



UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE
/ SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE /
CENTRE DE RECHERCHE EN SCIENCES
BIOLOGIQUES ALIMENTAIRES ET NUTRITIONNELLES



CENTRE NATIONAL
DE RECHERCHE ET DE FORMATION
SUR LE PALUDISME (CNRFP) /
LABORATOIRE D'IMMUNOLOGIE / PARASITOLOGIE

THESE DE DOCTORAT UNIQUE

Sur le thème :

Evaluation des facteurs influençant l'immunité bloquant la transmission du paludisme à *Plasmodium falciparum* en zone rurale du Burkina Faso

Présentée par :

André Lin OUEDRAOGO, Maître ès Sciences

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTEUR EN SCIENCES BIOLOGIQUES APPLIQUEES

Option : **BIOCHIMIE ET MICROBIOLOGIE APPLIQUEES**

Soutenue le 13 mars 2008 devant le jury :

Président : Pr. Alfred S. Traoré, Professeur titulaire, Université de Ouagadougou

Membres : Pr. Robert W. Sauerwein, Professeur titulaire, Radboud University Nijmegen, Pays bas
Pr. Aboubakar S. Ouattara, Maître de conférence, Université de Ouagadougou
Pr. Yves Traoré, Maître de conférence, Université de Ouagadougou
Dr. Sodiomon B. Sirima, M.D., PhD, CNRFP, Ouagadougou

Directeur de Thèse: Professeur Aboubakar S. Ouattara

Codirecteur de Thèse: Professeur Robert W. Sauerwein

Année académique 2007-2008

DEDICACES / REMERCIEMENTS

Je dédie ce travail à mon père (in memoriam) et à ma mère.

A ma fiancée Sabine et à toute ma famille.

Remerciements

Tout d'abord, je souhaiterais remercier très chaleureusement mes deux Directeurs de thèse, Professeur OUATTARA Aboubakar Sidiki et Professeur SAUERWEIN Robert W. pour l'opportunité qu'ils m'ont donné d'accomplir ce travail autour d'un thème, qui quoique complexe est passionnant. J'ai acquis beaucoup d'expérience sur diverses facettes du paludisme à savoir la parasitologie des formes asexuées et sexuées, l'immunologie des formes asexuées et sexuées, la biologie moléculaire du parasite ainsi que l'entomologie du paludisme en relation avec le comportement du vecteur, ses forces et faiblesses dans la transmission du parasite.

Au Professeur OUATTARA Aboubakar Sidiki, en plus des cours qu'il m'a prodigués à l'Université de Ouagadougou, nos nombreuses rencontres et discussions m'ont permis de découvrir un homme d'une richesse exceptionnelle, d'une grande simplicité et d'un regard toujours constructif sur mon travail. Sa gentillesse et son dynamisme m'ont beaucoup apporté tout au long de ma thèse et m'accompagneront encore longtemps. Ce fut un travail de longue haleine mais au bout du compte très fructueux. Grâce à sa grande patience et son enthousiasme, je peux aujourd'hui soutenir cette thèse dans la sérénité. Grand merci

Le Professeur Robert W. SAUERWEIN m'a toujours soutenu et encouragé depuis le début de ma thèse. Durant mes séjours à l'Université médicale St Radboud de Nijmegen aux Pays bas, il a mis à ma disposition les moyens nécessaires afin de mener à bien le travail; que ce soit au niveau des analyses de laboratoire ou en ressources humaines. Tout au long de ces années, il a su orienter mes recherches en me faisant participer à de nombreuses conférences et ateliers, il m'a permis de connaître bon nombre de scientifiques travaillant dans le domaine du paludisme et de l'immunité naturelle bloquant la transmission. Homme de grande écoute, sa porte m'a toujours été ouverte pour de bonnes discussions qui m'ont aidé à publier dans des journaux d'impact international, et à avoir sous la main bien d'autres articles en phase de soumission. Passionné par son travail et par ses recherches, il m'a bien communiqué cette passion que je garderai imprimée en moi. Merci Professeur d'avoir cru en moi durant ces années de thèse et merci pour les efforts fournis à mon égard afin que je puisse apporter ma modeste contribution aux défis fixés par mon institution le CNRFP.

Je remercie infiniment le Dr Nadine CUZIN OUATTARA qui m'a beaucoup soutenu dans ma thèse. C'est une personne extraordinaire. Je n'oublierai jamais la confiance qu'elle a eue en moi en me confiant cette thèse et je lui en serai éternellement reconnaissant. Sa patience, sa rigueur et son organisation du travail sont exceptionnelles. Sa disponibilité m'a été précieuse pour mener à bien les activités de collecte de données et la rédaction de cette thèse. Je garderai toujours avec moi son œil critique et son souci d'expliquer clairement les choses. L'amour du travail bien accompli, le sens de la responsabilité, dont j'ai hérités d'elle durant mes trois premières années de thèse resteront précieux pour moi. C'est dommage qu'elle s'est retirée de la recherche sur le paludisme mais cela me fait plaisir de savoir qu'elle est restée dans le domaine de la science et de l'enseignement et j'espère que d'autres étudiants seront aussi inspirés par ses qualités.

Je tiens à remercier vivement le Dr Issa NEBIE qui malgré ses nombreuses occupations au Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme, m'a épaulé et encouragé après le départ de Dr Cuzin-Ouattara. Au CNRFP, Il a été une des premières personnes clés dans la réussite des activités de terrain et de laboratoire de cette étude. Il a su m'écouter, me conseiller et me redonner des forces aux moments difficiles. Son engagement franc dans la

recherche et son contact étroit avec les chercheurs et techniciens dans les activités de laboratoires au CNRFP font de lui un homme plein de qualités et de dévouement. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je suis également très touché de compter le Professeur TRAORE Ives parmi les membres du jury. Je n'ai pas eu la chance d'être son étudiant mais son influence n'en demeure pas moins importante que ce soit par ses cours d'immunologie que j'ai pu lire à travers ses étudiants ou à travers les contacts professionnels que j'ai eus avec lui. Un grand merci à vous qui n'avez pas hésité à être rapporteur de mon travail et à faire partie du jury de thèse.

Toute ma profonde gratitude au Pr. Alfred S. TRAORE, qui m'a donné l'occasion de réaliser ma thèse au Centre de Recherche en Sciences de Biotechnologies Alimentaires et Nutritionnelle de l'UFR/SVT de l'Université de Ouagadougou en collaboration avec le Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme. C'est un homme plein de qualités humaines, pédagogiques et surtout scientifiques que je tiens à saluer. Je vous remercie sincèrement pour vos excellents enseignements depuis mon année de DEA à l'université de Ouagadougou et merci infiniment pour l'honneur que vous me faites d'être rapporteur de cette thèse et une fois de plus comme à mon DEA de présider ce jury.

Cette thèse n'aurait vu le jour sans la générosité de Dr Jan Peter VERHAVE, que je veux vivement remercier. Je le remercie infiniment pour le difficile rôle de coordination qu'il a joué entre les institutions de recherches impliquées dans cette étude. C'est un homme d'une gentillesse inestimable. Je voudrais aussi le remercier d'avoir assez tôt cru en mes capacités et de s'être battu pour que je conduise l'étude dont je suis en charge actuellement. Merci d'avoir fourni tant d'efforts à mon égard lors de mes séjours aux Pays bas. De plus, les conseils qu'il m'a prodigués tout au long de la rédaction de mes articles, ont toujours été clairs et succincts, me facilitant grandement la tâche et me permettant d'aboutir à la production de ce manuscrit.

Ma modeste connaissance du traitement des données et des analyses statistiques est attribuable essentiellement au Dr Sake J de Vlas de l'Université Médicale Erasmus de Rotterdam (Pays bas). Il m'a ouvert sa bibliothèque de statistique, allumé à plusieurs reprises son ordinateur et toujours travaillé à apporter des réponses aux questions que je lui posais. Sincères remerciements

Au Chef de Service Recherche et Formation du CNRFP, le Dr SIRIMA Sodiomon Bienvenue. C'est une personne remarquable que je tiens à remercier sincèrement ici. Il a été à la base de mon initiation à la recherche sur le paludisme au CNRFP en encadrant mon travail de DEA sur les hémoglobinopathies et le paludisme clinique. Ces connaissances acquises durant le DEA ont été utiles pour moi durant mes travaux de thèse et contribuent aujourd'hui à m'éclairer dans la compréhension de la transmission naturelle du paludisme. Je le remercie infiniment pour les précieux conseils et encouragements tout au long de mes dernières années de thèse et l'honneur qu'il me fait en acceptant d'être dans le jury de thèse.

Toute ma profonde gratitude au Dr KOUYATE Bocar, Directeur du CNRFP et au Dr PITROIPA Xavier ex-Coordonateur du CNRFP pour leur assistance.

Merci au Dr SANOGO Edith, elle qui s'est beaucoup donnée pour la réussite des enquêtes entomologiques. Grand merci aux Dr DIALLO Diadier, Dr KONATE Amadou, Dr TIONO Alfred et Dr SAGNON N'Falé d'avoir accepté de partager avec leur petit frère leurs précieuses expériences au cours de ces années de thèse.

Merci à tout le personnel technique du CNRFP en particulier celui du laboratoire d'Immuno-parasitologie, eux qui ont beaucoup contribué d'une manière ou d'une autre à la réussite de cette thèse. J'ai non seulement trouvé auprès d'eux des réponses à mes interrogations, mais aussi de vrais amis. Vous êtes tellement nombreux que je ne citerai pas des noms de peur d'en oublier. Trouver ici toute ma reconnaissance. Merci à M. OUEDRAOGO Karim et à toute l'administration.

Toute ma reconnaissance sincère à l'encontre des populations de l'étude vivant dans les villages de Koumtenga, Tampelga et Logdin de la province du Kourwéogo ainsi qu'aux populations des villages de Poedogo, Niandegain et Tanguin de la province de l'Oubritenga.

Je remercie également tous les membres du Département de Biochimie-Microbiologie (CRSBAN/UFR-SVT) de l'Université de Ouagadougou et particulièrement au Dr BARRO Nicolas pour ses encouragements. Merci beaucoup à Karou pour toutes ces années d'amitié et de soutien moral.

Je n'oublierai pas mon ami et collègue Teun Bousema qui m'a permis d'améliorer mes connaissances statistiques acquises aux côtés de Sake J de Vlas. Merci Teun pour le temps que tu as souvent réinventé pour travailler avec moi à résoudre les énigmes.

Grand merci au Dr Adrian JF Luty qui a récemment rejoint le groupe de recherche du Professeur Sauerwein à Nijmegen mais qui depuis lors m'a permis d'améliorer ma recherche au labo, et la rédaction de mes articles.

Bien entendu, mes connaissances ne seraient pas ce qu'elles sont sans les discussions avec tout le personnel du laboratoire de Microbiologie Médicale de l'Université de Nijmegen, spécialisée dans la recherche sur l'immunité bloquant la transmission du paludisme. J'ai trouvé dans ce laboratoire une ambiance particulièrement favorable pour mener à bien ce travail.

Je remercie particulièrement le Dr Will Roeffen qui m'a accueilli au labo et m'a appris les techniques immunologiques avec le concours de Karina Telleen et Mike Van der Kolk. Merci à Rob Hermsen, Heert Jan, Maria van de Vegte Bolmer et tout le reste du personnel. Merci à mes potes Ben Van Schaijk, Joost Koopman, Meta Roostenberg et aux secrétaires du Pr. SAUWERWEIN qui m'ont toujours facilité les démarches administratives.

Remerciement spécial à Mattew McCall, infatigable à mon égard quand il s'agissait de trouver des solutions aux problèmes inattendus que se soit professionnels ou sociaux sans oublier Petra Schneider qui s'est beaucoup investie pour me familiariser à la technique QT NASBA.

Enfin, et surtout, je tiens à remercier ma famille. En commençant par ma mère qui a toujours cru en moi, m'a toujours poussé et encouragé dans les moments de doutes. C'est d'une importance capitale de ne jamais se sentir seul. Merci Maman.

Ma fiancée Sabine, mes frères et sœurs sont très précieux pour moi. Ils sont et ont toujours été d'un énorme soutien.

A mes amis, qui sont très loin de la recherche scientifique mais très proches dans mon cœur.

Mon cœur va également à tous ceux que je n'ai pas cités ici (qu'ils me pardonnent).

Mille fois merci.

AVANT PROPOS

Ce travail est le fruit d'un programme de recherche intégré entre l'Université de Ouagadougou, le Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme à Ouagadougou, l'Université Médicale Saint Radboud de Nijmegen et l'Université Médicale Erasmus de Rotterdam. Il a été réalisé grâce aux financements de la fondation Néerlandaise pour la Recherche dans les Tropiques (WOTRO).

SOMMAIRE

SOMMAIRE

RESUME

SUMMARY

Introduction générale.....	1
1. Revue bibliographique.....	6
1.1. Paludisme au Burkina Faso.....	7
1.2. Biologie du parasite	9
1.2.1. Stade asexué	11
1.2.1.1 Antigènes de stades asexués.....	12
1.2.2. Stade sexué	15
1.2.2.1. Gamétocyto-genèse	15
1.2.2.2. Gamétogenèse	18
1.2.2.3. Fécondation	18
1.2.2.4. Antigènes de stades sexuels	19
1.3. Immunité naturelle acquise contre le paludisme.....	24
1.3.1. Niveau de transmission et Immunité acquise	24
1.3.2. Immunité cellulaire.....	27
1.3.3. Immunité humorale.....	29
1.3.4. Immunité bloquant la transmission du paludisme	31
1.4. Contrôle de la transmission	35
1.4.1. Facteurs humains	35
1.4.1.1. Utilisation d'antipaludiques	35
1.4.1.2. Le type d'hémoglobine.....	35
1.4.2. Facteurs parasitaires	36
1.4.2.1. Gamétocytémie.....	36
1.4.2.2. Maturité et qualité des gamétocytes	36
1.4.2.3. Sexe ratio des gamétocytes.....	36
2. Matériel et méthodes	37
2.1. Méthodes d'étude.....	38
2.1.1. Site de l'étude	38
2.1.2. Le choix des villages	40
2.1.3. La population de l'étude	40
2.1.4. Types d'études et choix de l'échantillon	41

2.2. Matériel utilisé	42
2.2.1 Matériel biologique.....	42
2.2.2. Matériel technique	42
2.3. Activités de l'étude.....	42
2.3.1. Activités de terrain.....	42
2.3.1.1. Collecte des données entomologiques.....	42
2.3.1.2. Collecte de données parasitologiques et sérologiques	44
2.3.1.3 Mesure de la transmission de l'Homme au moustique : Infection expérimentale de moustiques sur des sujets naturellement exposés au paludisme en zone rurale	45
2.3.2. Activités de laboratoire.....	47
2.3.2.1. Détermination de la densité parasitaire par la microscopie optique.....	47
2.3.2.2. Détermination de la densité parasitaire par la technique QT-NASBA	47
2.3.2.3 Dosage des titres d'anticorps dirigés contre les antigènes de stades asexués et sexués	51
2.4. Considérations éthiques.....	53
2.5. Analyse statistique des données	53
3. Résultats et Discussion	54
3.1. Seasonal patterns of <i>Plasmodium falciparum</i> gametocyte prevalence and density in rural population of Burkina Faso	55
3.2. Age-dependent distribution of <i>Plasmodium falciparum</i> gametocytes quantified by Pfs25 Real-Time QT-NASBA in a cross-sectional study in Burkina Faso	63
3.3. Age-dependent distribution of <i>Plasmodium falciparum</i> gametocytes quantified by Pfs25 Real-Time QT-NASBA in a cross-sectional study in Burkina Faso	69
3.4. Influence de l'âge sur l'infectivité des gamétocytes de <i>Plasmodium falciparum</i> : le vecteur est fréquemment infecté par des gamétocytémies sub-microscopiques.....	82
4. Discussion générale	83
Conclusion générale	104
5. Références bibliographiques	107
Annexes	125

Liste des figures et tableaux

Figures / Tableaux	Descriptions	Page
<u>Revue de la littérature</u>		
Figure 1:	Cycle biologique du <i>Plasmodium</i>	10
Figure 2:	Répartition de quelques antigènes potentiels de <i>Plasmodium falciparum</i>	14
Figure 3 :	Stades de développement sexué de <i>Plasmodium falciparum</i> en culture <i>in vitro</i>	17
Figure 4:	Sélection d'antigènes de <i>Plasmodium falciparum</i> chez les stades sexués.....	23
Figure 5:	Récapitulatif des mécanismes de la réponse immunitaire	34
<u>Matériel et Méthodes</u>		
Figure 1:	Site de l'étude	39
Figure 2:	Réprésentation schématique du processus de l'infection artificielle d'Anopheles .	46
Figure 3:	Processus d'amplification dans la technique QT-NASBA	49
Figure 4:	L'expression du gène <i>Pfs25</i> est spécifique au stade sexué	50
Figure 5:	Principes de l'ELISA : (A) Sandwich; (B) Capture	52
<u>Résultats et discussion</u>		
<i>Article 1</i>		
Figure 1:	A: Rain fall and B: Mean number of bites in 2002 and 2003.....	58
Figure 2:	<i>P falciparum</i> parasite prevalence (A) and density (B)	59
Table1:	Crude (unadjusted) and adjusted effect of season on gametocyte	60
<i>Article 2</i>		
Figure 1:	Parasite prevalence calculated by QT-NASBA and microscopy	65
Figure 2:	Parasite densities measured by QT-NASBA and microscopy.....	66
Table1:	Effect of asexual parasite density on age distribution of gametocyte carriage and gametocyte density measured by QT-NASBA	66
<i>Projet d'article 1</i>		
Figure 1:	Taux d'inoculation entomologique dans les deux zones du site de l'étude.....	76
Figure 2:	Prévalence et densité parasitaire en fonction du niveau de transmission	77
Figure 3:	Prévalence des immunoglobulines G en fonction du niveau de transmission	78

Figure 4: Prévalence des immunoglobulines en fonction de la saison.....78

Tableau 1: Paramètres immunologiques et parasitologiques en fonction du niveau de transmission et de la saison.....79

Projet d'article 2

Tableau 1 Infectivité des gamétocytes en relation avec les gamétocytes et les anticorps anti Pfs230.....91

RESUME / SUMMARY

Résumé

Les stades sexués (gamétocytes) de *Plasmodium falciparum* ne provoquent pas de manifestations cliniques du paludisme mais sont responsables de la transmission du parasite de l'homme au vecteur moustique. Des anticorps humains anti- gamétocytes sont capables de bloquer la transmission du parasite chez le vecteur et constituent aujourd'hui la part la plus importante de l'immunité bloquant la transmission du paludisme. Mieux comprendre la dynamique d'une telle immunité en zone endémique est très importante pour la mise au point de molécules vaccinales visant à réduire ou bloquer la transmission du paludisme. La présente étude avait pour objectifs d'évaluer les indicateurs de l'immunité bloquant la transmission du paludisme. Pour cela nous avons mesuré les paramètres susceptibles de moduler la réponse humorale dirigée contre 2 antigènes de gamétocytes candidats au vaccin bloquant la transmission du paludisme. Notre étude s'est déroulée de 2002 à 2005 dans deux zones rurales du Burkina Faso (provinces de l'Oubritenga et du Kourwéogo). Pour déterminer l'endémicité palustre dans les deux zones de l'étude, 2 études entomologiques longitudinales ont été conduites en 2002 et 2003. Cinq études transversales ont été conduites dont trois en 2002 (début, pic et fin de saison humide) et deux en 2003 (saison sèche et fin de saison humide) pour la collecte de données parasitologiques et immunologiques. Une étude transversale a été conduite en fin de saison 2004 pour évaluer l'infectivité des gamétocytes de *P. falciparum*. Sur le plan parasitologique, la microscopie et la technique moléculaire QT-NASBA montrent que le réservoir infectieux du paludisme diminue significativement avec l'âge et augmente avec la saison humide et la densité des parasites asexués. Cependant la technique QT-NASBA et les tests d'infections expérimentales démontrent que les adultes contribuent de manière importante à ce réservoir infectieux vu que l'infectivité des gamétocytes accroît significativement avec l'âge. Du point de vue endémicité, la prévalence de gamétocytes était trois fois plus élevée chez les enfants en zone de forte transmission qu'en zone de faible transmission. Sur le plan immunologique, les anticorps dirigés contre l'antigène Pfs230 du gamétocyte diminuent avec l'âge, et augmentent avec l'intensité de transmission (saison et endémicité) à l'inverse de l'antigène Pfs48/45. Les anticorps dirigés contre les antigènes GLURP et CS des parasites asexués augmentent avec l'âge et l'intensité de transmission et sont associés à de faibles prévalences de gamétocytes. Sur la base de nos résultats nous pouvons conclure que l'âge, la saison et l'endémicité palustre, les gamétocytes, les anticorps anti-Pfs230 et Pfs48/45 et les anticorps anti- GLURP et CS sont des paramètres importants pour prédire l'immunité bloquant la transmission du paludisme. Ces paramètres devraient donc être considérés dans les mesures visant à réduire la transmission du paludisme.

Summary

The sexual stages (gametocytes) of *Plasmodium falciparum* do not cause malaria clinical symptoms but are responsible of the parasite transmission from the human host to the mosquito. Human natural antibodies against *P. falciparum* sexual stages are known able to impede the parasite transmission from human to the vector *Anopheles* and actually constitute the major component of malaria transmission blocking immunity.

A better understanding of the dynamics of such immunity is of great interest for transmission blocking vaccines. The objectives of the present study were to evaluate local parameters that influence the development of malaria transmission blocking immunity. We have evaluated parameters that may modulate the humoral immune response against 2 antigens on the surface of gametocytes which are candidate for transmission blocking vaccine.

Our study was conducted in two rural areas with different levels of endemicity in Burkina Faso (the district of Ziniaré and the district of Boussé). To determine malaria transmission levels in both areas, 2 longitudinal entomological studies were carried out in 2002 and 2003. For parasitological and serological data and particularly data on gametocytes and sexual stage immunity, three cross sectional surveys were carried out in 2002 (start, peak and end of the wet season) and 2 cross sectional surveys in 2003 (dry season and end of wet season). For gametocyte infectiousness, 1 cross sectional survey was carried out at the end of the wet season in 2004. Regarding parasitological aspects, microscopy and the more sensitive QT-NASBA technique show that the infectious reservoir is bigger in youngest children as well as in the wet season and is asexual parasite density dependent. Though, gametocyte prevalence decreases with age, both molecular QT-NASBA technique and the membrane feeding assay demonstrate that adults remain an important component of this reservoir as gametocytes infectiousness significantly increases with age. Regarding immunological aspects, the prevalence of Pfs230 antibodies decreases with age and positively related to transmission intensity. There was no clear age-pattern in the prevalence of Pfs48/45 antibodies that was negatively related to transmission intensity. Antibodies to asexual parasite antigens GLURP and CS were age and transmission intensity related and associated with low asexual parasites densities and low gametocyte prevalence.

From our findings, we conclude that age, season, endemicity, gametocytes, Pfs230 and Pfs48/45 antibodies, GLURP and CS antibodies are important for predicting malaria transmission immunity and therefore should be considered in strategies that aim at reducing malaria transmission.

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Le paludisme est l'une des plus grandes causes de morbidité et de mortalité dans le monde. La maladie causée par un parasite protozoaire du genre *Plasmodium* est transmise par la piqûre de l'*Anopheles* femelle infectée. Au Burkina, malgré l'émergence ou la persistance d'une multitude de maladies transmissibles telles que les infections diarrhéiques et respiratoires ou le SIDA, le paludisme reste à l'échelle nationale l'une des premières priorités du Ministère de la Santé. En effet, l'infection est chaque année la cause de milliers de victimes dont environ 20 000 décès chez les enfants de moins de 5 ans (Ministère de la Santé-Burkina Faso, 2000). En 2001, 41,1% des décès survenus en milieu hospitalier étaient imputables au paludisme (Sirima *et al.*, 2003). L'ampleur des chiffres révèle à quel point le paludisme constitue un frein sensible au développement car, outre les pertes en vies humaines, il est cause de retard scolaire et de baisse de rendement au travail. Des moyens de contrôle efficaces avec pour objectifs la réduction de la morbidité, de la mortalité et de la propagation de la maladie s'imposent urgemment pour un développement durable des pays concernés ou à risque. Les premières stratégies de contrôle du paludisme à l'échelle mondiale ont été menées à travers le programme global d'éradication du paludisme, annoncé en 1955 par la huitième assemblée mondiale de la santé. Ce programme basé sur la lutte anti-vectorielle par des pulvérisations massives d'insecticide tel que le DDT ou le traitement et la chimioprophylaxie à base de la chloroquine fut un succès pour les zones de faible transmission d'Europe et d'Amérique du Nord. Il fut cependant un échec dans les zones tropicales en raison de la forte intensité de transmission, de l'instabilité politique et divers problèmes internes et s'est soldé dramatiquement par l'apparition de souches chloroquino-résistantes ainsi qu'une résistance des moustiques aux insecticides.

Pour faire face à cette situation de plus en plus critique, la conférence ministérielle sur le paludisme adoptait sur proposition de l'OMS à Amsterdam en 1992, le plan global d'action de contrôle du paludisme. Ce plan devait s'étendre de 1993 à 2000 et avait pour but principal la réduction de la morbidité et de la mortalité palustre et conséquemment une réduction des pertes socio-économiques. La stratégie du plan se focalisait principalement sur le diagnostic rapide et le traitement efficace, les mesures de prévention (prophylaxie et réduction du contact homme-vecteur par l'utilisation de matériaux imprégnés d'insecticide), la détection rapide des épidémies afin de les contenir efficacement (WHO 1996). L'Afrique subsaharienne malgré le lourd tribut qu'elle paye au paludisme n'était pas admissible au programme en raison de la précarité de ses infrastructures sanitaires et de communication. Même, si suite à ce plan, des

résultats significatifs ont été obtenus dans la réduction de la morbidité-mortalité pour certaines régions d'Asie et d'Amérique latine (Brésil, Chine, Philippines, Thaïlande, Viet Nam), il n'a pas été démontré une efficacité à long terme, d'autant plus que dans le passé il a été établi que l'utilisation d'antipaludiques et d'insecticides induisait une résistance.

Malgré tous ces efforts, on estime encore aujourd'hui que 40% des populations vivant en régions tropicales et subtropicales sont à risque et que chaque année, plus de 500 millions de personnes souffrent du paludisme dans le monde et environ 2 millions en meurent dont 90% sont des enfants de bas âge vivant en Afrique subsaharienne (WHO 1996). A cela, il faudrait ajouter la recrudescence du paludisme dans des foyers tempérés (Tadjikistan, Turquie, Azerbaïdjan) où il était pourtant maîtrisé à la fin des années 80. Dans ce contexte alarmant, une éventuelle vaccination constituerait de nos jours la mesure de contrôle la mieux acceptée.

En matière de vaccination, des études ont été menées dans le passé et sont toujours actuellement conduites pour le développement de trois types de vaccin :

- Le premier vise à prévenir l'entrée des sporozoïtes dans les hépatocytes ou à inhiber leur développement afin d'empêcher la progression de l'infection (Muller *et al.* 1993).
- Le second dirigé contre les stades asexués érythrocytaires et les toxines paludiques vise respectivement à réduire la parasitémie ou à interférer avec les toxines métaboliques dans le but de limiter les manifestations cliniques de la maladie (Tanner and Alonso 1996).
- Le troisième vise les formes sexuées du parasite. Son action se déroule dans l'estomac du moustique quelques minutes après que celui-ci ait pris son repas sanguin. Les gamétocytes ne sont pas accessibles par les facteurs immunitaires chez l'hôte humain car ils restent inertes dans les globules rouges mais une fois ingérés par le moustique, ils sont libérés dans l'estomac de ce dernier pour féconder. Durant ce processus, les facteurs immunitaires de l'hôte humain (exemple : anticorps bloquant la transmission) vont interférer pour empêcher la formation de nouveaux sporozoïtes et donc interrompent le cycle (Vermeulen *et al.*, 1985; Roeffen *et al.*, 1994; Roeffen *et al.*, 1996).

Les tentatives d'élaboration des deux premiers principes vaccinaux sont restées vaines. Cela se justifierait par la difficulté du problème abordé. En effet la variabilité génétique à laquelle s'ajoute la variabilité antigénique expliquerait à posteriori l'échec de la plupart des essais

vaccinaux contre les stades asexués de *Plasmodium*. L'exemple du mérozoïte de *Plasmodium falciparum* nous aide à comprendre à quel point le problème est complexe. Ce stade du parasite porte à lui seul environs 2000 fractions antigéniques constitutives auxquelles il faut ajouter celles sécrétées ou excrétées (Paloske 1989). De ce répertoire antigénique, on relèverait aussi des antigènes dont les épitopes dominants varient d'une souche plasmodiale à l'autre du fait de leur polymorphisme génétique (diversité antigénique). Au cours d'une infection, ces mêmes épitopes dominants se sont révélés capables de disparaître sous l'effet de la pression immunitaire au profit d'une nouvelle génération de variants (variation antigénique) qui échapperait ensuite à la réponse immunitaire de l'hôte.

Le troisième type de vaccin semble être plus promettant car présente les avantages suivants :

- Contrairement aux gènes de candidats vaccins contre les stades asexués hépatiques et sanguins, les gènes des antigènes candidats au vaccin contre les stades sexués sont très peu polymorphes, leurs variants auraient même des distributions géographiques distinctes (Kocken *et al.*, 1995; Drakeley *et al.*, 1996) et de ce fait sont favorables au développement d'un vaccin efficace et durable pour une zone donnée.
- La charge parasitaire cible du vaccin composée de gamètes et/ou zygotes au niveau de l'abdomen du moustique est très faible donc plus vulnérable comparée à la charge parasitaire asexuée dans le courant sanguin humain.
- C'est un vaccin d'impact communautaire car l'individu vacciné ne constituera pas un réservoir infectieux pour son entourage.
- L'utilisation d'un tel vaccin en zone de faible transmission peut conduire à l'éradication du paludisme alors qu'en association avec d'autres mesures de contrôle en zone de forte intensité de transmission, on réduirait sensiblement la morbidité et la mortalité due au paludisme.
- Un vaccin contre les stades sexués du parasite s'avèrerait original vu que sa probabilité d'induction de la résistance serait exceptionnellement faible.

Cependant, il s'agit d'un vaccin dit altruiste car il ne protège pas l'individu vacciné contre l'infection et ses manifestations cliniques et nécessite d'autres mesures pour protéger le vacciné. L'une des étapes dans le développement de ce principe vaccinal est la connaissance épidémiologique de la réponse humorale naturelle aux stades sexués. La dynamique et les potentialités d'une telle immunité doivent faire l'objet d'études approfondies. Si des études au laboratoire ont pu démontrer par l'utilisation d'anticorps monoclonaux que la transmission du paludisme peut être interrompue (Reiner *et al.*, 1983; Gozar *et al.*, 1998), celles menées sur le

terrain en région endémique pour évaluer la prévalence d'anticorps naturels susceptibles de jouer un rôle fondamental dans cette interruption ont été très peu développées par manque de méthodes adéquates (Graves *et al.*, 1988; Carter *et al.*, 1989; Roeffen *et al.*, 1996). Pour cette étude, nous allons tester et valider de nouvelles méthodes dans le but d'élaborer une base de données parasitologiques et séroépidémiologiques afin de mieux comprendre l'immunité naturelle bloquant la transmission dans des villages burkinabés. La dynamique de l'immunité anti-palustre étant régie par plusieurs facteurs, nous aborderons la question en tenant compte de certains paramètres essentiels susceptibles de l'influencer (paramètres parasitologiques, immunité anti-stades asexués, saison de transmission, âge des individus et l'endémicité palustre). Enfin, nous évaluerons, par des infections expérimentales de moustiques, la capacité de sérums d'individus vivant dans des villages burkinabé à bloquer la transmission du paludisme. Le présent travail tire son originalité du fait qu'il constitue une étude pionnière dans le domaine de la recherche sur l'immunité bloquant la transmission du paludisme au Burkina Faso.

Objectifs de l'étude

- Objectif général

Evaluer les indicateurs de l'immunité bloquant la transmission dans des villages burkinabé d'endémicités différentes

- Objectifs spécifiques

- Déterminer la prévalence des stades asexués et sexués de *Plasmodium falciparum* en fonction de l'âge et de la saison chez des sujets vivant en zone de transmission palustre
- Evaluer la prévalence des stades sexués sub-microscopiques de *Plasmodium falciparum* par la technique sensible QT-NASBA chez des sujets vivant en zone de transmission palustre
- Evaluer la prévalence des anticorps anti-stades sexués, asexués et pré érythrocytaires de *Plasmodium falciparum* en fonction de la saison et de l'endémicité chez des sujets vivant en zone de transmission palustre
- Evaluer l'infectivité des gamétocytes de *Plasmodium falciparum* par infections expérimentales chez des sujets vivants en zone de transmission palustre

CHAPITRE 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Revue bibliographique

1.1. Paludisme au Burkina Faso

Au Burkina, le paludisme constitue l'un des premiers motifs de consultation médicale et est responsable de 10% des décès enregistrés chez les moins de 10 ans.

En fonction des conditions géographiques et climatiques, trois faciès épidémiologiques peuvent être distingués (Ministère de la Santé, Burkina Faso, 1993).

En zone de savane, entre la frontière ivoirienne et le 14^{ème} degré de latitude Nord, on observe une transmission permanente ininterrompue. Les indices plasmodiques relevés chez les enfants de 2-9 ans vont de 50 à 70% traduisant respectivement un paludisme hyper endémique en saison sèche et holoendémique en saison pluvieuse.

En terrain sahélien la transmission est instable. Elle est dispersée selon le contexte géo climatique conduisant à un paludisme holoendémique autour des points d'eau et hypo endémique sur les axes de déplacement.

Dans la zone urbaine, le paludisme reste méso endémique avec des indices plasmodiques compris entre 10 et 40%.

La transmission du paludisme est saisonnière au Burkina, superposable à la présence des gîtes larvaires du vecteur, lesquels apparaissent et disparaissent en fonction des saisons. Les principaux vecteurs de la transmission sont le complexe *Anopheles gambiae* et le groupe *Anopheles funestus*, le dernier contribuant à un moindre degré (Costantini *et al.*, 1999). Ces deux complexes constituent le système vectoriel le plus efficace dans la transmission du paludisme à travers le monde. Ils sont ubiquitaires au Burkina alors que le parasite responsable du paludisme est à 90% *Plasmodium falciparum* et le plus mortel des quatre espèces infectant l'homme. On recense également *Plasmodium malariae* (8%) et *Plasmodium ovale* (2%). *Plasmodium vivax* est quasi absent. Les conditions climatiques dont la température, la pluviométrie et l'humidité permettent une parfaite synchronisation entre la multiplication, la durée de vie du vecteur et la réplication du parasite chez le moustique et chez l'homme conférant à *Plasmodium falciparum* un taux de reproduction exceptionnellement élevé au Burkina comme en Afrique subsaharienne contrairement à ce qu'on observe dans d'autres parties du globe.

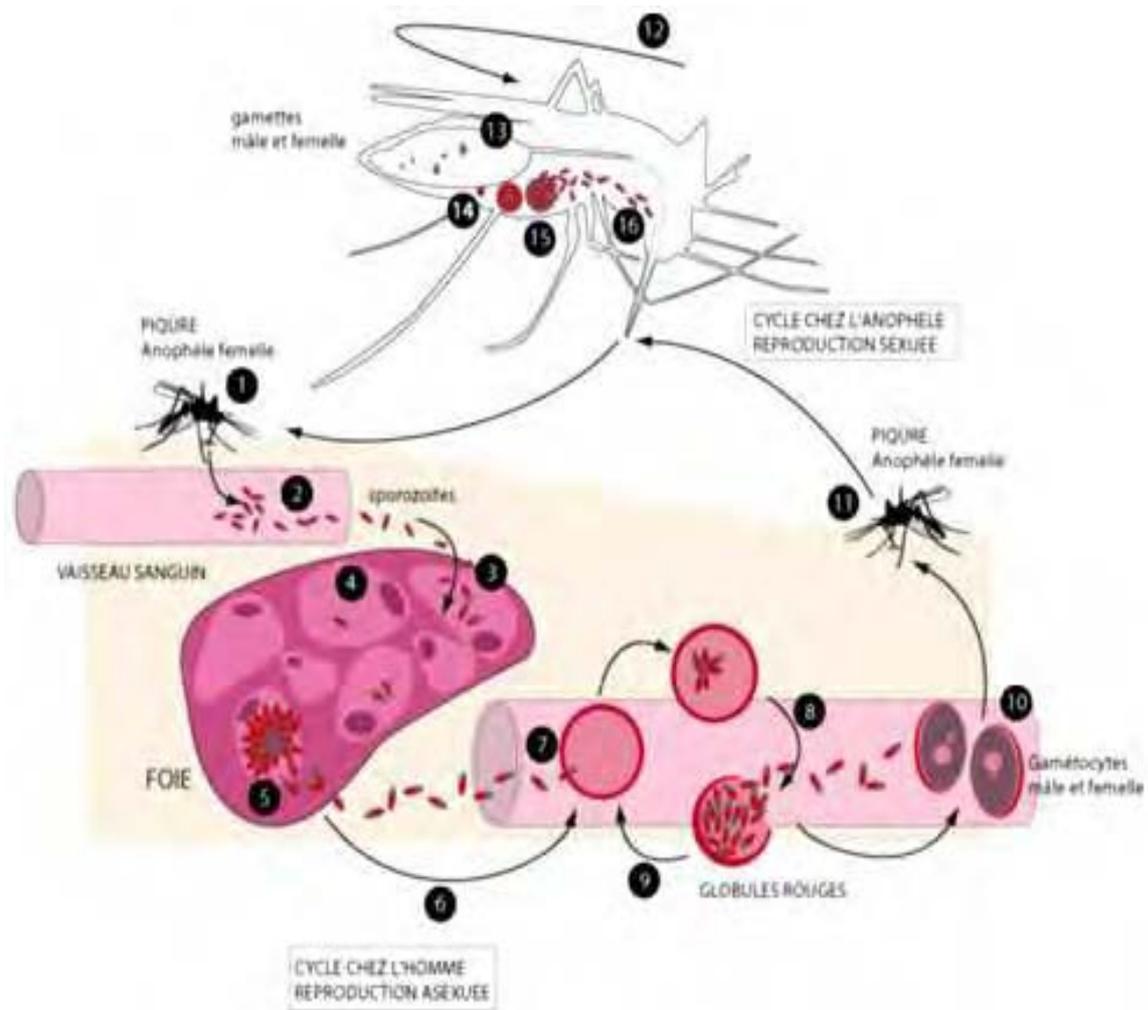
Dans la zone rurale du plateau Mossi (centre du pays), les communautés d'agriculteurs et d'éleveurs constituent la majorité des populations. Elles subissent un paludisme stable hyper à holoendémique en fonction de l'hétérogénéité écologique et des abondances pluviométriques de l'unique saison pluvieuse qui approvisionne les gîtes larvaires. En saison

sèche, la transmission du paludisme est souvent réduite à zéro pour certaines zones où les gîtes s'assèchent rapidement et entraînent une disparition temporaire du vecteur. Le retour du vecteur est toujours assuré par celui de la saison pluvieuse. Le vecteur, se déplaçant entre les localités à gîtes larvaires permanents et non permanents pour sa multiplication et sa survie, pérennise par l'occasion la vie du parasite. Ce dernier, grâce à ses potentialités exceptionnelles, surmonte les défenses immunitaires de l'hôte humain en saison sèche en attendant de redynamiser son cycle vital en saison pluvieuse.

La pauvreté au Burkina Faso a un impact sur le traitement et la capacité de prévenir la maladie au niveau individuel et communautaire. La couverture sanitaire étant très faible au niveau territorial, les zones urbaines restent privilégiées pour les soins de santé faisant de la zone rurale (80% de la population) la zone la plus critique où la maladie est dramatique. Le Ministère de la Santé, dans la recherche de solutions à la pandémie, a adopté à travers le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) un certain nombre de stratégies de contrôle de l'infection lesquelles sont adaptées à la réalité du pays. Ces stratégies émanent du plan d'action global lancé par l'OMS en 1992 (OMS, 1993) et concernent le diagnostic précoce et le traitement efficace, le traitement présomptif des femmes enceintes, l'éducation sanitaire de la communauté et sa participation à la lutte contre le paludisme, et enfin la prévention par l'utilisation des matériaux imprégnés d'insecticide. La coopération entre les institutions de recherche du Ministère de la Santé, du MESSRS et diverses institutions de recherches internationales et sous régionales assure en outre la recherche scientifique dans le but de surveiller l'évolution de la pandémie et d'ouvrir la voie à la mise au point d'éventuels médicaments ou de vaccins. La collaboration du Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme (CNRFP) avec l'Université de Nijmegen au Pays Bas est l'une de ses nombreuses coopérations bilatérales ou multilatérales qui a été lancée au début des années 2000. La présente étude est le fruit de cette initiative.

1.2. Biologie du parasite

Les *Plasmodium* sont des organismes unicellulaires eucaryotes de l'embranchement des *Apicomplexa*, de la classe des *Haemosporidae*, de l'ordre des *Haemosporida*, du sous ordre des *Haemosporididae* et de la famille des *Plasmodidae*. Ce sont des organismes au cycle biologique complexe (Figure 1) qui prennent des formes et des patrimoines biochimiques et antigéniques différents au cours des multiples stades de leur vie chez leurs deux hôtes, l'homme et le moustique.



Piqûre infectante pour l'homme 1.

Le cycle chez l'homme

Sporozoïtes dans le sang 2 avant de parvenir au foie 3.

Dans les cellules hépatiques :

Les sporozoïtes pénétrant dans les hépatocytes et vont y rester "cachés" pour une durée variable, allant de quelques jours à plusieurs années pour certaines espèces 4.

Multiplication asexuée dans les hépatocyte 5.

Mérozoïtes dans le sang circulant 6.

Mérozoïtes dans les globules rouges 7.

Libération de mérozoïtes dans le sang 8.

Cycle intraérythrocytaire 9.

Circulation libre de gamétocytes mâles et femelles dans le sang 10.

Piqûre infectante pour l'Anophèle : Repas sanguin et prélèvement de gamétocytes 11.

Le cycle chez l'Anophèle

Gamétocytes dans le tube digestif du moustique 12 donnant naissance à des gamètes mâles et femelles 13.

Fécondation et formation d'un oocyste (œuf) 14.

Oocyste mature 15.

Sporozoïtes dans les glandes salivaires 16.

Cycle bouclé.

Figure 1: Cycle biologique du *Plasmodium*

(Tirée de http://www.gsk.fr/gsk/votresante/paludisme/mci_cycle.html)

1.2.1. Stade asexué

La transmission naturelle d'une infection à *Plasmodium falciparum* du moustique à l'homme débute lorsque le moustique l'anophèle femelle infectée prend son repas sanguin chez l'homme. Au moment de sa piqûre, il injecte dans le courant sanguin de sa victime un peu de salive contenant un anesthésique et un anticoagulant ainsi que les plasmodies sous forme de sporozoïtes. Au cours de la première heure après l'inoculation, les sporozoïtes vont atteindre et envahir les hépatocytes du foie par le concours d'un ensemble d'antigènes sporozoïtiques (CS et TRAP) et de récepteurs hépatocytiques dont le HSPGs (héparine sulfate et proteoglycanes, Muller *et al.*, 1993). A l'intérieur de l'hépatocyte, les sporozoïtes entament une phase de prolifération asexuée (phase asexuée exo-érythrocytaire unique et asymptomatique) et forment des schizontes extra érythrocytaires (corps bleus) de plusieurs milliers de sporozoïtes.

Après 5 à 7 jours, les schizontes se rompent et libèrent entre 40000 et 50000 mérozoïtes dans le courant sanguin. Ces derniers vont à leur tour envahir les globules rouges (phase asexuée intra érythrocytaire). L'invasion du globule rouge par le mérozoïte est un processus séquentiel complexe. Chaque mérozoïte, long de 2µm, entre de façon aléatoire en collision avec un globule rouge, établit une interaction entre sa membrane filamenteuse et le complexe membranaire glycocalyx-sialoglycoprotéines-glycolipides de l'érythrocyte. A ce stade, le mérozoïte va s'activer et se réorienter pour établir une jonction électrostatique dense entre sa région apicale appelée apex et la membrane du globule rouge. Cette jonction est réalisée grâce à l'intervention de récepteurs parasitaires des micronèmes granulaires de l'apex (PfEBA-175, Pf155/RESA, MSP1) et des récepteurs du globule rouge (glycophorine A et B, déterminant duffy) (Gratzer and Dluzewski 1993). A cette étape, la membrane érythrocytaire est déformée, ce processus est probablement associé au relargage de substances à partir des rhoptries et des micronèmes (Bannister and Mitchell 1989; Sam-Yellowe *et al.*, 1998). La phase de pénétration est caractérisée par la formation d'une jonction annulaire mobile entre le parasite et la membrane de l'érythrocyte (Aikawa *et al.*, 1981). Par un phénomène d'endocytose facilité par des substances parasitaires (surfactants et lipides), le mérozoïte s'engouffre dans le cytosol érythrocytaire où il est isolé dans un compartiment appelé vacuole parasitophore dont la constitution membranaire est probablement d'origine parasitaire et érythrocytaire. A l'intérieur de ladite vacuole, le mérozoïte subit des modifications morphologiques avec la disparition des microtubules sous-pelliculaires et autres organites spécialisés comme les rhoptries pour engendrer la forme en anneau (Aikawa 1971).

L'augmentation progressive en taille de la forme en anneau et la mise en place d'un système vacuolaire intra parasitaire complexe conduit au stade trophozoïte, une cellule uni nucléée de 2-3 μm . Parallèlement, l'hémoglobine de l'érythrocyte migre par pinocytose à l'intérieur de la vacuole parasitophore et termine sa course au niveau de la vacuole digestive du parasite où elle va être utilisée comme source nutritionnelle. Elle y est hydrolysée par des enzymes du *Plasmodium* dont les plasmepsines (I et II) et la falcipaine en hème ferreux (Taramelli *et al.*, 1999). L'hème ferreux est ensuite oxydé en hématine ferrique laquelle se polymérise en β -hématine, pigment malarique à caractère pyrogène. Simultanément à ces réactions biochimiques, le noyau du trophozoïte subit une série de mitoses conduisant à un schizonte mûr de 6 à 24 noyaux (rosace). Lorsque finalement la rosace éclate, le globule rouge chargé perd son élasticité, se lyse et libère de nouveaux mérozoïtes qui envahissent à leur tour de nouveaux globules rouges pour poursuivre le cycle intra-érythrocytaire. Ces stades asexués érythrocytaires responsables de l'érythrocytopathie et par leur virulence antigénique sont responsables de la maladie.

1.2.1.1 Antigènes de stades asexués

La synthèse antigénique chez *Plasmodium* est spécifique au stade de développement quoique certaines protéines soient synthétisées de façon continue. Au cours du développement du stade asexué intra-érythrocytaire, deux pics de synthèse antigénique se produisent. Le premier a lieu entre la 20^{ème} et la 28^{ème} heure au cours de la transition de la forme annulaire au trophozoïte. Le second pic se produit entre la 32^{ème} et la 48^{ème} heure de la schizogonie. Des antigènes de stades hépatiques et érythrocytaires sont aujourd'hui mieux connus et constituent des cibles potentielles d'anticorps neutralisant. Parmi les plus importants (Diagramme 1), nous pouvons citer des antigènes du sporozoïte comme CSP (Circum sporozoïte protein), TRAP (Trombosponding Related Anonymous Protein), SSP (Infected Hepatocyte Sporozoïte Surface Protein), LSA (Liver Stage Antigen) certains de l'apex du mérozoïte comme AMA-1 (Apical Membrane Antigen), EBA-175 (Erythrocyte Binding Antigen-175) et Pf155/RESA (*Plasmodium falciparum*155/Rosetting Erythrocyte Surface Antigen). D'autres sont à la surface du mérozoïte comme MSP1, MSP2, MSP4 (Merozoïte Surface Protein1,2,4), certains de la vacuole parasitophore tels que GLURP (Glutamat Rich Protein), MSP3 (Merozoïte Surface Protein3), SERA (Serin-Rich-Antigen), ABRA (Acid Basic Repeat Antigen) ou ceux à la surface de la membrane érythrocytaire tels que PfEMP1 (*Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1) et Pf332. Deux antigènes ont été particulièrement étudiés ici :

- **La Circum sporozoite Protein (CSP)**

La Circum sporozoite Protein (CSP) et le Trombosponding Related Anonymous Protein (TRAP) sont des protéines présentes dans les micronèmes de l'ookinète et apparaissent ultérieurement à la surface d'autres stades du parasite au cours desquels elles jouent un rôle fonctionnel dans l'invasion cellulaire (Cerami *et al.*, 1992) grâce à leur domaines adhésifs. Des expériences ont montré que la présence des deux protéines est essentielle pour la mobilité de l'ookinète, son passage à travers l'estomac et la transition à l'oocyste (Dessens *et al.*, 1999; Templeton *et al.*, 2000).

La CS est la protéine majoritaire à la surface du sporozoïte. Elle est retrouvée à la surface du schizonte et du mérozoïte hépatique alors qu'elle est absente sur les schizontes et mérozoïtes intra-érythrocytaires. Quarante pour cent de sa structure primaire correspondant à un épitope immunodominant des cellules B est identique entre les espèces. Chez *P. falciparum*, le domaine central de la protéine de la CS contient des séquences répétitives dont environ 40 térapeptides NANP (Asn-Asp-Asn-Pro) et 4 NVDP (Asn-Val-Asp-Pro). Ce domaine central est flanqué à ces extrémités de régions non répétitives contenant des épitopes reconnus par les anticorps mais aussi par les lymphocytes T CD4+ et les lymphocytes CD8+ cytotoxiques (Lopez *et al.*, 2001).

- **La Glutamat Rich Protein**

La glutamate rich protein (GLURP) est présente dans la vacuole parasitophore du schizonte hépatique, du schizonte érythrocytaire et du mérozoïte (Borre *et al.*, 1991). C'est une protéine de 220-kD non transmembranaire (absence de séquence membranaire intégrale comme pour la CS et MSP-1). Elle contient une région répétitive R2 (705-1178) reconnue par les cellules T et B, une région répétitive R1 (489-705) et une non répétitive R0 (94-489) dans sa région N-terminale. Le rôle de GLURP dans la vie du parasite n'est pas encore bien élucidé, cependant la forte prévalence d'anticorps anti-glurp en région endémique stipule que la protéine est hautement immunogène (Borre *et al.*, 1991).

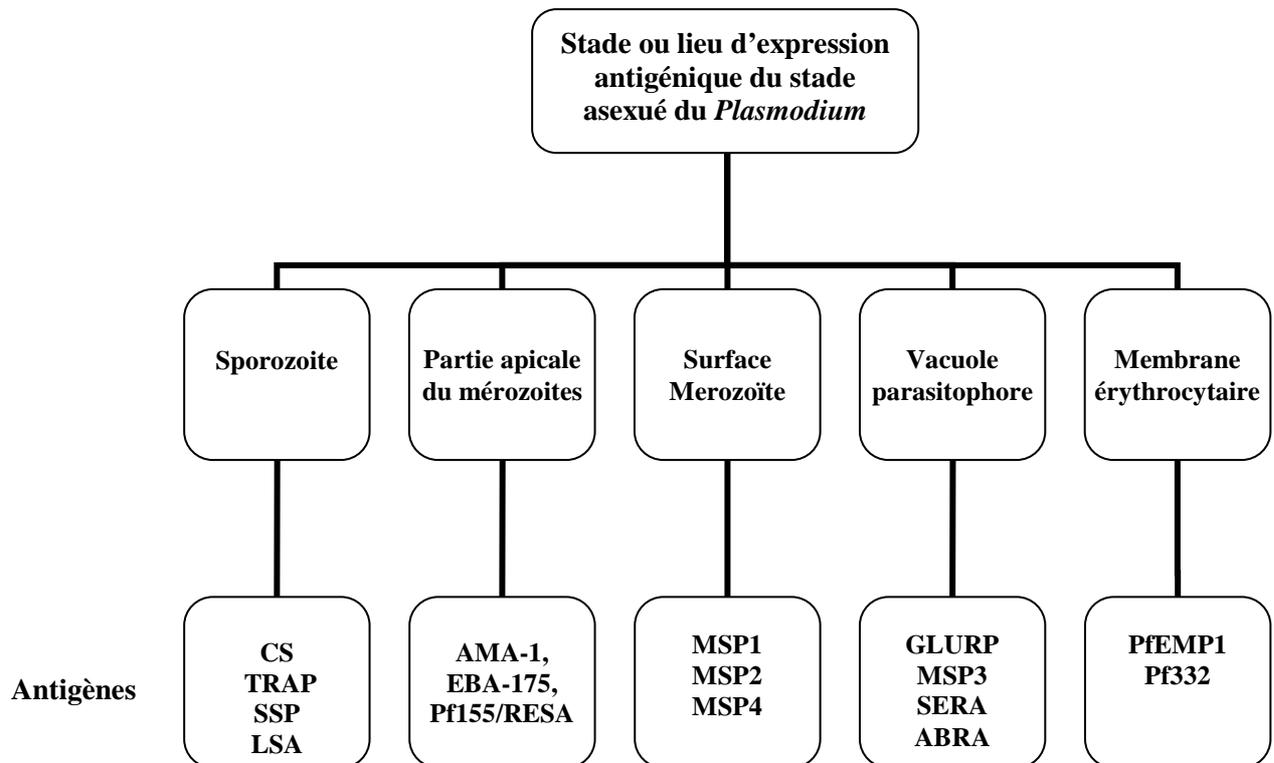


Figure 2: Répartition de quelques antigènes potentiels de *Plasmodium falciparum* en fonction du lieu d'expression de l'antigène ou du stade de développement du *Plasmodium*

1.2.2. Stade sexué

1.2.2.1. Gamétocytogenèse

Une petite proportion des mérozoïtes érythrocytaires ne vont plus former des schizontes mais vont se transformer en gamétocytes selon un procédé différent de celui des familles apparentées au *Plasmodium* (*Leucocytozoidae* et *Haemoproteidae*). En effet, dans le sous-ordre des *Haemosporididae*, l'habileté à continuer soit en stade asexué ou sexué reste un caractère distinctif de la famille des *Plasmodidae*. Les familles *Leucocytozoidae* et *Haemoproteidae* produisent leurs stades sexués dans le courant sanguin de l'hôte vertébré (Garnham 1966) alors que chez *Plasmodium*, un mécanisme dont les détails restent encore mal définis détermine le développement du mérozoïte à l'intérieur du globule rouge en forme asexué (première alternative) ou sexuée (deuxième alternative) (Bruce *et al.*, 1990). Dans la première alternative, le mérozoïte évolue en une forme asexuée mature (trophozoïte érythrocytaire) qui va assurer la phase érythrocytaire multiple et symptomatique.

Dans la seconde alternative, les mérozoïtes intra-érythrocytaires ne se divisent pas mais vont plutôt se différencier en stades sexués (gamétocytes mâle et/ou femelles), précurseurs des gamètes. Les mécanismes impliqués dans le déclenchement de la gamétocytogenèse restent encore non élucidés. Dyer et Day ont récemment proposé un modèle quantitatif regroupant des facteurs hypothétiques (métabolites, hormones, antipaludiques, facteur autocrine, AMPc) qui probablement interviendraient dans l'induction et le taux de conversion des stades asexués en stades sexués (Dyer and Day 2000).

En 2 jours de développement, un réseau sous pelliculaire de microtubules est élaboré et conduit à l'apparition des premiers caractéristiques morphologiques du gamétocyte (Hawking *et al.*, 1971; Sinden 1976). La maturation du gamétocyte passe par 5 stades morphologiquement distincts (Figure 2). Elle a lieu dans la rate et la moelle osseuse. Le gamétocyte est séquestré jusqu'à sa maturation complète avant d'entrer dans le courant sanguin périphérique. Le mécanisme primaire de cette séquestration est la cytoadhérence des érythrocytes contenant les gamétocytes immatures, comme cela a déjà été démontré pour les formes asexuées de *Plasmodium*, faisant intervenir la protéine PfEMP1 à la surface des érythrocytes. Des études ont depuis démontré que les érythrocytes hébergeant les premiers stades de gamétocytes (I, IIa) expriment à leur surface la protéine PfEMP1 (Smalley *et al.*, 1981) laquelle est génétiquement liée à la gamétocytogenèse et est impliquée dans la liaison du globule rouge aux récepteurs endothéliaux (CD36, ICAM1 et sélectine endothéliale) constitutivement exprimés par les microvaisseaux de la moelle osseuse. Cette expression de

PfEMP1 est en accord avec la présence des protubérances (Knobs) à la surface du globule rouge au stade I et IIa du gamétocyte, lesquelles protubérances disparaissent au stade IIb du gamétocyte (Hayward *et al.*, 1999). La maturation au stade IIb, en absence d'adhérence cellulaire va se poursuivre à la faveur d'un micro environnement à faible niveau d'oxyde nitrique (Milon and David 1999) et va durer 8 à 10 jours au cours desquels, des réarrangements importants de la structure cellulaire vont se produire. Au stade V, le gamétocyte repasse dans la circulation sanguine en tant que gamétocyte mature et est dorénavant potentiellement infectieux quoique inerte dans le sang tant qu'il n'est pas ingéré par le vecteur.

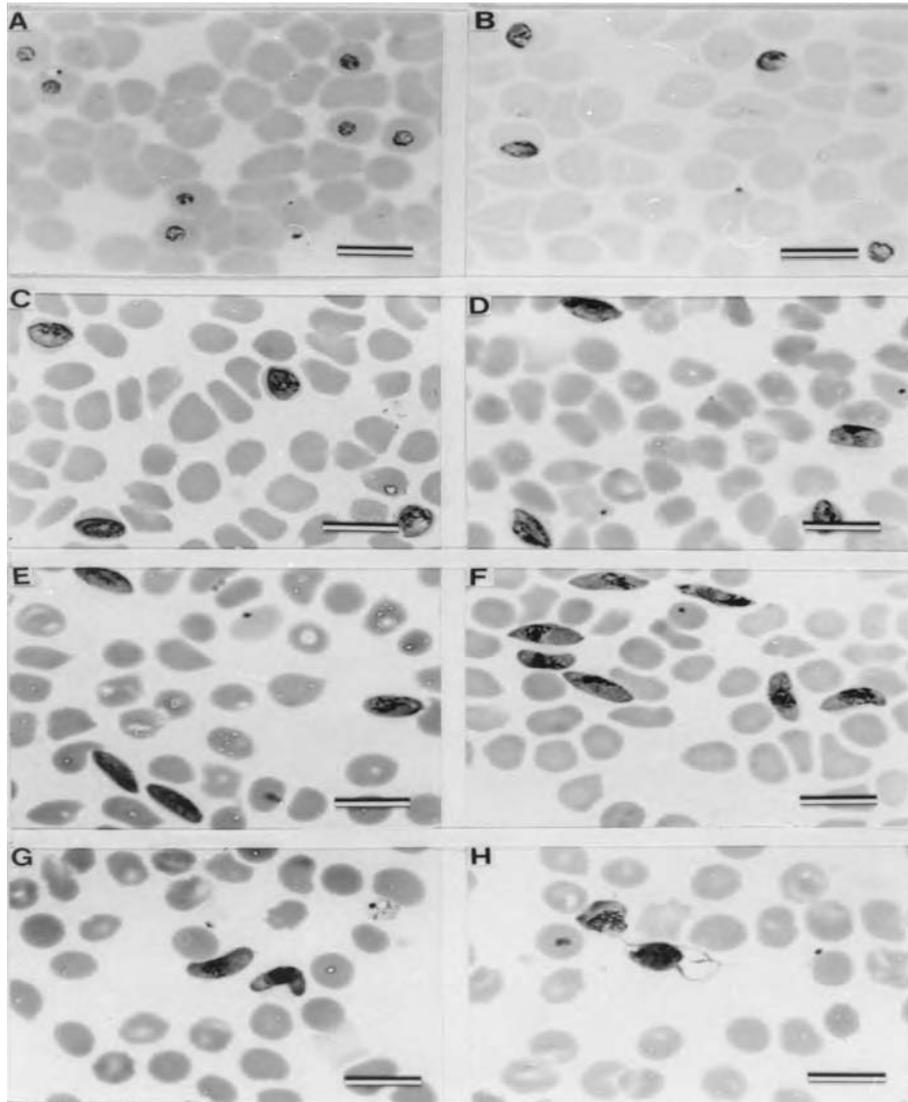


Figure 3 : Stade de développement sexué de *Plasmodium falciparum* en culture *in vitro* après synchronisation. (A) gamétoocyte de stade I (B) gamétoocyte de stage IIA (C) gamétoocyte de stade IIB (D) gamétoocyte de stade III (E) gamétoocyte de stade IV (F) gamétoocyte de stade VA (G) gamétoocyte de stade VB (H) gamète femelle et gamète male exflagellant (Ponnudurai *et al.*, 1986)

1.2.2.2. Gamétogenèse

La transmission du *Plasmodium* de l'homme au moustique se produit lorsque le moustique prend son repas sanguin chez un individu ayant des stades sexués du parasite dans son sang périphérique. A l'intérieur de l'abdomen du moustique, le gamétocyte mâle et le gamétocyte femelle s'activent, émergent de leurs hôtes érythrocytaires, traversent la barrière du sac membranaire du repas sanguin grâce à un enzyme, la chitinase. Le gamétocyte mâle se différencie par mitoses successives en 8 micro-gamètes haploïdes et flagellés (phénomène d'exflagellation). Le gamétocyte femelle évolue en un macro-gamète haploïde sans division nucléaire. C'est la gamétogenèse qui se produit 10 à 15 minutes après le repas sanguin du moustique en réaction aux changements de pH et de température entre les deux hôtes et à des facteurs propres au moustique (Carter and Nijhout 1977).

1.2.2.3. Fécondation

Dans la demi-heure qui suit la gamétogenèse, le gamète mâle va nager activement à la rencontre du gamète femelle pour le féconder. Le zygote ainsi obtenu se développe pour former 20 minutes après un ookynète mobile qui traverse l'épithélium intestinal par l'action d'antigènes tel que la CS et la TRAP, s'enkyste entre la lamelle basale et les cellules épithéliales sous forme d'oocyste. L'oocyste subit une division réductionnelle suivie de mitoses multiples. Entre 8 à 15 jours plus tard (selon l'espèce plasmodiale en cause), l'oocyste mature se rompt et libère des milliers de sporozoïtes qui migrent et s'accumulent dans les glandes salivaires du moustique. Ces sporozoïtes seront injectés à l'homme qui fournira au moustique son prochain repas sanguin et une nouvelle transmission de *Plasmodium* du moustique à l'homme est accomplie.

1.2.2.4. Antigènes de stades sexués

La synthèse des antigènes de stade sexués (Figure 1) est initiée très tôt au cours de la gamétocytogenèse et continue au niveau du moustique. Certains d'entre eux constituent des cibles potentielles d'anticorps bloquant la transmission du paludisme.

- **Antigène Pfs48/45**

L'antigène Pfs48/45 est une dimère de protéines de nature antigénique similaire et respectivement de 48 et 45 kDa. Il est codé par un gène de 1347 paires de base et est exprimé exclusivement durant la gamétocytogenèse. Son ARNm est immédiatement transcrit après l'entrée dans le globule rouge du mérozoïte prédestiné à se transformer en gamétocyte suggérant que Pfs48/45 est synthétisé au stade I du gamétocyte. C'est une protéine hydrophobe non répétitive de 448 résidus d'acides aminés flanqués d'un peptide signal à son extrémité N-terminale. Elle comprend une extrémité C-terminale hydrophobe et 7 sites potentiels N-glycosylés (Kocken *et al.*, 1993). En milieu réducteur, une seule bande de 57 kDa apparaît alors qu'en milieu non réducteur, Pfs48/45 apparaît sous la forme de deux protéines distinctes Pfs48 et Pfs45. La différence de taille observée entre les deux protéines en électrophorèse n'est liée ni à leur charge ni à la glycosilation mais serait due à des constituants non chargés tel que le peptide signal, ou encore serait le résultat d'une modification post-translationnel (Vermeulen *et al.*, 1986; Kocken *et al.*, 1993). Cependant, les deux protéines incorporent de manière identique les monosaccharides, se lient de manière identique aux mêmes anticorps suggérant qu'elles possèdent la même architecture polypeptidique. Pfs48/45 possède une structure tertiaire faite de résidus de cystéines liés entre eux par des liaisons de type disulfure. Cette structure consisterait en 3 domaines dont deux en 4 motifs et un en 5 motifs. L'utilisation d'anticorps monoclonaux contre l'antigène a permis de décrire 5 épitopes aux cellules B (Carter *et al.*, 1990; Roeffen *et al.*, 2001, Targett *et al.*, 1990). Les épitopes I, II et III ont une structure tridimensionnelle alors que l'épitope IV est linéaire. Quant à l'épitope V, il est capable de se lier de manière conformationnelle ou non aux anticorps. Le polymorphisme génétique de Pfs48/45 est très limité, une seule mutation nucléotidique en position 762 conduit soit à une lysine soit à une asparagine en position 254 définissant sur le plan sérologique les épitopes IIa et IIc. Ainsi, l'épitope II est subdivisé en IIa (prédominant en Asie du sud est), IIb et IIc (prédominant en Afrique). Les épitopes IIa et IIc sont les variants, IIb étant génétiquement conservé. En utilisant une gamme d'anticorps monoclonaux, des informations supplémentaires sur l'arrangement spatial de ces épitopes ont été apportées. Les anticorps se liant à l'épitope I et IIc sont inhibés par l'épitope V suggérant

que les épitopes I et II sont proches l'un de l'autre et que l'épitope V possède des constituants propres à ces épitopes (Carter *et al.*, 1990; Targett 1990). En outre, la liaison d'un anticorps à l'épitope III s'avère amplifiée par les deux anticorps dirigés contre l'épitope II. Cela signifie que ces trois épitopes sont si proches dans l'espace qu'ils apportent des changements conformationnels facilitant la liaison d'anticorps spécifiques.

Tous les anticorps monoclonaux dirigés contre les épitopes de Pfs48/45 à l'exception de ceux dirigés contre l'épitope III sont capables de bloquer la transmission au cours des infections expérimentales directes sur membrane artificielle (Vermeulen *et al.*, 1985; Targett 1988). Une étude a démontré qu'un gamète mâle de *P. bergeri* ayant perdu le rôle fonctionnel de Pfs48/45 était incapable d'interagir avec le macro-gamète pour le féconder suggérant le rôle fondamental de P48/45 dans le processus de la fécondation (van Dijk *et al.* 2001).

- **Antigène Pfs230**

La protéine Pfs230 est exprimée comme la protéine Pfs48/45 à la surface des gamétocytes et gamètes de *Plasmodium falciparum*. Elle comprend 14 domaines dont chacun est constitué de 5 motifs (Carter *et al.*, 1995). La plupart des anticorps monoclonaux spécifiques à la protéine la reconnaissent de manière dépendante à sa structure (Read *et al.*, 1994) et réagissent avec les épitopes à la surface des gamètes. Neuf épitopes isolés ont été caractérisés avec au moins 5 épitopes fixant le complément qui sont des cibles d'anticorps bloquant la transmission.

- **Antigène Pfg27**

La protéine Pfg27 est abondamment synthétisée dans le cytoplasme du gamétocyte très tôt au début de la gamétocytogenèse (Lobo *et al.*, 1994). En 1991, Wizel et collaborateurs démontrèrent que des anticorps monoclonaux bloquant la transmission reconnaissent un épitope de Pfg27. Une délétion de Pfg27 conduit à une perte du phénotype sexuel du gamétocyte de *Plasmodium falciparum* (Lobo *et al.*, 1994) et la synthèse de Pfs16 et Pfs230 est empêchée. Cependant, la protéine n'est pas directement accessible aux anticorps car intracellulaire, ce qui remet en cause son choix comme candidat à un vaccin bloquant la transmission du paludisme.

- **Antigène Pfs16**

L'antigène Pfs16 est précocement exprimé dans les 24 premières heures de la gamétocytogenèse. L'expression a lieu dans les jeunes trophozoïtes intra-érythrocytaires mais n'est pas détectable dans les mérozoïtes du schizonte. Ce n'est qu'à partir du stade I gamétocytaire que son expression reprend jusqu'à maturation du gamétocyte. Sa variation

antigénique limitée et sa séroréactivité importante en zone endémique avaient fait de lui un bon candidat vaccin (Carter and Mendis 1991; Moelans *et al.*, 1991). Cependant, aucun anticorps anti-Pfs16 bloquant la transmission du parasite au moustique n'a été décrit. La position de l'antigène sur la membrane parasitophore diminue considérablement son accessibilité par les anticorps dans l'estomac du moustique compromettant son choix comme candidat vaccin.

- **Antigène Pfs25**

Contrairement à Pfs230, Pfs48/45 et Pfs16, Pfs25 est majoritairement synthétisé chez le moustique après la fécondation des gamètes mâles et femelles. C'est le candidat vaccin bloquant la transmission le plus étudié (Barr *et al.*, 1991) et l'infime quantité de protéine exprimée au cours de la gamétocytogenèse n'est pas capable de provoquer une réponse humorale naturelle détectable. C'est un polypeptide de 25 kDa constitué de 217 acides aminés avec 22 résidus cystéines et est exprimé à la surface du zygote et de l'ookinète (Vermeulen *et al.*, 1985). La séquence GPI (glycosyl phosphatidyl inositol) qui ancre la protéine à la membrane est glycosylée par des résidus de mannose et de glucosamine et contient de l'acide palmitique et de l'acide méristique. La protéine disparaît au fur et à mesure de la pénétration de l'ookinète dans la paroi stomacale et au cours de la formation de l'oocyste. Des anticorps monoclonaux anti-Pfs25 ont été reconnus capables d'empêcher la transmission de gamétocytes de sujets naturellement infectés aux moustiques (Mulder *et al.*, 1994). Quoique les mécanismes de blocage de la transmission ne soient pas bien connus, il est reconnu que l'antigène est très immunogène et que l'action de ces mécanismes se situerait dans les étapes de passage de l'ookinète dans la paroi stomacale du moustique.

- **Antigène Pfs28**

Il a une structure proche de celle de Pfs25. Les deux antigènes sont génétiquement liés et ont une différence de taille de 3 kDa. La protéine Pfs28 contient 14 résidus cystéine comme dans le cas d'un domaine EGF (Epidermal Growth Factor). Des anticorps anti-Pfs28 peuvent réduire des infections artificielles avec *P. falciparum* et *P. gallinaceum* (Duffy *et al.*, 1993).

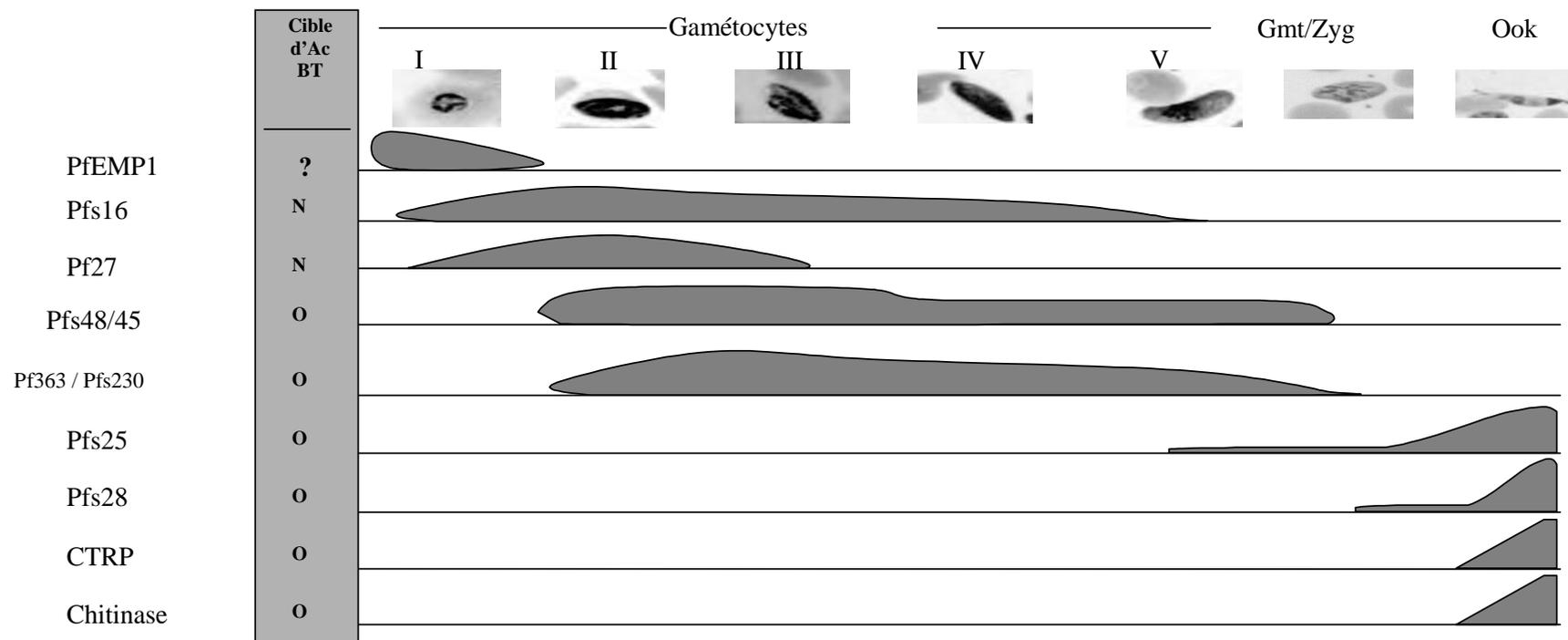
- **Antigène Pfs11.1/2400**

Pfs11.1/Pfs2400 est une protéine riche en glutamate spécifiquement exprimée sur la membrane parasitophore du gamétocyte et du gamète (Quakyi *et al.*, 1989). La caractérisation biochimique et immunologique de l'antigène n'a pas été effective car interagissant avec un

antigène de stade asexué le Pf155/RESA. Les anticorps anti-Pfs11.1 seraient en mesure d'inhiber l'infection du moustique par *P. falciparum* (Feng *et al.*, 1993).

- **La chitinase**

La chitinase est une protéine enzymatique produite par le parasite chez le moustique. Son activité chitinase permet au parasite de traverser le sac membranaire du repas sanguin (Shahabuddin *et al.*, 1993; Vinez *et al.*, 2000). Depuis que l'on a découvert que l'allosamidine, un antagoniste de la chitinase parasitaire, est en mesure d'inhiber le développement sporogonique (Shahabuddin *et al.*, 1993), la chitinase est devenue une cible potentielle de l'interruption de la transmission du paludisme.



Gmt: gamète femelle; Zyg: Zygote; Ook: Ookinete; BT: Bloquant la transmission; N=Non, O=Oui

Figure 4: Sélection d'antigènes de *Plasmodium falciparum* exprimés chez les stades sexués et sporogoniques (Sauerwein and Eling 2002)

1.3. Immunité naturelle acquise contre le paludisme

1.3.1. Niveau de transmission et Immunité acquise

L'immunité naturelle acquise contre le paludisme est capable de procurer à un adulte vivant en zone hyper ou holoendémique une résistance relativement efficace contre l'infection. Pour un adulte vivant en zone hyper ou holoendémique, l'immunité acquise (prémunition) est le produit cumulé d'une longue durée d'exposition aux antigènes d'une variété de souches plasmodiales. Une infection à *Plasmodium falciparum* provoque habituellement des manifestations cliniques chez des individus non immuns de tout âge alors que les adultes vivant en zone endémique et fréquemment infectés par le parasite font rarement des accès palustres. De même, les enfants vivant dans la même zone endémique acquièrent eux aussi une certaine protection contre le paludisme clinique léthal contrairement à un individu n'ayant jamais été chroniquement exposé au parasite. En effet, Binka et collaborateurs constatèrent au Ghana que 5% des enfants ayant subi 2 à 10 épisodes palustres par an mouraient du paludisme (Binka *et al.*, 1994) alors que 28% d'européens adultes non immuns mouraient du paludisme lors d'une expédition menée en Afrique tropicale (McGregor 1993). L'immunité naturellement acquise chez des enfants africains serait donc relativement efficace contre les accès palustres létaux quoiqu'elle soit moins efficace contre les fortes charges parasitaires (Molineaux and Gramiccia 1980; Cattani *et al.*, 1986; Akim *et al.*, 2000; van der Kolk *et al.*, 2003). Chez les adultes vivant dans la même zone, cette immunité est cliniquement et parasitologiquement plus efficace (Molineaux et Gramiccia, 1980) pour être considérée comme un modèle de vaccination. On parlerait cependant d'un modèle pauvre car cette immunité protectrice requiert au moins 10 à 15 ans d'exposition intense et ininterrompue à toute la variété antigénique des souches plasmodiales circulantes (Baird *et al.*, 1998). En plus, une telle immunité n'est pas stérilisante. Elle est même fragile car elle diminue d'intensité et peut finalement disparaître après un long séjour en zone non endémique.

Pour souligner l'importance de la stimulation antigénique variée et répétitive pour le développement d'une immunité naturelle efficace, certaines études ont démontré que les réactions immunitaires croisées dirigées contre différentes souches de *P. falciparum* étaient moins fréquentes chez l'enfant que chez l'adulte vivant dans une même région endémique. Chez l'enfant, elles seraient inefficaces ou monospécifiques alors qu'elles sont intenses avec un large spectre de spécificité chez l'adulte (Marsh and Howard 1986; Aguiar *et al.*, 1992).

Si alors l'établissement d'une telle immunité requiert le contact permanent avec une variété de clones parasitaires pendant une longue période, il a été aussi démontré que la fréquence des souches augmentait avec le niveau de transmission d'où la relation de cause à effet entre niveau de transmission et immunité acquise. Ainsi les fréquences de différents allèles de gènes tels que MSP1 et MSP2 ont été trouvées plus élevées en zone de forte transmission qu'en zone de faible transmission (Babiker *et al.*, 1997; Konaté *et al.*, 1999; Nébié *et al.*, 2003). Nébié et collaborateurs remarquèrent également que le nombre de clones parasitaires en fonction des allèles Th2R et Th3R de la CS était plus élevé chez des enfants non protégés par les rideaux imprégnés d'insecticide (3,4 clones/enfant) que chez les enfants protégés (2,5 clones/enfant) (Nébié *et al.*, 2003).

Cependant, le niveau de transmission bien qu'il soit un facteur important dans le développement effectif d'une prémunition n'est pas sans conséquence chez les enfants en bas âge. Des observations faites sur la morbidité en fonction du niveau de transmission ont montré que l'immunité acquise contre le paludisme se développait lentement en région de forte intensité pendant les deux premières années de la vie de l'enfant occasionnant ainsi un taux de morbidité élevé. Cette immunité deviendrait plus efficace avec l'âge contrairement à des enfants vivant dans une zone de faible transmission. En région de faible intensité de transmission, cette immunité se développe rapidement face à un répertoire antigénique moins complexe par le fait d'infections généralement monoclonales (Babiker and Walliker, 1997 ; Konaté *et al.*, 1999, Nébié *et al.*, 2003). Cette immunité tarderait cependant avant d'être efficace.

En région de forte intensité de transmission, la lenteur observée pour le développement de l'immunité contre le paludisme serait probablement due à un répertoire inadéquat de cellules mémoires ou effectrices de l'enfant (Baird *et al.*, 1998) face à un répertoire antigénique très complexe (Babiker and Walliker, 1997 ; Konaté *et al.*, 1999). D'autres suggèrent une surstimulation antigénique due aux piqûres infectantes répétées entraînant une sorte de phénomène d'apoptose au niveau des cellules T (Singer *et al.*, 2003).

Des études sur la relation entre morbidité et niveau de transmission permettent de mieux comprendre la dynamique de développement de l'immunité en fonction du niveau de transmission. En effet, des enfants vivant dans une zone de faible transmission n'étaient affectés pour la première fois d'une anémie ou d'un paludisme cérébral que tardivement à l'âge de 58 et 102 mois respectivement (Lepers *et al.*, 1990) alors que ceux vivant dans une région de forte intensité de transmission (Kilifi, Kenya) faisaient leur première anémie sévère

ou paludisme cérébral à l'âge de 16,7 et 20,3 mois respectivement (Snow *et al.*, 1997). Par ailleurs, il a été démontré dans une région holoendémique du Nord du Ghana que 25% des enfants âgés de 6 à 24 mois faisaient une anémie sévère en fin de saison de forte transmission contre 2% en fin de saison de faible transmission (Lepers *et al.*, 1990; Koram *et al.*, 2000). Cela suggère un manque d'équilibre entre intensité d'inoculation de l'antigène et développement d'une immunité efficace chez les enfants très tôt après la naissance. C'est ainsi que Singer et collaborateurs en 2003, ont comparé la réponse immunitaire de deux groupes d'enfants âgés de 2 ans et exposés à des niveaux de transmission différente et ont noté une prévalence d'anticorps anti-MSP1-19 plus élevée dans le groupe le moins exposé aux piqûres infectantes. Le phénomène inverse était par contre observé entre les deux groupes d'enfants au fur et à mesure que leur âge augmentait. Cette observation illustre clairement le modèle de réponse immunitaire en zone endémique laquelle se développerait lentement mais efficacement après quelques années d'exposition en zone de forte transmission et inversement en zone de faible transmission c'est-à-dire un développement rapide mais non efficace. Ces observations démontrent le rôle du niveau de transmission dans la dynamique du développement de l'immunité contre le paludisme. Effectivement pour des régions où le paludisme est épidémique ou hypo endémique, il a été démontré qu'il n'existait pas un profil parasitologique net en fonction de l'âge (Baird *et al.*, 1996). Par contre, ce profil parasitologique a été démontré par plusieurs études en zone hyper et holoendémique montrant une réduction significative de la prévalence parasitaire avec l'augmentation de l'âge (Molineaux et Gramiccia 1980; Akim *et al.*, 2000 ; Van der Kolk *et al.*, 2003). Quoique non stérilisante, cette immunité confère aux enfants d'une région endémique une protection clinique alors que chez l'adulte elle permet un contrôle de la charge parasitaire et réduit de façon significative la susceptibilité à la maladie. L'immunité acquise contre le paludisme est la résultante de deux composantes à savoir l'immunité cellulaire et l'immunité humorale.

1.3.2. Immunité cellulaire

L'immunité cellulaire naturelle contre le paludisme a été l'objet de nombreuses études. Les mécanismes immunitaires qui conduisent à la suppression des parasites impliquent plusieurs types de cellules du système immunitaire. On y distingue principalement les lymphocytes CD8⁺ et CD4⁺ ainsi que les lymphocytes T gamma/delta (T $\gamma\delta$) et NK (Natural Killer). Les cellules effectrices comme les macrophages et les monocytes interviennent également dans cette immunité (Figure 4).

Il a été démontré que les CD8⁺ cytotoxiques jouent un rôle important dans l'immunité contre les stades pré érythrocytaires grâce aux molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ainsi, des études ont démontré l'existence d'une spécificité entre lymphocytes T CD8⁺ et antigènes de stade pré érythrocytaires et ont permis la caractérisation d'épitopes T restreints aux molécules du CMH de classe I (Hill *et al.*, 1992; Aidoo *et al.*, 2000). Les lymphocytes T CD8⁺ reconnaissent à cet effet les molécules antigéniques parasitaires associées aux molécules de classe I du CMH présentes à la surface des cellules hépatiques. Activés par les épitopes T parasite, les lymphocytes T CD8⁺ produisent de l'interféron gamma (IFN- γ) lequel induit à son tour la production de monoxyde d'azote (NO) par les hépatocytes et les macrophages conduisant à la lyse des hépatocytes infectés par *Plasmodium*. De plus, le transfert de lymphocytes T CD8⁺ d'une souris immunisée à une souris naïve a montré que l'immunité protectrice contre le paludisme impliquait les cellules T CD8⁺ contre les stades pré érythrocytaires (Weiss *et al.*, 1988).

L'action cytotoxique directe des cellules T CD8⁺ sur les stades érythrocytaires est encore mal connue et serait probablement limitée par l'absence de molécule du CMH de classe I à la surface des globules rouges. Cependant, les lymphocytes CD8⁺ de phénotype T2 agiraient comme des immunosuppresseurs ou en tant que cellules anti-inflammatoires par la production de cytokines helper. Ainsi, chez des sujets immuns, des cellules T2 seraient impliquées dans des mécanismes d'immuno-suppression (Mshana *et al.*, 1993). D'autre part, Riley et collaborateurs constatent en 1993, que des cellules T CD8⁺ restreintes à l'haplo type HLA-DQ du CMH de classe II proliféraient en présence de MSP1, une protéine à la surface du mérozoïte.

Les expériences chez la souris ont par ailleurs montré que les lymphocytes T CD4⁺ sous l'effet de la stimulation antigénique parasitaire se différencient en deux sous populations lymphocytaires Th1 et Th2 de fonctions distinctes. Ces sous populations relarguent chacune des cytokines qui leur sont spécifiques et sont impliquées dans des mécanismes différents. Les

cellules Th1 produisent l'interleukine 2 (IL-2), l'INF- γ et de la lymphotoxine. Elles sont les premières à déclencher la réponse immunitaire à médiation cellulaire et l'activation des macrophages. Les cellules Th2 produisent l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-10 et l'IL-13. Celles-ci stimulent la croissance des mastocytes et des éosinophiles et la production d'immunoglobulines par les cellules B. Ainsi l'IL-4 stimule la production d'IgE (Finkelman *et al.*, 1990) et l'IL-10 la production d'IgG, d'IgM et d'IgA. A l'inverse des cellules CD8+, les CD4+ agiraient à la fois contre les stades pré érythrocytaires et érythrocytaires. La sous population Th1 reconnaît spécifiquement des épitopes T de la CSP (Plebanski *et al.*, 1997) et éliminerait les hépatocytes infectées par cytotoxicité dépendante de l'INF- γ et du Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α). De même il a été démontré que le transfert de lymphocytes Th1 à des souris leur conférerait une protection à la réinfection par des sporozoïtes de *P. yoelii* (Del Giudice *et al.*, 1990) alors que l'immunisation de souris avec un peptide synthétique correspondant à un épitope de la protéine SSP2 (TRAP) de *P. yoelii* induit une immunité protectrice stérilisante médiée par les cellules T CD4+ et dépendante de l'INF- γ (Wang *et al.*, 1996). En outre, l'injection de cellules T CD4+ spécifiques de *Plasmodium chabaudi* à des souris déficientes en T CD4+ et T CD8+ permet à ces dernières de contrôler l'infection par élimination des stades érythrocytaires grâce à la production de NO (Gysin 1992; Taylor-Robinson 1995).

Les cellules NK productrices d'INF- γ et les lymphocytes T $\gamma\delta$ producteurs d'INF- γ et de TNF- α jouent aussi un rôle dans les mécanismes anti-parasitaires.

Les cellules NK interviendraient comme cellules effectrices ou régulatrices de l'immunité contre le paludisme. Chez des souris normales et déficientes en cellules NK, il a été démontré que le groupe déficient développait des parasitémies plus élevées (Solomon *et al.*, 1985). Ainsi, les cellules NK activées par l'IL-12 seraient cytotoxiques contre les stades pré érythrocytaires et érythrocytaires par l'intervention directe ou non de l'INF- γ . Cependant, les mécanismes impliquant les cellules tueuses NK ne sont pas encore clairement élucidés.

Quant aux cellules T $\gamma\delta$, elles augmenteraient en nombre considérable chez l'homme ou chez le modèle animal lors d'infections par *Plasmodium*. Ces cellules prolifèrent en présence d'antigènes parasitaires, secrètent le TNF- α , l'INF- γ et l'IL-1 (Goodier *et al.*, 1993) et activent les macrophages dans le même but d'éliminer les parasites. *In vitro*, les cellules T $\gamma\delta$ d'individus n'ayant jamais été exposés au parasite inhibent la réplication des stades érythrocytaires de *P. falciparum* (Elloso *et al.*, 1994; van der Heyde *et al.*, 1995). *In vivo*, leur

transfert à des souris non immunes inhibe le développement des stades pré érythrocytaires (Tsuji *et al.*, 1995).

1.3.3. Immunité humorale

Par plusieurs études qui leur ont été consacrées, il a été montré que les immunoglobulines (Ig) jouent un rôle important dans le développement de l'immunité acquise contre le paludisme.

Cette immunité est de type non stérilisante, s'acquiert après plusieurs années d'exposition au parasite en zone endémique et est dépendante de la souche plasmodiale en cause. Les premiers types d'études pour comprendre le rôle des anticorps dans la protection contre l'infection furent les transferts passifs d'immunoglobulines. D'autres réalisés sur le modèle murin ont clairement établi que les IgG contrôlaient la parasitémie et prévenaient la mort de l'animal (Potocnjak *et al.*, 1980). Par ailleurs, chez l'Homme, le transfert d'IgG purifiées à partir d'adultes immuns africains a permis à des enfants thaïlandais non immuns souffrant d'accès palustre de lutter efficacement contre les manifestations cliniques du paludisme et de réduire sensiblement leur charges parasitaires (Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1990).

D'autre part, Holligdale et collaborateurs (1984) démontrèrent que des anticorps dirigés contre les sporozoïtes inhibent ou réduisent *in vitro* l'infectivité des sporozoïtes. Une étude expérimentale réalisée par Egan et collaborateurs en 1993 a démontré *in vivo* que des volontaires immunisés avec des sporozoïtes irradiés (clone 3D7 de souche NF54) ont été protégés contre l'infection à *P. falciparum* transmise par *Anopheles stephensis* infecté avec des souches de *P. falciparum* homologues aussi bien qu'hétérologues.

Du point de vue de la relation spécifique entre anticorps et antigène dans l'immunité protectrice, des études ont démontré que des anticorps dirigés contre le Pf155/RESA, antigène parasite de la membrane érythrocytaire, sont efficaces dans l'inhibition de l'invasion du globule rouge par le mérozoïte (Wahlin *et al.*, 1984) et protègent *in vivo* des singes *Aotus* (Berzins *et al.*, 1991). Cliniquement, des études récentes ont confirmé l'action d'anticorps dirigés contre les antigènes MSP3 et GLURP dans la protection contre les manifestations cliniques du paludisme (Hogh *et al.*, 1992 ; Dziegiel *et al.*, 1993, Doodoo *et al.*, 2000, Soe Soe *et al.*, 2004).

Sur le plan épidémiologique, une association négative entre charge parasitaire et IgG a été démontrée chez des enfants vivant en zone endémique au Liberia et au Burkina Faso suggérant la capacité des anticorps d'individus vivant en région endémique à inhiber la prolifération de *Plasmodium* (Hogh *et al.*, 1992 ; Nébié *et al.*, 2003). Les anticorps anti-sporozoïtiques sont détectés chez des individus vivant en région endémique, leur taux

évoluant avec l'âge (Nardin *et al.*, 1979) et le niveau de transmission (Singer *et al.*, 2003; Nébié *et al.*, 2003). Au Burkina, Aucan et collaborateurs (2000) ont montré une association négative entre le titre d'anticorps anti-RESA et anti-MSP2 avec des charges parasitaires faibles évoquant une suppression parasitaire dépendante des immunoglobulines.

Une large gamme d'immunoglobulines participerait aux mécanismes de protection, les plus importantes seraient les sous classes cytophiliques IgG1 et IgG3. En effet, les sous classes non cytophiliques (IgG2, IgG4 ou IgM) sont plus abondantes chez des individus cliniquement non protégés contre le paludisme alors que IgG1 et principalement IgG3 sont plus abondantes au sein d'individus protégés (Bouharoun-Tayoun et Druilhe 1992). Cependant, les immunoglobulines n'agiraient pas toutes seules dans la neutralisation des parasites mais coopèreraient avec des cellules immunitaires dont les monocytes ou autres globules blancs s'activant comme cellules effectrices (Groux et Gysin 1990; Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1990). Le mécanisme coopératif entre immunoglobulines et monocytes est le principal mécanisme de neutralisation parasitaire quoique les anticorps soient dans de rares cas capables eux-mêmes d'être des inhibiteurs comme dans le cas des anticorps anti-Pf155/RESA et anti-Pf332 inhibant *in vitro* l'invasion érythrocytaire par le mérozoïte (Ahlborg *et al.*, 1993). Les expériences *in vitro* de l'ADCI (Antibody-Dependent Cellular Inhibition) ont démontré que les anticorps cytophiliques dirigés contre les antigènes MSP3 et GLURP étaient capables d'inhiber l'invasion de l'érythrocyte par le mérozoïte ou de neutraliser les parasites circulants en présence de monocytes (Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1990). Ces mécanismes dépendent d'une étroite coopération entre les IgG cytophiliques et les cellules effectrices, par l'intermédiaire des récepteurs Fc γ R. La neutralisation parasitaire dans ce cas paraît principalement soutenue par des facteurs solubles (TNF α et NO) sécrétés par les monocytes. Ces facteurs solubles bloquent la division des parasites intra-érythrocytaires des globules rouges avoisinant en agissant sur le parasite à son stade mononucléé (Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1995). Les monocytes ont été également reconnus capables de phagocytose sur des globules rouges infectés et opsonisés alors que les lymphocytes sont capables de tuer les parasites via des anticorps spécifiques (Brown et Smalley 1980; Brown et Smalley 1981). Cependant, la complexité de cette réponse immune est telle qu'il existerait des immunoglobulines à effet non protecteur. En effet, les IgG2 et les IgG4 ont un effet inhibiteur sur l'opsonisation, ou sont prépondérantes dans les préparations d'IgG ou elles inhibent l'ADCI (Bouharoun-Tayoun et Druilhe, 1992; Groux et Gysin, 1990). En outre il a été démontré que les IgG1 anti-RESA et anti-MSP-2, ainsi que les IgG3 anti-exo antigènes

augmentent quand à elles le risque de survenue de manifestations cliniques du paludisme (Chumpitazi *et al.*, 1996; Dubois *et al.*, 1993).

La relation entre l'immunité dirigée contre les stades asexués et la prévalence des stades sexués responsables de la transmission en zone endémique est jusque là mal connue. Toute fois, il a été suggéré que la réponse immunitaire peut influencer le développement gamétocytaire au niveau de l'Homme (Piper *et al.*, 1999) ou d'empêcher le développement sporogonique au niveau du vecteur (Rener *et al.*, 1983; Vermeulen *et al.*, 1985; Carter *et al.*, 1990; Roeffen *et al.*, 1995; Gozar *et al.*, 1998; Roeffen *et al.*, 1996). L'immunité naturelle dirigée contre les stades sexués contribue par conséquent au contrôle de la transmission de la maladie en réduisant ou en bloquant le transfert du parasite de l'Homme au vecteur.

1.3.4. Immunité bloquant la transmission du paludisme

L'immunité dirigée contre les stades sexués peut être divisée en deux types. Le premier type correspond à l'immunité dirigée contre les gamétocytes chez l'hôte humain et le second l'immunité contre les stades sexués chez le moustique. Les premiers anticorps dirigés contre des gamétocytes ont été mis en évidence par l'utilisation de la technique d'immunofluorescence (Voller and Bray 1962). Par la suite, Aikawa et collaborateurs, (1981) ont montré que 40% de sérums provenant de sujets gambiens contenaient des anticorps dirigés contre les gamétocytes. Ces expériences ont prouvé que peu de sérums agissaient contre des préparations fraîches de gamétocytes comparées à des préparations sèches, suggérant que plus d'anticorps seraient dirigés contre les antigènes internes de gamétocytes qui ne sont accessibles qu'en préparation sèche.

Chez l'hôte humain, des études ont montré qu'au cours de la gamétocytogenèse, les gamétocytes de stade I et IIa adhèrent aux cellules endothéliales de la moelle osseuse grâce à l'expression de la protéine PfEMP1 à la surface des globules rouges (Smalley *et al.*, 1981). Cet antigène hautement immunogène est commun aux stades asexués du développement parasitaire et aux jeunes gamétocytes (Howard *et al.*, 1983). La réponse humorale qui lui est spécifique est dépendante de l'âge (Forsyth *et al.*, 1989 ; Bull *et al.*, 1998). Des études ont suggéré que la réduction avec l'âge de la prévalence des gamétocytes de *Plasmodium falciparum* chez des sujets vivant en zone endémique serait due à l'action indirecte de la suppression des stades asexués mais aussi à une action directe d'anticorps tels que ceux dirigés contre l'antigène PfEMP1 des jeunes gamétocytes (Piper *et al.* 1999). Contrairement aux stades asexués, la prévalence des gamétocytes peut alors être directement ou indirectement affectée par l'immunité acquise et ainsi devenir très tôt un phénomène rare chez

les adultes (Gramiccia, 1980 ; Cattani *et al.*, 1986; Mollineaux Akim *et al.*, 2000 ; Van der Kolk *et al.*, 2003; Bouseman *et al.*, 2004). Ce phénomène de suppression gamétocytaire dépendant de l'âge suggère l'existence d'une immunité acquise spécifique aux gamétocytes même si elle est encore mal connue.

Par ailleurs chez le moustique, des études ont montré que des protéines antigéniques de surface communes au gamétocyte et au gamète telles que Pfs48/45 et Pfs230 (Rener *et al.*, 1983 ; Vermeulen *et al.*, 1985 ; Carter *et al.*, 1990; Roeffen *et al.*, 1995) ainsi que certaines du zygote et de l'ookinète (Ps25) (Grotendorst *et al.*, 1984; Vermeullen *et al.*, 1985; Gozar *et al.*, 1998) sont *in vitro* des cibles potentielles d'anticorps monoclonaux bloquant la transmission. Des sérums bloquant la transmission ont été trouvés chez des individus vivant en région endémique lors d'études réalisées en Afrique et en Asie (Mulder *et al.*, 1994; Graves *et al.*, 1998). L'activité bloquante de sérums d'individus vivant en Nouvelle Guinée était associée à la présence d'anticorps dirigés contre l'antigène Pfs230 (Grave *et al.* , 1988) alors que celle observée au Cameroun était associée aux taux d'anticorps dirigés contre Pfs48/45 (Roeffen *et al.*, 1995, 1996). D'autre part, des travaux avec *P. vivax* au SriLanka démontrèrent que 65% des sérums utilisés dans l'étude étaient capables de bloquer la transmission lors d'expériences d'infections artificielles (Mendis *et al.*, 1987). Une telle activité bloquant la transmission peut perdurer grâce à une stimulation antigénique répétée, et peut disparaître 4 mois après en l'absence d'une nouvelle exposition au stimulus antigénique.

Le complément reste actif pendant plus de 8 heures dans l'abdomen du moustique. Des études *in vitro* on montré que les anticorps anti-Pfs230 et Pfs48/45 en coopération avec ou sans le complément provoquent la lyse rapide des gamètes et du zygote chez le moustique (Quakyi *et al.*, 1987; Rener *et al.*, 1983). Les anticorps agissant sans la coopération du complément provoqueraient un encombrement stérique afin de prévenir la fécondation comme dans le cas du fragment Fab de l'anticorps monoclonal dirigé contre Pfs48/45 (Carter *et al.*, 1990). Les immoglobulines G seraient capables d'empêcher le développement de l'oocyste et le fragment Fab à lui seul était capable de prévenir l'enkystement de l'ookinète dans l'épithélium de la paroi stomacale (Carter *et al.*, 1990).

L'immunité naturelle bloquant la transmission du paludisme peut aussi être à médiation cellulaire. Les mécanismes impliqués sont encore mal connus. Cependant, le rôle des cellules T a été évoqué dans le modèle animal par le transfert de cellules T à des souris infectées par *P. yoelli*. Ce transfert a été réalisé à partir de souris préalablement immunisées avec des gamètes. Les souris réceptrices ont significativement réduit le nombre de leur gamétocytes de

même que leur transmission à 95% (Harte *et al.*, 1985). En 1994, l'équipe de Ranawaka démontrait que la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps intervenait dans le mécanisme bloquant la transmission en empêchant la fécondation des gamètes (Ranawaka *et al.*, 1994). Des cellules phagocytaires (Sinden et Smalley 1976; Naotunne *et al.*, 1993; Lensen *et al.*, 1997; Lensen *et al.*, 1998) ainsi que certaines cytokines comme l'INF- γ , le TNF- α , les IL-2-4 y participent (Naotunne *et al.*, 1991).

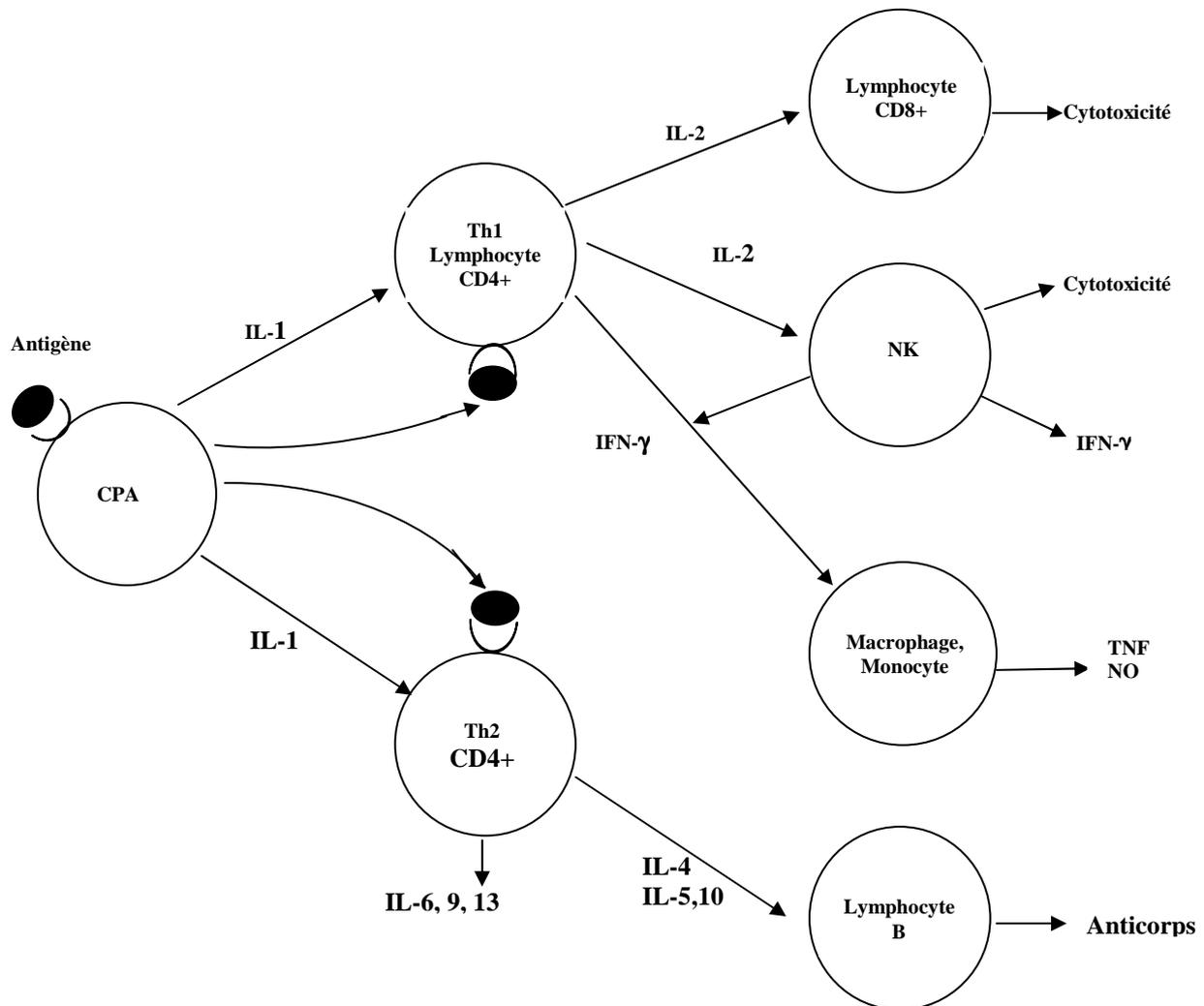


Figure 5: Récapitulatif des mécanismes de la réponse immunitaire cellulaire couplée à la réponse immunitaire humorale

CPA, Cellule présentatrice d'Antigène

IL, Interleukine

IFN, Interféron

NK, Natural Killer

NO, Nitric Oxide

Th, T helper

TNF, Tumor Necrosis Factor

1.4 Contrôle de la transmission

1.4.1. Facteurs humains

Outre l'immunité bloquant la transmission du paludisme énumérée plus haut, les facteurs suivants doivent également être pris en compte dans le contrôle de la transmission du paludisme.

1.4.1.1. Utilisation d'antipaludiques

Les médicaments antipaludiques sont capables d'influencer la transmission du parasite de l'Homme au moustique. La primaquine et la pamaquine ont une action gamétocydyque chez *Plasmodium falciparum* (Jeffery and Eyles 1955; Bruce-Chwatt 1986) alors que des sérums de volontaires européens jamais exposés au paludisme et sous prophylaxie à base de proguanil-chloroquine étaient capables de réduire la transmission au cours d'infections expérimentales (Ponnudurai *et al.*, 1989). Cependant, des sérums contenant seulement la chloroquine n'ont pas montré d'action sur la sporogonie (Chutmongkonkul *et al.*, 1992) mais semblent favoriser la transmission des souches chloroquinorésistantes (Robert *et al.*, 1996). Par ailleurs, il a été observé *in vitro* que la pyriméthamine et l'halofantrine rendaient les gamétocytes plus infectieux (Chutmonkonkul *et al.*, 1992).

1.4.1.2. Le type d'hémoglobine

Il est connu que le développement des stades sexués débute par l'invasion du globule rouge par le parasite. Seul ce stade sexué est en mesure de continuer le cycle du *Plasmodium* chez le moustique. Il constitue par conséquent un paramètre important dans la transmission du paludisme. Cependant, il est suspecté que les stades asexués en fortes charges sont susceptibles à se transformer sous l'effet stressant du milieu (rejet de toxines et pression immunitaire) en stades sexués. Les HbS et HbC sont capables d'inhiber la croissance parasitaire pour aboutir à de charges parasitaires moins élevées (Modiano *and al.* 2001) à tel point que les gamétocytes soient faiblement ou rarement produits influençant ainsi la transmission. Cependant, Robert et collaborateurs (1996) lors d'une étude au Sénégal montrèrent que les porteurs du type d'hémoglobine AS malgré leur faibles gamétocytémies infectaient plus de moustiques que les porteurs d'hémoglobine normale AA. L'hémoglobine aurait donc un rôle spécifique dans la transmission du paludisme indépendamment de la densité de gamétocytes.

1.4.2. Facteurs parasitaires

1.4.2.1. Gamétocytémie

Au sein d'une population d'individus naturellement infectés par *P. falciparum*, le seuil de densité gamétocytaire capable de provoquer une infection chez le moustique est relativement faible (Boudin *et al.*, 1989). Dans la majorité des cas, il a été démontré qu'une gamétocytémie de 100 gamétocytes/ μ l de sang était suffisante pour provoquer une infection naturelle chez le moustique. La proportion de cas d'infections chez le moustique augmente avec la gamétocytémie et est à son maximum lorsque la gamétocytémie atteint 1000 gamétocytes/ μ l de sang (Jeffery et Eyles, 1955).

1.4.2.2. Maturité et qualité des gamétocytes

La qualité du gamétocyte peut être évaluée à partir de sa morphologie et de sa capacité à se transformer en gamétocyte mâle ou femelle. Les gamétocytes de *P. falciparum* possèdent différentes caractéristiques morphologiques permettant de les identifier comme formes immatures ou aberrantes. Les formes matures sont en forme de croissant avec des bouts arrondis alors que les aberrants ont une forme en croissant mais des bouts pointus. Un autre critère de maturité est la distribution du pigment dans le cytoplasme. Les gamétocytes matures et fonctionnels ont un pigment localisé autour du noyau alors que chez les aberrants, il est localisé en bouquet sur un pôle de la cellule. La maturité des gamétocytes se caractérise aussi par leur capacité d'activation et d'exflagellation.

1.4.2.3. Sexe ratio des gamétocytes

En 1935, Boyd et collaborateurs démontrèrent que les plus faibles densités de gamétocytes mâles étaient plus infectieuses que les plus fortes alors que d'autres n'ont pu démontrer cet effet du sexe ratio sur l'infectivité des gamétocytes (Boudin *et al.*, 1989; Read *et al.*, 1992; Noden *et al.*, 1994).

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

2. Matériel et méthodes

2.1. Méthodes d'étude

2.1.1. Site de l'étude

Nous avons conduit notre étude dans deux provinces géographiquement contiguës (Figure 5). Les provinces de l'Oubritenga et du Kourwéogo sont situées respectivement à 30 km au Nord et Nord Ouest de Ouagadougou. La zone des deux provinces est une savane soudanienne avec des conditions climatiques caractérisées par une saison pluvieuse allant de juin à octobre et une saison sèche de novembre à mai. La transmission du paludisme est stable et saisonnière, elle démarre avec la venue des premières pluies, s'intensifie avec l'abondance des gîtes larvaires aux alentours du mois de septembre puis progressivement diminue d'intensité avec l'éloignement des pluies. Elle est hétérogène en fonction des conditions écologiques spécifiques d'un village à l'autre. La transmission du paludisme est assurée principalement par le complexe *Anopheles gambiae* et le groupe *Anopheles funestus* (Costantini *et al.*, 1999). *Plasmodium falciparum* est l'espèce plasmodiale la plus prévalente à 90% suivie de *Plasmodium malariae* à 8% et *Plasmodium ovale* à 2% (Habluetzel *et al.*, 1999).

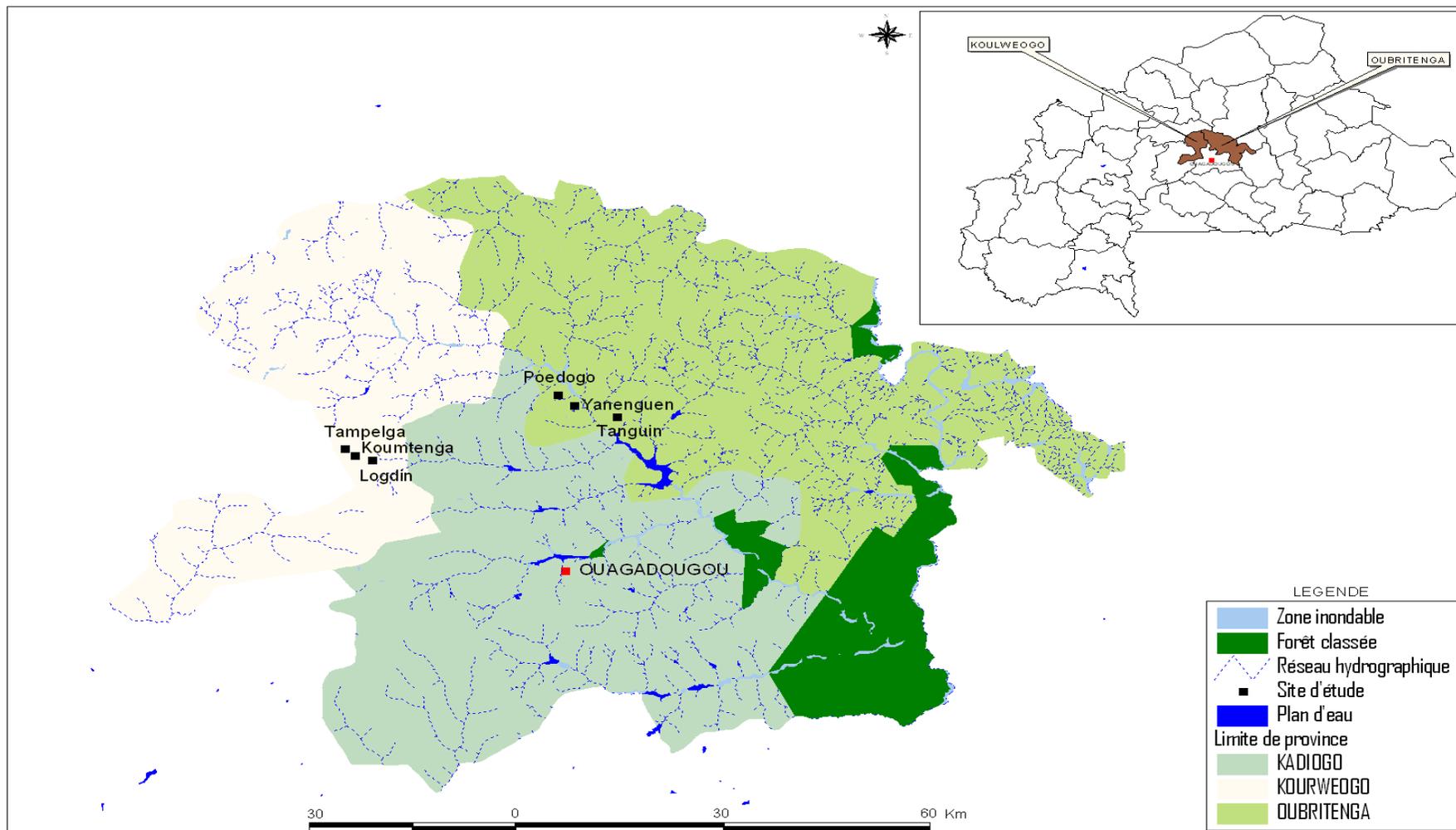


Figure 1: Site de l'étude

2.1.2. Le choix des villages

Le choix des villages a été guidé par leur proximité entre eux et leur proximité et accessibilité par rapport à la capitale. En outre, c'est une zone de transmission palustre stable et saisonnière qui a une longue tradition de collaboration avec le Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme. Les données épidémiologiques récoltées antérieurement sur le site répondraient aux questions de l'impact de l'âge, de la saison et du niveau de transmission sur les paramètres parasitologiques et immunologiques en relation avec la transmission du paludisme (Cuzin-Ouattara *et al.*, 1999).

2.1.3. La population de l'étude

Les populations du site appartiennent exclusivement à l'ethnie mossi. Ces populations vivent d'activités champêtres basées sur l'agriculture de subsistance et l'élevage du petit bétail. La population des six villages avoisine les 2700 individus. Les membres d'une même grande famille vivent généralement regroupés en petites familles au sein d'une même concession. En fonction du nombre de petites familles, une concession comporte des cases carrées et rondes. Entre 1993 et 1999, les 6 villages faisaient partie d'une étude à large échelle portant sur l'impact des rideaux imprégnés d'insecticide (RII) sur la mortalité toute cause confondue. Ce projet avait établi une base de données démographique octroyant à chaque individu un code d'identification unique. Avant le démarrage de nos activités, une mise à jour de cette base de données a été faite et nous a permis de mener notre étude sur des individus dont la date de naissance, le sexe, la localité et l'appartenance ethnique étaient disponibles. Les sujets de l'étude étaient aléatoirement sélectionnés sur la base de groupes d'âges préalablement déterminés (1-4, 5-9, 10-15, 15-25, ≥ 25 ans) et un minimum de 20 individus par groupe d'âge par village était inclus dans l'échantillon à chaque enquête transversale. Les populations de chaque village ont participé à l'étude avec le même poids en nombre, âge et genre. Le grand projet sur les RII avait cessé lorsque nous menions notre étude.

2.1.4. Types d'études et choix de l'échantillon

- **Evaluation de la prévalence des stades sexués de *Plasmodium falciparum* en fonction de la saison de transmission**

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'impact de la saison de transmission sur la prévalence des stades sexués. Pour atteindre cet objectif nous avons mené 4 enquêtes transversales en début de saison de transmission (juin 2002), au pic de la transmission (septembre 2002), en fin de transmission (décembre 2002) et une autre en pleine saison sèche (avril 2003). Les individus de tous les âges étaient éligibles à participer à l'étude

- **Evaluation de la prévalence des stades sexués de *Plasmodium falciparum* en fonction de l'âge : Détection des gamétocytemies sub-microscopiques par la technique sensible de QT-NASBA**

La technique QT-NASBA (Schneider *et al.*, 2004) est une méthode moléculaire innovante dans la quantification des parasites du paludisme. La microscopie est une technique de routine de détection du parasite mais fiable qu'en forte densité parasitaire. Les fortes densités gamétocytaires sont des phénomènes rares d'où la nécessité d'associer une technique plus sensible en vue d'améliorer la collecte de données épidémiologique et l'interprétation des résultats. Pour comparer la technique QT-NASBA à la microscopie optique dans le dénombrement parasitaire en fonction de l'âge, nous avons simultanément prélevé des échantillons sanguins d'individus de tout âge au cours d'une enquête transversale à la fin de la saison de transmission 2003 (Décembre). Ces échantillons ont servi à la confection de la goutte épaisse (microscopie) et à l'échantillonnage d'acides nucléiques (QT-NASBA).

- **Mesure de l'impact du taux d'inoculation entomologique sur le profil parasitologique et immunologique en fonction du niveau de transmission et de la saison**

Sur la base de nos hypothèses, en région endémique, les différences entre le profil parasitologique et la réponse immunitaire palustres en fonction du niveau de transmission seraient plus remarquables chez les enfants en bas âge en raison de leur vulnérabilité au paludisme, comparés aux adultes. Les prélèvements sanguins sur les enfants de 1 à 4 ans durant les enquêtes transversales de juin, septembre et décembre 2003 ont été par conséquent retenus pour la comparaison du profil parasitologique et de la réponse humorale contre les antigènes synthétiques PfCS₂₈₂₋₃₈₃ (C-terminal), GLURP₈₅₋₂₁₃ (Long peptide) et les antigènes

d'extraits gamétozyte Pfs48/45 et Pfs230 en fonction du niveau de transmission dans les deux groupes de villages. Le niveau de transmission en fonction de la saison et de la zone a été déterminé par une collecte de moustiques qui ont servi à mesurer le taux d'inoculation entomologique dans les 6 villages.

- **Evaluation de l'infectivité des gamétozytes de *P. falciparum* par infections expérimentales dans des villages burkinabé**

Si aujourd'hui des études permettent d'évaluer le niveau de transmission du moustique à l'Homme dans une région donnée, il n'en est pas de même pour le niveau de transmission de l'Homme au moustique. La mesure de la transmission de l'Homme au moustique par infections artificielles permet d'une part d'évaluer l'infectivité des gamétozytes de *P. falciparum* naturellement exposés au paludisme et d'autre part évaluer l'immunité bloquant la transmission du parasite. Les enfants de bas âge étant plus susceptibles de porter les stades infectieux du parasite (gamétozytes), étaient éligibles à participer à l'étude. La microscopie et la technique QT-NASBA étaient utilisées en vue de déterminer le statut parasitologique de chaque individu et l'ELISA, le statut sérologique en vue de confronter les paramètres parasitologiques de transmission à l'immunité bloquant la transmission.

2.2. Matériel utilisé

2.2.1 Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé dans cette étude était composé essentiellement de prélèvements sanguins, de gamétozytes de culture, de protéines antigéniques, de moustiques de capture et d'élevage.

- Les prélèvements sanguins ont été subdivisés en 4 types suivant l'objectif à atteindre :
 - Une goutte épaisse réalisée après un prélèvement à la pulpe du doigt pour le diagnostic quantitatif et qualitatif de l'infection à *Plasmodium* au microscope
 - Le plasma obtenu par un prélèvement à la pulpe du doigt pour la recherche d'anticorps spécifiques par la méthode ELISA
 - Le sang total obtenu par un prélèvement veineux sur tube héparine pour la mesure du niveau de transmission du moustique à l'Homme (mesure de l'infectivité des gamétozytes de *P. falciparum*) par des infections artificielles directes (DMFA) et le plasma pour la recherche d'anticorps bloquant la transmission par la méthode ELISA

- Le sang total obtenu par un prélèvement veineux ou à la pulpe du doigt pour le dénombrement quantitatif des parasites dans le sang par la technique du QT- NASBA
 - Les gamétocytes de culture ont servi à l'extraction d'antigènes de stades sexués pour la recherche d'anticorps bloquant la transmission par la technique d'ELISA
 - Le peptide synthétique LR67 (Glurp 85-213) et le segment synthétique de 102-acides aminés correspondant à la région C terminale de la protéine circum sporozoïtique (PfCS 282-383) étaient utilisés au cours des ELISAs pour la recherche d'anticorps dirigés contre les stades érythrocytaires et pré érythrocytaires.
 - Les moustiques de capture ont été obtenus dans les habitations villageoises pour la mesure du niveau de transmission en fonction de la saison et des villages
 - Les moustiques d'élevage (insectarium) ont été utilisés pour la mesure de l'infectivité des gamétocytes de sujets exposés au paludisme par infections artificielles directes (DMFA)

2.2.2. Matériel technique

- Un lecteur de plaque d'ELISA (Bio Rad model 3550 microplate reader) pour la détection d'anticorps spécifiques aux différents antigènes
- Un détecteur quantitatif d'acides nucléiques spécifiques (NucliSens EasyQ analyser, Biomerieux) pour la détermination quantitative de la gamétocytémie par la technique QT-NASBA.
- Un microscope optique pour la détection des parasites à partir de la goutte épaisse
- Un thermostat (Bioblock model 333) pour la réalisation des infections artificielles directes à travers les membranes.

2.3 Activités de l'étude

2.3.1. Activités de terrain

2.3.1.1. Collecte des données entomologiques

Une enquête longitudinale a été réalisée dans les villages de l'étude afin d'évaluer la distribution des espèces anophéliennes et leur agressivité, afin de déterminer l'indice sporozoïtique et le taux d'inoculation entomologique. Pour atteindre ces objectifs, nous avons procédé à la capture des moustiques par l'utilisation de pièges lumineux CDC.

Dans chaque village, 16 cases de concession différente ont été sélectionnées de façon aléatoire pour une estimation entomologique globale dans le village. La dispersion des cases était sur le plan géographique représentative du village. Chaque case était constituée d'une seule chambre et occupée par un seul dormeur. Les captures de moustiques étaient effectuées une fois par mois dans les mêmes maisons entre 10 heures du soir et 6 heures du matin. De juin 2002 à novembre 2002, puis d'avril 2003 à novembre 2003 tous les moustiques capturés à l'intérieur des cases ont été identifiés morphologiquement, regroupés selon l'espèce anophélienne et conservés dans des tubes contenant du silica gel.

Au laboratoire d'entomologie du CNRFP, le nombre de moustiques était compté afin de définir l'agressivité (nombre de piqûres/personne/unité de temps). Ensuite les moustiques (abdomen et thorax) étaient mis en microplaques pour subir le test ELISA (Beier *et al.*, 1987) dont l'objectif était la détection de la protéine CSP du parasite définissant l'infectivité du moustique. Ce test permet de déterminer l'indice sporozoïtique (pourcentage de moustiques infectés/zone/unité de temps) et du taux d'inoculation entomologique (TIE = nombre de piqûres infectantes/personne/unité de temps). Le TIE est défini comme étant le produit de l'agressivité par l'indice sporozoïtique. Il reflète le niveau de transmission du moustique à l'Homme dans une zone donnée à un moment donné. Tous les paramètres entomologiques étaient calculés par rapport à *Anopheles gambiae s.l.*

2.3.1.2. Collecte de données parasitologiques et sérologiques

La population de chaque village était préalablement informée de la date et du lieu des prélèvements sanguins. Chaque prélèvement de sang était réalisé avec le consentement personnel de l'individu et des parents lorsqu'il s'agissait d'un enfant. Cinq enquêtes transversales parasito-sérologiques ont été réalisées au cours de l'année 2002 et 2003 suivant les saisons de transmission du paludisme et a concerné toute la population. La première en début de saison de transmission au mois de juin 2002, la deuxième en saison pluvieuse au pic de la transmission (août 2002) et la troisième en fin de saison de transmission au mois de décembre 2002. Les 2 autres enquêtes ont été réalisées en saison sèche au mois d'avril 2003 et la seconde en fin de saison de transmission au mois de décembre 2003. Au cours des enquêtes, une goutte épaisse était réalisée sur toute la population et un prélèvement sanguin sur tube Eppendorf avec EDTA était fait au moins sur les dix premiers individus de chaque groupe d'âge (1-4, 5-9, 10-14, 15-24, 25+).

2.3.1.3 Mesure de la transmission de l'Homme au moustique : Infection expérimentale de moustiques sur des sujets naturellement exposés au paludisme en zone rurale

Pour mesurer le niveau de la transmission de l'homme au moustique dans le site de l'étude, nous avons procédé à des infections artificielles de moustiques du genre *Anopheles gambiae* dans le but d'évaluer l'infectivité des gamétocytes circulant dans les populations de l'étude. Des moustiques adultes de 2-3 jours étaient mis à jeun pendant 12 heures et amenés à prendre leur repas sur du sang de donneurs volontaires vivant dans le site de l'étude. La population cible de cette étude a concerné les enfants, principal réservoir de gamétocytes de *Plasmodium falciparum* en zone endémique (Molineaux et Gramiccia, 1980 ; Akim *et al.*, 2000; Van der Kok *et al.*, 2003 ; Bousema *et al.*, 2004). Les infections se déroulaient au CNRFP juste après avoir prélevé du sang veineux sur les porteurs. Le dispositif (Figure 6) de l'infection artificielle est muni de cellules cylindriques en verre reliées entre elles par une tuyauterie d'eau. L'eau est maintenue à 37°C et propulsée à travers les cellules par un thermostat muni d'une pompe. Le sang est maintenu à 37°C dans le cloison externe situé du côté inférieur de la cellule grâce à une membrane de parafilm à travers laquelle le moustique peut se nourrir pendant une quinzaine de minutes. Par la suite, les moustiques étaient retirés et élevés dans des conditions optimales pendant 7-8 jours et disséqués pour la recherche d'oocystes au niveau de l'estomac. La présence ou non d'oocyste(s) permet d'évaluer la capacité de l'individu à infecter le vecteur en relation avec son statut parasitologique et sérologique.

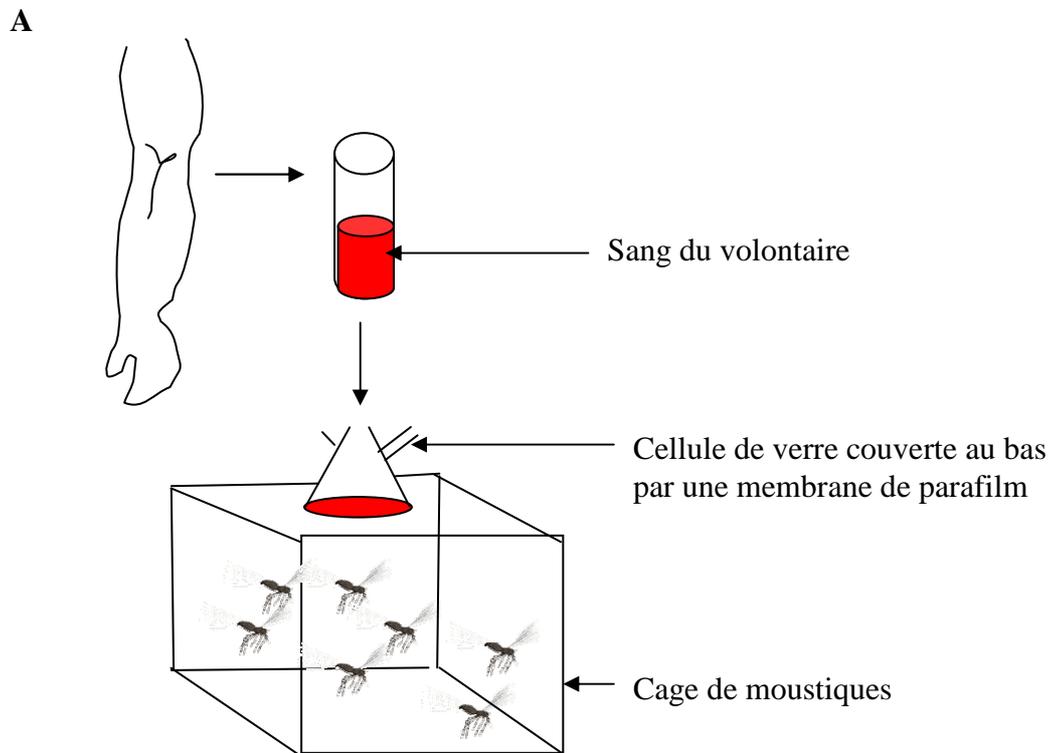


Figure 2: Représentation schématique du processus de l'infection artificielle d'anophèles (A) et dispositif expérimentale à l'insectarium (B, gobelet en lieu et place de la cage). Les flèches indiquent le sens du flux d'eau à 37°C à travers les cellules.

2.3.2. Activités de laboratoire

2.3.2.1. Détermination de la densité parasitaire par la microscopie optique

Les lames de terrain ont été colorées au Giemsa 5% pendant 35 minutes et lues au microscope optique à l'objectif 100 sous huile à immersion. Chaque lame a été lue par deux microscopistes indépendants et la moyenne des deux lectures était retenue. Lorsqu'il y avait une différence de lecture excédant 30% entre les deux microscopistes, celle d'un troisième était incluse, la moyenne des deux valeurs les plus proches était retenue ou celle du troisième le cas échéant. Le nombre de parasites (stade asexué et sexué) et de leucocytes était compté simultanément sur la goutte épaisse. La parasitémie était déterminée au microlitre de sang en fonction du nombre de leucocytes compté par microlitre. Une lame était considérée négative si aucun parasite n'était détecté sur 100 champs microscopiques. La méthode a un seuil de détection théorique de 4 parasites par μl de sang.

2.3.2.2. Détermination de la densité parasitaire par la technique QT-NASBA

Le principe de la technique QT-NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification, est basé sur la détection de molécules d'acides nucléiques fluorescentes (figure 7). C'est une technologie d'amplification isotherme de 90 minutes (41°C) de l'acide nucléique reposant sur l'action conjointe de trois enzymes : la transcriptase inverse AMV (Avian Myeloblastosis Virus Reverse transcriptase), la RNase-H et la polymérase-ARN T7 du bactériophage T7 lesquelles fonctionnent dans un milieu réactif contenant des amorces oligonucléotidiques spécifiques (A1 couplée au promoteur de l'ARN polymérase T7 et A2) d'une cible d'ARN sens et des sondes de détection.

Au cours de la réaction, la molécule d'ARN sens (exemple : ARNm du gène Pfs25 du gamétocyte, figure 8) est copiée en molécule d'ADNc double brin par la transcriptase inverse AMV à partir de l'amorce A1. La RNase H digère l'ARN sens. Le nouveau brin d'ADNc est ensuite copié à partir de l'amorce A2 et une molécule d'ADN double brin doté du promoteur de l'ARN polymérase T7 est formé. Cette molécule est transcrite en molécule d'ARN anti-sens par la polymérase-ARN T7 qui dissocie l'ADNc en libérant l'un des deux brins de l'ADN tandis que l'autre pénètre dans son site catalytique pour la transcription. La nouvelle molécule d'ARN antisens repart dans le processus et de nouvelles molécules d'ADN puis d'ARN anti-sens sont formées. Lorsque les amorces sont épuisées, la polymérase T7 continue l'amplification linéaire des copies d'ARN anti-sens jusqu'à la perte de son activité. Le produit d'amplification final d'ARN anti-sens s'hybride à la sonde (molecular beacon) et émet une intensité lumineuse détectable et quantifiable. Le "molecular beacon" est une nouvelle

catégorie de sonde d'hybridation qui devient fluorescente lors de l'hybridation. Elle possède une structure de type tige-boucle et contient un fluorophore et un groupe "quencher". La fixation de la séquence de boucle spécifique avec sa séquence complémentaire d'ARN anti-sens cible, produite au cours de la réaction NASBA, provoque un déroulement de la tige et l'émission d'un signal fluorescent lors de l'excitation à la longueur d'onde qui convient. Cette fluorescence est détectée et enregistrée par une cellule photoélectrique.

Une courbe standard est conçue au cours de la même réaction à base d'une série de dilutions de parasites de culture (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 parasites/ μ l). La détermination de la gamétocytémie de l'échantillon de terrain est possible grâce à une extrapolation de l'intensité lumineuse de l'échantillon en rapport avec celles de l'étalon dont les concentrations en parasites sont connues. La technique a un seuil de détection théorique de 20 parasites / ml de sang.

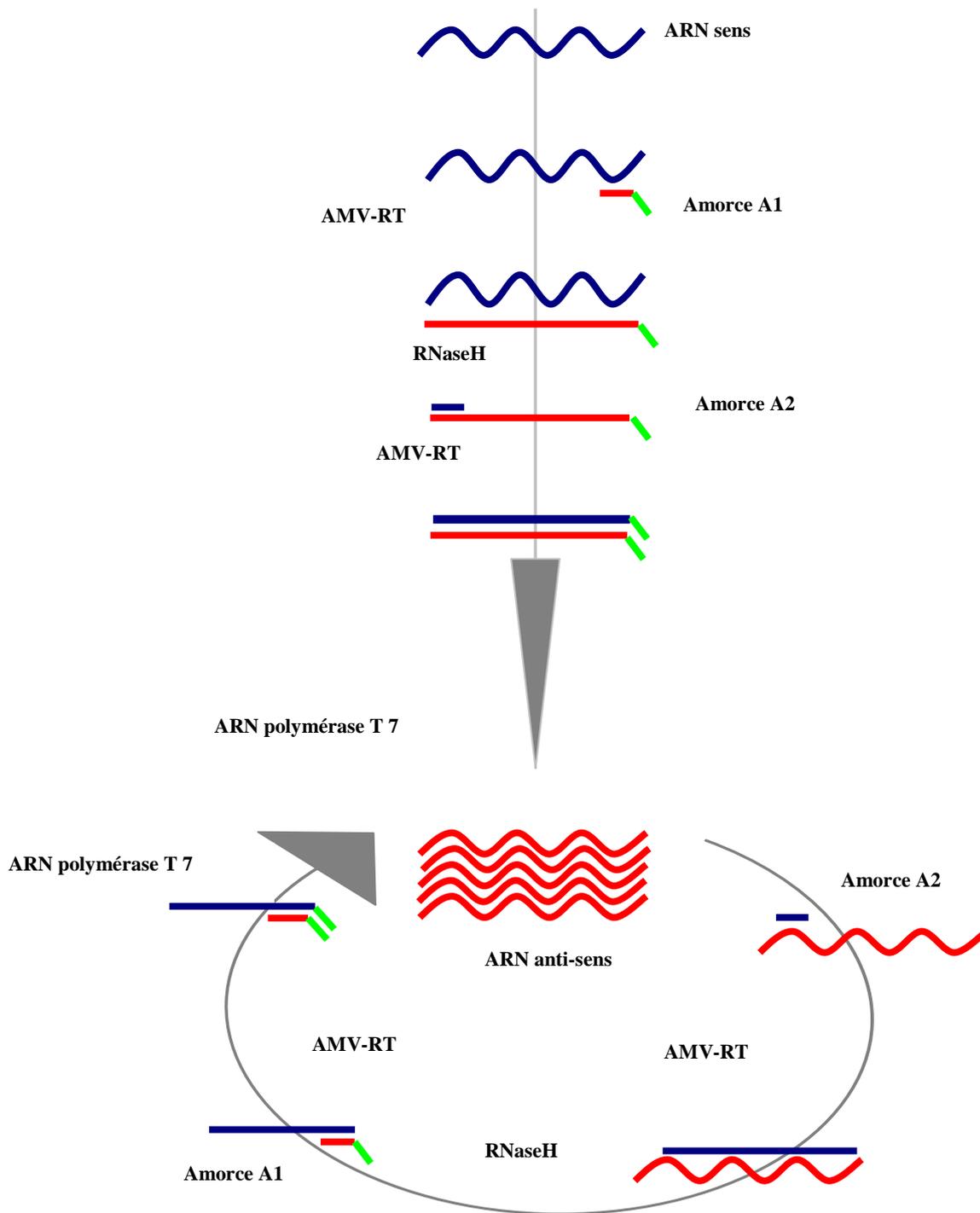


Figure 3: Processus d'amplification dans la technique QT-NASBA (Schneider, 2006b)

Stade asexué		Pfs25 mRNA - neg 18S rRNA - pos
Stade sexuellement converti		Pfs25 mRNA - neg 18S rRNA - pos
gametocyte mature		Pfs25 mRNA - pos 18S rRNA - pos

Figure 4: L'expression du gène *Pfs25* uniquement au stade sexué permet de quantifier spécifiquement les gamétocytes. neg: négatif, pas d'expression d'ARN; pos: positif, expression d'ARN.

2.3.2.3 Dosage des titres d'anticorps dirigés contre les antigènes de stades asexués et sexués

Le test ELISA (acronyme de *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) est un test immunologique destiné à détecter et/ou doser une protéine dans un liquide biologique (Engvall *et al.*, 1971). Dans la technique de dosage dite "en sandwich" (Figure 9A), les puits d'une microplaque (microplaque en polystyrène ou en polyvinyl) sont tapissés avec un antigène capable de se lier spécifiquement à l'anticorps recherché. Lors de cette opération appelée *coating*, l'antigène se fixe au plastique des puits par interaction électrostatique et assure la spécificité du test. La solution à tester est ensuite déposée dans les puits de la microplaque et si l'anticorps recherché est présent il va se lier spécifiquement à l'antigène. Un deuxième anticorps, l'anticorps traceur, capable de se lier à l'anticorps recherché est alors ajouté dans le puits et les anticorps traceurs non fixés sont éliminés par rinçage. L'anticorps traceur est couplé à une enzyme catalysant la formation d'un produit coloré en réaction avec un substrat. Le produit coloré est mesuré par un photomètre dont l'absorbance est déterminante de la positivité de l'échantillon. Dans la technique de dosage dite "en capture" (Figure 9B), les puits de la microplaque sont tapissés avec un anticorps monoclonal capable de lier spécifiquement l'antigène. Le reste de la procédure est le même que dans la technique dite en sandwich. Une série de lavages de la microplaque permet de minimiser le taux de fixations aspécifiques. La préparation d'un échantillon est dite positive si son absorbance (Densité Optique) est supérieure à celle des échantillons de contrôle négatif plus un certain nombre de déviations standard.

Dans notre étude, l'ELISA dit en sandwich s'applique aux antigènes GLURP et CS (antigène du sporozoïte chez l'homme). L'ELISA de capture s'applique aux antigènes CSP (antigène du sporozoïte chez le moustique) et les antigènes Pfs48/45 et Pfs230 des gamétocytes du parasite.

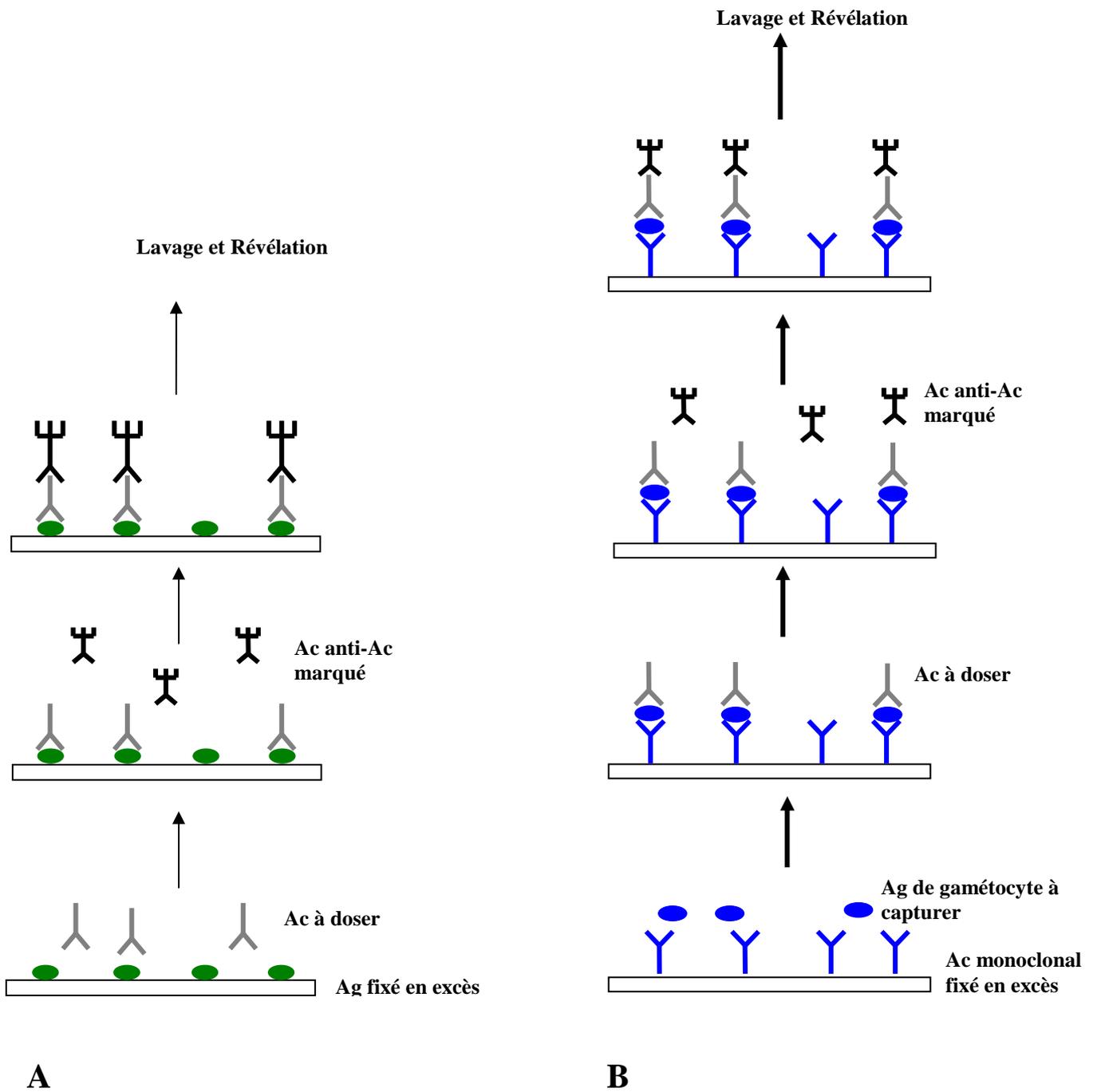


Figure 5: Principes de l'ELISA : (A) Sandwich; (B) Capture

2.4. Considérations éthiques

Les procédures opératoires écrites pour la réalisation de cette étude ont été approuvées par le Ministère de la Santé du Burkina Faso. Les populations des villages de l'étude ont été oralement informées des procédures et des objectifs de l'étude et leur consentement a été obtenu pour le déroulement de toutes les activités de terrain. Pour la participation des enfants dans l'étude, un consentement oral des parents ou des personnes en charge a été obtenu. Au cours des activités, les patients fébriles étaient gratuitement prises en charge en adoptant le protocole standard de traitement du paludisme du Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) et des compensations en nature (sardines, pains, riz, ustensiles de cuisine, chaussures pour enfants) étaient distribuées aux participants.

2.5. Analyse statistique des données

Les données ont été doublement saisies en utilisant le logiciel Epi Info version 6.0 et analysées avec le logiciel SPSS version 7.0. Les densités parasitaires des stades asexués et de gamétocytes ont été converties en valeurs logarithmiques et les moyennes géométriques étaient calculées. Des groupes d'âge en fonction des types d'étude ont été conçus afin de déterminer l'effet de l'âge sur la prévalence des parasites et des anticorps dirigés contre les antigènes parasitaires. Des modèles de régression linéaires et logistiques ont été utilisés pour estimer les effets de l'âge, de la densité parasitaire et de la saison sur la prévalence et la densité de gamétocytes. Le modèle de régression logistique était utilisé pour estimer l'effet de l'âge sur la prévalence des anticorps spécifiques aux marqueurs sérologiques utilisés. Le test de χ^2 de Pearson a été utilisé pour les différences entre les proportions. Le test t de Student a été utilisé pour déterminer l'effet du statut sérologique sur la densité parasitaire asexuée et la prévalence de gamétocytes de *Plasmodium falciparum*. Le seuil de significativité était fixé à une valeur de P inférieure ou égale à 0,05.

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSION

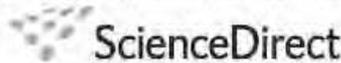
3. Résultats et discussion

3.1 Variations saisonnières de la prévalence et de la densité des gamétocytes de *Plasmodium falciparum* dans une population rurale du Burkina Faso

Résumé

Les gamétocytes sont les stades du parasite responsables du paludisme qui assurent la transmission de l'homme au moustique. L'identification de paramètres naturels qui influencent la prévalence de gamétocyte contribue à une meilleure compréhension de la dynamique des parasites de stade sexué et celle de l'immunité bloquant la transmission. Une lecture microscopique de 3400 gouttes épaisses a été réalisée au cours de 4 enquêtes transversales (2002-2003) afin de déterminer l'effet de l'âge et de la saison sur les gamétocytes de *Plasmodium falciparum* en zone rurale du Burkina Faso. L'intensité de transmission du paludisme du moustique à l'homme était estimée mensuellement par mesure du taux d'inoculation entomologique (TIE= nombre de piqûres infectantes/personne/mois). Cette intensité était estimée à environs 28 à 32 piqûres infectantes/personne/mois respectivement au cours des saisons de transmission humides de 2002 et 2003. Le TIE au cours des saisons sèches était en dessous d'une piqûre infectant/personne/mois. Au début de la saison humide, l'exposition naturelle aux piqûres infectantes était faible alors que le taux de piqûres non infectantes s'élève à 32 et 200 piqûres par personne et par mois respectivement au cours des deux années d'étude. La prévalence de gamétocytes était significativement plus élevée chez les enfants de moins de 15 ans comparés aux sujets de plus de 15 ans. La prévalence de gamétocytes était significativement plus élevée au début de la saison humide (juin) et au pic (Septembre) comparée à la prévalence en fin de saison humide (décembre) et en saison sèche (avril) après correction des facteurs confondants de l'âge et de la densité parasitaire asexuée. La prévalence élevée de gamétocytes en début de saison a précédé l'exposition soudaine aux piqûres infectantes en coïncidant avec celle aux piqûres non infectantes. Ainsi, la saison est un prédicateur indépendant de la prévalence et de la densité de gamétocytes et devrait par conséquent être prise en considération dans la planification de programmes de contrôle du paludisme avant le début de la transmission effective de l'infection à *Plasmodium falciparum*.

Mots clés: falciparum, gamétocyte, saison, Burkina

Available online at www.sciencedirect.com

Acta Tropica 105 (2008) 28–34

ACTA
TROPICAwww.elsevier.com/locate/actatropica

Seasonal patterns of *Plasmodium falciparum* gametocyte prevalence and density in a rural population of Burkina Faso

André Lin Ouédraogo^{a,c,d,*}, Sake J. de Vlas^b, Issa Nébié^a, Edith Ilboudo-Sanogo^a,
J. Teun Bousema^c, Aboubakar S. Ouattara^d, Jan Peter Verhave^c,
Nadine Cuzin-Ouattara^a, Robert W. Sauerwein^c

^a Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme, 01BP 2208, Ouagadougou 01, Burkina Faso

^b Department of Public Health, Erasmus MC, University Medical Centre Rotterdam, P.O. Box 1738, 3000 DR Rotterdam, The Netherlands

^c Department of Medical Microbiology, Radboud University Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands

^d Département de Biochimie Microbiologie, Université de Ouagadougou, 03BP 7131, Ouagadougou 03, Burkina Faso

Received 18 July 2006; received in revised form 16 September 2007; accepted 17 September 2007

Available online 21 September 2007

Abstract

Gametocytes are the malaria parasite stages that secure the transmission from the human host to the mosquito. The identification of natural parameters that influence gametocyte carriage can contribute to a better understanding of the dynamics of the sexual stage parasites for transmission reducing strategies. A total of 3400 blood slide readings were done during four cross-sectional surveys (2002–2003) including all age groups to determine the effect of season on *Plasmodium falciparum* gametocytes in a seasonal malaria transmission area of Burkina Faso. Entomological data were collected to determine the malaria transmission intensity in relation to seasons. Transmission intensity was estimated by monthly EIRs, averaging 28 and 32 infective bites/person/month in the wet seasons of 2002 and 2003, respectively. The EIR in the dry seasons was below one infective bite/person/month.

The gametocyte prevalence was significantly higher at the start and peak of the wet season compared to the dry season when corrected for asexual parasite density and age. Gametocyte density significantly increased during the wet season after correction for asexual parasite density and age. In this study, season appears to be an independent parameter that determines gametocyte prevalence and density and should be considered to be included in epidemiological studies on malaria transmission.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Malaria; *Falciparum*; Gametocyte; Season; Transmission; Burkina Faso

1. Introduction

Plasmodium falciparum is the most pathogenic specie of human malaria and an important cause of childhood morbidity and mortality in sub Saharan Africa. Gametocytes are responsible for transmission from the human host to the mosquito but do

not cause clinical disease. In malaria transmission areas, the effect of climatic features on vectorial capacity may lead to a variation of transmission intensity and subsequently on the epidemiology of the malaria infections. In some areas, season-related patterns were demonstrated in prevalence of asexual parasites (Baird et al., 2002; Sissoko et al., 2004) and in gametocytes (Barnish et al., 1993; van der Kolk et al., 2003; Nacher et al., 2004). The general goal of these studies was to identify natural factors that are associated with changes in the malaria parasite prevalence as they serve as base-line data for possible interventions. The only and little detailed study conducted in Burkina Faso on transmission showed a slight variation in gametocyte prevalence between the wet and the dry season (Boudin et al., 1991) and concluded that this variation could not be used for transmission control. The objective of the present study was to determine *P. falciparum* gametocyte prevalence and density

* Corresponding author at: Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme, 01BP 2208, Ouagadougou 01, Burkina Faso.

Tel.: +226 50 324675/95/96; fax: +226 50 310477.

E-mail addresses: andre_lin_o@yahoo.fr (A.L. Ouédraogo), s.devlas@erasmusmc.nl (S.J. de Vlas), issanebie.cnlp@fasonet.bf (I. Nébié), edith.cnlp@fasonet.bf (E. Ilboudo-Sanogo), t.bousema@ncmls.ru.nl (J.T. Bousema), ouattabs@univ-ouaga.bf (A.S. Ouattara), j.verhave@mmb.umcn.nl (J.P. Verhave), ndcuzin@fasonet.bf (N. Cuzin-Ouattara), r.sauerwein@mmb.umcn.nl (R.W. Sauerwein).

in Burkina Faso in relation to season. We have thus analyzed the relationship between entomological and parasitological parameters in two different seasons (wet and dry) in a rural area.

2. Materials and methods

2.1. Study area and population

The study took place in 2002 and 2003 in two rural zones of Burkina Faso. Three villages were selected from each zone based on their proximities and a recent evidence of high malaria endemicity. The distance between zones is about 30 km. Both zones are located 30 km north and northwest of Ouagadougou, the capital. The distance between villages inside each zone varies from 1 to 5 km. All together, these villages are situated in a Sudanese savannah area with a marked wet season from June to October. Malaria transmission in the area is stable and markedly seasonal. The average entomological inoculation rate (EIR) is estimated 300–500 infective bites/person/year (Cuzin-Ouattara et al., 1999) peaking during the rainy season. *P. falciparum* is the predominant malaria species in the region, accounting for 90% of the infections; the remaining 8% and 2% are attributed to *P. malariae* and *P. ovale*, respectively (Habluetzel et al., 1999).

Populations belong to the Mossi tribe and are predominantly subsistence farming communities. We first performed a complete census, which showed that there were 2767 residents in the six villages, each of comparable size and with similar age distributions. The census sizes were 348, 333, 494, 488, 680 and 424 in village 1 to 6, respectively. Participation of villagers to the study followed an enrollment procedure at which the first subjects that came were enrolled in the study. We performed a sample sizes calculation using STATA 9.0 (Stata Corporation, Texas, USA) with pre-existing data on gametocyte prevalence in Burkina Faso (Boudin et al., 1991). A sample size of 76 subjects per age group (1–4, 5–9, 10–14, 15–24 and 25+ years) would allow over 85% power to detect a decrease from 23% of gametocyte prevalence in children under 5–5% in adults above 25 years with a type I error of 0.05. To correct for unexpected missing data, a minimum number of 120 individuals/age group (pool of 20 individuals/age group/village) was thus included in the sample at each cross-sectional survey to allow a statistically robust testing between age groups. Furthermore, we combined the five age groups into three age groups to increase the power of the study.

The study was approved by the Ministry of Health of Burkina Faso. Villagers were informed about the purpose of the study and their consent was obtained. Benefits for the participants were free treatment for malaria and other common infections. In addition, protective means (insecticide treated bed nets) were given to volunteers that allowed the indoor mosquitoes collection from their houses. All participants with fever (axillary temperature $\geq 37.5^\circ\text{C}$) were treated with chloroquine according to the current national policy during the study period (2002–2003). Participants diagnosed with severe infections other than malaria were treated with antibiotics or offered transport to a medical centre when needed.

2.2. Entomologic data collection

The main malaria vector in the study area is the complex *Anopheles gambiae* s.l., with *An. funestus* contributing less to transmission (Petraera et al., 1986). Two men per village were recruited and trained for assistance in mosquito collection. CDC light trap captures were carried out within the six villages to estimate the entomological inoculation rate (EIR) as described by Cuzin-Ouattara et al. (1999). This design of indoor mosquito collection covered all time points of the parasitological studies. One cross-sectional survey was carried out in the dry season of 2002 from 19th to 30th March in 16 randomly selected houses of each village. Two longitudinal surveys were carried out from June to November 2002 and from April to September 2003. Each month, the mosquito collections were carried out in 16 randomly selected houses per village. These houses were each made of one room and inhabited by one person, a male adult or teenager, who slept under a non-impregnated bed net that we supplied. The CDC light trap was placed close to the bed. A monthly mosquito collection was completed per village within 4 weeks at the rate of four house captures per week. Field workers always returned to the same 16 houses, every month. Indoor mosquito capture was done on 1 day per house from 7:00 p.m. to 6:00 a.m. Mosquito species were identified morphologically, counted and stored in tubes with silica gel. The total density of *An. gambiae* was divided by the number of days of capture to define the daily biting rate per village assuming that each female captured by CDC light trap had a drive for biting. The monthly biting rate was estimated by multiplying the daily biting rate with the number of days in the month. A representative sample of *An. gambiae* mosquito thoraces and heads were examined for *P. falciparum* circumsporozoite protein (CSP) positivity index using CSP 2-site ELISA (Beier et al., 1987). The monthly sporozoite rate was estimated, testing a maximum of randomly selected specimens of *An. gambiae* from each village. The monthly sporozoite rate for each year was obtained by dividing the monthly number of positive mosquitoes in ELISA on the number of mosquitoes tested. The monthly entomological inoculation rate (number of infectious bites per person-time unit) was calculated as the product of the monthly biting rate and the monthly sporozoite rate. The uninfected biting rate was obtained by subtracting the number of infective bites per person-month from the monthly biting rate.

Data on seasons and rainfall were obtained from the Direction de la Météorologie Nationale, Ministère des Transports, Burkina Faso.

2.3. Parasitological data collection

Cross-sectional surveys were performed at 3 monthly intervals, at the start of the wet season (27 May–5 June 2002), the peak wet season (19–24 August 2002), the end of the wet season (2–13 December 2002) and the dry season (14–19 April 2003). At each cross-sectional survey, all adults and children of both sexes initially recorded in the census file that arrived at our location (a usual gathering place, not a health centre) were systematically included in the study. Thick and thin blood films were

both made on the same slide from finger prick blood, and air-dried. Villagers with fever (axillary temperature $\geq 37.5^\circ\text{C}$) were immediately treated with chloroquine according to the national policy. The four surveys conducted by our technical staff resulted in 3400 blood samples.

At the CNRFP laboratory, the thick smear was stained with 5% Giemsa for 35 min. One hundred high power fields per thick smear were examined for malaria parasites. Two microscopists read each slide sample independently and the mean density was considered. A third reader was involved when the difference between the readers exceeded 30% and in such a case the median reading was used. Trophozoite and gametocyte densities were assessed by counting against 500 leukocytes of blood and converted to counts per microlitre by assuming a standard count of 8000 leukocytes/ μl blood. A slide was considered negative if no parasite stages were found after examination of 100 fields.

2.4. Data analysis

Data were double entered by two independent data clerks and were compared for typing errors. The number of missing values was very low (<0.5%). Analyses of data were performed using SPSS version 12.01 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Parasite densities of positive individuals were analyzed after log-transformation. Geometric mean densities and medians were calculated. The distribution of positive densities of log-transformed densities of gametocyte and asexual parasite was tested for normality using the Kolmogorov–Smirnov test.

Seasonal patterns were analyzed using the dry season survey as a reference category for the other three surveys. Unadjusted (crude) values of odds ratios and of the regression coefficient determine the effect of season on gametocytes dependent of age and asexual parasite density as selected potential confounding factors. Gender was left out as variable, because it did not influence the analysis outcome. Gametocyte prevalence and gametocyte density were used as dependent variables. Season,

age and log asexual parasite density were used as independent variables. Adjusted values of odds ratios and regression coefficient (β) were calculated using a logistic and linear regression model to determine the specific effect of season on gametocyte prevalence and log density, independent of age and asexual parasite density. In these models, the effect of age was assessed after categorization into groups 1–4 years, 5–14 years and ≥ 15 years. Odds ratios and regression coefficients were calculated with 95% confidence intervals (95% CI). Comparison of parasite densities was performed using the Student's *t*-test for normally distributed data and the Mann–Whitney *U*-test in case of data not conforming to a normal distribution.

Contrarily to gametocyte prevalence and density and asexual parasite density measured at 3 monthly intervals time points (cross-sectional surveys) at an individual based level, entomological data were longitudinally collected from a representative set of houses to describe seasonality of malaria transmission in the area. Consequently, our data on entomology were not included in regression analyses for predicting gametocyte prevalence, but were used to support effects of seasons on gametocytes independently of individual-based variables as age and asexual parasite density.

3. Results

3.1. Entomological and parasitological parameters

The weather in our study area was characterized by a clear seasonality with peak rainfall between June and September (Fig. 1A).

The biting rate, the sporozoite rate and EIR calculations were based on *A. gambiae*. Representative samples of 4593 and 3569 female *An. gambiae* (approximately half numbers of total mosquitoes collected) were tested to estimate transmission intensity in 2002 and 2003, respectively. All entomological parameters are shown in Fig. 1B. Transmission intensity quan-

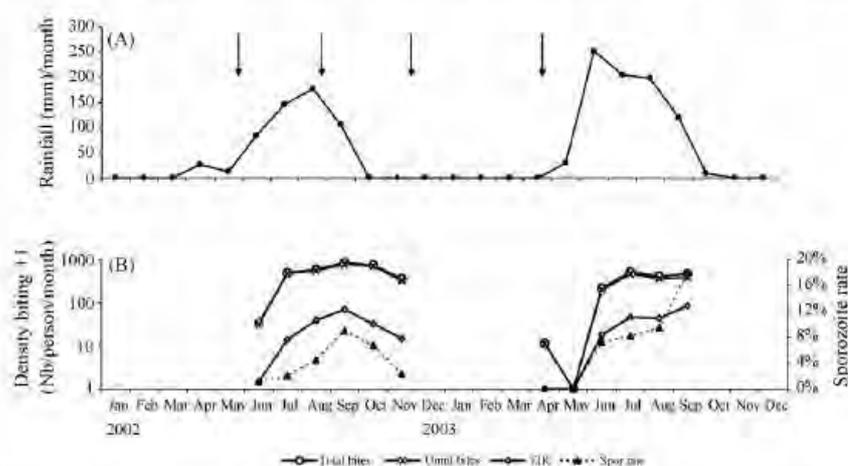


Fig. 1 (A) Mean monthly rainfall in 2002 and 2003. (B) Mean number of bites/person/month (total bites), mean number of infective bites/person/month (EIR), mean number of uninfected bites/person/month (Uninf bites), monthly sporozoite rate (Spor rate) in 2002 and 2003. Arrows indicate cross-sectional surveys for parasitological data collection. A total of 10,262 mosquitoes were longitudinally captured from the start to the end of the wet season 2002 and showed 9785 *An. gambiae* vs. 477 *An. funestus*. From the dry season to the peak-wet season 2003; 6044 *An. gambiae* were captured vs. 445 *An. funestus*.

tified by the number of infectious bites (EIR) peaked 1 month after the peak rainfall (Fig. 1A and B). The entomological cross-sectional survey carried out during the dry season in March 2002 resulted in the capture of eight *An. gambiae* mosquitoes. A total of 68 uninfected *An. gambiae* were captured in April in the dry period of 2003 and 0 in May 2003.

Infectious mosquitoes were not collected in both dry seasons. While the exposure to infectious bites at the start of the wet season was low, exposure to uninfected mosquito bites was elevated to 32 and 200 mosquito bites per person per month at the start of the wet season (June) in 2002 and 2003, respectively (Fig. 1B).

During the entire study period, *P. falciparum* asexual or sexual stages were microscopically detected in 61.8% (2100 of 3400 blood slides). Only asexual parasites were detected in 43.4% ($n=1477$); asexual parasites and gametocytes in 14.8% ($n=503$) and only gametocytes in 3.5% ($n=120$). Of the children under 5 years of age 71.3% (452/634) and 27.9% (177/634) carried asexual parasites and gametocytes, respectively. In subjects >30 years only 23.5% (160/682) and 5.3% (36/682) carried asexual parasites and gametocytes, respectively. The negative association between age in years and parasite prevalence was statistically significant for both asexual parasites (OR = 0.94; 95% CI 0.94–0.95) and gametocytes (OR = 0.95; 95% CI 0.95–0.96).

3.2. Season and asexual parasites

Asexual parasite prevalence showed a marked seasonality (Fig. 2A). Compared to the dry season, asexual parasite preva-

lence was significantly elevated at the peak (OR = 3.90, 95% CI 3.12–4.86; $p < 0.001$) and end (OR = 2.31, 95% CI 1.84–2.91; $p < 0.001$) of the wet season, after adjustment for age. The geometric mean of positive parasite densities was markedly different between the age groups at any period of the year (Fig. 2B). The parasite density was highest at the peak of the wet season and decreased towards the end of the wet season. This lower asexual parasite density at the end compared to the peak of the wet season was significant for children aged 5–14 years ($t=3.889$; d.f. = 521; $p < 0.001$) but not for adults of ≥ 15 years ($t=1.814$, d.f. = 219; $p=0.07$) and children below 5 years of age ($t=1.05$; d.f. = 228; $p=0.3$).

3.3. Season and gametocytes

Gametocyte prevalence was positively associated with log-transformed asexual parasite density (OR 1.17; 95% CI 1.05–1.31) and was also elevated in the wet season (Fig. 2C). Gametocyte prevalence was significantly higher at the beginning and the peak of the wet season, as compared to the dry season, after adjustment for age and asexual parasite density. In contrast, gametocyte prevalence appeared to be somewhat lower at the end of the wet season (Table 1).

Densities of gametocytes were 1–2 logs lower than asexual parasites with no consistent difference between age groups (Fig. 2D). The median of gametocyte density was 24 (IQR 16–40) gametocytes/ μ l at the start of the wet season, 32 (IQR 16–64) at the peak of the wet season, 40 (IQR 36–56) at the end of the wet season and 24 (IQR 16–32) in the dry season.

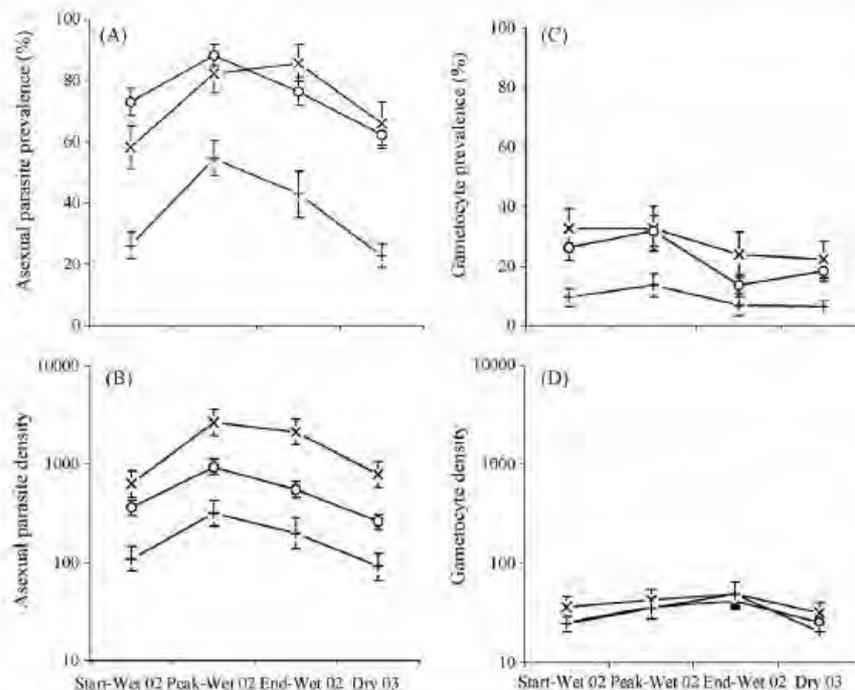


Fig. 2. *Plasmodium falciparum* asexual parasite prevalence (A), density (B) and gametocyte prevalence (C) and density (D) in relation to season in different age group (x) = 1–4 years; (o) = 5–14 years; (+) = 15+ years. The error bars show the \pm limits of the 95% confidence intervals. The number of blood samples collected at the start, peak and end of the wet season in 2002 was 968, 749 and 599, respectively. During the dry season 2003, 1084 samples were collected. Densities concern positive cases only.

Table 1
Crude (unadjusted) and adjusted effect of season on gametocyte prevalence and density

Gametocyte prevalence	n/N	Crude OR (95% CI)	p-Value adjusted	OR (95% CI) ^a	p-Value
Start wet season	201/968	1.62 (1.28–2.04)	<0.001	1.81 (1.36–2.42)	<0.001
Peak wet season	188/749	2.07 (1.63–2.62)	<0.001	1.75 (1.30–2.35)	<0.001
End wet season	83/599	0.99 (0.75–1.33)	0.97	0.68 (0.48–0.96)	0.03
Dry season	151/1084	1.0 ^b		1.0 ^b	
Gametocyte density	Mean ^c (n)	Crude β (95% CI)	p-Value	Adjusted β (95% CI) ^a	p-Value
Start wet season	28.3 (201)	0.04 (–0.027–0.107)	0.24	0.014 (–0.064–0.092)	0.73
Peak wet season	37.6 (188)	0.164 (0.10–0.23)	<0.001	0.109 (0.028–0.189)	0.008
End wet season	45.1 (83)	0.243 (0.16–0.33)	<0.001	0.152 (0.053–0.251)	0.003
Dry season	25.8 (151)	0.0 ^b		0.0 ^b	

OR = odds ratio; β = regression coefficient; CI = confidence interval; n = number of positive slides; N = total number of slides read.

^a Values are adjusted for age and log-transformed individual asexual parasite density.

^b Reference group.

^c Geometric mean of positive samples.

There was no difference in the gametocyte density between the start of the wet season and the dry season ($p=0.48$, Mann–Whitney U -test). It was significantly higher at the peak and end of the wet season compared to the dry season ($p<0.001$ and $p<0.001$, respectively, Mann–Whitney U -test).

After adjustment for age and asexual parasite density, gametocyte density was significantly higher at the peak and end but not at the beginning of the wet season, when compared to the dry season (Table 1). Despite these seasonal differences in low gametocyte densities, the prevalences are more robust, particularly at the start of the transmission season.

4. Discussion

This study shows the parasitological characteristics in a rural area in Burkina Faso during distinct seasons. An important finding is that season appears to be a factor independent of age and asexual parasite density that drives gametocyte prevalence and density. The prevalence and density of asexual parasites and gametocytes increase during the wet season. Malaria transmission varies between villages but is intense in the entire study area. Estimated sporozoite rates are in line with results from previous studies performed in the same area (Cuzin-Ouattara et al., 1999) as such studies described higher prevalences of infected mosquitoes reaching 20% during peak transmission period.

Seasonal patterns of *P. falciparum* gametocyte prevalence have been described (Abdel-Wahab et al., 2002; Rosenberg et al., 1990; Nacher et al., 2004; Molineaux et al., 1980; van der Kolk et al., 2003; Ord et al., in press). Gametocyte prevalence at the start and peak of the wet season is higher than in the dry season. In addition, gametocyte density is also elevated in the wet season, although only at the peak and end of the wet season. The elevated gametocyte prevalence and density in the wet season generally coincides with an increased asexual parasite density.

Gametocytes are derived from asexual parasites and asexual parasite density is strongly associated with gametocyte prevalence and density (Bousema et al., 2004; Akim et al., 2000; Ouedraogo et al., 2007). It is therefore not surprising that a strong correlation is found between asexual parasite density and gametocyte prevalence. The same argumentation may explain

the negative association between gametocyte prevalence and age (Akim et al., 2000; Bousema et al., 2004; van der Kolk et al., 2003). In addition, increased gametocyte density may be the result of a partial loss of immunity against gametocytes during the long dry season (Boudin et al., 1991), although evidence for the existence of specific gametocyte immunity remains inconclusive (Taylor and Read, 1997).

Though gametocyte prevalence is found higher in younger children, the contribution of older children and adults to the infectious reservoir should be taken into consideration as they represent a big part of the whole population and contribute considerably to malaria transmission (Toure et al., 1998; Muirhead-Thomson, 1954, 1957; Drakeley et al., 2000).

Our findings suggest that gametocyte prevalence and density may have an independent relationship with season. This follows from our finding that the effect of season on gametocyte prevalence and – to a lesser extent – density remains apparent after adjustment for age and asexual parasite density at the individual level. The development of gametocytes from asexual parasites takes 8–11 days (Sinden, 1983), and variation in asexual parasite carriage in the weeks prior to the start of the wet season may (partly) explain the observed effect on gametocyte prevalence.

Secondly, the elevated gametocyte prevalence that precedes the rise in sporozoite exposure and asexual parasite density may due to a sudden increase in uninfected mosquito bites in this period, as suggested by Paul et al. (2004). Parasites would indeed have a substantial fitness advantage if gametocytogenesis would be upregulated by uninfected mosquito bites. Our study design did not allow us to directly determine the relation between uninfected mosquito bites and gametocytogenesis since mosquito catches were not conducted throughout the dry season. The hypothesis, which gives equivocal results in rodent malaria studies (Billingsley et al., 2005; Shutler et al., 2005) require future field studies with a longitudinal design (Dunyo et al., 2006) in combination with more sensitive molecular detection of gametocytes (Schneider et al., 2005; Ouedraogo et al., 2007).

Studies using highly sensitive molecular methods have recently revealed that the vast majority of gametocytes remain undetected by microscopy (Schneider et al., 2005; Ouedraogo

et al., 2007). Therefore, our microscopical data only reflect the patterns of the relatively higher gametocyte densities, starting to increase at the beginning of the transmission season and continuing during the remainder of the wet season. The increased infection rate during the wet season may be the result of a higher complexity of infections, which may lead to an increased gametocyte production because of interclonal competition (Nassir et al., 2005). Extended duration of illness (Adedéji et al., 2005) and/or the use of anti-malarial drugs (Price et al., 1999) may further stimulate gametocyte carriage during the wet season. Finally, more efficient asexual parasite immunity halfway acquired through the wet season because of accumulated recent parasite exposure may also drive parasites towards sexual stage development (Boudin et al., 1991; Abdel-Wahab et al., 2002).

In conclusion, linked parasitological and entomological data from an area of highly seasonal transmission in Burkina Faso, shows that microscopic gametocyte prevalence and density is independently determined by age, asexual parasite density and season. The mechanisms behind the seasonal component remain elusive and will be subject to further studies.

Acknowledgements

We are grateful to all the inhabitants of the study villages for their co-operation, the Ministry of health of Burkina Faso and the staff of CNRFP for their assistance in the implementation of this study. We thank the parasitology and data entry units of CNRFP namely Albert Nyameogo, Daniel Tiendrebeogo, Zoungrana Benoit, Amadou Sankara, Amidou Ouedraogo and also Dr. Alfred Tiono, for his assistance. We are very grateful for the statistical advice by Dr. Caspar Looman of the Department of Public Health, Erasmus MC, Rotterdam and Dr. Adrian JF Luty for his advises. This study was funded by the Netherlands Foundation, for the Advancement of Tropical Research (WOTRO WM 93-350).

References

- Abdel-Wahab, A., Abdel-Muhsin, A.M., Ali, E., Suleiman, S., Ahmed, S., Waliker, D., Babiker, H.A., 2002. Dynamics of gametocytes among *Plasmodium falciparum* clones in natural infections in an area of highly seasonal transmission. *J. Infect. Dis.* 185, 1838–1842.
- Adedéji, A.A., Fehintola, F.A., Fatéye, B.A., Happi, T.C., Amoo, A.O., Gbetsho, G.O., Sowunmi, A., 2005. *Plasmodium falciparum* malaria in Nigerian children during high and low transmission seasons: gametocyte carriage and response to oral chloroquine. *J. Trop. Pediatr.* 51, 288–294.
- Akim, N.I.J., Drakeley, C., Kingo, T., Simon, B., Senkoro, K., Sauerwein, R.W., 2000. Dynamics of *P. falciparum* gametocytemia in symptomatic patients in an area of intense perennial transmission in Tanzania. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 63, 199–203.
- Baird, J.K., Owusu Agyei, S., Utz, G.C., Koram, K., Barcus, M.J., Jones, T.R., Fryauff, D.J., Binka, F.N., Hoffman, S.L., Nkrumah, F.N., 2002. Seasonal malaria attack rates in infants and young children in northern Ghana. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66, 280–286.
- Barnish, G., Maude, G.H., Bockarie, M.J., Erunkulu, O.A., Dumbuya, M.S., Greenwood, B.M., 1993. Malaria in a rural area of Sierra Leone. II. Parasitological and related results from pre- and post-rains clinical surveys. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 87, 137–148.
- Beier, J.C., Perkins, P.V., Wirtz, R.A., Whitnire, R.E., Mugambi, M., Hockmeyer, W.T., 1987. Field evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for *Plasmodium falciparum* sporozoite detection in anopheline mosquitoes from Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36, 459–468.
- Billingsley, P.F., Snook, L.S., Johnston, V.J., 2005. Malaria parasite growth is stimulated by mosquito probing. *Biol. Lett.* 1, 185–189.
- Boudin, C., Lyannaz, J., Bosseno, M.F., Carnevale, P., Ambroise-Thomas, P., 1991. Epidemiology of *Plasmodium falciparum* in a rice field and a savanna area in Burkina Faso: seasonal fluctuations of gametocytaemia and malarial infectivity. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 85, 377–385.
- Bousema, J.T., Gouagna, L.C., Drakeley, C.J., Meutstege, A.M., Okech, B.A., Akim, I.N., Beier, J.C., Githure, J.I., Sauerwein, R.W., 2004. *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage in asymptomatic children in western Kenya. *Malar. J.* 3, 18.
- Cuzin-Ouattara, N., Van den Broek, A.H., Habluetzel, A., Diabate, A., Sanogou-Ilboudo, E., Diallo, D.A., Cousens, S.N., Esposito, F., 1999. Wide-scale installation of insecticide-treated curtains confers high levels of protection against malaria transmission in a hyperendemic area of Burkina Faso. *Trans. R. Soc., Trop. Med. Hyg.* 93, 473–479.
- Drakeley, C.J., Akim, N.I., Sauerwein, R.W., Greenwood, B.M., Targett, G.A., 2000. Estimates of the infectious reservoir of *Plasmodium falciparum* malaria in The Gambia and in Tanzania. *Trans. R. Soc., Trop. Med. Hyg.* 94, 472–476.
- Dunyo, S., Milligan, P., Edwards, T., Sutherland, C., Targett, G., Pinder, M., 2006. Gametocytaemia after drug treatment of asymptomatic *Plasmodium falciparum*. *PLoS Clin. Trials* 4, e20.
- Habluetzel, A., Cuzin, N., Diallo, D.A., Nebie, I., Belem, S., Cousens, S.N., Esposito, F., 1999. Insecticide-treated curtains reduce the prevalence and intensity of malaria infection in Burkina Faso. *Trop. Med. Int. Health* 4, 557–564.
- Molineaux, L., Storey, J., Cohen, J.E., Thomas, A., 1980. A longitudinal study of human malaria in the West African Savanna in the absence of control measures: relationships between different *Plasmodium* species, in particular *P. falciparum* and *P. malariae*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29, 725–737.
- Muirhead-Thomson, R.C., 1954. Factors determining the true reservoir of infection of *Plasmodium falciparum* and *Wuchereria bancrofti* in a West African village. *Trans. R. Soc., Trop. Med. Hyg.* 48, 208–225.
- Muirhead-Thomson, R.C., 1957. The malarial infectivity of an African village population to mosquitoes (*Anopheles gambiae*). *Trans. R. Soc., Trop. Med. Hyg.* 6, 971–979.
- Nacher, M., Carrara, V.I., Ashley, E., McGready, R., Hutagalung, R., Nguen, J.V., Thwai, K.L., Looareesuwan, S., Nosten, F., 2004. Seasonal variation in hyperparasitaemia and gametocyte carriage in patients with *Plasmodium falciparum* malaria on the Thai-Burmese border. *Trans. R. Soc., Trop. Med. Hyg.* 98, 322–328.
- Nassir, E., Abdel-Muhsin, A.M., Suljaman, S., Kenyon, F., Kheir, A., Geha, H., Ferguson, H.M., Waliker, D., Babiker, H.A., 2005. Impact of genetic complexity on longevity and gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* during the dry and transmission-free season of eastern Sudan. *Int. J. Parasitol.* 35, 49–55.
- Ord, R., Alexander N., Dunyo S., Hallett R., Jawara M., Targett G., Drakeley C.J., Sutherland C.J., in press. Seasonal carriage of *pfprt* and *pfmdr1* alleles in Gambian *Plasmodium falciparum* imply reduced fitness of chloroquine-resistant parasites. *J. Infect. Dis.*
- Ouedraogo, A.L., Schneider, P., De Kruijff, M., Nebie, I., Verhave, J.P., Cuzin-Ouattara, N., Sauerwein, R.W., 2007. Age-dependent distribution of *Plasmodium falciparum* gametocytes quantified by Pfs25 real-time QTNASBA in a cross-sectional study in Burkina Faso. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 4, 626–630.
- Paul, R.E., Diallo, M., Brey, P.T., 2004. Mosquitoes and transmission of malaria parasites—not just vectors. *Malar. J.* 3, 39.
- Petrarca, V., Petrangeli, G., Rossi, P., Sabatelli, G., 1986. Chromosomal study of *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* in Ouagadougou (Burkina Faso) and various neighboring villages. *Parassitologia* 28, 41–61.
- Price, R., Nosten, F., Simpson, J.A., Luxemburger, C., Phaipun, L., ter Kuile, F., van Vugt, M., Chongsaphajaisiddhi, T., White, N.J., 1999. Risk factors for gametocyte carriage in uncomplicated *falciparum* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60, 1019–1023.

- Rosenberg, R., Andre, R.G., Ketrangsee, S., 1990. Seasonal fluctuation of *Plasmodium falciparum* gametocytaemia. *Trans. R. Soc., Trop. Med. Hyg.* 84, 29–33.
- Schneider, P., Wolters, L., Schoone, G., Schallig, H., Sillekens, P., Hermesen, R., Sauerwein, R., 2005. Real-time nucleic acid sequence-based amplification is more convenient than real-time PCR for quantification of *Plasmodium falciparum*. *J. Clin. Microbiol.* 1, 402–405.
- Shutler, D., Reece, S.E., Mullie, A., Billingsley, P.F., Read, A.F., 2005. Rodent malaria parasites *Plasmodium chabaudi* and *P. vinckei* do not increase their rates of gametocytogenesis in response to mosquito probing. *Proc. Biol. Sci.* 1579, 2397–2402.
- Sinden, R.E., 1983. Sexual development of malarial parasites. *Adv. Parasitol.* 22, 153–216.
- Sissoko, M.S., Dicko, A., Briet, O.J., Sissoko, M., Sagara, I., Keita, H.D., Sogoba, M., Rogier, C., Toure, Y.T., Doumbo, O.K., 2004. Malaria incidence in relation to rice cultivation in the irrigated Sahel of Mali. *Acta Trop.* 89, 161–170.
- Taylor, L.H., Read, A.F., 1997. Why so few transmission stages? Reproductive restraint by malaria parasites. *Parasit. Today* 13, 135–140.
- Toure, Y.T., Doumbo, O., Toure, A., Bagayoko, M., Diallo, M., Dolo, A., Vernick, K.D., Keister, D.B., Muratova, O., Kaslow, D.C., 1998. Gametocyte infectivity by direct mosquito feeds in an area of seasonal malaria transmission: implications for Bancoumana, Mali as a transmission-blocking vaccine site. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59, 481–486.
- van der Kolk, M., Tebo, A.E., Nimpaye, H., Ngo Ndongol, D., Sauerwein, R.W., Eling, W.M.C., 2003. Transmission of *Plasmodium falciparum* in urban Yaoundé, Cameroon, is seasonal and age-dependent. *Trans. R. Soc., Trop. Med. Hyg.* 97, 375–379.

3.2. Distribution avec l'âge des gamétocytes de *Plasmodium falciparum* quantifiés par la technique Pfs25 Real-Time QT-NASBA au cours d'une enquête transversale au Burkina Faso

Résumé

Les stades sexués de *Plasmodium falciparum* jouent un rôle clé dans la transmission du paludisme. Les études sur les gamétocytes sont généralement basées sur la détection microscopique alors que des méthodes plus sensibles détectent fréquemment des gamétocytes sous le seuil de la limite microscopique. Nous avons utilisé la technique Pfs25 ARNm QT-NASBA pour quantifier les gamétocytes de 412 échantillons collectés au cours d'une enquête transversale sur une population de tous les âges afin de déterminer le profil de la prévalence et de la densité de gamétocytes en fonction de l'âge. La technique QT-NASBA a estimé la prévalence de gamétocytes 3,3 fois plus élevée que la microscopie (70% contre 21.4% respectivement). La prévalence de gamétocytes a significativement diminué avec l'âge. L'analyse de nos données suggère que les stades asexués sont les premiers responsables de cet effet de l'âge du fait du développement d'une immunité anti-stades asexués. La densité de gamétocytes diminue aussi avec l'âge et dépendrait premièrement de la diminution avec l'âge de la densité de stades asexués. Un effet direct et significatif de l'âge sur la gamétocytémie pourrait être la cause d'une immunité spécifique anti-stades sexués.

AGE-DEPENDENT DISTRIBUTION OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* GAMETOCYTES QUANTIFIED BY PFS25 REAL-TIME QT-NASBA IN A CROSS-SECTIONAL STUDY IN BURKINA FASO

ANDRÉ LIN OUÉDRAOGO,* PETRA SCHNEIDER, MARCEL DE KRUIJF, ISSA NÉBIÉ, JAN PETER VERHAVE, NADINE CUZIN-OUATTARA, AND ROBERT W. SAUERWEIN

Department of Medical Microbiology, University Medical Centre Nijmegen, Nijmegen, The Netherlands; Département des Sciences Biomédicales, Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme, Ouagadougou, Burkina Faso

Abstract. Sexual stages of *Plasmodium falciparum* play a key role in the transmission of malaria. Studies on gametocytes are generally based on microscopic detection, but more sensitive detection methods for *P. falciparum* gametocytes frequently detect sub-patent gametocytes. We used Pfs25 mRNA quantitative-nucleic acid sequence-based amplification (QT-NASBA) to quantify gametocytes in 412 samples from a cross-sectional study in Burkina Faso, covering all age groups, to determine age-related patterns in gametocyte carriage and gametocyte density. The more sensitive QT-NASBA technique gave estimates of gametocyte prevalence 3.3-fold higher than microscopy (70.1% versus 21.4%, respectively). Prevalence of gametocytes significantly decreased with age. Our data suggest that asexual parasite densities are primarily responsible for the age-related decrease of gametocyte prevalence, possibly because of developing asexual stage immunity. Gametocyte densities decrease also with age, primarily because of decreasing asexual parasite densities; only a small but significant age effect on gametocyte density may be caused by developing sexual stage-specific immunity.

INTRODUCTION

Malaria is caused by protozoan parasites of the genus *Plasmodium*. The life cycle of these parasites consists of both asexual and sexual phases occurring in two hosts. Sexual reproduction occurs in the invertebrate vector, *Anopheles* mosquitoes for human malaria, whereas reproduction in the vertebrate host is solely asexual. However, sexual stage development starts in the vertebrate host where a proportion of the asexual parasites transform into sexual stages, called gametocytes. The gametocytes can infect mosquitoes, reproduce sexually, and are responsible for ongoing transmission of malaria to the next host. Despite the importance of gametocytes for the spread of malaria, relatively little is known about sexual stage development in comparison to the asexual stages that cause disease symptoms. Until recently, studies on gametocytes were based on microscopy, which is rather insensitive and inaccurate in quantification of gametocytes in blood samples (A. L. Ouédraogo and others, unpublished data). Individuals without microscopically detectable gametocytes can infect mosquitoes,¹ and higher gametocyte prevalences are found when larger volumes of blood are used for analysis.²⁻⁴ More sensitive detection methods for *Plasmodium falciparum* gametocytes such as the Pfs25 or Pfg377 reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)⁵⁻⁷ are able to detect sub-patent gametocytes,^{8,9} which can be quantified by Pfs25 mRNA quantitative-nucleic acid sequence-based amplification (QT-NASBA).^{10,11} The Pfs25 QT-NASBA has a detection limit of 20–100 gametocytes/mL of blood, and the high-throughput format allows its use in large epidemiologic studies. A previous study with Pfs25 QT-NASBA showed very high prevalence of gametocytes in symptomatic children in Kenya.¹¹

The objective of this study was to determine submicroscopic levels of gametocytes in a different epidemiologic setting. We used Pfs25 QT-NASBA to quantify gametocytes in

412 samples from a cross-sectional study in Burkina Faso, covering all age groups, and determined age-related patterns in gametocyte carriage and density.

MATERIALS AND METHODS

Field study. The study took place in six small rural villages 30 km north of Ouagadougou, Burkina Faso. These villages are situated in a Sudanese savannah area with a marked wet season from June to October. The distance between villages varies from 1 to 5 km. Malaria transmission is highest in the wet season and peaks around September.

Plasmodium falciparum is responsible for 90% of malaria infections with *Anopheles gambiae* and *A. funestus* as major vectors.¹² Health care facilities are equally distributed in the six villages, and residents live by subsistence farming.

A cross-sectional survey was carried out at the end of the transmission season (December 2003), at which time 412 villagers of all ages were enrolled. Adults and children of both sexes and exclusively of the Mossi ethnic were randomly included in the study by order of arrival until a minimum number of 10 individuals per age group with informed consent were included. A finger prick blood sample was taken from all participants. Thick and thin blood films were made, air-dried, and stained with 5% Giemsa. For collection of nucleic acids, 100 μ L of blood was mixed with 900 μ L of L6 lysis buffer and stored for RNA extraction. Most participants were asymptomatic; only 7% had a body temperature of > 37.5°C and were treated with chloroquine according to the national policy after blood samples for the study had been obtained. The study received ethical approval of the Ministry of Health of Burkina Faso.

Microscopic detection of *P. falciparum* parasites. Samples were considered negative if no parasites were detected in 100 fields (10 \times 100 magnification). Both asexual stage and gametocyte densities were simultaneously assessed by counting against 500 leukocytes in the thick smear. The lower limit of microscopy for gametocyte quantification was therefore evaluated to 16 gametocytes/ μ L of blood. Parasite counts were converted to numbers of parasites per microliter by assuming a standard count of 8,000 leukocytes/ μ L of blood.

* Address correspondence to André Lin Ouédraogo, Département des Sciences Biomédicales, Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme, 01 BP 2208 Ouagadougou 01, Burkina Faso. E-mail: andre_lin_o@yahoo.fr

Each sample was read independently by two microscopists. A third reader was involved when the difference between the readers exceeded 30%, and in such a case, the median reading was used (CNRFP Ouagadougou).

Real-time Pfs25 QT-NASBA and nucleic acid extraction. Nucleic acids were extracted from blood samples using the guanidiniumthiocyanate (GuSCN)/silica procedure,¹³ and 18S rRNA real-time QT-NASBA¹⁴ and *Pfs25* real-time mRNA QT-NASBA¹¹ were performed as described elsewhere. Briefly, real-time QT-NASBA for *Pfs25* mRNA (Genbank accession no. AF193769.1) was performed on a Nuclisens EasyQ analyser (bioMérieux sa, Lyon, France) using the Nuclisens BasicKit for amplification according to the manufacturer's instructions at a KCl concentration of 80 mmol/L. Reactions were performed in a total reaction volume of 10 μ L per reaction (forward primer: 5'-gactgtaaataaacattgtggaga-3'; reverse primer: 5'-aattctaatacagactactataggagaaggcattaccgttaccacaagtta-3'; *Pfs25* molecular beacon: 5'-TexasRed-cgatcgccctttcatacgcttgaacgatcg-DABSYL-3'). For quantification, time to positivity was calculated (i.e., the time-point during amplification at which the fluorescence detecting target amplicons becomes higher than the mean fluorescence of three negative controls + 20 SD). The use of a standard gametocytes stage 5 dilution series allowed exact calculation of the number of gametocytes present in unknown samples.^{10,11}

Data analysis. Statistical analyses were performed in SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) 12.0.1. Because parasitologic parameters, including total parasite and gametocyte densities, were not different between the six villages (data not shown), samples were pooled for analyses. Spearman correlation was used to determine correlation between results of microscopy and QT-NASBA. A $^{10}\log(x + 1)$ transformation was applied to both asexual parasite and gametocyte counts to allow negative samples in the analysis. Geometric mean of gametocyte density was calculated for gametocyte positive samples and for all samples, including the negatives. To determine the relation to age group and asexual parasite density, logistic regression was used for gametocyte prevalence and linear regression for gametocyte density. The age range was very large, and therefore, we analyzed age group as a categorical variable in comparison with the oldest age group of 25+ years (adults). With such analyses, a decrease of the correlation coefficient with increasing age group indicates a negative relation between age group and the parameter under study.

RESULTS

Comparison of QT-NASBA and microscopy for gametocyte detection. Blood samples for QT-NASBA analysis were collected randomly from 412 individuals with a mean age of 17.5 years (range, 2–83 years) after informed consent. All participants were assigned to age groups: < 5 ($N = 79$), 5–9 ($N = 97$), 10–14 ($N = 78$), 15–24 ($N = 71$), and ≥ 25 years ($N = 87$).

Pfs25 mRNA QT-NASBA confirmed that 92% (81/88) of samples were gametocyte positive by microscopy, with a geometric mean QT-NASBA gametocyte density of 3.90×10^3 /mL blood (IQR, 5.11×10^2 – 2.72×10^4 /mL blood). In general, gametocyte densities detected by microscopy were close to the microscopical detection limit with 1 gametocyte/500 leucocytes counted in 51.1% of these samples. The more sensi-

tive QT-NASBA detected gametocytes in an additional 208 samples, with a geometric mean density below the detection limit of microscopy (1.98×10^3 /mL blood; IQR, 3.95×10^2 – 9.60×10^3 /mL blood).

Parasite prevalence. Detection of gametocytes by *Pfs25* real-time QT-NASBA considerably increased gametocyte prevalence from 21.4% (microscopy) to 70.1%. Total parasite and gametocyte prevalence as detected by the two methods are shown for all age groups in Figure 1. The detection of total parasite prevalence and gametocyte prevalence were higher by QT-NASBA compared with standard microscopy. A decrease of *P. falciparum* prevalence with age was found by microscopy but not by QT-NASBA, indicating that parasite densities in adults were merely reduced to submicroscopic levels. Gametocyte prevalence was negatively associated with age and 3.2- to 3.8-fold higher in the three youngest age groups (0–15 years) compared with that in adults (25+ years) by QT-NASBA analyses (Table 1). For microscopy, this was 1.7- to 1.9-fold higher (data not shown).

Asexual parasite densities detected by microscopy decrease significantly with age (A. L. Ouédraogo and others, unpublished data). Because gametocytes are derived from their asexual progenitors, it is important to separately detect the

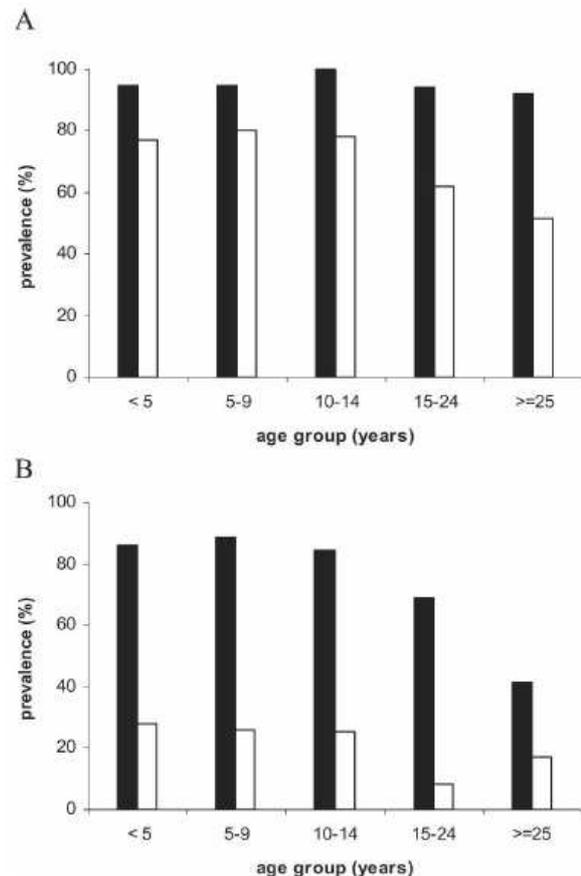


FIGURE 1. Parasite prevalence for the different age groups, calculated by QT-NASBA A, and microscopy B. Solid bars represent total parasite prevalence, including asexual parasites and gametocytes. Open bars represent gametocyte prevalence.

TABLE 1
Effect of asexual parasite density on age distribution of gametocyte carriage and gametocyte density measured by QT-NASBA

Gametocyte prevalence					
Age group (years)	N	OR* (95% CI)	P value	OR† (95% CI)	P value
< 5	79	3.16 (1.61–6.20)	0.001	1.53 (0.73–3.24)	0.262
5–9	97	3.83 (2.00–7.37)	0.000	1.86 (0.90–3.83)	0.094
10–14	78	3.35 (1.69–6.63)	0.001	1.85 (0.89–3.88)	0.101
15–24	71	1.52 (0.80–2.88)	0.197	1.05 (0.53–2.08)	0.884
≥ 25	87	1.0‡		1.0‡	

Gametocyte density§					
Age group (years)	N	β* [SE (β)]	P value	β† [SE (β)]	P value
< 5	79	1.11 (0.26)	0.000	0.50 (0.28)	0.071
5–9	97	1.19 (0.25)	0.000	0.59 (0.27)	0.027
10–14	78	1.02 (0.27)	0.000	0.53 (0.27)	0.053
15–24	71	0.45 (0.27)	0.098	0.16 (0.27)	0.556
≥ 25	87	0.0‡		0.0‡	

Gametocyte density¶**			
Age group (years)	N	β* [SE (β)]	P value
< 5	61	0.406 (0.19)	0.037
5–9	78	0.369 (0.19)	0.046
10–14	61	0.248 (0.19)	0.201
15–24	44	0.213 (0.21)	0.309
≥ 25	45	0.0‡	

* Crude values of odds ratio (OR) and β.
 † OR and β adjusted for ¹⁰log asexual parasite density. Asexual density OR = 1.27 (CI = 1.16–1.38; *P* < 0.001) for gametocyte prevalence and β = 0.18 [SE(β) = 0.03; *P* < 0.001] for gametocyte density.
 ‡ Age group ≥ 25 years was used as reference group.
 § All samples.
 ¶ Samples from Pfs25 QT-NASBA-positive gametocyte carriers.
 ** Adjustment for asexual density was not significant with β = 0.023, SE(β) = 0.026, and *P* = 0.378.

effects of age on asexual parasites and on gametocytes. Therefore, the asexual parasite density was included as an explanatory variable in the analyses of age-related decrease of gametocyte prevalence. After adjustment for asexual parasite density, no significant decrease of gametocyte prevalence, detected by either QT-NASBA (Table 1) or microscopy (data not shown), was found with increasing age. A significant positive association was shown between asexual parasite density and gametocyte prevalence (OR = 1.27; 95% CI = 1.16–1.38; *P* < 0.001 for QT-NASBA [Table 1]; OR = 1.12; 95% CI = 1.01–1.25; *P* = 0.040 for microscopy). These data suggest that the age-related decrease of gametocyte prevalence is probably the result of decreasing asexual parasite densities.

Parasite density. Figure 2 shows that gametocyte densities and the asexual parasite densities decrease with age. Linear regression analyses showed a significant negative effect of age on gametocyte density detected by both QT-NASBA (Table 1) and microscopy (data not shown). Individuals older than 15 years of age carried lower gametocyte densities than children 0–15 years of age. When asexual parasite density was included as a covariate, a significant positive relation was found with gametocyte density by both QT-NASBA [β = 0.18; SE(β) = 0.033; *P* < 0.001 (Table 1)] and microscopy [β = 0.076; SE(β) = 0.036; *P* = 0.036]. After this adjustment for asexual parasite density, the age-related difference in gametocyte density mostly disappeared, although a trend remained. These results suggest that an age-related decrease of gametocyte densities mainly depend on asexual density as shown for gametocyte prevalence.

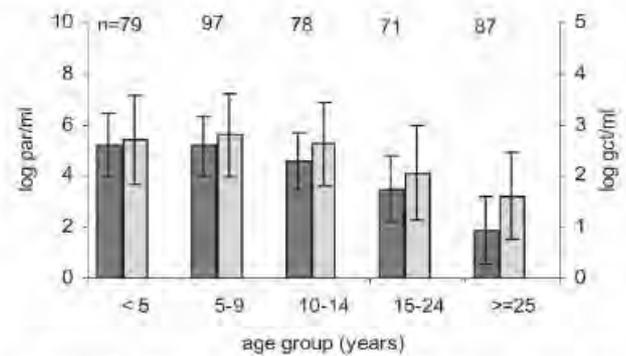


FIGURE 2. Mean parasite densities for different age groups, calculated for all samples. Solid bars represent asexual parasite density measured by microscopy. Striped bars represent gametocyte density measured by QT-NASBA. Numbers of individuals per group are presented on top of bars. Error bars indicate SD.

Calculations of mean gametocyte densities are influenced by gametocyte prevalence if gametocyte-negative samples are included. Therefore, any factor that influences gametocyte prevalence may have been included in the analysis, without necessarily having a direct relation to gametocyte density. To avoid the risk of incorporating such indirect effects, the analyses were repeated in only QT-NASBA gametocyte-positive samples. Asexual density still tended to decrease with age, although the relation was not significant (*P* = 0.378). However, QT-NASBA gametocyte densities still decreased slightly with age. Table 1 shows that the two youngest age groups (< 10 years) carry significantly higher gametocyte densities compared with adults. This effect of age is independent of asexual density. Such an age effect was not significant for microscopy, with or without asexual parasite density as a covariate.

DISCUSSION

Pfs25 real-time QT-NASBA showed an overall gametocyte prevalence of 70.1% during a cross-sectional study at the end of the rainy season in Burkina Faso, which is higher than in studies based on microscopy.^{15,16} Although the additionally detected gametocyte carriers in general have very low gametocyte densities, the potential contribution of this group to the infectious reservoir should not be ignored (P. Schneider and others, unpublished data).¹¹ Therefore, transmission studies based on mosquito feeds with random population samples^{16–18} will give a more adequate estimation of population-wide transmission potential than studies based on microscopy.^{15,19–21}

Age-related decreases in both asexual parasites and gametocytes have been shown before.^{15,16,18,22–24} Such relations may be the result of developing immunity to asexual and sexual stages of *P. falciparum* over time. In this study, the age-dependent decrease of asexual parasites suggests the development of asexual stage immunity. Gametocyte prevalence and densities also decreased with age. As these stages are formed from their asexual progenitors, this may be the result of a lower availability of asexual progenitors (asexual stage immunity), of cross-stage immunity,²⁵ or of sexual stage-specific immunity. Our results show that the relation be-

tween age and both gametocyte prevalence and density depends primarily on asexual parasite density, suggesting that asexual or cross-stage immunity may be an important determinant. This effect may obscure direct influences of age (i.e., anti-gametocyte immunity). We adjusted for this effect in two different ways. 1) We adjusted for asexual parasite density. Although a trend was seen, age-related decreases in gametocyte density were non-significant after this adjustment. However, as a result of adjustment with highly variable asexual parasite densities, larger sample sizes may be needed to obtain significant relationships. 2) We selected only Pfs25 QT-NASBA-positive samples. The influence of asexual parasite density was reduced to insignificant levels in this selection, whereas an age-related decrease in gametocyte density was still seen. This decrease of gametocyte densities with age, unaffected by asexual parasite densities, may be the result of anti-gametocyte immunity. However, the age-related decrease of gametocytes is likely determined by immunity that results in primarily a decreased asexual parasite density rather than direct effect on gametocytes.

The influence of asexual parasite density on gametocytes, described above, was based on analyses including microscopically counted asexual parasites. Although microscopic detection of asexual parasites is more robust than that of gametocytes, more sensitive methods like QT-NASBA may also detect sub-patent asexual parasites. Ideally, we would have included asexual parasite density determined by QT-NASBA as a covariate. QT-NASBA is currently available for quantification of the total parasite load¹⁴ or for gametocytes only, but not yet for specific quantification of asexual parasites as is the case for other molecular biology methods such as PCR.^{7,14}

Our results were obtained with samples collected at the end of the wet season. With a marked seasonal transmission in Burkina Faso, we cannot generalize these results to all seasons. It is possible that gametocyte prevalence and mean gametocyte densities, as well as the relations with age, vary over time. However, in a preceding study over various seasons, of which the present samples are a small part, we came to similar conclusions with microscopic parasite detection (A. L. Ouédraogo and others, unpublished data). QT-NASBA analysis of samples of cross-sectional surveys in other seasons will be performed.

Received July 31, 2006. Accepted for publication January 11, 2007.

Acknowledgments: The authors thank the people participating in the study for their cooperation; the staff of the parasitology laboratory at CNRFP in Burkina Faso; Professor A. S. Ouattara for supervision; Marga van de Vegte-Bolmer of Radboud University Nijmegen for gametocyte production in the *in vitro* parasite culture; and Gerard Schoone and Henk Schallig of KIT Biomedical Research Amsterdam and Sake de Vlas of Erasmus University Rotterdam for advice, support, and motivation during the study and preparation of the manuscript.

Financial support: This work was supported by the Technology Foundation STW (Grant NFA6009) and WOTRO (WM 93-350).

Authors' addresses: André Lin Ouédraogo, Issa Nébié, and Nadine Cuzin-Ouattara, Département des Sciences Biomédicales, Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme, 01 BP 2208 Ouagadougou 01, Burkina Faso, Telephone: 226-50-324695, Fax: 226-50-310477. André Lin Ouédraogo, Petra Schneider, Marcel de Kruijf, Jan Peter Verhave, and Robert W. Sauerwein, Medical Microbiology Department 268, Radboud University Medical Centre, PO Box 9101, 6500 HB Nijmegen, The Netherlands, Telephone: 31-24-3610577, Fax: 31-24-3614666.

Reprint requests: Robert W. Sauerwein, Medical Microbiology 268, Radboud University Medical Centre, PO Box 9101, 6500 HB Nijmegen, The Netherlands.

REFERENCES

- Muirhead-Thomson RC, 1954. Factors determining the true reservoir of infection of *Plasmodium falciparum* and *Wuchereria bancrofti* in a West African village. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 48: 208–225.
- Trape JF, 1985. Rapid evaluation of malaria parasite density and standardization of thick smear examination for epidemiological investigations. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 79: 181–184.
- Dowling MAC, Shute GT, 1966. A comparative study of thick and thin blood films in the diagnosis of scanty malaria parasitaemia. *Bull World Health Organ* 34: 249–267.
- Greenwood BM, Armstrong JR, 1991. Comparison of two simple methods for determining malaria parasite density. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 85: 186–188.
- Babiker HA, Abdel-Wahab A, Ahmed S, Suleiman S, Ranford-Cartwright L, Carter R, Walliker D, 1999. Detection of low level *Plasmodium falciparum* gametocytes using reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 99: 143–148.
- Menegon M, Severini C, Sannella A, Paglia MG, Sangare D, Abdel-Wahab A, Abdel-Muhsin AA, Babiker H, Walliker D, Alano P, 2000. Genotyping of *Plasmodium falciparum* gametocytes by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 111: 153–161.
- Paganotti GM, Palladino C, Modiano D, Sirima BS, Raberg L, Diarra A, Konaté A, Coluzzi M, Walliker D, Babiker HA, 2006. Genetic complexity and gametocyte production of *Plasmodium falciparum* in Fulani and Mossi communities in Burkina Faso. *Parasitol* 132: 607–614.
- Abdel-Wahab A, Abdel-Muhsin AA, Ali E, Suleiman S, Ahmed S, Walliker D, Babiker HA, 2002. Dynamics of gametocytes among *Plasmodium falciparum* clones in natural infections in an area of highly seasonal transmission. *J Infect Dis* 185: 1838–1842.
- Nassir E, Abdel-Muhsin AM, Suliaman S, Kenyon F, Kheir A, Geha H, Ferguson HM, Walliker D, Babiker HA, 2005. Impact of genetic complexity on longevity and gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* during the dry and transmission-free season of eastern Sudan. *Int J Parasitol* 35: 49–55.
- Schneider P, Schoone G, Schallig H, Verhage D, Telgt D, Eling W, Sauerwein R, 2004. Quantification of *Plasmodium falciparum* gametocytes in differential stages of development by quantitative nucleic acid sequence-based amplification. *Mol Biochem Parasitol* 137: 35–41.
- Schneider P, Bousema T, Omar S, Gouagna L, Sawa P, Schallig H, Sauerwein R, 2006. (Sub)microscopic *Plasmodium falciparum* gametocytaemia in Kenyan children after treatment with sulphadoxine-pyrimethamine monotherapy or in combination with artesunate. *Int J Parasitol* 36: 403–408.
- Petrarca V, Petrangeli G, Rossi P, Sabatinelli G, 1986. Chromosomal study of *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* in Ouagadougou (Burkina Faso) and various neighboring villages. *Parassitologia* 28: 41–61.
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van-Dillen PM, Noordaa JVD, 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28: 495–503.
- Schneider P, Wolters L, Schoone G, Schallig H, Sillekens P, Hermsen R, Sauerwein R, 2005. Real-time nucleic acid sequence-based amplification is more convenient than real-time PCR for quantification of *Plasmodium falciparum*. *J Clin Microbiol* 43: 402–405.
- Boudin C, Lyannaz J, Bosseno MF, Carnevale P, Ambroise-Thomas P, 1991. Epidemiology of *Plasmodium falciparum* in a rice field and a savanna area in Burkina Faso: seasonal fluctuations of gametocytaemia and malarial infectivity. *Ann Trop Med Parasitol* 85: 377–385.
- Boudin C, Olivier M, Molez JF, Chiron JP, Ambroise-Thomas P, 1993. High human malarial infectivity to laboratory-bred

- Anopheles gambiae* in a village in Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg* 48: 700-706.
17. Muirhead-Thomson RC, 1957. The malarial infectivity of an African village population to mosquitoes (*Anopheles gambiae*): a random xenodiagnostic survey. *Am J Trop Med Hyg* 6: 971-979.
 18. Githeko AK, Brandling-Bennett AD, Beier M, Atieli F, Owaga M, Collins FH, 1992. The reservoir of *Plasmodium falciparum* malaria in a holoendemic area of western Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86: 355-358.
 19. Gouagna LC, Bonnet S, Gounoue R, Verhave JP, Eling W, Sauerwein R, Boudin C, 2004. Stage-specific effects of host plasma factors on the early sporogony of autologous *Plasmodium falciparum* isolates within *Anopheles gambiae*. *Trop Med Int Health* 9: 937-948.
 20. Toure YT, Doumbo O, Toure A, Bagayoko M, Diallo M, Dolo A, Vernick KD, Keister DB, Muratova O, Kaslow DC, 1998. Gametocyte infectivity by direct mosquito feeds in an area of seasonal malaria transmission: implications for Bancoumana, Mali as a transmission-blocking vaccine site. *Am J Trop Med Hyg* 59: 481-486.
 21. Drakeley CJ, Akim NI, Sauerwein RW, Greenwood BM, Targett GA, 2000. Estimates of the infectious reservoir of *Plasmodium falciparum* malaria in The Gambia and in Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94: 472-476.
 22. Akim NI, Drakeley C, Kingo T, Simon B, Senkoro K, Sauerwein RW, 2000. Dynamics of *P. falciparum* gametocytemia in symptomatic patients in an area of intense perennial transmission in Tanzania. *Am J Trop Med Hyg* 63: 199-203.
 23. Kolk MVD, Tebo AE, Nimpaye H, Ndongbol DN, Sauerwein RW, Eling WM, 2003. Transmission of *Plasmodium falciparum* in urban Yaounde, Cameroon, is seasonal and age-dependent. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97: 375-379.
 24. Bousema JT, Gouagna LC, Drakeley CJ, Meutstege AM, Okech BA, Akim IN, Beier JC, Githure JI, Sauerwein RW, 2004. *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage in asymptomatic children in western Kenya. *Malar J* 3: 18.
 25. Piper KP, Hayward RE, Cox MJ, Day KP, 1999. Malaria transmission and Naturally acquired immunity to PfEMP-1. *Infect Immun* 67: 6369-6374.

3.3 Anticorps IgG humains dirigés contre les antigènes Pfs48/45, Pfs230, GLURP et CS de *Plasmodium falciparum* en fonction de l'endémicité et de la saison chez des enfants de moins de 5 ans au Burkina Faso

André Lin Ouédraogo^{1,2,*}, W. Roeffen², Issa Nébié¹, Sake J. de Vlas³, Edith Ilboudo-Sanogo¹, Jan Peter Verhave², Aboubakar S. Ouattara⁴, Nadine Cuzin-Ouattara¹ and Robert W. Sauerwein²

¹Centre National de Recherche et de Formation sur le paludisme, 01BP 2208 Ouagadougou 01, Burkina Faso

²Department of Medical Microbiology, Radboud University Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands

³Department of Public Health, Erasmus MC, University Medical Centre Rotterdam, P.O. Box 1738, 3000 DR Rotterdam, The Netherlands

⁴Departement de Biochimie-Microbiology, Université de Ouagadougou, 03 BP:7131, Ouagadougou 03, Burkina Faso

Mots clés: malaria, *falciparum*, gametocyte, season, transmission, Burkina Faso

Résumé

Nous avons évalué le profil parasitologique et immunologique du paludisme et particulièrement le profil des stades sexués et l'immunité humorale anti-stade sexué en fonction de la saison de transmission et de l'endémicité palustre chez des enfants de moins de 5 ans vivant dans des villages burkinabé. Au total, 102 enfants ont été enrôlés dans l'étude. La prévalence de stades asexués était significativement plus élevée dans la zone de forte transmission comparée à la zone de faible transmission. La prévalence des gamétocytes était également plus élevée dans la zone de forte transmission mais cette différence n'était pas significative. La prévalence et la densité de gamétocytes étaient non significativement plus élevées en saison humide au pic de la transmission palustre. La prévalence des anticorps humains dirigés contre les antigènes CS et GLURP était non significativement plus élevée en zone de forte transmission et s'associe à de faibles densités de parasites asexués et de faibles prévalences de gamétocytes. La prévalence des anticorps contre l'antigène Pfs48/45 de stade sexué était non significativement plus élevée dans la zone de forte transmission qu'en zone de faible transmission contrairement à l'antigène Pfs230 qui montrait une réactivité plus faible quoique non significative en zone de forte transmission.

Mots clés: *falciparum*, gamétocyte, Pfs48/45, Pfs230, Burkina

Introduction

Le paludisme léthal au Burkina Faso est causé par l'espèce *Plasmodium falciparum*. Les sporozoïtes sont les stades du parasite qui sont inoculés par le vecteur infecté dans le courant sanguin humain et qui vont initier l'infection. L'intensité de l'inoculation de sporozoïtes devient dès lors un paramètre clé dans l'épidémiologie du paludisme. Les stades asexués érythrocytaires (mérozoïtes) sont les stades du parasites qui occasionnent les manifestations cliniques de l'infection alors que les gamétocytes circulant dans le sang périphérique sont des facteurs clés dans la transmission de l'infection d'un individu à un autre en fécondant chez le moustique pour générer de nouveaux sporozoïtes infectieux pour l'homme. Des études ont démontré que des anticorps humains dirigés contre les antigènes CS du sporozoïte (Holligdale *et al.*, 1984 ; Egan *et al.*, 1993), GLURP du mérozoïte (Dziegiel *et al.*, 1993, Doodoo *et al.*, 2000), Pfs48/45 et Pfs230 du gamétocyte (Carter *et al.*, 1990; Roeffen *et al.*, 1995) sont capables d'inhiber l'infection de l'hôte humain, de protéger contre les manifestations cliniques du paludisme et d'interrompre la transmission de l'infection respectivement. L'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide chez des enfants a démontré qu'il y avait une réduction de l'incidence palustre

associée à la morbidité et de la mortalité palustre (Diallo *et al.*, 2004; Lengeler *et al.*, 1998; Snow *et al.*, 1996). Des études sur la relation entre morbidité et niveau de transmission ont également permis de comprendre l'implication de la prévalence parasitaire et de l'immunité palustre en fonction du niveau de transmission dans les cas cliniques du paludisme chez l'enfant (Lepers *et al.*, 1990, Snow *et al.*, 1997). Ces informations prédisent par conséquent qu'un contrôle de la transmission aura un impact positif sur le control du paludisme.

Dans la présente étude nous mesurerons les facteurs parasitologiques et immunologiques palustres en fonction du niveau de transmission dans des villages burkinabé.

Matériel et méthodes

Site et population de l'étude

L'étude s'est déroulée dans six villages des provinces de Kourwéogo et de l'Oubritenga au Burkina Faso. Dans chacune des deux provinces, un groupe de 3 villages a été sélectionnée sur la base de leur proximité avec la capitale, leur accessibilité. Les villages de la province de l'Oubritenga et du Kourwéogo sont situés à environs 30 km au nord et au nord-ouest respectivement de Ouagadougou. Selon des études entomologiques préliminaires, les villages situés dans la province de

l'Oubritenga avaient retrouvé quelques années après l'installation de rideaux imprégnés d'insecticides, un niveau de transmission palustre supérieur à celui des villages de la province du Kourwéogo. Ces informations étaient prises en compte pour la conduite de la présente étude qui consiste à comparer les indices paludologiques entre les populations des deux zones en fonction du niveau de transmission. La population de l'étude était constituée d'enfants de moins de 5 ans des deux genres et appartenant exclusivement à l'ethnie Mossi. Les parents ou tuteurs des enfants ont été clairement informés des objectifs et des procédures de l'étude et leur consentement oral a été obtenu. Une approbation écrite du Ministère de la Santé du Burkina Faso a rendu possible la conduite de l'étude. Trois enquêtes transversales ont été conduites au cours de l'année 2002 en début de la saison des pluies (début de saison de transmission en juin), au pic de la saison de transmission en septembre et en fin de la saison de transmission en décembre). Une vingtaine d'enfants de moins de 5 ans par village étaient enrôlés à chaque enquête pour le prélèvement sanguin parasitologique et immunologique. Le choix de l'âge des enfants s'est basé sur leur vulnérabilité vis-à-vis du paludisme et de leur susceptibilité à présenter différents aspects parasitologiques et sérologiques du

paludisme en fonction du niveau de transmission auquel ils sont naturellement exposés (Singer *et al.*, 2003).

Données entomologiques

Nous avons conduit une étude entomologique dans les six villages dans le but d'infirmier ou de confirmer la différence de transmission entre les deux zones. La comparaison de la transmission devait être faite sur la base du taux d'inoculation entomologique (TIE). Le TIE était défini comme le nombre de piqûres infectantes par personne et par unité de temps. C'est le produit du nombre de moustiques capturées par unité de temps multiplié par le l'indice sporozoïtique de la même unité de temps. Des cases au nombre de 16 étaient sélectionnées par village à l'intérieur desquelles la capture de moustiques devait se dérouler chaque mois. Un seul dormeur y résidait pour permettre le calcul du TIE. La capture des moustiques était réalisée entre juin et novembre 2002 avec le piège lumineux CDC. Les moustiques étaient ramenés au laboratoire d'entomologie du CNRFP pour la recherche de la protéine CSP dans les thorax des moustiques par la méthode de l'ELISA (Beier *et al.*, 1987)..

Données parasitologiques et immunologiques

Les données parasitologiques et immunologiques ont été collectés lors des enquêtes transversales dans les six villages des deux zones. Une lame de goutte épaisse et de frottis sanguin était réalisée à partir du sang capillaire sur chaque participant. Un autre prélèvement sanguin était réalisé dans des tubes eppendorff contenant de l'EDTA comme anticoagulant pour la recherche d'anticorps dirigés contre les antigènes CS, GLURP des stades asexués de *Plasmodium falciparum* et Pfs45/45, Pfs230 des stades sexués du parasite.

Détection des anticorps anti-GIURP et anti-CS

Le peptide synthétique GLURP₈₅₋₂₁₃ dilué à une concentration de 0.2µg/ml dans 0.05M de tampon carbonate (50µl/puits) était fixé dans une microplaque de 96 puits à fond plat (NUNCTM Maxisorp, Nalge Nunc International Corp, Life Techn, The Netherlands). Pour détecter les anticorps anti-sporozoïte, le peptide synthétique PfCS₂₈₂₋₃₈₃ dilué à 1µg/ml dans du PBS (50 µl/puits) était fixé dans une microplaque de 96 puits à fond rond (Sterilin®). Les plaques étaient incubées toute la nuit à 4°C et lavées avec du tampon PBS/Tween. Les sites libres étaient bloqués avec 150 µl/puits de 2.5% de lait/PBS (Marvel). Les plaques étaient lavées et incubées pendant 1h 00 à

température ambiante avec les échantillons de plasma dilués à 1:200 dans du PBSTM (2.5% lait et 0.05% tween20 dans du PBS) pour l'ELISA GLURP ou avec une dilution de 1:100 pour l'ELISA CS. Les plaques étaient lavées et incubées pendant 1h00 avec l'anticorps conjugué à la peroxydase (rabbit anti-human IgG-Peroxydase ; Dako, P-214) diluée à 1:10,000 dans du PMSTM avant la réaction avec le substrat (TMB). La réaction était arrêtée après 15 min avec de l'acide sulfurique 4N. La densité optique était mesurée par un photomètre (Anthos 2001 Microplate Reader, Labtec BV) à 450 nm. Dans chaque microplaque au cours du test d'ELISA, un plasma contrôle positif et 3 plasmas contrôles négatifs étaient utilisés. Un plasma de sujet était considéré positif si sa densité optique était supérieure à la moyenne de celles des contrôles négatifs plus 2 déviations standards.

Détection des anticorps anti-Pfs230 et anti-Pfs48/45

Pour détecter les anticorps anti-Pfs230 et anti-Pfs48/45 dans le plasma, 10µg/ml de PBS d'anticorps monoclonaux 63F6D7-F(ab)₂ de souris anti-Pfs230 et 10µg/ml de PBS d'anticorps monoclonaux 85RF45.3 anti-Pfs48/45 étaient fixés dans une microplaque de 96 puits à fond rond respectivement (Sterilin®, International

Medical Products B.V., Zutphen, The Netherlands). Les sites de fixation libres de l'antigène étaient bloqués avec un tampon PBS à 5% de lait (Marvel, Premier International Foods Ltd, Spalding, Lines United Kingdom). Les antigènes Pfs230 ou Pfs48/45 étaient capturés toute la nuit à 4°C à partir de 50 µl d'extrait de gamétocytes. Les plasmas de sujets et de contrôle étaient dilués à 1:100 et distribués dans les puits. Les anticorps des plasma fixés pouvaient ensuite capturer le conjugué anti-Humain IgG-péroxydase (H+L, Pierce). La révélation était faite par le substrat (Tétraméthyl Benzidine, TMB) et arrêtée avec de l'acide sulfurique 4NH₂SO₄. La densité optique était mesurée par un photomètre (Anthos 2001 Microplate Reader, Labtec BV) à 450 nm. Le reste de la procédure est identique à celle des ELISAs GLURP et CS

Analyse statistique des données

Toutes les données parasitologiques ont été doublement entrées dans l'ordinateur par deux opératrices de saisie et validées par le logiciel Epi Info version 6.0. Le nettoyage des données et la préparation à l'analyse ont été fait dans Excel et l'analyse dans le logiciel SPSS version 12.0. Les données parasitologiques ont été transformées en valeurs logarithmiques pour la détermination des moyennes géométriques des densités parasitaires. Les comparaisons

de proportions et de densités entre les deux zones de transmission différentes étaient faites par les tests de Chi carré de Pearson et du test t de Student respectivement. Les analyses de variance étaient appliquées à la comparaison des données en fonction des saisons. Le seuil de significativité étaient fixé à une valeur de p inférieur ou égale à 0,05.

Résultats

Résultats entomologiques

La différence de transmission était statistiquement significative si le nombre de piqûres infectantes par personne et par mois (p/p/m) dans une des zones était supérieur de 10 pas le niveau dans l'autre. Cette différence était significative entre les deux zones. En effet le nombre de piqûres infectantes par personne et par mois (p/p/m) en début de saison de transmission était de 17 dans la zone de forte transmission contre 0 p/p/m dans la zone de faible transmission (figure 1). Au pic de la transmission, ce nombre était 17 fois plus élevé dans la zone de forte transmission (134 p/p/m) que dans la zone de faible transmission (8 p/p/m) (figure 1).

Résultats parasitologiques

En fonction du niveau de transmission

Au total, 102 lames dont 59 de la zone de forte transmission contre 43 dans la zone

de faible transmission ont été lues pour le diagnostic parasitologique de *Plasmodium falciparum*. La prévalence des deux stades du parasite entre la zone de forte et faible transmission est présentée dans la figure 1.

La prévalence de stades asexués était significativement plus élevée (OR = 3,08; IC95% 1,20-7,98; Tableau 1) dans la zone de forte transmission comparée à la zone de faible transmission.

La prévalence de gamétocytes était par contre non significativement plus élevée (OR = 1,53; IC95% 0,55-4,28; Tableau 1) dans la zone de forte transmission comparée à la zone de faible transmission. Les moyennes géométriques des densités parasitaires en fonction de la zone de transmission sont présentées dans la figure 2B. Aucune différence n'a été observée entre les deux zones.

En fonction de la saison de transmission

La prévalence des gamétocytes n'a pas significativement varié malgré un taux de portage plus élevé au pic et de moindre degré en début de transmission comparé à la prévalence de gamétocytes en fin de transmission (Tableau 1). La densité de gamétocytes était significativement plus élevée au pic et fin de la saison de transmission comparée au début de la transmission ($p = 0,001$; IC95% 1,15-1,69; Tableau 1).

Résultats sérologiques

Dans la population d'étude, 9,2% réagissait contre l'antigène CS, 30,7% contre GLURP, 35% contre Pfs48/45 et 38,6% contre Pfs230 (Tableau 1).

En fonction du niveau de transmission

La figure 3 donne la prévalence des anticorps spécifiques aux antigènes CS, GLURP, Pfs48/45, Pfs230 en fonction du niveau de transmission. La prévalence des anticorps humains dirigés contre les antigènes CS et GLURP était non significativement plus élevée en zone de forte transmission qu'en zone de faible transmission (OR = 2,73; IC95% 0,48-2,02 pour CS et OR = 1,87; IC95% 0,7-5,01 pour GLURP).

La prévalence des anticorps contre l'antigène Pfs48/45 était non significativement plus élevée dans la zone de faible transmission qu'en zone de forte transmission (OR = 1,60; IC95% 0,48-6,80). Le contraire était observé pour l'antigène Pfs230 qui montrait une réactivité plus élevée mais non significative en zone de forte transmission qu'en zone de faible transmission (OR = 0,79; IC95% 0,32-1,91).

En fonction de la saison de transmission

Les mesures de titres d'anticorps entre le début et la fin de la saison de transmission

ont permis de comparer la réactivité de la population vis-à-vis des différents antigènes en fonction de la période de transmission.

Par surprise, la prévalence des anticorps anti-CS était plus élevée en début de transmission comparée au reste de la période de transmission. Il n'y avait pas de différence significative entre le pic de la transmission et la fin de la saison de transmission. La prévalence des anticorps contre l'antigène GLURP était non significativement plus élevée au pic de la saison de transmission comparée à la prévalence relevée en début et en fin de transmission.

La même observation était faite pour l'antigène de stade sexué Pfs230 dont les anticorps étaient plus prévalents au pic qu'en début et fin de transmission. La prévalence des anticorps dirigés contre l'antigène Pfs48/45 était de façon non significative plus élevée en début et fin de transmission comparée au pic de la transmission (Tableau 1)

Discussion

La présente étude montre que les paramètres parasitologiques et sérologiques diffèrent en fonction du niveau et de la saison de transmission palustre. La prévalence des stades asexués et de gamétocytes de *Plasmodium falciparum* augmente dans les villages de

forte transmission et durant la saison de transmission intense (septembre).

Le taux d'inoculation entomologique apparaît donc un facteur déterminant dans la prévalence parasitaire comme le concluent d'autres études (Van der kolk *et al.*, 2003, Nacher *et al.*, 2004 ; McElroy *et al.*, 1994). L'explication potentielle se résume au fait que plus le taux d'inoculation est élevé, plus l'inoculation de sporozoïtes est importante et plus la prévalence et la densité de stades asexués sera importante. La conséquence directe sera une forte prévalence de gamétocytes lesquels sont générés à partir des stades asexués. La deuxième hypothèse est qu'en zone de forte transmission, le nombre de clones serait plus élevé (Babiker *et al.*, 1997; Nébié *et al.*, 2002) avec certains capables donc d'échapper à la réponse immunitaire (virulence parasitaire) non spécifique pour aboutir à la transformation en stades sexués. La même situation se confirme en saison de forte de transmission. Dans notre étude, la forte densité parasitaire au pic de la transmission est un précurseur important de gamétocytes. Cependant la saison elle-même apparaît un facteur clé de la prévalence de gamétocyte du fait de l'élévation de la prévalence de gamétocytes en début de saison où le taux d'inoculation entomologique est quasi réduit à zéro. L'une des explications

plausibles serait un impact des piqûres non infectés occasionnant la production de gamétocytes à partir d'infection palustres asymptomatiques (Paul *et al.*, 2004 ; Ouédraogo *et al.*, 2008). Cette étude a également démontré qu'il y avait une association entre la prévalence des anticorps contre les antigènes CS, GLURP, Pfs230 et Pfs48/45 avec le niveau de transmission dans les villages et avec la saison de transmission.

Par évidence, l'augmentation de cette séroconversion des anticorps de stade asexué en situation de forte intensité de transmission s'expliquerait par l'exposition à une plus forte intensité du stimulus antigénique. Cependant, ces différences de prévalence d'anticorps n'étaient pas significatives comme d'autres études l'ont déjà observé (Dodoo *et al.*, 2000 ; Dziegel *et al.*, 1993). Cette absence de différence pourrait s'expliquer outre la petitesse de la taille de l'échantillon par le fait que les saisons sont rapprochées les unes des autres ou que les demi-vies des anticorps sont raccourcies en absence de réinfection. A l'opposé de nos résultats, Singer *et al.*, en 2003 constatèrent que des enfants de moins de 2 ans présentaient de faibles titres d'anticorps contre MSP-19 dans une zone de forte transmission comparée aux enfants de la zone de faible transmission. Les auteurs suggérèrent qu'une sur-stimulation antigénique due aux piqûres infectantes

répétées capables d'entraîner une sorte de phénomène d'apoptose au niveau des cellules T (Singer *et al.*, 2003), ce phénomène serait spécifique aux plus jeunes enfants qui manquent encore d'une population lymphocytaire adéquate pour faire face à un répertoire antigénique varié et intensément inoculé alors que notre population d'étude était composé d'enfants âgés de moins de 5 ans. Les prévalences d'anticorps contre Pfs48/45 et Pfs230 étaient élevées dans notre étude par rapport aux données de Drakeley *et al.* Collectés dans la région d'Ifakara en Tanzanie en 2006 ou de Carter *et al.*, en 1989 en Papoua Nouvelle guinée. Cela s'expliquerait par la différence des régions au niveau épidémiologique dans la mesure où Ifakara est une zone de très faible intensité de transmission et du fait que les auteurs ont uniquement détecté l'isotype IgG1 contrairement à la présente étude où nous avons détecté tous les IgG. La prévalence d'anticorps dirigés contre Pfs48/45 et Pfs230 a inversement varié en fonction des saisons. Au niveau du gamétocyte, les deux antigènes forment un complexe et la différence dans la prévalence des anticorps qui leur sont spécifiques s'expliquerait probablement par le fait qu'ils sont différents du point de vue de l'immunogénécité ou cela est due à des différences génétiques au niveau de la région du complexe majeur

d'histocompatibilité qui contrôle la réponse des lymphocytes T helpers.

En outre nous avons observé dans cette étude, que la densité de parasites asexués et la prévalence de gamétocytes étaient significativement réduites chez les sujets adultes qui étaient positifs aux anticorps anti-GLURP et anti-CS (Ouédraogo *et al.* données non publiées) comparés aux sujets négatifs. Ceci confirmerait l'association des anticorps anti-GLURP et anti-CS à la prévention des fortes parasitémies palustres (Egan *et al.*, 1993; Dodoo *et al.*,

2000) et conséquemment aux faibles taux de portage gamétocytaire.

En conclusion la présente étude montre que le niveau de transmission palustre dans les villages ainsi que la saison de transmission s'associent aux à la prévalence de gamétocytes et aux anticorps anti-stades sexués de *Plasmodium falciparum* et par conséquent devrait être prise en considération dans la prédiction de l'immunité dirigée contre les stades sexués du paludisme et en particulier l'immunité bloquant la transmission de l'infection.

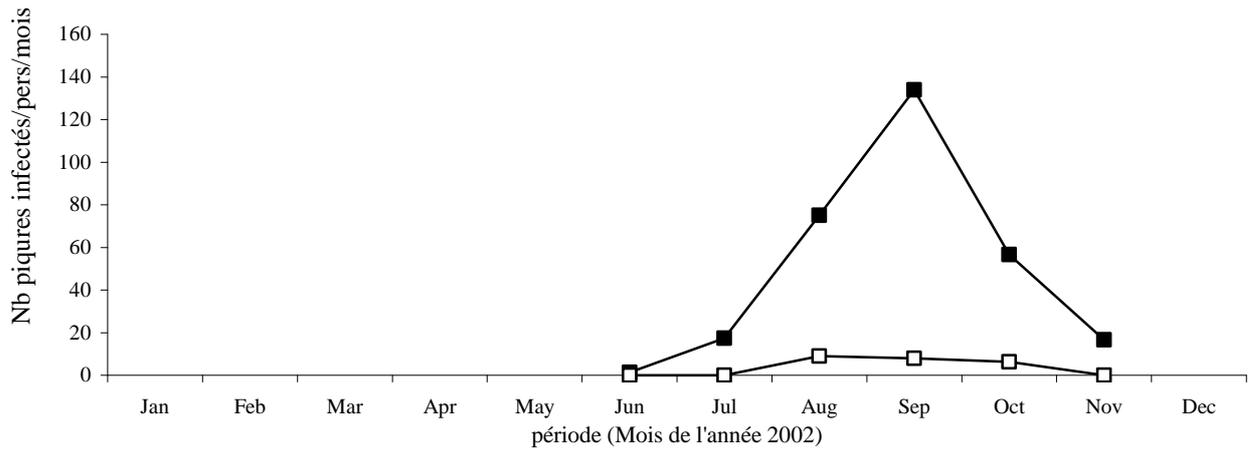


Figure 1: Taux d'inoculation entomologique dans les deux zones du site de l'étude. La courbe aux symboles carrés de couleur noire représente le TIE de la zone de transmission intense, les carrés blancs la zone de transmission faible

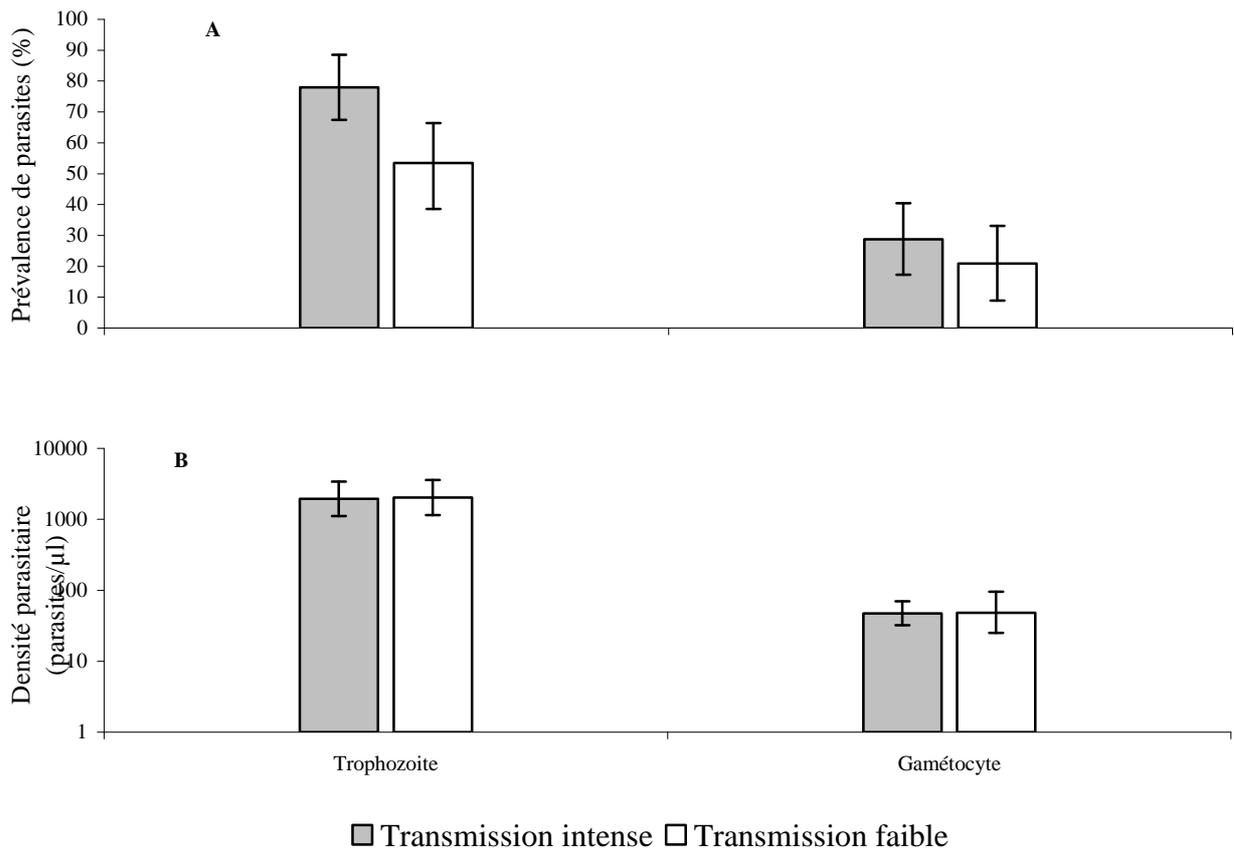


Figure 2: Prévalence (A) et densité parasitaire (B) en fonction du niveau de transmission (intense et faible)

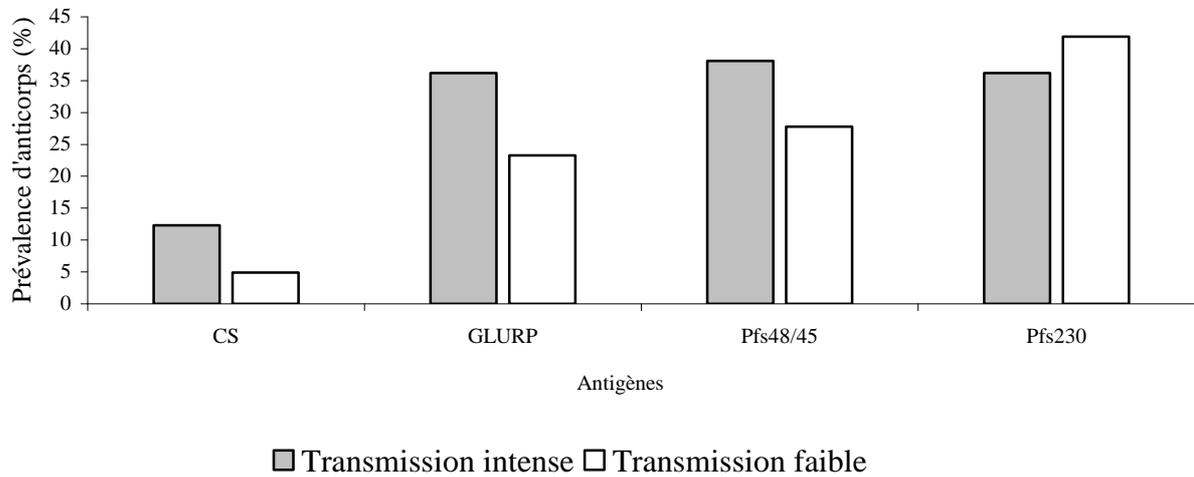


Figure 3: Prévalence des immunoglobulines G en fonction du niveau de transmission (intense et faible)

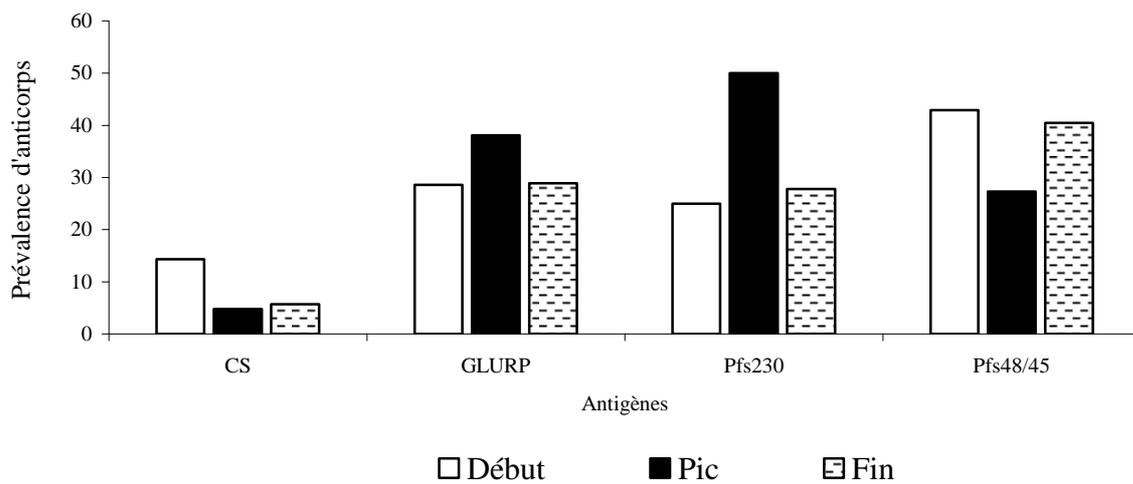


Figure 4: Prévalence des immunoglobulines en fonction de la saison de transmission (début de transmission, pic de la transmission et fin de transmission)

Tableau 1: Paramètres immunologiques et parasitologiques en fonction du niveau de transmission et de la saison

	Niveau de transmission du paludisme			OR (95%IC)	Saison de transmission			<i>P</i>
	Intense	Faible	<i>P</i>		Début	Pic	Fin	
% anticorps anti-CS (n/N)	12,3 (7/57)	4,9 (2/41)	0,21	2,73 (0,48-2024)	14,3 (6/42)	4,8 (1/21)	5,7 (2/35)	<i>Ns</i>
% anticorps anti-GLURP (n/N)	36,2 (21/58)	23,3 (10/43)	0,30	1,87 (0,7-5,01)	28,6 (12/42)	38,1 (8/21)	28,9 (11/38)	<i>Ns</i>
% anticorps anti-Pfs230 (n/N)	38,1 (16/42)	27,8 (5/18)	0,59	1,60 (0,42-6,80)	25 (5/20)	50 (11/22)	27,8 (5/18)	<i>Ns</i>
% anticorps anti-Pfs48/45 (n/N)	36,2 (21/58)	41,9 (18/43)	0,70	0,79 (0,32-1,91)	42,9 (18/42)	27,3 (6/22)	40,5 (15/37)	<i>Ns</i>
Parasitémie (n)	1939 (46)	2028 (23)	<i>Ns</i>	-----	677 (18)	2866 (19)	2870 (32)	0,02 ^b (95%IC 0,01-0,15)
Gamétocytémie (n)	47 (17)	48 (9)	<i>Ns</i>	-----	39 (12)	48 (8)	73 (6)	<i>Ns</i>
Porteurs de trophozoïtes (%) (n/N)	78 (46/59)	53,5 (23/43)	0,009 ^a	3,08 (1,20-7,98)	42,9 (18/42)	86,4 (19/22)	84,2 (32/38)	0,001 ^b (95%IC 1,15-1,69)
Porteurs de gametocytes (%) (n/N)	29 (17/59)	8,8 (9/43)	0,63	1,53 (0,55-4,28)	26,2 (11/42)	31,8 (7/22)	13,2 (5/38)	<i>Ns</i>

^a Test de Chi carré de Pearson; ^b Model de régression; *Ns*, non statistiquement significatif

Revue bibliographique

- Babiker, HA, J Lines, WG Hill, D Walliker, 1997. Population structure of *Plasmodium falciparum* in villages with different malaria endemicity in east Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 56: 141-147.
- Carter, R, PM Graves, DB Keister, IA Quakyi, 1990. Properties of epitopes of Pfs 48/45, a target of transmission blocking monoclonal antibodies, on gametes of different isolates of *Plasmodium falciparum*. *Parasite Immunol.* 12: 587-603.
- Carter, R, PM Graves, IA Quakyi, MF Good, 1989. Restricted or absent immune responses in human populations to *Plasmodium falciparum* gamete antigens that are targets of malaria transmission-blocking antibodies. *J Exp Med.* 169: 135-147.
- Cuzin-Ouattara, N., Van den Broek, A. H., Habluetzel, A., Diabate, A., Sanogo-Ilboudo, E., Diallo, D. A., Cousens, S. N. and Esposito, F.; 1999. Wide-scale installation of insecticide-treated curtains confers high levels of protection against malaria transmission in a hyperendemic area of Burkina Faso. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 93, 473-479.
- Diallo, DA, SN Cousens, N Cuzin-Ouattara, I Nebie, E Ilboudo-Sanogo, F Esposito, 2004. Child mortality in a West African population protected with insecticide-treated curtains for a period of up to 6 years. *Bull World Health Organ.* 82: 85-91.
- Dodoo, D, M Theisen, JA Kurtzhals, BD Akanmori, KA Koram, S Jepsen, FK Nkrumah, TG Theander, L Hviid, 2000. Naturally acquired antibodies to the glutamate-rich protein are associated with protection against *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis.* 181: 1202-1205.
- Drakeley, CJ, JT Bousema, NI Akim, K Teelen, W Roeffen, AH Lensen, M Bolmer, W Eling, RW Sauerwein, 2006. Transmission-reducing immunity is inversely related to age in *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers. *Parasite Immunol.* 28: 185-190.
- Drakeley, CJ, JT Bousema, NI Akim, K Teelen, W Roeffen, AH Lensen, M Bolmer, W Eling, RW Sauerwein, 2006. Transmission-reducing immunity is inversely related to age in *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers. *Parasite Immunol.* 28: 185-190.
- Dziegiel, M, P Rowe, S Bennett, SJ Allen, O Olerup, A Gottschau, M Borre, EM Riley, 1993. Immunoglobulin M and G antibody responses to *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein: correlation with clinical immunity in Gambian children. *Infect Immun.* 61: 103-108
- Egan, JE, SL Hoffman, JD Haynes, JC Sadoff, I Schneider, GE Grau, MR Hollingdale, WR Ballou, DM Gordon, 1993. Humoral immune responses in volunteers immunized with irradiated *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Am J Trop Med Hyg.* 49: 166-173.
- Hollingdale, MR, EH Nardin, S Tharavanij, AL Schwartz, RS Nussenzweig, 1984. Inhibition of entry of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* sporozoites into cultured cells; an in vitro assay of protective antibodies. *J Immunol.* 132: 909-913.

- Lengeler, C, J Armstrong-Schellenberg, U D'Alessandro, F Binka, J Cattani, 1998. Relative versus absolute risk of dying reduction after using insecticide-treated nets for malaria control in Africa. *Trop Med Int Health*. 3: 286-290.
- Lepers, JP, D Fontenille, MD Andriamangotiana-Rason, P Deloron, P Coulanges, 1990. [Ecological factors in the renewed outbreak of malaria in Madagascar]. *Bull Soc Pathol Exot*. 83: 330-341.
- Nacher, M., Carrara, V. I., Ashley, E., McGready, R., Hutagalung, R., Nguen, J. V., Thwai, K. L., Looareesuwan, S. and Nosten, F.; 2004. Seasonal variation in hyper parasitaemia and gametocyte carriage in patients with *Plasmodium falciparum* malaria on the Thai-Burmese border. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 98, 322-328.
- Ouedraogo, A. L., Schneider, P., De Kruif, M., Nebie, I., Verhave, J. P., Cuzin-Ouattara, N. and Sauerwein, R. W.; 2007. Age-dependent distribution of *Plasmodium falciparum* gametocytes quantified by Pfs25 real-time QT-NASBA in a cross-sectional study in Burkina Faso. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 4, 626-630.
- Paul, R. E., Diallo, M. and Brey, P. T.; 2004. Mosquitoes and transmission of malaria parasites - not just vectors. *Malar. J*. 3, 39.
- Roeffen, W, F Geeraedts, W Eling, P Beckers, B Wizel, N Kumar, T Lensen, R Sauerwein, 1995. Transmission blockade of *Plasmodium falciparum* malaria by anti-Pfs230-specific antibodies is isotype dependent. *Infect Immun*. 63: 467-471
- Roeffen, W, B Mulder, K Teelen, M Bolmer, W Eling, GA Targett, PJ Beckers, R Sauerwein, 1996. Association between anti-Pfs48/45 reactivity and *P. falciparum* transmission-blocking activity in sera from Cameroon. *Parasite Immunol*. 18: 103-109.
- Singer, LM, LB Mirel, FO Ter Kuile, OH Branch, JM Vulule, MS Kolczak, WA Hawley, SK Kariuki, DC Kaslow, DE Lanar, AA Lal, 2003. The Effects of Varying Exposure to Malaria Transmission on Development of Antimalarial Antibody Responses in Preschool Children. XVI. Asembo Bay Cohort Project. *The Journal of Infectious Diseases*. 187: 1756-1764.
- Snow, RW, CS Molyneux, PA Warn, J Omumbo, CG Nevill, S Gupta, K Marsh, 1996. Infant parasite rates and immunoglobulin M seroprevalence as a measure of exposure to *Plasmodium falciparum* during a randomized controlled trial of insecticide-treated bed nets on the Kenyan coast. *Am J Trop Med Hyg*. 55: 144-149.
- Snow, RW, JA Omumbo, B Lowe, CS Molyneux, JO Obiero, A Palmer, MW Weber, M Pinder, B Nahlen, C Obonyo, C Newbold, S Gupta, K Marsh, 1997. Relation between severe malaria morbidity in children and level of *Plasmodium falciparum* transmission in Africa. *Lancet*. 349: 1650-1654.
- van der Kolk, M., Tebo, A. E., Nimpaye, H., Ngo Ndombol, D., Sauerwein, R. W. and Eling, W. M. C.; 2003. Transmission of *Plasmodium falciparum* in urban Yaoundé, Cameroon, is seasonal and age-dependent. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 97, 375-379.

3.4. Influence de l'âge sur l'infectivité des gamétoocytes de *Plasmodium falciparum* : le vecteur est fréquemment infecté par des gamétoytémies sub-microscopiques

A.L. Ouédraogo^{1,2}, E. Ilboudo-Sanogo¹, W. Roeffen², P. Schneider², I. Nébié¹, J.P. Verhave², S.J. De Vlas³, Aboubakar S. Ouattara⁴, N. Cuzin-Ouattara¹ and R. Sauerwein²

¹Centre National de Recherche et de Formation sur le paludisme, 01BP 2208 Ouagadougou 01, Burkina Faso

²Department of Medical Microbiology, Radboud University Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands

³Department of Public Health, Erasmus MC, University Medical Centre Rotterdam, P.O. Box 1738, 3000 DR Rotterdam, The Netherlands

⁴Departement de Biochimie-Microbiology, Université de Ouagadougou, 03 BP:7131, Ouagadougou 03, Burkina Faso

Résumé :

La transmission de *Plasmodium falciparum* de l'homme au moustique nécessite la présence de gamétoocytes infectieux chez l'hôte humain. Des échantillons sanguins de 80 enfants âgés de moins de 15 ans vivant en zone rurale du Burkina Faso étaient utilisés aux cours d'infections expérimentales pour infecter *Anophèles gambiae* élevé à l'insectarium. La proportion de sujets infectant les moustiques augmentait avec l'âge. La technique moléculaire QT-NASBA révéla la présence de gamétoocytes dans des échantillons infectieux considérés négatifs par la microscopie. La prévalence d'anticorps anti-Pfs-230 était négativement associés à l'âge et pourrait expliquer la relation positive entre l'âge et l'infectivité des gamétoocytes de *P. falciparum* dans la zone.

Mots clés: *Plasmodium falciparum*, gamétoocyte, infection expérimentale, âge, Burkina

Introduction

Le stade sexué (gamétocyte) de *Plasmodium falciparum* n'est pas associé aux manifestations cliniques du paludisme mais est toutefois responsable de la transmission du paludisme de l'homme au moustique. En effet, la propagation du paludisme à *P. falciparum* nécessite outre le moustique vecteur l'Anophèles femelle, la présence de gamétocytes infectieux dans le courant sanguin de l'hôte humain. L'identification de paramètres naturels influençant l'infectivité du gamétocyte est importante pour la caractérisation du réservoir infectieux du paludisme et pour l'efficacité des campagnes visant à réduire sa transmission dans les populations humaines. De nombreuses études ont montré que l'âge était un facteur déterminant dans la prévalence et la densité des gamétocytes (Ouedraogo *et al.*, 2007; Muirhead-Thomson 1954a; Molineaux *et al.*, 1980; Boudin *et al.*, 1991; Van der Kok *et al.*, 2003.). Cependant très peu d'études ont démontré sa relation avec l'infectivité du gamétocyte (Drakeley *et al.*, 2006).

L'évaluation d'une telle relation est faisable par l'utilisation du système d'infection expérimentale direct qui teste l'infectivité des gamétocytes de sujets naturellement exposés au paludisme en utilisant des moustiques élevés au laboratoire.

Dans cette étude, nous évaluons l'infectivité des gamétocytes de sujets naturellement exposés au paludisme en relation avec l'âge, la gamétocytemie et la réponse humorale anti-gamétocyte. Nous mesurerons la réponse humorale par le dosage d'anticorps dirigés contre l'antigène Pfs230, une protéine à la surface des gamétocytes et des gamètes de *P. falciparum* dont les anticorps sont à mesure d'interrompre la transmission du parasite chez le moustique (Healer *et al.*, 1997; Roeffen *et al.*, 1994 ; Williamson *et al.* 1995). Des études ont démontré que des densités gamétocytaires sub-microscopiques sont à mesure d'infecter les moustiques (Muirhead Thomson *et al.*, 1957, Schneider *et al.*, 2005). Aussi nous utilisons la technique moléculaire QT-NASBA afin d'améliorer l'interprétation des résultats et apprécier l'implication des gamétocytemies sub-microscopiques dans la transmission du paludisme au Burkina Faso.

Matériel et Méthodes

Site et population d'étude

L'étude a été conduite dans le village de Laye à 30 km au Nord-Ouest de Ouagadougou, capitale du Burkina Faso. Le site est une savane soudanienne avec une saison humide unique allant de Juin à Octobre et une saison sèche le reste de l'année. Les principaux vecteurs du

paludisme sont *An gambiae s.l* et à un moindre degré *An funestus s.l* (Ouedraogo *et al.*, 2007; Costantini *et al.*, 1999). La transmission du paludisme est intense et saisonnière avec un pic au mois de septembre. Le taux d'inoculation entomologique est estimé à 30 piqûres infectantes par personne et par mois au pic de la saison de transmission palustre (Ouedraogo *et al.*, 2007). *P. falciparum* est l'espèce plasmodiale la plus prévalente à 95% dans les infections palustres chez les enfants de moins de 5 ans (Habluetzel *et al.*, 1999). L'étude a concerné 80 enfants des deux genres, résidents permanent du village et âgés de moins de 15 ans.

Recrutement des sujets de l'étude

L'étude s'est déroulée à la fin de la saison de transmission 2004 (Décembre). La première étape du recrutement a consisté à recruter de façon randomisée des sujets porteurs au moins de parasites asexués de *P. falciparum* afin d'accroître la proportion de porteurs de gamétocytes dans l'échantillon de l'étude. Pour cela, une lame de goutte épaisse et de frottis sanguin a été préalablement réalisée sur chaque volontaire consentant. Après lecture des lames au microscope, seuls les sujets porteurs de parasites asexués et/ou gamétocytes avec une température axillaire inférieure à 37°5 C étaient définitivement enrôlés dans l'étude. Les sujets infectés de

P. falciparum et ayant une température axillaire $\geq 37^{\circ}5$ C étaient traités à l'aide d'un antipaludique répondant aux exigences de la politique nationale de lutte contre le paludisme. Les sujets présentant des symptômes autres que ceux du paludisme étaient traités à l'aide d'antibiotiques ou référés à un service de santé spécialisé. Afin d'éviter les interférences médicamenteuses (Price *et al.*, 1999) sur la capacité de transmission du parasite de l'homme au moustique, tous les sujets ayant reçu un traitement médicamenteux étaient exclus de l'étude. Un consentement éclairé a été obtenu auprès des parents et tuteurs des enfants pour leur participation. L'étude a obtenu l'approbation du Ministère de la Santé du Burkina Faso.

Infections expérimentales

Nous avons utilisé *Anopheles gambiae s.l.* élevé à l'insectarium du Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme pour la réalisation des infections expérimentales. Les moustiques utilisés étaient âgés de 2 à 3 jours et mis à jeun pendant 12 heures avant d'être exposés au repas sanguin humain. Les moustiques étaient repartis par gobelet hermétiquement fermé par un morceau de moustiquaire qui leur permet de prendre leur repas sanguin sans pouvoir s'échapper. Pour l'obtention du repas sanguin, nous avons prélevé par sujet,

3 ml de sang veineux dans un tube à héparine. Le sang (2 ml) de chaque sujet était injecté dans une cellule de verre chauffée à 37°C pour servir de repas sanguin aux moustiques à travers une membrane de parafilm (Mulder *et al.*, 1994). Le volume de sang restant (1 ml) a servi à l'analyse des paramètres susceptibles d'influencer l'infectivité du gamétocyte. La prise du repas sanguin par les moustiques durait 15 minutes. Les moustiques pleinement gorgés étaient séparés des moustiques non gorgés et des moustiques partiellement gorgés. Seuls les moustiques pleinement gorgés étaient retenus et élevés au jus sucré pendant 7 jours pour déterminer s'il y a eu un éventuel développement sporogonique. Au septième jour, nous avons procédé à la dissection des moustiques et la coloration au mercurochrome (1% de mercurochrome dans du PBS) de l'estomac. Un moustique était considéré infecté si un ou plusieurs oocystes étaient détectés dans son estomac à l'aide de la microscopie optique au grossissement 40.

Mesure des paramètres susceptibles d'influencer la transmission de l'homme au moustique

Une collecte de données biologiques a été réalisée au cours des infections expérimentales pour l'analyse des paramètres (densité gamétocytaire, anticorps IgG anti-gamétocyte) susceptibles

d'influencer l'infectivité des gamétocytes et gamètes.

Pour la collecte des données biologiques, une lame de goutte épaisse / frottis sanguin était réalisée par sujet pour la détection microscopique de gamétocytes, et 100µl de sang veineux recueilli pour la quantification de gamétocytes par la technique moléculaire QT-NASBA. Environ 800µl de sang était centrifugé et le plasma recueilli pour le dosage des anticorps dirigés contre l'antigène Pfs230 par ELISA.

Détection de gamétocytes par la microscopie : Les lames de goutte épaisse étaient colorées au Giemsa et lues au microscope optique. La parasitémie (nombre de parasites/µl de sang) était déterminée en fonction de 500 leucocytes comptés au grossissement X100. La lame était considérée négative si aucun parasite n'était détecté après l'observation de 100 champs microscopiques.

Détection de gamétocytes par QT-NASBA : Brièvement, un volume de 100 µl de sang total était ajouté à 900 µl de tampon de lyse L6 suivant la méthode au guanidinium isothiocyanate (Boom *et al.*, 1990). La réaction de quantification de l'ARNm du gène Pfs25 spécifique au gamétocyte (Genbank accession number AF193769.1) était réalisée à l'aide du Nuclisens EasyQ analyser (Bio Mériex sa,

Lyon, France) dans un milieu de KCl à concentration de 80 mM suivant la procédure du Kit de base Nuclisens. L'utilisation d'une série de dilutions de gamétocytes de culture matures au cours de la même réaction permettait une quantification exacte du nombre de gamétocytes présent dans l'échantillon (Schneider *et al.*, 2006).

Détection des anticorps anti-Pfs230 par ELISA

Pour détecter les anticorps anti-Pfs230 dans le plasma, 10µg/ml de PBS d'anticorps monoclonaux 63F6D7-F(ab)2 de souris anti-antigène Pfs230 étaient fixés dans une microplaque de 96 puits à fond rond (Sterilin®, International Medical Products B.V., Zutphen, The Netherlands). Les sites de fixation libres de l'antigène étaient bloqués avec un tampon PBS à 5% de lait (Marvel, Premier International Foods Ltd, Spalding, Lines United Kingdom). L'antigène Pfs230 était capturé toute la nuit à 4°C à partir de 50 µl d'extrait de gamétocytes. Les plasmas de sujets et de contrôle étaient dilués à 1:100 et distribués dans les puits. Les anticorps des plasma fixés pouvaient ensuite capturer le conjugué anti-Humain IgG-péroxydase (H+L, Pierce). La révélation était faite par le substrat (Tétraméthyl Benzidine, TMB) et arrêtée avec de l'acide sulfurique 4NH₂SO₄. La

densité optique était mesurée par un photomètre (Anthos 2001 Microplate Reader, Labtec BV) à 450 nm. Dans chaque microplaque au cours du test d'ELISA, un plasma contrôle positif et 3 plasmas contrôles négatifs étaient utilisés. Un plasma de sujet était considéré positif si sa densité optique était supérieure à la moyenne de celles des contrôles négatifs plus 3 déviations standards.

Analyse statistique des données

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel SPSS version 12.0.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Les densités de parasites ont été transformées en valeurs logarithmiques et les moyennes géométriques calculées. Le test de Kilmogorov Smirnov a été utilisé pour le test de normalité des données continues. Le test du χ^2 et le test de Kruskal-Wallis ont été respectivement utilisés pour la comparaison des proportions et des moyennes.

L'âge a été subdivisé en groupes de 0-4 ans, 4-8 ans et 8-13 ans et les proportions de sujets infectieux par groupe d'âge calculées. Une analyse de régression logistique a été utilisée pour déterminer l'effet spécifique de l'âge sur la probabilité qu'ait un sujet à infecter au moins un moustique indépendamment de la densité gamétocytaire. Le seuil de significativité

des tests était fixé à une valeur de p inférieur ou égale à 0,05.

Résultats

Infections expérimentales

En moyenne, 25 moustiques étaient disséqués par sujet volontaire une semaine après l'infection expérimentale. Dans l'effectif; 36,25% (29/80) des enfants étaient à mesure d'infecter au moins un moustique. Chez les sujets porteurs de gamétocytes détectables au microscope; 62,5% (15/24) étaient à mesure d'infecté au moins un moustique. Dans le groupe des sujets à gamétocytémie sub-microscopique, 25% (14/56) étaient à mesure d'infecté au moins un moustique (Tableau 1). La proportion de porteurs de gamétocytes infectieux augmentait significativement avec l'âge dans l'échantillon total ($n = 80$, OR = 2,16; 95%IC, 1,1-4,1; $p < 0,02$) et chez les porteurs de gamétocytes détectables au microscope ($n = 24$; OR = 9; 95%IC, 1,1-73,4 ; $p = 0,04$). Cette proportion augmentait également avec l'âge quoique de façon non significative chez les porteurs de gamétocytes sub-microscopiques ($n = 56$; OR=1,75; 95%IC, 0,8-3,83 ; $p = 0,16$).

Après ajustement par la densité gamétocytaire mesurée par QT-NASBA, la proportion de sujets infectieux augmentait toujours avec l'âge ($n = 72$; OR ajusté = 2,16; 95%IC, 1,04-4,46, $p = 0,03$).

Paramètres biologiques susceptibles d'influencer la transmission homme-moustique

Microscopie : Parasites asexués : Au total, 82.5% des enfants étaient porteurs de parasites asexués de *Plasmodium falciparum*. Il n'y avait pas une variation significative avec l'âge ni pour la prévalence de parasite ($\chi^2 = 0,241$, $p=0,8$; Tableau 1) ni pour la densité parasitaire ($p = 0,081$; Tableau 1).

Gamétocytes : De l'échantillon total, 30% des enfants était porteurs de gamétocytes détectable au microscope avec une densité variant entre 25 et 42 gamétocytes / μ l. Ni la prévalence ni la densité de gamétocytes n'ont significativement varié avec l'âge ($p = 0,11$ pour la prévalence et $p = 0,08$ pour la densité; Tableau 1).

QT-NASBA : Gamétocytes : La prévalence de porteurs de gamétocytes estimée par la technique QT-NASBA était 3 fois plus élevée que celle déterminée par la microscopie (90% contre 30% respectivement). La prévalence de porteurs de gamétocytes n'a pas varié avec l'âge. La moyenne de la densité gamétocytaire positive mesurée par QT-NASBA était 1,3 fois (43 gamétocyte / μ l) plus élevée que celle mesurée par la microscopie (34 gamétocyte/ μ l). La densité gamétocytaire était cependant significativement moins

élevé chez les enfants les plus jeunes (p=0,04, Tableau 1).

Paramètres sérologiques susceptibles d'influencer la transmission homme-moustique

Dans l'échantillon total, 19,2% des enfants étaient porteurs d'anticorps IgG anti-Pfs230. La prévalence des anticorps diminuait de façon non significative avec l'âge (N = 73; OR = 0,78; 95%IC, 0,33-1,55; p = 0,4; Tableau 1). Les moyennes géométriques des titres d'anticorps anti-Pfs230 (densité optique) était de 0,245 (min max, 0,101-0,578) chez les 3-4 ans ; 0,231 (min max, 0,124-0,483) chez les 5-7 ans; 0,152 (min max, 0,100-0,233) chez les 8-13 ans. Il n'y avait pas une variation avec l'âge du titre d'anticorps anti-Pfs230.

Discussion

Nous avons évalué l'impact de l'âge sur l'infectivité des gamétocytes de *P. falciparum* lors d'infections expérimentales de moustiques par des plasmas de sujets vivant en zone rurale du Burkina Faso. Il ressort que la proportion de sujets dont le sang périphérique infecte les moustiques ainsi que la proportion de moustiques infectés augmente avec l'âge. L'effet de l'âge sur l'infectivité des gamétocytes est démontré tant chez les porteurs de gamétocytes détectables au microscope que

chez les porteurs. Chez les porteurs, la proportion de sujets infectieux est de 62,5% et corrobore les résultats d'études antérieures (Mulder *et al.*, 1993 ; Graves *et al.*, 1988a). L'infection de moustiques à partir de seuils de gamétocytémies sub-microscopiques (Muirhead-Thomson *et al.*, 1954b) est aussi en accord avec les résultats d'études récemment obtenus au Kenya (Schneider *et al.*, 2006).

Le recensement de la population totale a révélé que les enfants du groupe d'âge « < 4 ans » représente 10% de la population alors que les groupes d'âge 4-8 et 8-14 représentent respectivement 12 et 18 % de la population. En tenant compte de ces informations démographiques, les enfants dont les gamétocytes sont détectables au microscope contribueraient respectivement à 8,5% et 15,5% dans la transmission du paludisme alors que les enfants porteurs de gamétocytémies sub-microscopiques contribueraient quand à eux à 1,6%, 2,53% et 4,41% respectivement des plus jeunes aux vieux.

L'augmentation de la proportion de moustiques infectés en relation avec la gamétocytémie de sujets naturellement exposés au paludisme avait déjà été démontrée (Mulder *et al.*, 1993; Schneider *et al.*, 2006). Des études ayant utilisé des gamétocytes de culture ont de même confirmé ce résultat (Schneider *et al.*, 2006; Ponnudurai *et al.*, 1989). La deuxième

information intéressante de cette étude montre que des sujets arborent des gamétocytes détectables au microscope et cependant non infectieux pour les moustiques. En effet, au sein des de porteurs de gamétocytes détectables au microscope (rangée 8-78 gamétocytes / μl de sang), 37,7% d'entre eux n'étaient pas capables d'infecter un moustique. L'explication potentielle de cette observation serait une réduction de l'infectivité de ces gamétocytes par la présence dans le sang humain de facteurs immunologiques capables d'interférer avec le développement sporogonique au niveau de l'estomac du moustique. Cette association entre anticorps dirigés contre des antigènes de stades sexués et l'interruption du cycle sporogonique chez le moustique a été déjà suggérée par des études antérieures. En effet, des sérums capables de bloquer la transmission ont été démontrés chez des sujets vivant en région endémique d'Afrique et d'Asie (Graves *et al.*, 1988a; Mulder *et al.*, 1994). L'activité bloquante de sérums d'individus vivant en Nouvelle Guinée était aussi associée à la présence d'anticorps dirigés contre l'antigène Pfs230 (Graves *et al.*, 1988b) alors que celle observée au Cameroun était associée aux titres d'anticorps dirigés contre l'antigène de stade sexué Pfs48/45 (5). L'étude de Drakeley *et al.* (18) a montré que l'activité réduisant la transmission du

parasite de l'homme au moustique et la prévalence d'anticorps bloquant la transmission était négativement associée à l'âge. La technique QT-NASBA a permis la détection de gamétocytémies sub-microscopiques permettant ainsi l'amélioration de l'interprétation de nos résultats. C'est par conséquent un outil plus fiable que la microscopie dans l'établissement de bases de données épidémiologiques sur les gamétocytes.

En résumé, notre étude démontre une augmentation du taux d'infectivité des gamétocytes de *P. falciparum* avec l'âge en zone endémique du Burkina Faso. Nous démontrons également que la proportion de moustiques infectés augmente avec l'âge. Nous concluons par conséquent que l'âge et la gamétocytémie sont des variables primaires clés qui doivent être considérées par les campagnes visant à réduire la transmission du paludisme.

Tableau 1

	Groupe d'âge (ans)		
	1-4	4-8	8-13
Population d'étude			
% Sexe male (n/N)	45,5(10/22)	57,6 (19/33)	60(15/25)
Microscopie			
% porteur t (n/N)	18,2 (4/22)	42,4 (14/33)	24 (6/25)
Gamétocytémie	28 (20)	61 (26)	26 (6)
QT-NASBA			
% porteur gct (n/N)	95,2 (20/21)	92,8 (26/28)	95 (21/22)
Gamétocytémie	28 (20)	61 (26)	39 (21)
Sérologie			
% Anticorps anti-Pfs230	23,8 (5/21)	20 (6/30)	13,6 (3/22)
Infections expérimentales			
% de sujets infectieux ^a	13,6 (3/22)	42,4 (14/33)	48 (12/25)
% de sujets infectieux ^b	16,7 (3/18)	21,1 (4/19)	36,8 (7/19)
% de sujets infectieux ^c	0 (0/4)	71,4 (10/14)	83,3 (5/6)
% moustiques infectés	2 (11/570)	7,5 (80/1068)	4,5 (28/623)

^a échantillon total; ^b non porteurs ou porteurs sub-microscopique de gamétocytes; ^c porteurs de gamétocytes par microscopie. Les moyennes de gamétocytémie concernent les individus dont la lame ou le QT-NASBA était positif

Références bibliographiques

- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van-Dillen PM & Noordaa Jvd. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 1990, 28, 495-503.
- Costantini C, Sagnon N, Iboudo-Sanogo E, Coluzzi M & Boccolini D. Chromosomal and bionomic heterogeneities suggest incipient speciation in *Anopheles funestus* from Burkina Faso. *Parassitologia*, 1999, 41, 595-611.
- Diallo DA, Habluetzel A, Cuzin-Ouattara N, Nebie I, Sanogo E et al. Widespread distribution of insecticide-impregnated curtains reduces child mortality, prevalence and intensity of malaria infection, and malaria transmission in rural Burkina Faso. *Parassitologia*, 1999, 41, 377-381.
- Drakeley CJ, Bousema JT, Akim NI, Teelen K, Roeffen W et al. Transmission-reducing immunity is inversely related to age in *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers. *Parasite Immunol*, 2006, 28, 185-190.
- Graves PM, Burkot TR, Carter R, Cattani JA, Lagog M et al. Measurement of malarial infectivity of human populations to mosquitoes in the Madang area, Papua, New Guinea. *Parasitology*, 1988, 96, 251-263.
- Graves PM, Carter R, Burkot TR, Quakyi IA & N Kumar. Antibodies to *Plasmodium falciparum* gamete surface antigens in Papua New Guinea sera. *Parasite Immunol*, 1988, 10: 209-218.
- Graves PM, Carter R, Burkot TR, Renner J, Kaushal DC, Williams & JL. Effects of transmission-blocking monoclonal antibodies on different isolates of *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun*, 1985, 48, 611-616.
- Habluetzel, A., Cuzin, N., Diallo, D. A., Nebie, I., Belem, S., Cousens, S. N. and Esposito, F.; 1999. Insecticide-treated curtains reduce the prevalence and intensity of malaria infection in Burkina Faso. *Trop. Med. Int. Health*. 4, 557-64.
- Healer, J., McGuinness, D., Hopcroft, P., Haley, S., Carter, R. and Riley, E. (1997). "Complement-mediated lysis of *Plasmodium falciparum* gametes by malaria-immune human sera is associated with antibodies to the gamete surface antigen Pfs230." *Infect Immun* 65(8): 3017-23.
- Molineaux, L., Storey, J., Cohen, J. E. and Thomas, A.; 1980. A longitudinal study of human malaria in the West African Savanna in the absence of control measures: relationships between different *Plasmodium* species, in particular *P. falciparum* and *P. malariae*. *Am J Trop Med Hyg* 29, 725-37.
- Muirhead-Thomson, R. C. ; 1954a. Low gametocyte thresholds of infection of *Anopheles* with *Plasmodium falciparum*; a significant factor in malaria epidemiology. *Br Med J*, 4853, 68-70.
- Muirhead-Thomson, R. C.; 1954b. Factors determining the true reservoir of infection of *Plasmodium falciparum* and *Wuchereria bancrofti* in a West African village. *Trans R Soc*

- Trop Med Hyg 48, 208-225.
- Muirhead-Thomson, R. C.; 1957. The malarial infectivity of an African village population to mosquitoes (*Anopheles gambiae*). Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 6, 971-979.
- Mulder B, Tchuinkam T, Dechering K, Verhave JP, Carnevale P, et al. Malaria transmission-blocking activity in experimental infections of *Anopheles gambiae* from naturally infected *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers, 1994, Trans R Soc Trop Med Hyg. 88, 121-125.
- Mulder B, Tchuinkam T, Verhave JP & Robert V. Malaria transmission-blocking activity in the plasma of *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers in Cameroon. Parassitologia, 1993, 35, 65-67.
- Ouedraogo, A. L., Schneider, P., De Kruif, M., Nebie, I., Verhave, J. P., Cuzin-Ouattara, N. and Sauerwein, R. W.; 2007. Age-dependent distribution of *Plasmodium falciparum* gametocytes quantified by Pfs25 real-time QT-NASBA in a cross-sectional study in Burkina Faso. Am J Trop Med Hyg 4, 626-630.
- Petrarca V, Petrangeli G, Rossi P & Sabatinelli G. [Chromosomal study of *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* in Ouagadougou (Burkina Faso) and various neighboring villages]. Parassitologia, 1986, 28, 41-61.
- Ponnudurai T, Lensen AH, Van Gemert GJ, Bensink MP, Bolmer M & Meuwissen JH. Infectivity of cultured *Plasmodium falciparum* gametocytes to mosquitoes. Parasitology, 1989, 98, 165-173.
- Price, R., Nosten, F., Simpson, J. A., Luxemburger, C., Phaipun, L., ter Kuile, F., van Vugt, M., Chongsuphajaisiddhi, T. and White, N. J.; 1999. Risk factors for gametocyte carriage in uncomplicated *falciparum* malaria. Am J Trop Med Hyg 60, 1019-23.
- Quakyi IA, Carter R, Rener J, Kumar N, Good MF & Miller LH. The 230-kDa gamete surface protein of *Plasmodium falciparum* is also a target for transmission-blocking antibodies. J Immunol, 1987, 139, 4213-4217.
- Roeffen W, Lensen T, Mulder B, Teelen K, Sauerwein R et al. Transmission blocking immunity as observed in a feeder system and serological reactivity to Pfs 48/45 and Pfs230 in field sera. Mem Inst Oswaldo, 1994, 89, 13-15.
- Roeffen W, Mulder B, Teelen K, Bolmer M, Eling W et al. Association between anti-Pfs48/45 reactivity and *P. falciparum* transmission-blocking activity in sera from Cameroon. Parasite Immunol, 1996, 18, 103-109.
- Schneider P, Bousema T, Omar S, Gouagna L, Sawa P et al. (Sub)microscopic *Plasmodium falciparum* gametocytaemia in Kenya children after treatment with sulfadoxine-pyrimethamine monotherapy or in combination with artesunate. International Journal for Parasitology, 2006, 36, 403-408
- Schneider P, Schoone G, Schallig H, Verhage D, Telgt D et al. Quantification of *Plasmodium falciparum* gametocytes in differential stages of development by quantitative nucleic acid sequence-based amplification. Mol Biochem Parasitol, 2004, 137, 35-41.

- van der Kok, M., Tebo, A. E., Nimpaye, H., Ngo Ndongbol, D., Sauerwein, R. W. and Eling, W. M. C.; 2003. Transmission of *Plasmodium falciparum* in urban Yaoundé, Cameroon, is seasonal and age-dependent. *Trans R Soc Trop Med. Hyg.* 97.
- Vermeulen AN, Ponnudurai T, Beckers PJ, Verhave JP, Smits MA & Meuwissen JH. Sequential expression of antigens on sexual stages of *Plasmodium falciparum* accessible to transmission-blocking antibodies in the mosquito. *J Exp Med*, 1985, **162**,1460-1476.
- Williamson, K. C., Keister, D. B., Muratova, O. and Kaslow, D. C. (1995). "Recombinant Pfs230, a *Plasmodium falciparum* gametocyte protein, induces antisera that reduce the infectivity of *Plasmodium falciparum* to mosquitoes." *Mol Biochem Parasitol* 75(1): 33-42.

CHAPITRE 4

DISCUSSION GENERALE

4. Discussion générale

Des antigènes de stade sexué de *Plasmodium falciparum* ont fait l'objet d'études au labo et sont actuellement des candidats potentiels au vaccin bloquant la transmission du paludisme. Les études épidémiologiques en situation de transmission naturelle du paludisme visant à valider ces antigènes ont été cependant rares vu la complexité de la question. La présente étude a eu pour objectifs d'évaluer les indicateurs directs (prévalence et densité de gamétocytes, anticorps anti-gamétocytes) ou indirects (prévalence et densités de parasites asexués, âge, saison et endémicité) de l'immunité bloquant la transmission du paludisme à *P. falciparum*.

Dans le premier volet de notre étude, nous étudions l'influence de la saison comme indicateur direct de la prévalence des gamétocytes de *Plasmodium falciparum* et indirectement de l'immunité bloquant la transmission.

Nos résultats montrent que les gamétocytes, précurseurs du stimulus antigénique de l'immunité bloquant la transmission du paludisme varient avec la saison indépendamment de l'âge et de la densité de parasites asexués. La prévalence et la densité de parasites asexués ainsi que celles des gamétocytes augmente durant la saison humide. La densité de gamétocytes est aussi élevée en saison humide quoique plus important au pic et à la fin de la saison. Plusieurs études ont déjà décrit la prévalence saisonnière des gamétocytes à *P. falciparum* (Van der kolk *et al.*, 2003, Nacher *et al.*, 2004). L'augmentation de la prévalence et de la densité de gamétocytes durant la saison humide coïncide en générale avec une augmentation de la densité de leurs précurseurs parasites asexués. Il n'est donc pas surprenant qu'une forte corrélation existe entre la prévalence des gamétocytes et la densité des parasites asexués. La même argumentation pourrait expliquer l'association négative qui existe entre la prévalence des gamétocytes et l'âge. Autrement, la forte prévalence de gamétocytes pourrait aussi résulter d'une perte partielle de l'immunité anti-gamétocytaire durant la saison sèche quoique l'existence d'une telle immunité suppressive reste à démontrer. Même si les fortes prévalences de gamétocytes sont observées chez les jeunes enfants, la contribution des plus âgés au réservoir infectieux du paludisme ne devrait pas être négligée vu qu'ils représentent une grande partie de la population et contribuent remarquablement à la transmission.

Les résultats obtenus lors de notre étude suggèrent que la prévalence et la densité des gamétocytes auraient une relation indépendante avec la saison. En effet, après ajustement par

l'âge et la densité de parasites asexués, l'impact de la saison sur la prévalence des gamétocytes, et à un moindre degré sur leur densité demeure toujours apparente. L'augmentation de la prévalence de gamétocytes qui précède l'exposition aux piqûres infectantes de moustiques et l'augmentation de la densité de parasites asexués pourrait être le résultat de l'augmentation des piqûres non infectantes de moustiques telle que suggéré par Paul et al. (2004). En fait cela représenterait un avantage adaptatif pour le parasite si la gamétocytogénèse était positivement régulée par les piqûres non infectantes de moustiques. Malheureusement notre étude ne nous permet pas de définir de facto une telle relation entre les piqûres non infectantes et la gamétocytogénèse étant donné que la capture longitudinale de moustiques a eu seulement lieu en saison humide. Une telle hypothèse devrait par conséquent être vérifiée par des études longitudinales de terrain.

Les compétitions inter clonales dans les infections multiples en saison humide sont aussi capables d'induire la production de gamétocytes. La persistance de manifestations cliniques du paludisme d'une part et/ou l'usage de médicaments antipaludiques pourrait également favoriser la production de gamétocytes au cours de cette saison humide. Finalement, l'acquisition à court terme d'une immunité contre les parasites asexués suite à une exposition abusive à de nouvelles infections palustres pourrait accélérer le processus de développement vers le stade sexué. En conclusion, la combinaison de données parasitologiques et entomologiques montre que la prévalence et la densité de gamétocyte est indépendamment déterminée par la saison, l'âge mais aussi la densité de parasites asexués et sont de facto par leur association aux gamétocytes des indicateurs potentiels indirectes de l'immunité bloquant la transmission.

Dans le deuxième volet de l'étude, il s'agissait de déterminer l'impact de l'âge comme indicateur de la prévalence de gamétocytes et d'évaluer la proportion de porteurs de gamétocytes sub-microscopiques contribuant au réservoir infectieux du paludisme.

A ce niveau, nos résultats montrent que la prévalence et la densité de gamétocytes est significativement liée à l'âge. La technique moléculaire en temps réel QT-NASBA a montré que la prévalence de gamétocytes est de 70,1% dans la zone d'étude, un taux 3 fois plus élevé que ceux déterminés par des études basées sur la microscopie (Akim *et al.*, 2000, Bousema *et al.*, 2004, Ouédraogo *et al.*, 2007; 2008). Même si la proportion d'individus additionnels détectés par la technique moléculaire ont une faible densité de gamétocytes, la contribution de ces individus au réservoir infectieux ne devrait pas être ignorée car leurs gamétocytes peuvent

autant être infectieux que ceux visibles à la microscopie et en forte densité. La réduction du port de gamétocytes ou de parasites asexués avec l'âge a déjà été démontrée par plusieurs études (Molinaux *et al.*, 1980, Bousema *et al.*, 2004). Cela pourrait être le résultat d'une immunité acquise au fil du temps. Dans la présente étude, la prévalence et la densité de gamétocytes diminuent avec l'âge. Etant donné que cette forme sexuée du parasite dérive de la forme asexuée, ceci pourrait résulter d'une faible disponibilité des gamétocytes suite au développement d'une immunité contre les formes asexuées, d'une immunité croisée ou d'une immunité spécifique au stade sexué.

Nos résultats montrent que la relation entre la densité et la prévalence de gamétocytes avec l'âge dépend principalement de la densité des formes asexuées, suggérant que l'immunité croisée ou spécifique pourrait être un facteur déterminant. Cette réduction de la gamétocytemie en fonction de l'âge, indépendamment de la densité des parasites asexués pourrait résulter d'une immunité anti-gamétocyte. Toute fois, la réduction de gamétocytes résulterait probablement d'une immunité entraînant une réduction du parasite asexué plutôt que d'un effet direct sur les gamétocytes.

L'influence de la densité des parasites asexués sur les gamétocytes ci-dessus démontrée est basée sur des analyses incluant un décompte microscopique des parasites asexués. Même si la détection microscopique des parasites asexués est plus robuste que la détection des gamétocytes, la technique QT-NASBA permet aussi de détecter les parasites asexués sub-microscopiques. Idéalement, la quantité de parasites asexués déterminée par QT-NASBA aurait dû être incluse dans les analyses, malheureusement cette technique nécessite encore une mise au point pour la détermination de la densité des parasites asexués. Cette technique est seulement disponible pour la quantification de la charge totale parasitaire (Schneider *et al.*, 2005) et spécifiquement de la densité de gamétocytes. En conclusion, les résultats obtenus dans ce volet d'étude démontrent que l'âge est un facteur clé indirect dans la détermination du réservoir de gamétocytes et par conséquent un indicateur indirect de l'immunité bloquant la transmission du paludisme.

Dans le troisième volet de l'étude, nous avons estimé la prévalence des immunoglobulines G humains, principaux indicateurs directs de l'immunité bloquant la transmission du paludisme chez les enfants de moins de 5 ans en fonction de la saison et de la zone de transmission.

Nos résultats montrent que les paramètres parasitologiques et sérologiques diffèrent en fonction du niveau et de la saison de transmission palustre. La prévalence des stades asexués

et de gamétocytes de *Plasmodium falciparum* augmente dans les villages de forte transmission et durant la saison de transmission intense (septembre). Le taux d'inoculation entomologique apparaît donc un facteur déterminant dans la prévalence de parasites asexués et sexués comme le concluent d'autres équipes de recherche (Van der kolk *et al.*, 2003, Nacher *et al.*, 2004 ; McElroy *et al.*, 1994). L'explication potentielle se résume au fait que plus le taux d'inoculation est élevé, plus l'inoculation de sporozoïtes est importante et plus la prévalence et la densité de stades asexués sera importante. La conséquence directe sera une forte prévalence de gamétocytes lesquels sont générés à partir des stades asexués. La deuxième hypothèse est qu'en zone de forte transmission, le nombre de clones serait plus élevé (Babiker *et al.*, 1997; Nébié *et al.*, 2002) avec certains capables donc d'échapper à la réponse immunitaire (virulence parasitaire) non spécifique pour aboutir à la transformation en stades sexués. La même situation se confirme en saison de forte de transmission. Dans notre étude, la forte densité parasitaire au pic de la transmission est un précurseur important de gamétocytes. Cependant la saison elle-même apparaît un facteur clé de la prévalence de gamétocyte du fait de l'élévation de la prévalence de gamétocytes en début de saison où le taux d'inoculation entomologique est quasi nul. L'une des explications plausibles serait un impact des piqûres non infectés occasionnant la production de gamétocytes à partir d'infection palustres asymptomatiques (Paul *et al.*, 2004). Cette étude a également démontré qu'il y avait une association entre la prévalence des anticorps contre les antigènes CS, GLURP, Pfs230 et Pfs48/45 avec le niveau de transmission dans les villages et avec la saison de transmission.

Par évidence, l'augmentation de cette séroconversion des anticorps de stade asexué en situation de forte intensité de transmission s'expliquerait par l'exposition à une plus forte intensité du stimulus antigénique. Cependant, ces différences de prévalence d'anticorps n'étaient pas significatives comme d'autres études l'ont déjà observé (Dodoo *et al.*, 2000 ; Dzielg *et al.*, 1993). Cette absence de différence significative pourrait s'expliquer par le fait que les saisons sont rapprochées les unes des autres ou que les demi-vies des anticorps sont raccourcies en absence de réinfection. Aussi la petitesse de la taille de l'échantillon pourrait expliquer cette absence de différence significative. A l'opposé de nos résultats, Singer *et al.*, en 2003 constatèrent que des enfants de moins de 2 ans présentaient de faibles titres d'anticorps contre MSP-19 dans une zone de forte transmission comparée aux enfants de la zone de faible transmission. Les auteurs suggérèrent qu'une sur-stimulation antigénique due aux piqûres infectantes répétées était capable d'entraîner une sorte de phénomène d'apoptose au niveau des cellules T (Singer *et al.*, 2003), ce phénomène serait spécifique aux plus jeunes

enfants qui manquent encore d'une population lymphocytaire adéquate pour faire face à un répertoire antigénique varié et intensément inoculé alors que notre population d'étude était composé d'enfants âgés de 1 à 3,99 ans. Les prévalences d'anticorps contre Pfs48/45 et Pfs230 étaient élevées dans notre étude par rapport aux données de Drakeley *et al.* Collectés dans la région d'Ifakara en Tanzanie en 2006 ou de Carter *et al.*, en 1989 en Papoua Nouvelle guinée. Cela s'expliquerait par la différence des régions au niveau épidémiologique dans la mesure où Ifakara est une zone de très faible intensité de transmission et du fait que les auteurs ont uniquement détecté l'isotype IgG1 contrairement à la présente étude où nous avons détecté tous les IgG totaux. La prévalence d'anticorps dirigés contre Pfs48/45 et Pfs230 a inversement varié en fonction des saisons. Au niveau du gaméocyte, les deux antigènes forment un complexe et la différence dans la prévalence des anticorps qui leur sont spécifiques s'expliquerait probablement par le fait qu'ils sont différent du point de vue de l'immunogénéicité ou cela est due à des différences génétiques au niveau de la région du complexe majeur d'histocompatibilité qui contrôle la réponse des lymphocytes T helpers. En conclusion la présente étude montre que le niveau de transmission palustre en fonction de la zone ou de la saison de transmission est en association avec les paramètres parasitologiques et immunologiques de l'infection à *Plasmodium falciparum* en générale et de l'immunité bloquant la transmission en particulier. L'intensité de transmission en fonction de la zone ou de la saison est par conséquent un prédicateur clé de l'immunité anti-gaméocytes et donc de l'immunité bloquant la transmission.

Dans le quatrième volet, nous avons évalué l'infectivité des gaméocytes de *P. falciparum* lors d'infections expérimentales de moustiques en relation avec les immunoglobulines IgG de plasmas de sujets vivant en zone rurale du Burkina Faso.

Il ressort que la proportion de sujets dont les gaméocytes infectent les moustiques ainsi que la proportion de moustiques infectés augmente avec l'âge. L'effet de l'âge sur l'infectivité des gaméocytes est démontré tant chez les porteurs de gaméocytes détectables au microscope que chez les porteurs de gaméocytes sub-microscopiques. Chez les porteurs, la proportion de sujets infectieux est de 62,5% et corrobore les résultats d'études antérieures (Mulder *et al.*, 1993 ; Graves *et al.*, 1988a). L'infection de moustiques à partir de seuils de gaméocytemies sub-microscopiques (Muirhead-Thomson *et al.*, 1954) est aussi en accord avec les résultats d'études récemment obtenus au Kenya (Schneider *et al.*, 2006).

Le recensement de la population totale a révélé que les enfants du groupe d'âge « < 4 ans » représente 10% de la population alors que les groupes d'âge 4-8 et 8-14 représentent respectivement 12 et 18 % de la population. En tenant compte de ces informations démographiques, les enfants dont les gamétocytes sont détectables au microscope contribueraient respectivement à 8,5% et 15,5% dans la transmission du paludisme alors que les enfants porteurs de gamétocytémies sub-microscopiques contribueraient quand à eux à 1,6%, 2,53% et 4,41% respectivement des plus jeunes aux plus vieux.

L'augmentation de la proportion de moustiques infectés en relation avec la gamétocytémie de sujets naturellement exposés au paludisme avait déjà été démontrée (Mulder *et al.*, 1993; Schneider *et al.*, 2006). Des études ayant utilisé des gamétocytes de culture ont de même confirmé ce résultat (Schneider *et al.*, 2006; Ponnudurai *et al.*, 1989). La deuxième information intéressante de cette étude montre que des sujets arborent des gamétocytes détectables au microscope mais cependant non infectieux pour les moustiques. En effet, au sein des porteurs de gamétocytes détectables au microscope (rangée 8-78 gamétocytes / μ l de sang), 37,7% d'entre eux n'étaient pas capables d'infecter les moustiques. L'explication potentielle de cette observation serait une réduction de l'infectivité de ces gamétocytes par la présence dans le sang humain de facteurs immunologiques capables d'interférer avec le développement sporogonique au niveau de l'estomac du moustique. Cette association entre anticorps dirigés contre l'antigène Pfs230 du gamétocyte et l'interruption du cycle sporogonique chez le moustique a déjà été suggérée par des études antérieures. En effet, des sérums capables de bloquer la transmission ont été démontrés chez des sujets vivant en région endémique d'Afrique et d'Asie (Graves *et al.*, 1988a; Mulder *et al.*, 1994). L'activité bloquante de sérums d'individus vivant en Nouvelle Guinée était aussi associée à la présence d'anticorps dirigés contre l'antigène Pfs230 (Graves *et al.*, 1988b) alors que celle observée au Cameroun était associée aux titres d'anticorps dirigés contre l'antigène de stade sexué Pfs48/45 (Roefen *et al.*, 1996). L'étude de Drakeley *et al.* (2006) a montré que l'activité réduisant la transmission du parasite de l'homme au moustique et la prévalence d'anticorps bloquant la transmission était négativement associée à l'âge. La technique QT-NASBA a permis la détection de gamétocytémies sub-microscopiques permettant ainsi l'amélioration de l'interprétation de nos résultats. C'est par conséquent un outil plus fiable que la microscopie dans l'établissement de bases de données épidémiologiques sur les gamétocytes et leur capacité à infecter le vecteur.

En résumé, notre étude démontre une augmentation du taux d'infectivité des gamétocytes de *P. falciparum* avec l'âge et inversement associé à la prévalence d'anticorps dirigés contre l'antigène candidat vaccin Pfs230 ; ces anticorps peuvent par conséquent être considérés comme des indicateurs directs de l'immunité bloquant la transmission. Nous démontrons également que la proportion de moustiques infectés augmente avec l'âge et que des gamétocytemies non détectables au microscope contribuaient également à la transmission du paludisme.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

Plusieurs indicateurs susceptibles d'influencer l'immunité anti-gamétocytes et en particulier celle bloquant la transmission du paludisme à *Plasmodium falciparum* ont été évalués dans la présente étude. Ces indicateurs hypothétiques sont entre autre l'âge de l'individu porteur de *Plasmodium*, la saison de transmission palustre, l'intensité de transmission (endémicité), la prévalence des gamétocytes, la prévalence des parasites asexués (précurseurs des gamétocytes), l'infectivité des gamétocytes, et la prévalence des immunoglobulines humains lesquels sont susceptibles d'influencer le taux de portage gamétocytaire ou le développement sporogonique chez le moustique.

L'évaluation de ces indicateurs est très importante parce qu'elle permettra d'une part d'établir une base de données nécessaire à l'aboutissement de la mise au point de vaccins bloquant la transmission. D'autre part, elle est importante dans les politiques d'élaboration de stratégies anti-paludiques par la caractérisation du réservoir infectieux, cible des campagnes visant à réduire la transmission du paludisme.

Au terme de notre étude, les résultats démontrent que nombreux sont les indicateurs de l'immunité bloquant la transmission (IBT) de *Plasmodium falciparum* en zone endémique du Burkina faso.

Le stimulus antigénique apporté par les gamétocytes du sang périphérique, facteur clé pour la synthèse d'anticorps anti-gamétocytes, est influencé par l'âge, la saison, la densité de parasites asexués et l'immunité anti-stade asexué du parasite. Nos études épidémiologiques de caractérisation parasitologique ont démontré que le réservoir de gamétocytes à *Plasmodium falciparum* est majoritairement représenté par les enfants de moins de 15 ans comparés aux adultes. Cependant nos études expérimentales et épidémiologiques intégrant la technique moléculaire QT-NASBA ont démontré que les adultes contribueraient également au réservoir infectieux vu que leurs gamétocytémies détectables au microscope ou par QT-NASBA quoique de faible densités s'avèrent plus infectieux que celles portées par les enfants.

En plus de l'âge, ce réservoir devient plus important au cours de la saison humide et dans les villages de transmission intense. En d'autres termes l'âge, la saison et le niveau d'endémicité interviendraient de façon indirecte dans la prédiction de l'immunité bloquant la transmission car ils constituent des indicateurs du stimulus antigénique gamétocytaire.

Nous avons observé que les individus positifs aux anticorps dirigés contre les parasites asexués en l'occurrence les antigènes GLURP et CS des mérozoïtes et sporozoïtes ont une prévalence gamétocytaire significativement bas comparés aux individus négatifs à ces anticorps. L'immunité anti-stade asexué modifie le paramètre antigénique gamétocytaire et par conséquent est un indicateur indirect de l'immunité bloquant la transmission.

Les immunoglobulines dirigées contre les antigènes candidats (Pfs48/45, Pfs230) de la surface des gamétocytes et gamètes de *P. falciparum* sont par contre des indicateurs directes de l'immunité bloquant la transmission vu qu'ils sont à mesure d'interagir directement pour empêcher la fécondation des gamètes chez le moustique. Leur prévalence diminue avec l'âge, augmente en saison humide et en zone de forte transmission coïncidant avec les fortes prévalences de gamétocytes. Ces observations supportent les résultats obtenus lors de nos infections expérimentales au cours desquelles l'infectivité des gamétocytes augmentent avec l'âge contrairement aux anticorps anti-Pfs230. Il existe donc un probable équilibre entre le réservoir de gamétocytes et la prévalence d'anticorps anti-gamétocytes ce qui étend le réservoir infectieux du paludisme à tous les âges. Chez les enfants, les gamétocytes sont plus abondantes mais moins infectieux et inversement chez les adultes.

Nous concluons que l'immunité bloquant la transmission du paludisme est majoritairement détectable chez les enfants quoi que de faible amplitude. Contrairement aux enfants, les adultes sont exposés à un faible stimulus antigénique d'où une faible réponse en anticorps bloquant la transmission. Cette immunité peut visiblement être prédite par l'âge, la prévalence et la densité des gamétocytes et parasites asexués, l'immunité anti-stade asexué et l'intensité de transmission (endémicité palustre dans la zone et la saison).

Des études longitudinales ultérieures seront nécessaires pour déterminer les sous classes d'IgG intervenant dans la réponse humorale contre les stades sexués, leur durée de vie et leur activité bloquant la transmission à travers des techniques d'infections expérimentales standardisées avec pour but de mesurer de façon adéquate l'efficacité de l'immunité bloquant la transmission du paludisme lors de futurs essais vaccinaux.

Chapitre 5
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

5. Références bibliographiques

- Abdel-Wahab, A., Abdel-Muhsin, A. M., Ali, E., Suleiman, S., Ahmed, S., Walliker, D. and Babiker, H. A.; 2002. Dynamics of gametocytes among *Plasmodium falciparum* clones in natural infections in an area of highly seasonal transmission. *J Infect Dis* 185, 1838-1842.
- Adedeji, A. A., Fehintola, F. A., Fateye, B. A., Happi, T. C., Amoo, A. O., Gbotosho, G. O. and Sowunmi, A.; 2005. *Plasmodium falciparum* malaria in Nigerian children during high and low transmission seasons: gametocyte carriage and response to oral chloroquine. *J Trop Pediatr* 51, 288-294.
- Aguiar, J. C., G. R. Albrecht, P. Cegielski, B. M. Greenwood, J. B. Jensen, G. Lallinger, A. Martinez, I. A. McGregor, J. N. Minjas, J. Neequaye and et al. (1992). "Agglutination of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes from east and west African isolates by human sera from distant geographic regions." *Am J Trop Med Hyg* 47(5): 621-32.
- Ahlborg, N., D. Haddad, A. B. Siddique, C. Roussillon, C. Rogier, J. F. Trape, M. Troye-Blomberg and K. Berzins (2002). "Antibody responses to the repetitive *Plasmodium falciparum* antigen Pf332 in humans naturally primed to the parasite." *Clin Exp Immunol* 129(2): 318-25.
- Aidoo, M., A. Lalvani, S. C. Gilbert, J. T. Hu, P. Daubersies, N. Hurt, H. C. Whittle, P. Druihle and A. V. Hill (2000). "Cytotoxic T-lymphocyte epitopes for HLA-B53 and other HLA types in the malaria vaccine candidate liver-stage antigen 3." *Infect Immun* 68(1): 227-32.
- Aikawa, M., J. Renner, R. Carter and L. H. Miller (1981). "An electron microscopical study of the interaction of monoclonal antibodies with gametes of the malarial parasite *Plasmodium gallinaceum*." *J Protozool* 28(3): 383-8.
- Aikawa, M. (1971). "Parasitological review. *Plasmodium*: the fine structure of malarial parasites." *Exp Parasitol* 30(2): 284-320.
- Aikawa, M., L. H. Miller, J. R. Rabbege and N. Epstein (1981). "Freeze-fracture study on the erythrocyte membrane during malarial parasite invasion." *J Cell Biol* 91(1): 55-62.
- Akim, N. I., Drakeley, C., Kingo, T., Simon, B., Senkoro, K. & Sauerwein, R. W. (2000). Dynamics of *P. falciparum* gametocytemia in symptomatic patients in an area of intense perennial transmission in Tanzania. *Am J Trop Med Hyg*, 63, 199-203.
- Babiker, H. A., Abdel-Wahab, A., Ahmed, S., Suleiman, S., Ranford-Cartwright, L., Carter, R. and Walliker, D. (1999) Detection of low level *Plasmodium falciparum* gametocytes using reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 99: 143-148.
- Babiker, H. A., J. Lines, W. G. Hill and D. Walliker (1997). "Population structure of *Plasmodium falciparum* in villages with different malaria endemicity in east Africa." *Am J Trop Med Hyg* 56(2): 141-7.

- Baird, J. K., Jones, T. R., Purnomo Masbar, S., Ratiwayanto, S. & Leksana, B. (1991). Evidence for specific suppression of gametocytemia by *Plasmodium falciparum* in residents of hyperendemic Irian Jaya. *Am J Trop Med Hyg*, 44, 183-90.
- Baird, J. K., S. Masbar, H. Basri, S. Tirtokusumo, B. Subianto and S. L. Hoffman (1998). "Age-dependent susceptibility to severe disease with primary exposure to *Plasmodium falciparum*." *J Infect Dis* 178(2): 592-5.
- Baird, J. K., Owusu Agyei, S., Utz, G. C., Koram, K., Barcus, M. J., Jones, T. R., Fryauff, D. J., Binka, F. N., Hoffman, S. L. and Nkrumah, F. N.; 2002. Seasonal malaria attack rates in infants and young children in northern Ghana. *Am J Trop Med Hyg* 66, 280-286.
- Baird, J. K., P. Sismadi, S. Masbar, A. Ramzan, B. W. Purnomo, Sekartuti, E. Tjitra, B. W. Rumoko and P. R. Arbani (1996). "A focus of endemic malaria in central Java." *Am J Trop Med Hyg* 54(1): 98-104.
- Bannister, L. H. and G. H. Mitchell (1989). "The fine structure of secretion by *Plasmodium knowlesi* merozoites during red cell invasion." *J Protozool* 36(4): 362-7.
- Barragan, A., P. G. Kremsner, W. Weiss, M. Wahlgren and J. Carlson (1998). "Age-related buildup of humoral immunity against epitopes for rosette formation and agglutination in African areas of malaria endemicity." *Infect Immun* 66(10): 4783-7.
- Barnish, G., Maude, G. H., Bockarie, M. J., Erunkulu, O. A., Dumbuya, M. S. and Greenwood, B. M.; 1993. Malaria in a rural area of Sierra Leone. II. Parasitological and related results from pre- and post-rains clinical surveys. *Ann Trop Med Parasitol* 87, 137-148.
- Beier, J. C., Perkins, P. V., Wirtz, R. A., Whitmire, R. E., Mugambi, M. and Hockmeyer, W. T.; 1987. Field evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for *Plasmodium falciparum* sporozoite detection in anopheline mosquitoes from Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 36, 459-468.
- Berzins, K., H. Perlmann, B. Wahlin, H. P. Ekre, B. Hogh, E. Petersen, B. Wellde, M. Schoenbechler, J. Williams, J. Chulay and et al. (1991). "Passive immunization of *Aotus* monkeys with human antibodies to the *Plasmodium falciparum* antigen Pf155/RESA." *Infect Immun* 59(4): 1500-6.
- Binka, F. N., S. S. Morris, D. A. Ross, P. Arthur and M. E. Aryeetey (1994). "Patterns of malaria morbidity and mortality in children in Northern Ghana." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88: 381-385.
- Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van-Dillen, P. M. and Noordaa, J. v. d. (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28: 495-503.
- Borre, M. B., M. Dziegiel, B. Hogh, E. Petersen, K. Rieneck, E. Riley, J. F. Meis, M. Aikawa, K. Nakamura, M. Harada and et al. (1991). "Primary structure and localization of a conserved immunogenic *Plasmodium falciparum* glutamate rich protein (GLURP)

- expressed in both the preerythrocytic and erythrocytic stages of the vertebrate life cycle." *Mol Biochem Parasitol* 49(1): 119-31.
- Boudin, C., Lyannaz, J., Bosseno, M. F., Carnevale, P. and Ambroise-Thomas, P. (1991) Epidemiology of *Plasmodium falciparum* in a rice field and a savanna area in Burkina Faso: seasonal fluctuations of gametocytaemia and malarial infectivity. *Ann Trop Med Parasitol* 85: 377-385.
- Boudin, C., J. Lyannaz, M. F. Bosseno, J. Chaize and P. Carnevale (1989). "Production of sporozoites of human *Plasmodium* in Bobo-Dioulasso (Burkina Faso)." *Ann Soc Belg Med Trop.* 69(1): 3-23.
- Boudin, C., Olivier, M., Molez, J. F., Chiron, J. P. and Ambroise-Thomas, P. (1993) High human malarial infectivity to laboratory-bred *Anopheles gambiae* in a village in Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg* 48: 700-706.
- Bouharoun-Tayoun, H., P. Attanath, A. Sabchareon, T. Chongsuphajaisiddhi and P. Druilhe (1990). "Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes." *J Exp Med* 172(6): 1633-41.
- Bouharoun-Tayoun, H. and P. Druilhe (1992). "Antibodies in *falciparum* malaria: what matters most, quantity or quality?" *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87 Suppl 3: 229-34.
- Bousema, J. T., Gouagna, L. C., Drakeley, C. J., Meutstege, A. M., Okech, B. A., Akim, I. N., Beier, J. C., Githure, J. I. and Sauerwein, R. W. (2004) *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage in asymptomatic children in western Kenya. *Malar J* 3: 18.
- Boyd, M.F., Stratman-Thomas, W.K., Kitchen, S.F.(1935). On the relative susceptibility of *An. Quadrimaculatus* to *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 15: 485-493.
- Brown, J. and M. E. Smalley (1980). "Specific antibody-dependent cellular cytotoxicity in human malaria." *Clin Exp Immunol* 41(3): 423-9.
- Brown, J. and M. E. Smalley (1981). "Inhibition of the in vitro growth of *Plasmodium falciparum* by human polymorphonuclear neutrophil leucocytes." *Clin Exp Immunol* 46(1): 106-9.
- Bruce-Chwatt, L. J. (1986). "Chemotherapy of Malaria, Geneva, WHO."
- Bruce, M. C., P. Alano, S. Duthie and R. Carter (1990). "Commitment of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* to sexual and asexual development." *Parasitology* 100: 191-200.
- Bull, P. C., B. S. Lowe, M. Kortok, C. S. Molyneux, C. I. Newbold and K. Marsh (1998). "Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria." *Nat Med* 4(3): 358-60.
- Carter, R., P. M. Graves, D. B. Keister and I. A. Quakyi (1990). "Properties of epitopes of Pfs

- 48/45, a target of transmission blocking monoclonal antibodies, on gametes of different isolates of *Plasmodium falciparum*." *Parasite Immunol* 12(6): 587-603.
- Carter, R., P. M. Graves, I. A. Quakyi and M. F. Good (1989). "Restricted or absent immune responses in human populations to *Plasmodium falciparum* gamete antigens that are targets of malaria transmission-blocking antibodies." *J Exp Med* 169(1): 135-47.
- Carter, R. and K. N. Mendis (1991). "Immune responses against sexual stages of *Plasmodium vivax* during human malarial infections in Sri Lanka." *Parassitologia* 33(1): 67-70.
- Carter, R. and M. M. Nijhout (1977). "Control of gamete formation (exflagellation) in malaria parasites." *Science* 195(4276): 407-9.
- Cattani, J. A., J. L. Tulloch, H. Vrbova, D. Jolley, F. D. Gibson, J. S. Moir, P. F. Heywood, M. P. Alpers, A. Stevenson and R. Clancy (1986). "The epidemiology of malaria in a population surrounding Madang, Papua New Guinea." *Am J Trop Med Hyg* 35(1): 3-15.
- Cerami, C., F. Kwakye-Berko and V. Nussenzweig (1992). "Binding of malarial circumsporozoite protein to sulfatides [Gal(3-SO₄)_β1-Cer] and cholesterol-3-sulfate and its dependence on disulfide bond formation between cysteines in region II." *Mol Biochem Parasitol* 54(1): 1-12.
- Chumpitazi, B. F., J. P. Lepers, J. Simon and P. Deloron (1996). "IgG1 and IgG2 antibody responses to *Plasmodium falciparum* exoantigens correlate inversely and positively, respectively, to the number of malaria attacks." *FEMS Immunol Med Microbiol* 14(2-3): 151-8.
- Chutmongkonkul, M., W. A. Maier and H. M. Seitz (1992). "*Plasmodium falciparum*: effect of chloroquine, halofantrine and pyrimethamine on the infectivity of gametocytes for *Anopheles stephensi* mosquitoes." *Ann Trop Med Parasitol* 86(2): 103-10.
- Costantini, C., Sagnon, N., Ilboudo-Sanogo, E., Coluzzi, M. and Boccolini, D. (1999). "Chromosomal and bionomic heterogeneities suggest incipient speciation in *Anopheles funestus* from Burkina Faso." *Parassitologia* 41(4): 595-611.
- Cuzin-Ouattara, N., Van den Broek, A. H., Habluetzel, A., Diabate, A., Sanogo-Ilboudo, E., Diallo, D. A., Cousens, S. N. and Esposito, F.; 1999. Wide-scale installation of insecticide-treated curtains confers high levels of protection against malaria transmission in a hyperendemic area of Burkina Faso. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93, 473-479.
- Del Giudice, G., C. Tougne, J. A. Louis, P. H. Lambert, E. Bianchi, F. Bonelli, L. Chiappinelli and A. Pessi (1990). "A multiple antigen peptide from the repetitive sequence of the *Plasmodium malariae* circumsporozoite protein induces a specific antibody response in mice of various H-2 haplotypes." *Eur J Immunol* 20(7): 1619-22.
- Dessens, J. T., A. L. Beetsma, G. Dimopoulos, K. Wengelnik, A. Crisanti, F. C. Kafatos and R. E. Sinden (1999). "CTRP is essential for mosquito infection by malaria ookinetes." *Embo J* 18(22): 6221-7.

- Diallo, D. A., Cousens, S. N., Cuzin-Ouattara, N., Nebie, I., Ilboudo-Sanogo, E. and Esposito, F. (2004). "Child mortality in a West African population protected with insecticide-treated curtains for a period of up to 6 years." *Bull World Health Organ* 82(2): 85-91.
- Dodoo, D., M. Theisen, J. A. Kurtzhals, B. D. Akanmori, K. A. Koram, S. Jepsen, F. K. Nkrumah, T. G. Theander and L. Hviid (2000). "Naturally acquired antibodies to the glutamate-rich protein are associated with protection against *Plasmodium falciparum* malaria." *J Infect Dis* 181(3): 1202-5.
- Dowling, M. A. C. and Shute, G. T. (1966) A comparative study of thick and thin blood films in the diagnosis of scanty malaria parasitaemia. *Bull World Health Organ* 34: 249-267.
- Drakeley, C. J., Akim, N. I., Sauerwein, R. W., Greenwood, B. M. and Targett, G. A. (2000) Estimates of the infectious reservoir of *Plasmodium falciparum* malaria in The Gambia and in Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94: 472-476.
- Drakeley, C. J., Bousema, J. T., Akim, N. I., Teelen, K., Roeffen, W., Lensen, A. H., Bolmer, M., Eling, W. and Sauerwein, R. W. (2006). "Transmission-reducing immunity is inversely related to age in *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers." *Parasite Immunol* 28(5): 185-90.
- Dubois, B., P. Deloron, P. Astagneau, C. Chougnet and J. P. Lepers (1993). "Isotypic analysis of *Plasmodium falciparum*-specific antibodies and their relation to protection in Madagascar." *Infect Immun* 61(10): 4498-500.
- Duffy, P. E., P. Pimenta and D. C. Kaslow (1993). "Pgs28 belongs to a family of epidermal growth factor-like antigens that are targets of malaria transmission-blocking antibodies." *J Exp Med* 177(2): 505-10.
- Dunyo, S., Milligan, P., Edwards, T., Sutherland, C., Targett, G. and Pinder, M., 2006. Gametocytaemia after Drug Treatment of Asymptomatic *Plasmodium falciparum*. *PLoS Clin. Trials*. 4, e20.
- Dyer, M. and K. P. Day (2000). "Commitment to gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum*." *Parasitol Today* 16(3): 102-7.
- Dziegiel, M., P. Rowe, S. Bennett, S. J. Allen, O. Olerup, A. Gottschau, M. Borre and E. M. Riley (1993). "Immunoglobulin M and G antibody responses to *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein: correlation with clinical immunity in Gambian children." *Infect Immun* 61(1): 103-8.
- Egan, J. E., S. L. Hoffman, J. D. Haynes, J. C. Sadoff, I. Schneider, G. E. Grau, M. R. Ilingdale, W. R. Ballou and D. M. Gordon (1993). "Humoral immune responses in volunteers immunized with irradiated *Plasmodium falciparum* sporozoites." *Am J Trop Med Hyg* 49(2): 166-73.
- Elloso, M. M., H. C. van der Heyde, J. A. vande Waa, D. D. Manning and W. P. Weidanz (1994). "Inhibition of *Plasmodium falciparum* in vitro by human gamma delta T cells." *J Immunol* 153(3): 1187-94.

- Feng, Z., R. N. Hoffmann, R. S. Nussenzweig, M. Tsuji, H. Fujioka, M. Aikawa, T. H. Lensen, T. Ponnudurai and L. G. Polge (1993). "Pfs2400 can mediate antibody-dependent malaria transmission inhibition and may be the *Plasmodium falciparum* 11.1 gene product." *J Exp Med* 177(2): 273-81.
- Finkelman, F. D., J. Holmes, I. M. Katona, J. F. Urban, Jr., M. P. Beckmann, L. S. Park, K. A. Schooley, R. L. Coffman, T. R. Mosmann and W. E. Paul (1990). "Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection." *Annu Rev Immunol* 8: 303-33.
- Forsyth, K. P., G. Philip, T. Smith, E. Kum, B. Southwell and G. V. Brown (1989). "Diversity of antigens expressed on the surface of erythrocytes infected with mature *Plasmodium falciparum* parasites in Papua New Guinea." *Am J Trop Med Hyg* 41(3): 259-65.
- Garnham, P. C. (1966). "Comments on biology of human malaria." *Mil Med* 131(9): Suppl:961-2.
- Githeko, A. K., Brandling-Bennett, A. D., Beier, M., Atieli, F., Owaga, M. and Collins, F. H. (1992) The reservoir of *Plasmodium falciparum* malaria in a holoendemic area of western Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86: 355-358.
- Goodier, M., M. Krause-Jauer, A. Sanni, A. Massougbodji, B. C. Sadeler, G. H. Mitchell, M. Modolell, K. Eichmann and J. Langhorne (1993). "Gamma delta T cells in the peripheral blood of individuals from an area of holoendemic *Plasmodium falciparum* transmission." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87(6): 692-6.
- Gouagna, L. C., Bonnet, S., Gounoue, R., Verhave, J. P., Eling, W., Sauerwein, R. and Boudin, C. (2004) Stage-specific effects of host plasma factors on the early sporogony of autologous *Plasmodium falciparum* isolates within *Anopheles gambiae*. *Trop Med Int Health* 9: 937-948.
- Gozar, M. M., V. L. Price and D. C. Kaslow (1998). "Saccharomyces cerevisiae-secreted fusion proteins Pfs25 and Pfs28 elicit potent *Plasmodium falciparum* transmission-blocking antibodies in mice." *Infect Immun* 66(1): 59-64.
- Gratzer, W. B. and A. R. Dluzewski (1993). "The red blood cell and malaria parasite invasion." *Semin Hematol* 30(3): 232-47.
- Graves, P. M., Burkot, T. R., Carter, R., Cattani, J. A., Lagog, M., Parker, J., Brabin, B. J., Gibson, F. D., Bradley, D. J. & Alpers, M. P. (1988). Measurement of malarial infectivity of human populations to mosquitoes in the Madang area, Papua, New Guinea. *Parasitology*, 96 (Pt 2), 251-63.
- Graves, P. M., R. Carter, T. R. Burkot, I. A. Quakyi and N. Kumar (1988). "Antibodies to *Plasmodium falciparum* gamete surface antigens in Papua New Guinea sera." *Parasite Immunol* 10(2): 209-18.
- Greenwood, B. M. and Armstrong, J. R. M. (1991) Comparison of two simple methods for determining malaria parasite density. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 85: 186-188.

- Grotendorst, C. A., N. Kumar, R. Carter and D. C. Kaushal (1984). "A surface protein expressed during the transformation of zygotes of *Plasmodium gallinaceum* is a target of transmission-blocking antibodies." *Infect Immun* 45(3): 775-7.
- Groux, H. and J. Gysin (1990). "Opsonization as an effector mechanism in human protection against asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*: functional role of IgG subclasses." *Res Immunol* 141(6): 529-42.
- Gysin, J. (1992). "Mechanisms of protective immunity against asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* in the experimental host Saimiri." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87 Suppl 3: 407-12.
- Habluetzel, A., Cuzin, N., Diallo, D. A., Nebie, I., Belem, S., Cousens, S. N. and Esposito, F.; 1999. Insecticide-treated curtains reduce the prevalence and intensity of malaria infection in Burkina Faso. *Trop Med Int Health* 4, 557-564.
- Harte, P. G., N. C. Rogers and G. A. Targett (1985). "Role of T cells in preventing transmission of rodent malaria." *Immunology* 56(1): 1-7.
- Hawking, F., M. E. Wilson and K. Gammage (1971). "Evidence for cyclic development and short-lived maturity in the gametocytes of *Plasmodium falciparum*." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 65(5): 549-559.
- Hayward, R. E., B. Tiwari, K. P. Piper, D. I. Baruch and K. P. Day (1999). "Virulence and transmission success of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(8): 4563-8.
- Healer, J., McGuinness, D., Hopcroft, P., Haley, S., Carter, R. and Riley, E. (1997). "Complement-mediated lysis of *Plasmodium falciparum* gametes by malaria-immune human sera is associated with antibodies to the gamete surface antigen Pfs230." *Infect Immun* 65(8): 3017-23.
- Hill, A. V., J. Elvin, A. C. Willis, M. Aidoo, C. E. Allsopp, F. M. Gotch, X. M. Gao, M. Takiguchi, B. M. Greenwood, A. R. Townsend and et al. (1992). "Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria." *Nature* 360(6403): 434-9.
- Hogh, B., E. Petersen, M. Dziegiel, K. David, A. Hanson, M. Borre, A. Holm, J. Vuust and S. Jepsen (1992). "Antibodies to a recombinant glutamate-rich *Plasmodium falciparum* protein: evidence for protection of individuals living in a holoendemic area of Liberia." *Am J Trop Med Hyg* 46(3): 307-13.
- Hollingdale, M. R., E. H. Nardin, S. Tharavanij, A. L. Schwartz and R. S. Nussenzweig (1984). "Inhibition of entry of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* sporozoites into cultured cells; an in vitro assay of protective antibodies." *J Immunol* 132(2): 909-13.
- Jeffery, G. M. and D. E. Eyles (1955). "Infectivity to mosquitoes of *Plasmodium falciparum*

- as related to gametocyte density and duration of infection." *Am J Trop Med Hyg* 4(5): 781-9.
- Kocken, C. H., J. Jansen, A. M. Kaan, P. J. Beckers, T. Ponnudurai, D. C. Kaslow, R. N. Konings and J. G. Schoenmakers (1993). "Cloning and expression of the gene coding for the transmission blocking target antigen Pfs48/45 of *Plasmodium falciparum*." *Mol Biochem Parasitol* 61(1): 59-68.
- Kocken, C. H., R. L. Milek, T. H. Lensen, D. C. Kaslow, J. G. Schoenmakers and R. N. Konings (1995). "Minimal variation in the transmission-blocking vaccine candidate Pfs48/45 of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*." *Mol Biochem Parasitol* 69(1): 115-8.
- Konate, L., J. Zwetyenga, C. Rogier, E. Bischoff, D. Fontenille, A. Tall, A. Spiegel, J. F. Trape and O. Mercereau-Puijalon (1999). "Variation of *Plasmodium falciparum* msp1 block 2 and msp2 allele prevalence and of infection complexity in two neighbouring Senegalese villages with different transmission conditions." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93 Suppl 1: 21-8.
- Koram, K. A., S. Owusu-Agyei, G. Utz, F. N. Binka, J. K. Baird, S. L. Hoffman and F. K. Nkrumah (2000). "Severe anemia in young children after high and low malaria transmission seasons in the Kassena-Nankana district of northern Ghana." *Am J Trop Med Hyg* 62(6): 670-4.
- Lobo, C. A., R. N. Konings and N. Kumar (1994). "Expression of early gametocyte-stage antigens Pfg27 and Pfs16 in synchronized gametocytes and non-gametocyte producing clones of *Plasmodium falciparum*." *Mol Biochem Parasitol* 68(1): 151-4.
- Lobo, C. A., H. Fujioka, M. Aikawa and N. Kumar (1999). "Disruption of the Pfg27 locus by homologous recombination leads to loss of the sexual phenotype in *P. falciparum*." *Mol Cell* 3(6): 793-8.
- Lensen, A., L. Mulder, T. Tchuinkam, L. Willemssen, W. Eling and R. Sauerwein (1998). "Mechanisms that reduce transmission of *Plasmodium falciparum* malaria in semiimmune and nonimmune persons." *J Infect Dis* 177(5): 1358-63.
- Lensen, A. H., M. Bolmer-Van de Vegte, G. J. van Gemert, W. M. Eling and R. W. Sauerwein (1997). "Leukocytes in a *Plasmodium falciparum*-infected blood meal reduce transmission of malaria to *Anopheles* mosquitoes." *Infect Immun* 65(9): 3834-7.
- Lengeler, C., J. Armstrong-Schellenberg, U. D'Alessandro, F. Binka, J. Cattani, 1998. Relative versus absolute risk of dying reduction after using insecticide-treated nets for malaria control in Africa. *Trop Med Int Health*. 3: 286-290.
- Lepers, J. P., D. Fontenille, M. D. Andriamangotiana-Rason, P. Deloron and P. Coulanges (1990). "[Ecological factors in the renewed outbreak of malaria in Madagascar]." *Bull Soc Pathol Exot* 83(3): 330-41.
- Lopez, J. A., C. Weilenman, R. Audran, M. A. Roggero, A. Bonelo, J. M. Tiercy, F. Spertini

- and G. Corradin (2001). "A synthetic malaria vaccine elicits a potent CD8(+) and CD4(+) T lymphocyte immune response in humans. Implications for vaccination strategies." *Eur J Immunol* 31(7): 1989-1998.
- Marsh, K. and R. J. Howard (1986). "Antigens induced on erythrocytes by *P. falciparum*: expression of diverse and conserved determinants." *Science* 231(4734): 150-3.
- McElroy, P. D., Beier, J. C., Oster, C. N., Beadle, C., Sherwood, J. A., Oloo, A. J. and Hoffman, S. L. (1994). "Predicting outcome in malaria: correlation between rate of exposure to infected mosquitoes and level of *Plasmodium falciparum* parasitemia." *Am J Trop Med Hyg* 51(5): 523-32.
- McGregor, I. A. (1993). "Towards a vaccine against malaria." *Br J Biomed Sci* 50(1): 35-42.
- Mendis, K. N., Y. D. Munesinghe, Y. N. de Silva, I. Keragalla and R. Carter (1987). "Malaria transmission-blocking immunity induced by natural infections of *Plasmodium vivax* in humans." *Infect Immun* 55(2): 369-72.
- Menegon, M., Severini, C., Sannella, A., Paglia, M. G., Sangare, D., Abdel-Wahab, A., Abdel-Muhsin, A. A., Babiker, H., Walliker, D. and Alano, P. (2000) Genotyping of *Plasmodium falciparum* gametocytes by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 111: 153-161.
- Milon, G. and P. H. David (1999). "Transmission stages of *Plasmodium*: does the parasite use the one same signal, provided both by the host and the vector, for gametocytogenesis and sporozoite maturation?" *Parassitologia* 41(1-3): 159-62.
- Ministere de la Santé (Burkina Faso). 1993. "Direction de la médecine préventive." Programme National de la Lutte Antipaludique: 28 p.
- Ministere de la Santé (Burkina Faso). (2000). "Direction des études et de la planification." Annuaire Statistique Santé: 189p.
- Moelans, II, C. H. Klaassen, D. C. Kaslow, R. N. Konings and J. G. Schoenmakers (1991). "Minimal variation in Pfs16, a novel protein located in the membrane of gametes and sporozoites of *Plasmodium falciparum*." *Mol Biochem Parasitol* 46(2): 311-3.
- Molineaux, L. and G. Gramiccia (1980). "THE GARKI PROJECT. Research on the Epidemiology and Control of Malaria in the Sudan Savanna of West Africa." WHO report: 311.
- Molineaux, L. and G. Gramiccia (1980). "Parasitology, chapter five in "THE GARKI PROJECT. Research on the Epidemiology and Control of Malaria in the Sudan Savanna of West Africa"." WHO report: 109-172.
- Molineaux, L., Storey, J., Cohen, J. E. & Thomas, A. (1980). A longitudinal study of human malaria in the West African Savanna in the absence of control measures: relationships between different *Plasmodium* species, in particular *P. falciparum* and *P. malariae*. *Am J Trop Med Hyg*, 29, 725-37.

- Mshana, R. N., J. Boulandi, J. Mayombo and G. Mendome (1993). "In vitro lymphoproliferative responses to malaria antigens: a prospective study of residents of a holoendemic area with perennial malaria transmission." *Parasite Immunol* 15(1): 35-45.
- Muirhead-Thomson, R. C. (1954) Factors determining the true reservoir of infection of *Plasmodium falciparum* and *Wuchereria bancrofti* in a West African village. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 48: 208-225.
- Muirhead-Thomson, R. C. (1957) The malarial infectivity of an african village population to mosquitoes (*Anopheles gambiae*). A random xenodiagnostic survey. *Am J Trop Med Hyg* 6: 971-979.
- Mulder, B., T. Tchuinkam, K. Dechering, J. P. Verhave, P. Carnevale, J. H. Meuwissen and V. Robert (1994). "Malaria transmission-blocking activity in experimental infections of *Anopheles gambiae* from naturally infected *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88(1): 121-5.
- Muller, H. M., E. Scarselli and A. Crisanti (1993). "Thrombospondin related anonymous protein (TRAP) of *Plasmodium falciparum* in parasite-host cell interactions." *Parassitologia* 35 Suppl: 69-72.
- Nacher, M., Carrara, V. I., Ashley, E., McGready, R., Hutagalung, R., Nguen, J. V., Thwai, K. L., Looareesuwan, S. and Nosten, F.; 2004. Seasonal variation in hyper parasitaemia and gametocyte carriage in patients with *Plasmodium falciparum* malaria on the Thai-Burmese border. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98, 322-328.
- Nardin, E. H., R. S. Nussenzweig, I. A. McGregor and J. H. Bryan (1979). "Antibodies to sporozoites: their frequent occurrence in individuals living in an area of hyperendemic malaria." *Science* 206(4418): 597-9.
- Nardin, E. H., V. Nussenzweig, R. S. Nussenzweig, W. E. Collins, K. T. Harinasuta, P. Tapchaisri and Y. Chomcharn (1982). "Circumsporozoite proteins of human malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*." *J Exp Med* 156(1): 20-30.
- Naotunne, T. S., N. D. Karunaweera, G. Del Giudice, M. U. Kularatne, G. E. Grau, R. Carter and K. N. Mendis (1991). "Cytokines kill malaria parasites during infection crisis: extracellular complementary factors are essential." *J Exp Med* 173(3): 523-9.
- Naotunne, T. S., N. D. Karunaweera, K. N. Mendis and R. Carter (1993). "Cytokine-mediated inactivation of malarial gametocytes is dependent on the presence of white blood cells and involves reactive nitrogen intermediates." *Immunology* 78(4): 555-62.
- Nassir, E., Abdel-Muhsin, A. M., Suliaman, S., Kenyon, F., Kheir, A., Geha, H., Ferguson, H. M., Walliker, D. and Babiker, H. A.; 2005. Impact of genetic complexity on longevity and gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* during the dry and transmission-free season of eastern Sudan. *Int J Parasitol* 35, 49-55.
- Nebie, I., N. Cuzin-Ouattara, D. A. Diallo, S. N. Cousens, M. Theisen, G. Corradin, A. S.

- Traore and F. Esposito (2003). "Humoral responses to defined malaria antigens in children living since birth under insecticide treated curtains in Burkina Faso." *Acta Trop* 88(1): 17-25.
- Noden, B. H., P. S. Beadle, J. A. Vaughan, C. B. Pumpuni, M. D. Kent and J. C. Beier (1994). "*Plasmodium falciparum*: the population structure of mature gametocyte cultures has little effect on their innate fertility." *Acta Trop* 58(1): 13-9.
- Oeuvray, C., M. Theisen, C. Rogier, J. F. Trape, S. Jepsen and P. Druilhe (2000). "Cytophilic immunoglobulin responses to *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein are correlated with protection against clinical malaria in Dielmo, Senegal." *Infect Immun* 68(5): 2617-20.
- Ord, R., Alexander N., Dunyo S., Hallett R., Jawara M., Targett G., Drakeley C. J. and Sutherland C. J.; 2007. Seasonal carriage of *pfert* and *pfmdr1* alleles in Gambian *Plasmodium falciparum* imply reduced fitness of chloroquine-resistant parasites. *J Inf Dis* in press
- Ouédraogo, A.L., de Vlas, S.J., Nébié, I, Ilboudo-Sanogo, E., Bousema, J.T., Ouattara, A.S., Verhave, J.P., Cuzin-Ouattara, N., Sauerwein, R.W. (2008). Seasonal patterns of *Plasmodium falciparum* gametocyte prevalence and density in a rural population of Burkina Faso. *Acta Trop* 105(1):28-34.
- Ouedraogo, A. L., Schneider, P., De Kruif, M., Nebie, I., Verhave, J. P., Cuzin-Ouattara, N. and Sauerwein, R. W.; 2007. Age-dependent distribution of *Plasmodium falciparum* gametocytes quantified by Pfs25 real-time QT-NASBA in a cross-sectional study in Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg.* 4, 626-630.
- Paganotti GM, Palladino C, Modiano D, Sirima BS, Raberg L, Diarra A, Konaté A, Coluzzi M, Walliker D, Babiker HA, 2006. Genetic complexity and gametocyte production of *Plasmodium falciparum* in Fulani and Mossi communities in Burkina Faso. *Parasitol* 132: 607--614.
- Paloske, B. L., Howard R. J. (1989). "The promise of asexual malaria vaccine development." *Am J Trop Med Hyg* : 3-10.
- Paul RE, Diallo M & Brey PT (2004) Mosquitoes and transmission of malaria parasites- not just vectors. *Malaria Journal* 3, 39.
- Petrarca V, Petrangeli G, Rossi P & Sabatinelli G (1986a) Chromosomal study of *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* in Ouagadougou (Burkina Faso) and various neighboring villages. *Parassitologia* 28, 41-61.
- Petrarca, V., G. Petrangeli, P. Rossi and G. Sabatinelli (1986b). "[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): 189-91.
- Piper, K. P., Hayward, R. E., Cox, M. J. & Day, K. P. (1999). Malaria transmission and naturally acquired immunity to PfEMP-1. *Infect Immun*, 67, 6369-74.
- Plebanski, M., M. Aidoo, H. C. Whittle and A. V. Hill (1997). "Precursor frequency analysis

- of cytotoxic T lymphocytes to pre-erythrocytic antigens of *Plasmodium falciparum* in West Africa." *J Immunol* 158(6): 2849-55.
- Price, R., Nosten, F., Simpson, J. A., Luxemburger, C., Phaipun, L., ter Kuile, F., van Vugt, M., Chongsuphajaisiddhi, T. & White, N. J. (1999b). Risk factors for gametocyte carriage in uncomplicated *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg*, 60, 1019-23.
- Piper, K. P., R. E. Hayward, M. J. Cox and K. P. Day (1999). "Malaria transmission and Naturally acquired immunity to PfEMP-1." *Infect Immun* 67(12): 6369-6374.
- Ponnudurai, T., A. H. Lensen, G. J. Van Gemert, M. P. Bensink, M. Bolmer and J. H. Meuwissen (1989). "Infectivity of cultured *Plasmodium falciparum* gametocytes to mosquitoes." *Parasitology* 98 Pt 2: 165-73.
- Potocnjak, P., N. Yoshida, R. S. Nussenzweig and V. Nussenzweig (1980). "Monovalent fragments (Fab) of monoclonal antibodies to a sporozoite surface antigen (Pb44) protect mice against malarial infection." *J Exp Med* 151(6): 1504-13.
- Quakyi, I. A., R. Carter, J. Rener, N. Kumar, M. F. Good and L. H. Miller (1987). "The 230-kDa gamete surface protein of *Plasmodium falciparum* is also a target for transmission-blocking antibodies." *J Immunol* 139(12): 4213-7.
- Quakyi, I. A., Y. Matsumoto, R. Carter, R. Udonsangpetch, A. Sjolander, K. Berzins, P. Perlmann, M. Aikawa and L. H. Miller (1989). "Movement of a *falciparum* malaria protein through the erythrocyte cytoplasm to the erythrocyte membrane is associated with lysis of the erythrocyte and release of gametes." *Infect Immun* 57(3): 833-9.
- Ranawaka, G. R., S. L. Fleck, A. R. Blanco and R. E. Sinden (1994). "Characterization of the modes of action of anti-Pbs21 malaria transmission-blocking immunity: ookinete to oocyst differentiation in vivo." *Parasitology* 109 (Pt 4): 403-11.
- Read, A. F., A. Narara, S. Nee, A. E. Keymer and K. P. Day (1992). "Gametocyte sex ratios as indirect measures of outcrossing rates in malaria." *Parasitology* 104 (Pt 3): 387-95.
- Rener, J., P. M. Graves, R. Carter, J. L. Williams and T. R. Burkot (1983). "Target antigens of transmission-blocking immunity on gametes of *plasmodium falciparum*." *J Exp Med* 158(3): 976-81.
- Riley, E. M., S. Morris-Jones, A. W. Taylor-Robinson and A. A. Holder (1993). "Lymphoproliferative responses to a merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum*: preliminary evidence for seasonal activation of CD8+/HLA-DQ-restricted suppressor cells." *Clin Exp Immunol* 94(1): 64-7.
- Robert, V., A. F. Read, J. Essong, T. Tchuinkam, B. Mulder, J. P. Verhave and P. Carnevale (1996). "Effect of gametocyte sex ratio on infectivity of *Plasmodium falciparum* to *Anopheles gambiae*." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90(6): 621-4.
- Robert, V., J. F. Molez and J. F. Trape (1996). "Short report: gametocytes, chloroquine pressure, and the relative parasite survival advantage of resistant strains of *falciparum* malaria in west Africa." *Am J Trop Med Hyg* 55(3): 350-351.

- Roeffen, W., B. Mulder, K. Teelen, M. Bolmer, W. Eling, G. A. Targett, P. J. Beckers and R. Sauerwein (1996). "Association between anti-Pfs48/45 reactivity and *P. falciparum* transmission-blocking activity in sera from Cameroon." *Parasite Immunol* 18(2): 103-9.
- Roeffen, W., T. Lensen, B. Mulder, K. Teelen, R. Sauerwein, W. Eling, J. H. Meuwissen and P. Beckers (1994). "Transmission blocking immunity as observed in a feeder system and serological reactivity to Pfs 48/45 and Pfs230 in field sera." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89 Suppl 2: 13-5.
- Roeffen, W. F., J. M. Raats, K. Teelen, R. M. Hoet, W. M. Eling, W. J. van Venrooij and R. W. Sauerwein (2001). "Recombinant human antibodies specific for the Pfs48/45 protein of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*." *J Biol Chem* 276(23): 19807-11.
- Rosenberg R, Andre RG & Ketrangsee S (1990) Seasonal fluctuation of *Plasmodium falciparum* gametocytaemia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84, 29-33.
- Sam-Yellowe, T. Y., R. A. Del Rio, H. Fujioka, M. Aikawa, J. C. Yang and Z. Yakubu (1998). "Isolation of merozoite rhoptries, identification of novel rhoptry-associated proteins from *Plasmodium yoelii*, *P. chabaudi*, *P. berghei*, and conserved interspecies reactivity of organelles and proteins with *P. falciparum* rhoptry-specific antibodies." *Exp Parasitol* 89(3): 271-84.
- Sauerwein, R. W. and W. M. C. Eling (2002). "Sexual and sporogonic stage antigens." *Malaria Immunology* (Karger, Zurich) Eds: P. Perlmann, Th. Troye-Blomberg.
- Schneider, P., Bousema, T., Omar, S., Gouagna, L., Sawa, P., Schallig, H0., Sauerwein, R., (2006a). (Sub)microscopic *Plasmodium falciparum* gametocytaemia in Kenyan children after treatment with sulphadoxine-pyrimethamine monotherapy or in combination with artesunate. *Int J Parasitol* 36: 403--408.
- Schneider, P., (2006b). Thèse de doctorat. Université Saint Radboud de Nijmegen, Pays bas.
- Schneider, P., Schoone, G., Schallig, H., Verhage, D., Telgt, D. S., Eling, W. and Sauerwein, R. (2004) Quantification of *Plasmodium falciparum* gametocytes in differential stages of development by Quantitative Nucleic Acid Sequence-Based Amplification. *Mol Biochem Parasitol* 137: 35-41.
- Schneider, P., Wolters, L., Schoone, G., Schallig, H., Sillekens, P., Hermsen, R. and Sauerwein, R. (2005) Real-time nucleic acid sequence-based amplification is more convenient than real-time PCR for quantification of *Plasmodium falciparum*. *J Clin Microbiol* 43: 402-405.
- Shahabuddin, M., T. Toyoshima, M. Aikawa and D. C. Kaslow (1993). "Transmission-blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitinase by mosquito protease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(9): 4266-70.
- Shutler, D., Reece, S. E., Mullie, A., Billingsley, P. F. and Read, A. F.; 2005. Rodent

- malaria parasites *Plasmodium chabaudi* and *P. vinckei* do not increase their rates of gametocytogenesis in response to mosquito probing. *Proc. Biol. Sci.* 1579, 2397-2402.
- Sinden RE (1983) Sexual development of malaria parasites. *Advances in Parasitology* 22, 153-216.
- Sinden, R. E. and M. E. Smalley (1976). "Gametocytes of *Plasmodium falciparum*: phagocytosis by leucocytes in vivo and in vitro." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 70(4): 344-5.
- Singer, L. M., L. B. Mirel, F. O. Ter Kuile, O. H. Branch, J. M. Vulule, M. S. Kolczak, W. A. Hawley, S. K. Kariuki, D. C. Kaslow, D. E. Lanar and A. A. Lal (2003). "The Effects of Varying Exposure to Malaria Transmission on Development of Antimalarial Antibody Responses in Preschool Children. XVI. Asembo Bay Cohort Project." *J Inf Dis* 187: 1756-64.
- Sissoko, M. S., Dicko, A., Briet, O. J., Sissoko, M., Sagara, I., Keita, H. D., Sogoba, M., Rogier, C., Toure, Y. T. and Doumbo, O. K.; 2004. Malaria incidence in relation to rice cultivation in the irrigated Sahel of Mali. *Acta Trop* 89, 161-170.
- Smalley, M. E., S. Abdalla and J. Brown (1981). "The distribution of *Plasmodium falciparum* in the peripheral blood and bone marrow of Gambian children." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 75(1): 103-5.
- Snow, RW, CS Molyneux, PA Warn, J Omumbo, CG Nevill, S Gupta, K Marsh, (1996). Infant parasite rates and immunoglobulin M seroprevalence as a measure of exposure to *Plasmodium falciparum* during a randomized controlled trial of insecticide-treated bed nets on the Kenyan coast. *Am J Trop Med Hyg.* 55: 144-149.
- Snow, R. W., J. A. Omumbo, B. Lowe, C. S. Molyneux, J. O. Obiero, A. Palmer, M. W. Weber, M. Pinder, B. Nahlen, C. Obonyo, C. Newbold, S. Gupta and K. Marsh (1997). "Relation between severe malaria morbidity in children and level of *Plasmodium falciparum* transmission in Africa." *Lancet* 349: 1650-1654.
- Soe, S., M. Theisen, C. Roussilhon, K. S. Aye and P. Druilhe (2004). "Association between protection against clinical malaria and antibodies to merozoite surface antigens in an area of hyperendemicity in Myanmar: complementarity between responses to merozoite surface protein 3 and the 220-kilodalton glutamate-rich protein." *Infect Immun* 72(1): 247-52.
- Solomon, J. B., M. G. Forbes and G. R. Solomon (1985). "A possible role for natural killer cells in providing protection against *Plasmodium berghei* in early stages of infection." *Immunol Lett* 9(6): 349-52.
- Tanner, M. and P. L. Alonso (1996). "The development of malaria vaccines: SPf66--what next?" *Schweiz Med Wochenschr* 126(27-28): 1210-5.
- Taramelli, D., D. Monti, N. Basilico, S. Parapini, F. Omodeo-Sale and P. Olliaro (1999). "A

- fine balance between oxidised and reduced haem controls the survival of intraerythrocytic plasmodia." *Parassitologia* 41(1-3): 205-8.
- Targett, G. (1990). "Immunity to sexual stages of human malaria parasites: immune modulation during natural infections, antigenic determinants, and the induction of transmission-blocking immunity." *Scand J Infect Dis Suppl* 76: 79-88.
- Targett, G. A. (1988). "*Plasmodium falciparum*: natural and experimental transmission-blocking immunity." *Immunol Lett* 19(3): 235-40.
- Targett, G. A., P. G. Harte, S. Eida, N. C. Rogers and C. S. Ong (1990). "*Plasmodium falciparum* sexual stage antigens: immunogenicity and cell-mediated responses." *Immunol Lett* 25(1-3): 77-81.
- Taylor-Robinson, A. W. (1995). "Regulation of immunity to malaria: valuable lessons learned from murine models." *Parasitol Today* 11(9): 334-42.
- Templeton, T. J., D. C. Kaslow and D. A. Fidock (2000). "Developmental arrest of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* within the mosquito midgut via CTRP gene disruption." *Mol Microbiol* 36(1): 1-9.
- Toure, Y. T., Doumbo, O., Toure, A., Bagayoko, M., Diallo, M., Dolo, A., Vernick, K. D., Keister, D. B., Muratova, O. and Kaslow, D. C. (1998) Gametocyte infectivity by direct mosquito feeds in an area of seasonal malaria transmission: implications for bancoumana, Mali as a transmission-blocking vaccine site. *Am J Trop Med Hyg* 59: 481-486.
- Trape, J. F. (1985) Rapid evaluation of malaria parasite density and standardization of thicksmear examination for epidemiological investigations. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 79: 181-184.
- Tsuji, M., Y. Miyahira, R. S. Nussenzweig, M. Aguet, M. Reichel and F. Zavala (1995). "Development of antimalaria immunity in mice lacking IFN-gamma receptor." *J Immunol* 154(10): 5338-44.
- van der Heyde, H. C., M. M. Elloso, W. L. Chang, M. Kaplan, D. D. Manning and W. P. Weidanz (1995). "Gamma delta T cells function in cell-mediated immunity to acute blood-stage *Plasmodium chabaudi adami* malaria." *J Immunol* 154(8): 3985-90.
- van der Kolk M, Tebo AE, Nimpaye H, Ndongbol DN, Sauerwein RW & Eling WM (2003) Transmission of *Plasmodium falciparum* in urban Yaounde, Cameroon, is seasonal and age-dependent. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97, 375-9.
- van Dijk, M. R., C. J. Janse, J. Thompson, A. P. Waters, J. A. Braks, H. J. Dodemont, H. G. Stunnenberg, G. J. van Gemert, R. W. Sauerwein and W. Eling (2001). "A central role for P48/45 in malaria parasite male gamete fertility." *Cell* 104(1): 153-64.
- Vermeulen, A. N., J. van Deursen, R. H. Brakenhoff, T. H. Lensen, T. Ponnudurai and J. H.

- Meuwissen (1986). "Characterization of *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens and their biosynthesis in synchronised gametocyte cultures." *Mol Biochem Parasitol* 20(2): 155-63.
- Vermeulen, A. N., W. F. Roeffen, J. B. Henderik, T. Ponnudurai, P. J. Beckers and J. H. Meuwissen (1985). "*Plasmodium falciparum* transmission blocking monoclonal antibodies recognize monovalently expressed epitopes." *Dev Biol Stand* 62: 91-7.
- Vinetz, J. M., J. G. Valenzuela, C. A. Specht, L. Aravind, R. C. Langer, J. M. Ribeiro and D. C. Kaslow (2000). "Chitinases of the avian malaria parasite *Plasmodium gallinaceum*, a class of enzymes necessary for parasite invasion of the mosquito midgut." *J Biol Chem* 275(14): 10331-41.
- Voller, A. and R. S. Bray (1962). "Fluorescent antibody staining as a measure of malarial antibody." *Proc Soc Exp Biol Med* 110: 907-10.
- Wahlin, B., M. Wahlgren, H. Perlmann, K. Berzins, A. Bjorkman, M. E. Patarroyo and P. Perlmann (1984). "Human antibodies to a Mr 155,000 *Plasmodium falciparum* antigen efficiently inhibit merozoite invasion." *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(24): 7912-6.
- Wang, R., Y. Charoenvit, G. Corradin, P. De La Vega, E. D. Franke and S. L. Hoffman (1996). "Protection against malaria by *Plasmodium yoelii* sporozoite surface protein 2 linear peptide induction of CD4+ T cell- and IFN-gamma-dependent elimination of infected hepatocytes." *J Immunol* 157(9): 4061-7.
- Weiss, W. R., M. Sedegah, R. L. Beaudoin, L. H. Miller and M. F. Good (1988). "CD8+ T cells (cytotoxic/suppressors) are required for protection in mice immunized with malaria sporozoites." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(2): 573-6.
- WHO (1996). "World malaria situation in 1993." Part1. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 71: 17-22.
- Williamson, K. C., Keister, D. B., Muratova, O. and Kaslow, D. C. (1995). "Recombinant Pfs230, a *Plasmodium falciparum* gametocyte protein, induces antisera that reduce the infectivity of *Plasmodium falciparum* to mosquitoes." *Mol Biochem Parasitol* 75(1): 33-42.
- Wizel, B. and N. Kumar (1991). "Identification of a continuous and cross-reacting epitope for *Plasmodium falciparum* transmission-blocking immunity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(21): 9533-7.

ANNEXES

Annexes

I. Conférence/Société Neerlandaise et Belge de Parasitologie, 10 Juin 2004, Anvers, Belgique

P. FALCIPARUM ASEXUAL AND SEXUAL STAGE IMMUNITY IN AREAS WITH DIFFERENT ENDEMICITIES IN BURKINA FASO

André Lin Ouédraogo, Will Roeffen, Sake J. de Vlas, Issa Nebié, Edith Sanogo, Karina Teelen, Marga van de Vegte-Bolmer, Mike Van Der kolk, Aboubacar S. Ouattara, Jan Peter Verhave, Nadine Cuzin Ouattara and Robert Sauerwein



Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme, Ouagadougou, Burkina Faso
andrelincnrfp@hotmail.com
Université de Ouagadougou



The Nijmegen Center of Molecular Life Sciences, The Netherlands



ABSTRACT

Effective human immunity against malaria involves the acquisition of antibodies against pre-erythrocytic and asexual blood stages of *Plasmodium* to prevent the liver invasion by sporozoites and to reduce asexual parasitaemia, respectively. It could moreover involve sexual stage antibodies to prevent the transmission of the disease. Antibodies against Pfs48/45 (a protein on the surface of gametocytes, gametes and zygotes) can prevent oocyst development in the mosquito midgut. Seroreactivities to Pfs48/45 and to GLURP were evaluated in areas with different endemicities to better understand the seroepidemiology of sexual stage immunity for transmission blocking vaccine promoting.

OBJECTIVES

To understand the relationship between *Plasmodium falciparum* sexual and asexual stage antibodies according to age and level of malaria transmission

RESULTS

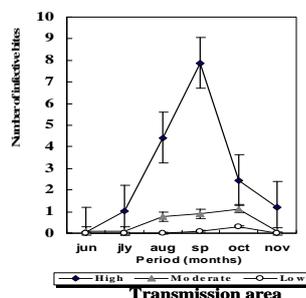
Figure 1: Differences in entomological inoculation rate (EIR) and seroreactivity to *P. falciparum* pre-erythrocytic stage

(A) The number of infective bites differed at least 10 fold between areas.
(B) There was a trend towards a higher percentage of children under 5 years reacting to the pre-erythrocytic stage antigen (PfCS) in the high transmission area compared to low OR=7,5; IC95% (0,56-393,2); $p=0,09$. In the low transmission area, this reactivity was age related (R=0,14; IC95% (0-1,26); $p<0,04$)

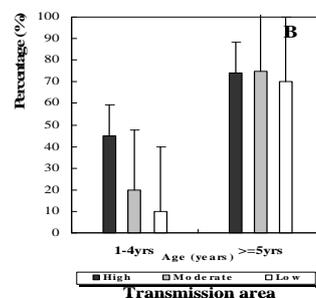
Figure 2: Seroreactivity to asexual (GLURP) and sexual stage antigen (Pfs48/45) in areas with different transmission levels

(A) The seroreactivity to GLURP was significantly higher in children under 5 years living in the high transmission area versus the low transmission area (OR=10,8; IC95% (0,81-550,48); $p<0,05$) and was age related in the low transmission area (OR=0,16; IC% (0-1,13), $p<0,05$).
(B) The seroreactivity to Pfs48/45 in the high transmission area was significantly higher in children under 5 years compared to older subjects (OR=7,43; IC95% (0,97-59,27); $p<0,02$)

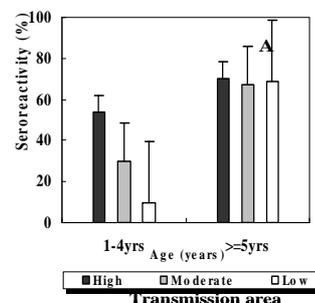
Entomologic Inoculation Rate



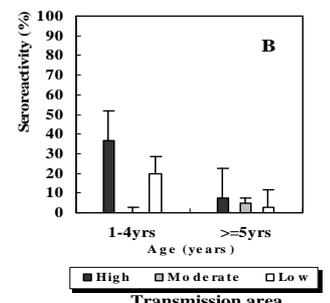
Seroreactivity to sporozoites



Seroreactivity to GLURP



Seroreactivity to Pfs48/45



Antibody reactivity to sporozoites is age related in low transmission area

Humoral response to asexual and sexual stage asynchronously developed with age

METHODS

Study population: N=149; Villagers living in high (n=50), moderate (n=50) and low (n=49) transmission areas in the vicinity of Ouagadougou (capital of Burkina Faso; west africa)

Age groups: **1-4years** (High; n=11; mean age $2,8 \pm 1$) (Moderate; n=10; mean age $3,5 \pm 1$); (Low; n=10; mean age $3,3 \pm 1,2$); **>=5years** (High; n=39; mean age $19,8 \pm 14$) (Moderate; n=40; mean age $19,9 \pm 14$); (Low; n=39; mean age $20,2 \pm 17$)

Entomological data collection: CDC light traps were used

Sera collection: Sera were collected during a cross sectional survey at the peak of transmission (september 2002) for serological assays (ELISA)

Antibodies detected by ELISA: Anti PfCS(282-383) IgG (Pattern in the pre-erythrocytic stage immunity); Anti PfGLURP(LR67, 85-213) IgG (pattern in asexual stage antigen immunity) Anti Pfs48/45 IgG (pattern in sexual stage immunity): Anti-Pfs48/45 rat mAb 85RF45.3 [1] was used to capture Pfs48/45 from gametocyte extract (NF54 strain: described by Ponnudurai et al. [2]).

Data analysis: Data were double entered using EpiInfo 6.0 and the Fisher exact test was used to compare antibodies frequency

CONCLUSIONS

- Asexual stage immunity is transmission level and age related
- Sexual stage immunity does not significantly correlate with the transmission level
- Sexual stage immunity is significantly higher in children under 5 years

References

- 1) Roeffen et al. (2001) Experimental Parasitology. 97:45-49
- 2) Ponnudurai et al. (1982) Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg. 76:812-818

II. Gordon Conference, 21-26 Août 2005, Oxford, Royaume Uni

The age-related pattern of infectiousness with *P. falciparum* assessed by membrane feeding assays: association with sexual stage-specific antibodies

André Lin Ouédraogo^{1,2,3*}, Edith Sanogo¹, Will Roeffen², Petra Schneider², Jan Peter Verhave², Aboubacar S. Ouattara³, Issa Nebié¹, Nadine Cuzin-Ouattara¹ and Robert Sauerwein²



¹Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme, Ouagadougou, Burkina Faso
*a.ouedraogo@mmb.umcn.nl

³Université de Ouagadougou

UMC St Radboud
²The Nijmegen Center of Molecular Life Sciences, The Netherlands



INTRODUCTION

Transmission of *P. falciparum* requires the presence of infectious gametocytes in the human host. Pfs48/45 and Pfs230 are antigens on the surface of gametocytes/gametes of the parasite and are involved in the fertilisation process in the mosquito midgut. Experimental studies have demonstrated the capacity of monoclonal and natural anti-Pfs48/45 and anti-Pfs230 antibodies to block parasite development in mosquitoes. However, the ability of such antibodies to reduce transmission under natural conditions is less well explored. Defining these parameters in endemic areas is important for the development of transmission reducing strategies. Experimental infection of local reared *A. gambiae* was carried out in Burkina Faso to appreciate the association of naturally acquired antibodies in transmission blocking. The QT-NASBA technique was used for gametocyte detection to complement microscopy and improve interpretation of the results.

OBJECTIVES

To understand the relationship between naturally acquired *P. falciparum* sexual stage antibodies and parasite transmission from man to mosquitoes

METHODS

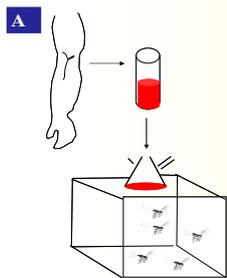
Study area and population: 80 children aged 3-13 years living in malaria transmission villages around Ouagadougou (capital city of Burkina Faso; West Africa) were included in the study. Blood slides, RNA-NASBA samples (Boom et al., 1990) and sera were collected from venous blood.

DMFA (A) Blood drawn into heparinized tubes was offered to starved local reared *A. gambiae* through a parafilm membrane in water-jacketed (37°C) glass feeders. 7-8 days later, stomachs of fed mosquitoes were stained with mercurochrome for microscopical oocysts detection.

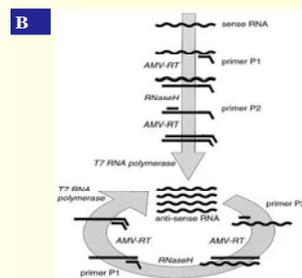
Antibodies detection: Anti-Pfs48/45 IgG rat mAbs 85RF45.3 [1] and Pfs230 IgG mouse mAbs 63F2A2 [2] were used to capture Pfs48/45 and Pfs230 antigens from gametocyte extract (NF54 strain, Ponnudurai et al. [2]) in capture ELISA.

QT-NASBA (B): The quantitative nucleic acid sequence-based amplification is a technique based on RNA detection of *P. falciparum* parasites (Pfs25 mRNA for mature gametocyte, 18S rRNA for asexual blood stage)

Data Analysis: Data were analysed using SPSS 12.0.1



Direct Membrane Feeding Assay



Principle of QT-NASBA technique

CONCLUSION

- o *P. falciparum* gametocyte infectiousness increases with age
- o The QT-NASBA technique better quantifies gametocyte counts and improves interpretation of infection assays
- o Some natural human antibodies against sexual stage antigens are associated with *P. falciparum* gametocyte infectiousness in malaria transmission areas of Burkina Faso

References

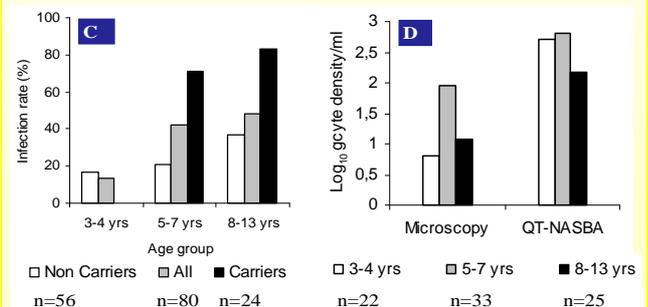
- 1) Roeffen et al. (2001) *Experimental Parasitology*, 97:45-49
- 2) Roeffen et al. (1995) *Experimental Parasitology*, 80:15-26
- 3) Ponnudurai et al. (1982) *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 76:812-818
- 4) Boom et al. (1990) *J. Clin. Microbiol.* 28:495-503

Research funded by WOTRO and STW NFA6009

RESULTS

(C) The age-related infectiousness with *P. falciparum* gametocyte (microscopy) in mosquito feeders. The anopheline infection rate increased with age in the whole group (OR=2.16; 95%IC, 1.13-4.20; p<0.02), but also in those found either to be gametocyte carriers by microscopy (odds ratio: OR=9.0; 95%IC, 1.10-73.46; p=0.04), or not (OR=1.75; 95%IC, 0.8-3.83; ns).

(D) Gametocyte density measured by microscopy and QT-NASBA in mosquito feeders. Gametocyte density is higher in younger children. The NASBA technique gave estimates of gametocyte density 3 fold higher than microscopy and revealed the presence of gametocytes in infectious samples considered negative by microscopy.

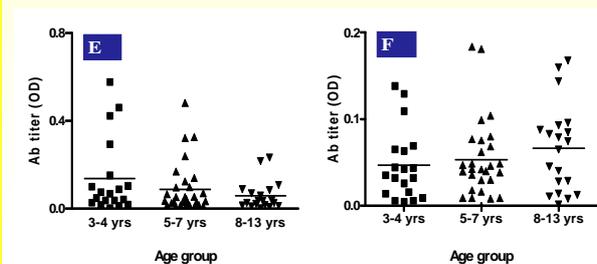


(E) Pfs230 antibody levels in mosquito feeders

Pfs230-specific antibodies levels showed an inverse association with age ($\beta = -0.035$, $se(\beta) = 0.019$; $p = 0.06$)

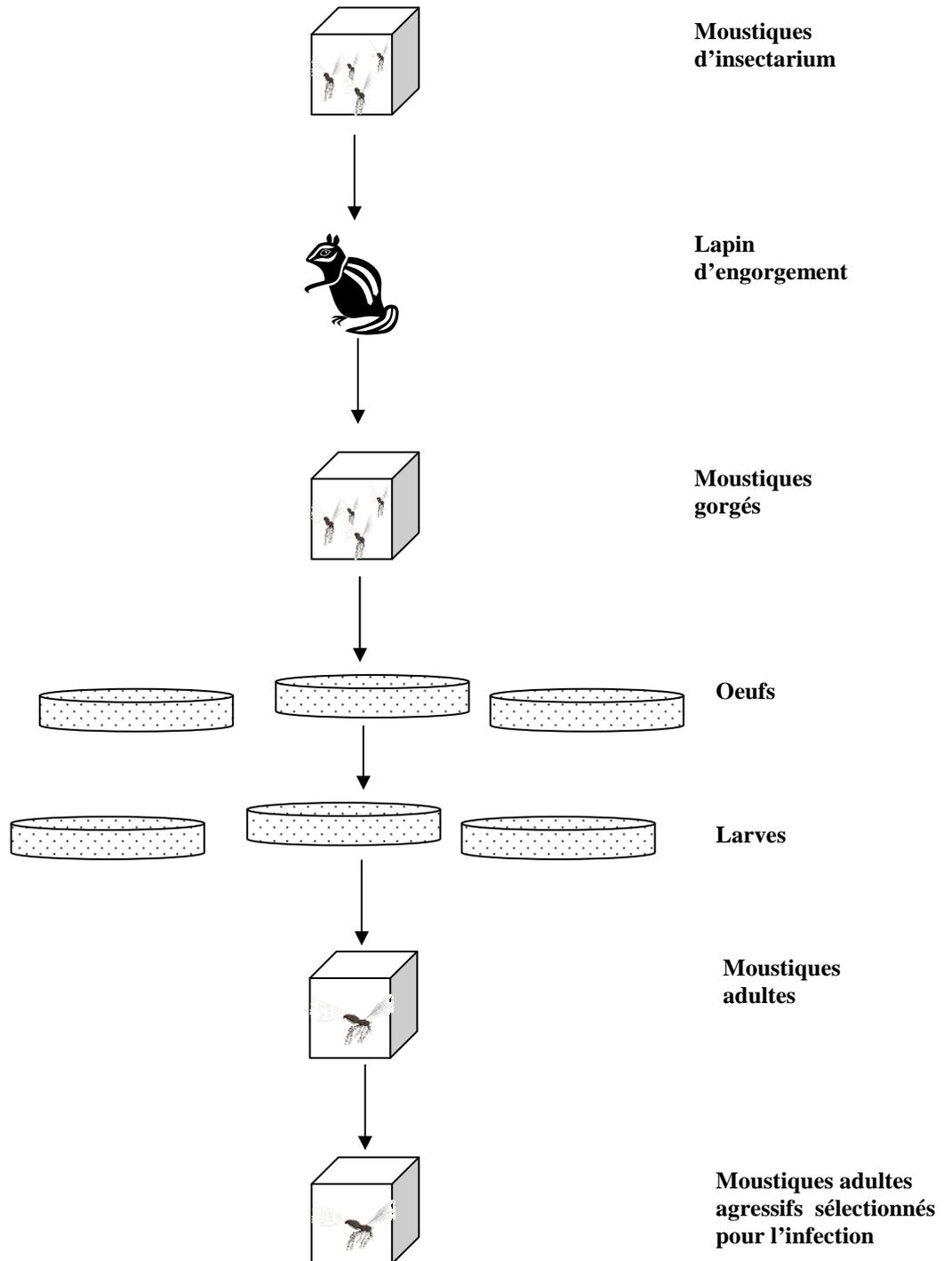
(F) Pfs48/45 antibody levels in mosquito feeders

Pfs48/45-specific antibodies levels showed no specific association with age ($\beta = 0.011$, $se(\beta) = 0.007$; $p = 0.12$). Most of non infectious feeders were positive either to Pfs230 or to Pfs48/45

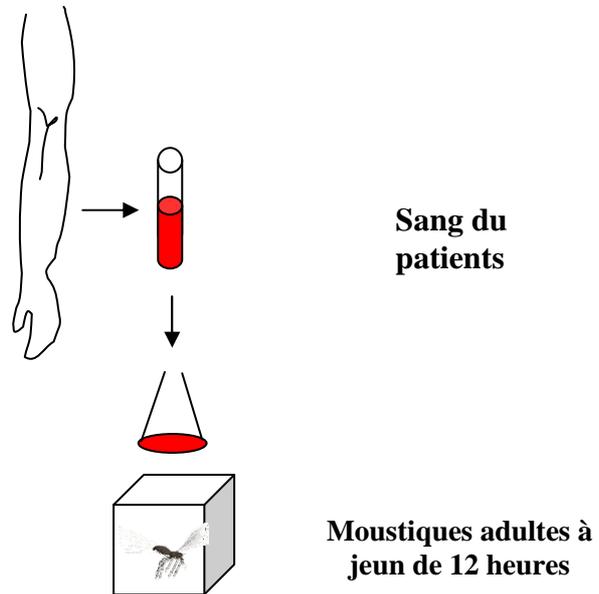


III. Procédure de mise en route de l'infection expérimentale

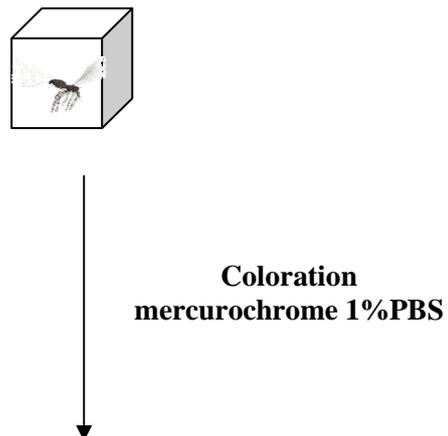
1) Elevage des moustiques



2) Infection expérimentale



3) Dissection et recherche d'oocystes 7-8 jours après



Dissection, recherche et dénombrement des oocystes au microscope optique objectif X40

IV. Protocole technique pour la détection par ELISA des sporozoïtes de *P. falciparum* chez le moustique

Mettre un thorax de moustique dans un puit d'une plaque rigide à fond rond (GREINER 96 puits) bloquée au paravent avec un tampon bloquant (PBS azide+1% de lait écrémé) pour débarrasser celle-ci de toute impureté qui pourrait jouer sur les résultats de la manip. On placera dans les quatre derniers puits de la dernière 4 moustiques mâles comme contrôle négatif et laisser les puits suivants vides. Ajouter 50µl / puit de tampon de dilution BB-NP40 ; couvrir la plaque et laisser les moustiques s'imprégner du tampon pendant 15mn puis stocker au congélateur jusqu'à utilisation.

Premier jour

Dans les plaques maxisorps (NUNC 96 puits), mettre 50µl d'ac. 2A10 /puit et laisser une nuit à t° ambiante .Cette étape est communément appelée Coating c'est à dire la fixation de l'ac monoclonal sur les parois du plastique.

Chaque moustique est testé en double ; Ceci permettra de mieux apprécier les résultats.

Deuxième jour

Sortir les plaques contenant les suspensions de thorax du congélateur ; les écraser à l'aide de pipettes Pasteur et y ajouter 200µl de Blocking Buffer (BB) /puit.

Vider les puits des plaques maxisorps et y déposer 200µl de BB pour saturer les sites de fixation.

Incuber 1h à t° ambiante.

Aspirer le contenu des plaques maxisorps et transférer dans chaque puit 50µl de suspension de broyat de thorax homogénéisée. Dans les 2 puits suivant les 4 témoins, déposer 50µl de témoin positif ; les 2 derniers puits serviront de blanc.

Incuber 2h à t° ambiante.

Aspirer et laver 6 fois avec du Washing Buffer (WB) ; mettre 50µl / puit d'anticorps 2A10 marqué à la peroxydase

Incuber 1h à t° ambiante

Aspirer et laver 3 fois avec du WB

Mettre 100µl de substrat(OPD+ peroxyde d'urée + citrate de sodium)

Incuber pendant 25-30mn à l'obscurité

Stopper la réaction de coloration avec 25µl/puit d'acide sulfurique dilué à moitié avec de l'eau distillée.

Essuyer le dessous des plaques et lire l'absorbance à 492nm avec un spectrophotomètre.

Evaluation des résultats

Le seuil de positivité est fixé à une densité optique (DO) supérieure ou égale à 0,1. Ainsi donc tous les puits ayant une $DO \geq 0,1$ correspondent à des moustiques infectés

V. Procédure d'extraction des antigènes de gamétocytes pour la détection d'anticorps contre Pfs48/45 et Pfs230

Materiel

- Tubes contenant $30 \cdot 10^6$ gamétocytes (freezer V2 drawer 5)
- 1% DOC (Sodium deoxycholate)
- 100 mM PMSF dans 1-propanol (Phenylmethylsulfonylfluoride, inhibiteur de protéase)

Méthode

- Ajouter 100 μ l de DOC et 1 μ l de PMSF au tube de gamétocytes
 - Resuspendre
 - Incuber 15 minutes à température ambiante
 - Centrifuger 2 minutes à 13000 rpm
 - Transférer le surnageant dans un tube de 15 ml et ajouter 900 μ l de PBS
 - Diluer l'extrait de gamétocytes avant d'utiliser.
 - Le reste de la dilution peut être stocker à -20°C pour utilisation ultérieure.
- Stockage à durée limitée (1 ou 2 semaines).

VI. Procédure d'extraction des acides nucléiques dans la technique QT-NASBA

1- Préparation des solutions

Tampon L2: (= 0.1M Tris-HCl, pH 6.4)

- Dissoudre 12.1g de Tris dans 800 ml d'H₂O distillée
- Ajouter 8.1ml de HCl à 37%
- Compléter le volume à 1 litre avec H₂O distillée

Solution de lavage L2

- Dissoudre 120g de GuSCN dans 100 ml de tampon L2,
- Secouer légèrement dans un bain marie de 60°C.

0.2M EDTA pH8:

- Dissoudre 37.2g EDTA et 4.4g de NaOH dans 500 ml d'H₂O distillée

Tampon de lyse L6 (200ml): (garder à l'ombre)

- 100 ml de solution de lavage L2
- Ajouter 22 ml 0.2M EDTA pH8
- Ajouter 2.6g (=ml) Triton-X-100
- Homogénéiser

Silica:

- Utiliser une colonne d'eau de 5 cm de diamètre et 27.5cm de hauteur
- Suspendre 60 g de dioxyde de silice dans 500 ml d'H₂O
- Sédimer pendant 24 hrs à 1g à température ambiante
- Jeter 430 ml du surnageant
- Ajouter 500 ml d'H₂O et résuspendre (en secouant)
- Sédimer pendant 5 hrs à 1g à température ambiante
- Jeter 440 ml du surnageant
- Ajouter 600 µl HCl 32% et résuspendre (vortexer)
- Distribuer en petites aliquotes (dans de petites bouteilles)
- Autoclaver 20 min, 121°C in tightly closed bottles

2- Echantillonnage

Méthode au SiO₂ et au guanidinium thiocyanate

- Ajouter 100 µl de sang frais à 900µl de tampon L6,
- Bien mélanger,
- Ajouter 30 µl de silica (dioxyde de silice),
- Vortexer
- Centrifuger 10 min à 150rpm (ou 5 min à 300rpm)
- Vortexer 5 sec
- Centrifuge 15 sec à 12000g
- Jeter le surnageant et garder le silica
- Stocker à -20°C

Remarque : Cette méthode d'échantillonnage est beaucoup plus compliquée et sa fiabilité n'a pas encore été testée.