Miller L. (1988). Immunity to sexual stages of malaria parasites. - *Prog. Allergy 41*: 193-214.
- Cholera R. et al. (2008). Impaired cytoadherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes containing sickle hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A 105* (3): 991-996.
- Clement A.N. (1992). The endocrine system and hormone. In "The Biology of Mosquitoes", Chapman & Hall, New York, 1st ed., pp. 206- 219.
- Collins WE, Sullivan JS, Fryauff DJ, Kendall J., Jennings V., Galland GG, Morris CL.(2000). Adaptation of a chloroquine-resistant strain of *Plasmodium vivax* from Indonesia to New World monkeys. *Am J Trop Med Hyg. 62* (4): 491-495.
- David J. Weatherall, Louis H. Miller, Dror I. Baruch, Kevin Marsh, Ogobara K. Doumbo, Climent Casals-Pascual, and David J. Roberts.(2002). Malaria and the Red Cell. *Nature 415* (6872): 673-679.
- Devoucoux R., Hurpin C., Baudon D., Molez J.F., Roux J.F., Guilloud-Batailles M., Carnevale P. and Feingold J. (1991). Population genetics of abnormal haemoglobins in Burkina Faso, West Africa. *Annals of Human Biology 18* (4): 295-302.
- Enevold A., Alifrangis M., Sanchez JJ, Carneiro I., Roper C., Borsting C., Lusingu J., Vestergaard LS, Lemnge MM, Morling N., Riley E., Drakeley CJ.(2007). Associations between alpha +/- thalassemia and *Plasmodium falciparum* malarial infection in northeastern Tanzania. *J infect Dis 196* (3): 451-459.
- Fairhurst R.M., Fujioka H., Hayton K., Collins K.F., & Wellems T.E. (2003). Aberrant development of *Plasmodium falciparum* in hemoglobin CC red cells: implications for the malaria protective effect of the homozygous state. *Blood 101* (8): 3309-3315.
- Fairhurst R.M. et al. (2005). Abnormal display of PfEMP-1 on erythrocytes carrying haemoglobin C may protect against malaria. *Nature 435* (7045): 1117-1121.
- Feng Z., Hoffmann R.N., Nussenzweig R.S., Tsuji M., Fujioka H. Aikawa M., Lensen T.H.W., Ponnudurai T. & Polog L.G. (1993). Pfs 2400 can mediate antibody-dependant malaria transmission inhibition and may be the *Plasmodium falciparum* 11.1 gene product. - *J.Exp. Med. 177*: 273-281.
- Friedman M.J. (1978). Erythrocytic mechanism of sickle cell resistance to malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A 75* (4): 1994-1997.
- Fry AE., Griffiths MJ, Auburn S., Diakite M., Forton JT., Green A., Richardson A., Wilson J., Jallow M., Sisay-Joof F., Pinder M., Peshu N., Williams TN, Marsh K., Molyneux ME, Taylor TE, Rockett KA, Kwiatkowski DP. (2008). Common variation in the ABO glycotransferase is

- associated with susceptibility to severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Hum Mol Genet* **17** (4): 567-576.
- Galaup B., Robert V., Gazin P., Guillaud D., Baronnat J.P., Devoucoux R., Brandicourt O. et Carnevale P. (1985). Enquêtes paludologiques dans la zone Sahélienne du Burkina Faso en Février et Mars 1983. *OCCGE-Inf* **99** pp. 5- 27.
- Gardner MJ., Shallom SJ., Carlton JM., Salzberg SL., Nene V., Shoaibi A., Ciecko A., Lynn J., Rizzo M., Weaver B., Jarrahi B., Brenner M., Parvizi B., Tallon L., Moazzez A., Granger D, Fujii C, Hansen C et al. (2002). Sequence of *Plasmodium falciparum* chromosomes 2, 10, 11 and 14. *Nature* **419** (6906): 531-534.
- Garrett- Jones C., Shidrawi GR. (1969). Malaria vectorial capacity of a population of *Anopheles gambiae*: an exercise in epidemiological entomology. *Bull WHO* 1969, **40**: 531-545.
- Gentilini M. *Médecine Tropicale*. 5^{ème} ed : Flammarion Science medicine (1993). **928** : 91-122.
- Gouagna LC., Ferguson HM., Okech BA., Killen GF, Beier JC, Githure JI and Yan G. (2004). *Plasmodium falciparum* disease manifestations in human and transmission to *Anopheles gambiae*: A field study in Western Kenya. *Parasitology* **128**: 235-243.
- Graves PM., Burkot TR, R Carter, Cattani JA, Lagog M, Parker J, Brabin BJ., Gibson FD., Bradley DJ., Alpers MP. (1988). Measurement of malarial infectivity of human populations to mosquitoes in the Madang area Papua, New Guinea. *Parasitology* **96**: 251-263.
- 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.
- Halidou Tinto, Lougué Gue Koun, Issaka Zongo, Robert Tinga Guiguemdé, Umberto D'Alessandro and Jean Bosco Ouédraogo. (2008). Chloroquine-resistance molecular markers (Pfcrt T76 and Pfmdr-I Y86) and amodiaquine resistance in Burkina Faso. *Trop Med and Int Health* **13** (2) : 238-240.
- Hamon J., Choumara R., Ricosse J., Baily H & Adam D. (1959). Le paludisme dans la zone pilote de Bobo Dioulasso, Haute Volta. *Cahier de L'O.R.S.T.O.M* No.1.
- Happi C. T., Gbotosho G.O., Sowunmi A., Falade C.O., Akinboye D. O., Gerena L., Kyle D.E., Milhous W., Wirth D.F. and Oduola A.M.J.(2004). Molecular analysis of *Plasmodium falciparum* recrudescence malaria infections in children treated with chloroquine in Nigeria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **70** (1): 20 – 26.
- Hill A.V. (2006). Aspects of genetic susceptibility to human infectious diseases. *Annu Rev Genet* **40**: 469-486.
- Hill A.V. et al. (1991). Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature* **352** (6336): 595-600.
- Holt RA., Subramanian GM., Halpern A., Sutton GG., Charlab R., Nusskern DR., Wincker P., Clark AG et al. (2002). The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* **298** (5591): 129-149.
- <http://astrium.com/maladies:visa09-6.HtIm>

<http://www.fasosanté.net/santé/2007/04/24>

<http://www.plan-burkina.org/spip.php?article178>)

<http://www.who.int/malaria/malariaendemiccountries.html>

- Itano HA., Neel JV. (1950). A new inherited abnormality of human haemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA*. **36**(11) : 613-617.
- Majori G., Sabatinelli G., Coluzzi M. (1987). Efficacy of permethrin –impregnated curtains for malaria vector control. *Med Vet entomology*. **1** : 185-192.
- Mendis K.N., David P.H. & Carter R. (1990). Human immune responses against sexual stages of malaria parasites: Considerations for malaria vaccines - *Int. J. Parasitol.* **20**: 497-502.
- Miller LH., Mason SJ., Clyde DF., Mc Ginniss MH. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks.(1976).The Duffy- blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med*. **295** (6): 302-304.
- Modiano D., Luoni G., Sirima BS., Simporé J., Verra F., Konate A., Rastrelli E., Olivieri A., Calissano C., Paganotti GM., D'Urbano L., Sanou I., Sawadogo A., Modiano G., Coluzzi M.(2001). Haemoglobin C protects against Clinical *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* **414** : 305-308.
- Modiano D., Bancone G., Ciminelli BM, Pompei F., Blot I., Simporé J., Modiano G. (2008). Haemoglobin S and haemoglobin C: 'quick but costly' versus 'slow but gratis' genetic adaptations to *Plasmodium falciparum* malaria. *Hum Mol Genet* **17** (6) : 789-799.
- Mouchet J., Carnevale P., Coosemans M., Julvez J., Manguin S., Richard-Lenoble D., Sircoulon J. (2004). Biodiversité du paludisme dans le monde. *Editions John Libbey Eurotext*, ISBN 2-7420-0452-1 p.428.
- Naotunne T. De S., Karunaweera N. D., Giudice G. Del, Kularatne 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.
- Naotunne T. De S., Karunaweera N., Mendis K. N. & Carter R. (1993). Cytokine-mediated inactivation of malarial gametocytes is dependent on the presence of white blood cells and involves reactive nitrogen intermediates. *Immunology* **78**: 555-562.
- OMS: Paludisme. Rapport de secrétariat. Genève 2005, n°7.
- Oo M., Tin-Shwe, Marlar Than, O'Sullivan WJ.(1995). Genetic red cell disorders and severity of *falciparum* malaria in Myanmar. **73** (5): 659-665.
- Pascal Rihet, Laurence Flori, François Tall, Alfred S. Traoré and Francis Fumoux. (2004). Hemoglobin C is associated with reduced *Plasmodium falciparum* parasitemia and low risk of mild malaria attack. *Human Molecular Genetics* **13** (1): 1-6.
- Pasvol G., Weatherall D.J., & Wilson R.J. (1978). Cellular mechanism for the protective effect of haemoglobin S against *P. falciparum* malaria. *Nature* **274** (5672): 701-703.

- Pertrarca V., Petrangeli G., Rossi P., Sabatinelli G. (1996). Antimalarial campaign program in Ouagadougou (Burkina Faso): The *Anopheles gambiae* complex in the city of Ouagadougou and surrounding villages. *Ann. Ist. Super Sanita*, **22** (1): 189-191.
- Perutz M.F. & Lehmann H. (1968). Molecular pathology of human haemoglobin. *Nature* **219** (5157): 902-909.
- Ponnudurai T., Lensen A.H.W., Van Germert G.J.A., Bensink T., Bolmer M. & Meuwissen J.H.E.Th. (1989). Sporozoïte load of mosquitoes infected with *Plasmodium falciparum*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **83**: 67-70.
- Ponnudurai T., Van Gemert G. J. A., Bensink M. P. E., Lensen A. H. W., Meuwissen J. H. E. Th. (1987). Transmission blockage of *Plasmodium falciparum*: its variability with gametocyte numbers and concentration of antibody. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **81**: 491-493.
- Read A.F., Narara A., Nee S., Keymer A. E. & Day K.P. (1992). Gametocyte sex ratio as indirect measures of outcrossing rates in malaria. *Parasitology* **104**: 387-395
- Robert V. & Boulon C. (2003). Biologie de la transmission homme-moustique du *Plasmodium*. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* **96** (1) : 6-20.
- Robert V., Gazin P., Boulon C., Molez JF., Ouedraogo V. and Carnevale P. (1985). La transmission du paludisme dans une zone de savane arborée et en zone rizicole des environs de Bobo dioulasso, Burkina faso. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.* pp. 201-214.
- Rowe JA., Handel IG., Thera MA., Deans AM., Lyke KE., Kone A., Diallo DA, Raza A., Kai O., Marsh K., Plowe CV, Doumbo OK., Moulds JM. (2007). Blood group O protects against severe *Plasmodium falciparum* malaria through the mechanism of reduced rosetting. *Proc Natl Acad Sci USA.* **104** (44): 17471-17476.
- Ruwende C., Khoo SC, Snow RW, Yates SN, Kwiatkowski D, Gupta S, Warn P, Allsopp CE, Gilbert SC, Peschu N et al. (1995). Natural selection of hemi and heterozygote for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria. *Nature* **376** (6537): 246-249.
- Scherf A., Carter C., Peterson C. & Alano P.(1992). Gene activation of Pfl1-1 of *Plasmodium falciparum* by chromosome breakage and healing: identification of a gametocyte protein with a potential role in gametogenesis - *EMBO* **11**: 2293.
- Sergent E. (1950). Définition de l'immunité et de la prémunition. *Annales de l'institut Pasteur* **79**: 786-797.
- Smalley ME & Brown J. (1981). *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis stimulated by lymphocytes and serum from infected Gambian children. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **75**: 316-317.
- Smalley ME & Sinden RE. (1977). *Plasmodium falciparum* gametocytes: this longevity and infectivity. *Parasitology* **74**: 1-8.
- Smith T., Felger I., Kitua A., Tanner M., Beck HP. (1999). Dynamics of multiple *Plasmodium falciparum* infections in infants in a highly endemic area of Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **93** (1): 35-39.

- Tanner M., Beck HP., Felger I., Smith T. (1999).The epidemiology of multiple *Plasmodium falciparum* infections. I. General introduction. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **93** (1): 1-2.
- Tchuinkam. (1994). Etude du pouvoir infectant des porteurs de gamétocytes de *Plasmodium falciparum* pour *Anopheles gambiae* en zone d'endémie palustre, Yaoundé (Cameroon) - Thèse, p.180.
- Tchuikam T., Mulder B., Dechering K., Stoffels H., Verhave JP., Cot M., Carnevale P., Meuwissen JH., Robert V. (1993). Experimental infections of *Anopheles gambiae* with *Plasmodium falciparum* of naturally infected gametocyte carriers in Cameroon: factors influencing the infectivity to mosquitoes. *Trop.Med.Parasitol* **44**: 271-276.
- Theander TG. (1998).Unstable malaria in Sudan: the influence of the dry season. Malaria in areas of unstable and seasonal transmission.Lessons from Daraweesh. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **92** (6): 589-592.
- Tokumasu F., Fairhurst R.M, Ostera GR, Brittain N.J, Hwang J., Wellems T.E, Dvorak J.A. (2005). Band 3 modifications in *Plasmodium falciparum*-infected AA and CC erythrocytes assayed by autocorrelation analysis using quantum dots. *J Cell Sci* **118** (Pt 5): 1091-1098.
- Trager W., Gill G.S., Lawrence C., & Nagel R.L. (1999).*Plasmodium falciparum*: enhanced gametocyte formation in vitro in reticulocyte-rich blood. *Exp Parasitol* **91** (2): 115-118.
- Vermeulen A.N., Ponnudurai T., Beckers P.J.A., Verhave J.P., Smits M., Meuwissen J.H.E.Th. (1985). Sequential expression of antigens on sexual stages of *Plasmodium falciparum* accessible to transmission-blocking antibodies in the mosquito - *J. Exp. Med.***162**: 1460 – 1476.
- Walsh PS., Metzger DA, Higuchi R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR based typing from forensic material. *Biotechniques.* **10** (4):506-513
- Wambua S., Mwangi TW, Kortok M., Uyoga SM, Macharia AW, Mwacharo JK, Weatherall DJ, Snow RW, Marsh K., Williams TN. (2006). The effect of alpha +/- thalassaemia on the incidence of malaria and other diseases in children living on the coast of Kenya. *Plos Med* **3** (5): e 158.
- www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=305900.
- Ye S., Dhillon S., Ke X., Collins AR., Day IN. (2001). An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.* **29**(17): E88-8.

ANNEXES

ANNEXE 1

BURKINA FASO
MINISTERE DE LA SANTE
IRSS/ CENTRE MURAZ

Enquête de démographie Santé

Fiche d'énumération des concessions de Soumousso

Page.... de.....

Nom de l'enquêteur.....

Date.....

Province

Département

Code village

Quartier

N° concession	N° ménage	Nom Chef concession CC	Nom chef ménage CM	Sexe 1 :M 2 : F	GPS		
					Longitude	Latitude	Altitude

ANNEXE 1

BURKINA FASO
MINISTÈRE DE LA SANTÉ
IRSS/ CENTRE MURAZ

Enquête de démographie Santé

Questionnaire ménage

A- IDENTIFICATION DU MENAGE

Nom de l'enquêteur / _____ /

Nom du superviseur / _____ /

Nom du Chef ménage / _____ /

Province / _____ /

Village / _____ /

Quartier / _____ /

N° concession /.../.../.../ N° ménage /.../.../ N° questionnaire .../...

Résultats de l'entretien			
	Visite 1	Visite 2	Visite 3
Date			
Résultats			

Codes (Résultat)

1 : Mener à bien
2 : Partiellement réalisé

3 : personne absente
4: Refus

B- MEMBRES DU MENAGE

N° de membre	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Noms des résidents											
	Chef										
Ecrire code correspondant	B2 Quelle est la relation de (Nom) avec CM										
RP 1 RA2	B3 Quel est le statut de résidence de (Nom)										
Ecrire code correspondant	B4 De quelle ethnie est (Nom)										
1 M 2 F	B5 De quel sexe est (Nom)										
	B6 Quel est date de naissance ou âge de (Nom)										
1 Sou 2 autre	B7 Quel est le lieu de naissance de (Nom)										
Ecrire code correspondant	B8 Quel est le niveau d'instruction de Nom										
	B9 Quelle est la profession principale de (Nom)										
Ecrire code	B10 Quel est le statut matrimonial de (Nom)										
1.tjrs 2 années	B11 Nombre d'année de résidence dans ce village										
1 oui 2 non	B 12 Nom est-il tombé malade au cours des 4 dernières semaines										
	B 13 De quoi nom a t-il souffert										
1 dispen 2 tradi 3 auto	B 14 où nom s'est-il soigné ?										
	B 15 Qu'est ce que (Nom) a t-il pris										
	B16 Combien (nom) a t-il dépensé au total										
1 imprég 2 simple 3 non	B 17 Est ce que (nom) utilise t-il tjrs moustiquaire										
	B18 Quel est le nom du père biologique de (Nom)										
1 sou 2 autre	B19 Dans quel village réside t-il										
	B20 Dans quel quartier réside t-il										
	B 21 Quel est le nom de la mère biologique de (Nom)										
	B22 Dans quel village réside t-elle										
1 Sou 2 Autre											
	B23 Dans quelle quartier réside t-elle										

Si < 7ans aller à B11

Si non aller à B17

Pas palu aller à B17

Si filiation avec CM fin

Pas Sou allera B21

Pas sou fin

ANNEXE 2 : Composition du mélange réactionnel de la ARMS PCR pour l'allèle C et l'allèle A dans un volume final (Vf) de 10µl/tbe

Réactifs	Concentration	Volume (µl)
Buffer	10X	1
dNTPs	2Mm	1
MgCl ₂	50Mm	0,3
Hbex For	10 µM	0,2
Hbex Rev	10 µM	0,2
arms A-REV	10 µM	0,4
Arms C+BETA C- FOR	10 µM	0,2
Tag Polymérase	5U/µl	0,2
H ₂ O	-	4,5
ADN	-	2
Volume final 10µl		

ANNEXE 2 : Programme d'amplification pour l'allèle C et l'allèle A et la séquence des amorces

Séquence des amorces	Programme d'amplification
Amorces normales :	95°C 5mn
HBext_For 5'-GAGATATATCTTAGAGGGGAGGGC-3'	95°C 50''
HBext_rev 5'-GCCTATCAGAAACCCAAGAGTC-3'	64°C 50''
Amorces allèles spécifiques (nucléotide du 6è codon en rouge) :	72°C 40''
armsC_For 5'-ACCATGGTGCATCTGACTCCTA-3'	} 12cycles, Tm-0,5° à chaque cycle
BETAC-FOR 5'-CATGGTGCACCTGACTCTT-3'	
armsA_rev 5'-AGTAACGGCAGACTTCTC-3'	
	95°C 40''
	58°C 40''
	72°C 30''
	} 25 cycles

ANNEXE 3A : Composition du mélange réactionnel de la PCR simple pour l'allèle S dans un volume final de 10µl/tube

Réactifs	Concentration	Volume (µl)
Buffer	10 X	1
dNTPs	2Mm	1
MgCl ₂	50Mm	0,3
Hbext_For	10µM	0,2
Hbext_Rev	10µM	0,2
Tag polymérase	5U/µl	0,2
H ₂ O	-	5,1
ADN	-	2
Volume final 10µl		

ANNEXE 3B : Programme d'amplification pour l'allèle S et la séquence des amorces

Séquence des amorces	Programme d'amplification
HBext_For 5'-GAGATATATCTTAGAGGGAGGGC-3'	95°C 5mn
	95°C 50''
HBext_rev 5'-GCCTATCAGAAACCCAAGAGTC-3'	64°C 50''
	72°C 40''
	} 12cycles, Tm-0,5°C à chaque cycle
	95°C 40''
	58°C 40''
	72°C 30''
	} 25 cycles
	72°C 7mn

ANNEXE 4 : Composition du mélange réactionnel de la digestion enzymatique avec la Dde dans un volume final de 10µl/tube

Réactifs	Concentration	Volume (µl)
Buffer	10 X	1
BSA	100 X	0,1
Dde	10U/µl	0,3
H ₂ O	-	1,6
ADN	-	7
Volume final 10µl		

NB : La digestion se passe à l'étuve à 36°C durant quatre heures et le contrôle se fait sur un gel d'agarose 1,5%.