

BURKINA FASO
UNITE-PROGRES-JUSTICE

MINISTERE DES ENSEIGNEMENTS SECONDAIRE ET
SUPERIEUR

UNIVERSITE POLYTECHNIQUE DE BOBO-DIOULASSO

INSTITUT DU DEVELOPPEMENT RURAL



Année universitaire 2011-2012

Mémoire N°

**THEME : Evaluation du réservoir infectieux du paludisme
chez l'enfant de 2 à 10 ans dans la province du Kourwéogo
(Burkina Faso) : étude comparative entre la microscopie
et la technique ELISA dans la détection de l'infection chez
*Anopheles gambiae***

MEMOIRE

Présenté et soutenue publiquement le 10/12/2012 par :

THIOMBIANO Fatimata

En vue de l'obtention du

Diplôme D'études Approfondies (DEA)
en Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques

Devant le jury composé de :

Président Pr Georges Anicet OUEDRAOGO

Co directeur Dr André Lin OUEDRAOGO

Membre Dr Juliette TRANCHOT-DIALLO

Dédicaces

Je dédie ce travail à mes très chères parents THIOMBIANO Sikaria et THIOMBIANO Adama qui n'ont cessé et continue de me soutenir. Puisse DIEU vous accorder une longue vie et vous bénir constamment

A ma grande sœur THIOMBIANO Lizèta pour tous ses conseils et sa disponibilité

A mon grand frère THIOMBIANO Bassirou pour ses encouragements et ses conseils multiformes.

A mes petits frères et sœurs pour leurs soutiens et leurs motivations constantes.

A tous ces frères et sœurs de l'Association des Elèves et Etudiants Musulmans au Burkina(AEEMB), que DIEU vous soutienne constamment.

A mes amis du Centre Culturel Islamique du Burkina (CCIB) pour tout le soutien dont ils ont faits montre

A tous les enfants qui ont participé à cette étude,

Remerciements

*A l'issue de ce travail nous rendons Louanges à ALLAH,
l'OMNISCIENT qui nous a facilité ce travail.*

Nos sincères remerciements vont en l'endroit.

*Au Pr Georges Anicet OUEDRAOGO responsable du DEA de Biologie
Appliquée et de Modélisation des Systèmes Biologiques.*

*Au Pr Yves TRAORE, Maître de Conférence en Immunologie à
l'Université de Ouagadougou pour nous avoir encadré et dirigé notre
travail.*

*Au Dr André Lin OUEDRAOGO Immunologiste épidémiologiste au
CNRFP pour avoir co dirigé ce mémoire.*

*Au Dr Juliette TRANCHOT- DIALLO pour avoir accepté juger notre
travail, nous vous en sommes reconnaissants.*

*Au Dr Sodiomon B. SIRIMA Médecin-épidémiologiste,
Administrateur Délégué du Centre National de Recherche et de
Formation sur le Paludisme(CNRFP) pour nous avoir acceptés dans
son centre de recherche.*

*Au Dr Amadou T. KONATE Médecin, Coordonnateur à la Recherche
et à la Formation au Centre National de Recherche et de Formation
sur le Paludisme (CNRFP) pour son soutien, et ses conseils.*

*Au Dr ISSA NEBIE Biologiste, responsable du laboratoire d'Immuno-
Parasitologie du CNRFP pour tous ses conseils et sa disponibilité*

*Au Pr Aboubacar S. OULATTARA, Professeur titulaire en
Microbiologie de l'Environnement à l'Université de Ouagadougou pour
ses conseils et son soutien.*

Au Dr Souleymane SANOÛ pour sa disponibilité.

A Mr DIARRA pour son encadrement et ses conseils

A SANOÛ S. Guillaume pour sa présence et ses conseils

A Cherif Mariama pour son soutien et sa disponibilité

A Mr VALIAN Elie, Mr OUEDRAOGO Pierre, Mr ZONGO Pascal, Mr DRAME Drissa, Mr NABOLE Mady, Mr TRAORE Mamoudou, Mr YAMEOGO Albert, Mr TIENDREBEOGO Daniel, TARAMA Casimir, TAPSOBA Michel, TAPSOBA Désiré pour leurs collaborations, leurs conseils et leurs encadrements.

A nos aînés OUEDRAOGO Mireille, TRAORE Safiatou, BENGDE Bruno, DEMBELE Barbara

A nos promotionnaires de classe pour leur collaboration

A la famille TIENDREBEOGO pour son accueil, son attention et ses conseils.

A mes amis TAPSOBA Zeynab , COMPAORE Inoussa, ILBOUDO Souleymane, SIMPORE Youssouf , KASSAH Haoua , TRAORE Irène, TIENDREBEOGO Simao, TIENDREBEOGO Ibrahim , Nikiema Safi, YAMEOGO Aroun , aux membres du bureau ATEMB CG/UO mandat 2008-2009 pour leur soutien ,conseils et disponibilité.

A imam ILBOUDO Khalid, imam TIEGO TIEMTORE, pour le rappel constant sur l'importance de la science et leurs conseils.

A tous ces parents et enfants qui ont consenti donner leur sang pour notre étude, nous vous sommes reconnaissants.

Liste des abréviations

An	: Anopheles
CNRFP	: Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme
DDT	: Dichloro-Diphényl-Trichloréthane).
DGISS	: Direction Générale de l'Information et des Statistiques Sanitaires
DMFA	: Direct Membrane Feeding Assay
ELISA	: Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
Gf	: Gaméocyte de <i>Plasmodium falciparum</i>
MI	: Moustique Infecté
MILDA	: Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide à Longue Durée d'Action
NK	: Natural Killer
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
<i>P.falciparum</i>	: <i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P.malariae</i>	: <i>Plasmodium malariae</i>
<i>P.ovale</i>	: <i>Plasmodium ovale</i>
<i>P.vivax</i>	: <i>Plasmodium vivax</i>
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PCR	: Polymerase Chain Reaction
SMFA	: Standard Membrane Feeding Assay
Tf	: Trophozoïte de <i>Plasmodium falciparum</i>
TPI	: Traitement Préventif Intermittent

Sommaire

Dédicaces.....	ii
Remerciements.....	iv
Liste des abréviations.....	vii
Liste des tableaux.....	x
Listes des figures.....	xi
Résumé.....	xii
Introduction	1
I. Revue bibliographique.....	5
I.1. L'agent pathogène.....	6
I.2. Les vecteurs.....	7
I.3. Biologie du parasite.....	7
I.3.1. Cycle asexué.....	7
I.3.2. Cycle sexué.....	9
I.4. Cycle du vecteur	11
I.5. Les faciès épidémiologiques du paludisme au Burkina Faso.....	12
I.6. Contrôle du paludisme.....	12
I.6.1. Prise en charge en cas de paludisme.....	12
I.6.2. Chimio prophylaxie.....	13
I.6.3. Lutte anti vectorielle	13
I.6.4. La vaccination anti palustre.....	14
I.6.5. La réponse immunitaire anti palustre.....	14
I.7. Les outils d'évaluation de l'efficacité des interventions visant à réduire la transmission du paludisme de l'homme au moustique vecteur	15
I.7.1. Le xénodiagnostic.....	16
I.7.2. L'infection artificielle.....	16
II. Méthodologie.....	18
II.1. Site d'étude.....	19
II.2. La population d'étude.....	20
II.3. Considérations éthiques.....	20
II.4. Collecte des échantillons	21
II.5. Analyses des données au laboratoire.....	21

II.5.1. Détermination de la densité parasitaire.....	21
II.5.2. Réalisation des infections expérimentales.	22
II.5.3. Détection des moustiques infectés par la technique de la dissection à l'issue des infections expérimentales.....	23
II.5.4. Détection des moustiques infectés par la technique ELISA	24
II.6. Gestion et analyse des données.....	26
III. Résultats.....	27
III.1. Caractéristiques démographiques et palustres de la population d'étude.....	28
III.2. Le réservoir infectieux humain déterminé par la dissection de moustique après l'infection expérimentale.....	30
III.3. Variabilité intra-test de la technique de dissection dans la détection de moustiques infectés après l'infection expérimentale.....	32
III.4. Le réservoir infectieux déterminé par l'ELISA du moustique après l'infection expérimentale	33
III.5. Analyse comparative entre la technique de la dissection et l'ELISA dans l'évaluation du réservoir infectieux.....	35
IV. Discussion.....	38
IV.1. Le réservoir infectieux du paludisme chez l'enfant de 2 à 10 ans	39
IV.2. Etude comparative entre la Microscopie et l'ELISA dans l'évaluation du réservoir infectieux	41
Conclusion	43
Perspectives.....	46
Bibliographie.....	47
Annexes.....	54

Liste des tableaux

Tableau I : Indices démographiques et paludométriques de la population d'étude.....	29
Tableau II : Pourcentage des enfants infectieux en fonction de l'âge et de la densité de gamétocytes.....	30
Tableau III : Pourcentage d'enfants infectieux en fonction du temps d'incubation des moustiques après l'infection expérimentale.....	33
Tableau IV : Caractéristiques du réservoir infectieux en fonction de l'âge et de la technique utilisée.....	35
Tableau V : Evaluation du taux d'infection anophélienne au cours d'infection expérimentale de moustiques en fonction de la technique détection.....	36

Liste des figures

<u>Figure 1</u> : Cycle biologique du <i>Plasmodium</i>	10
<u>Figure 2</u> : Cycle de vie du moustique	11
<u>Figure 3</u> : Dispositif pour l'infection expérimentale.....	17
<u>Figure 4</u> : Carte de la zone d'étude.....	19
<u>Figure 5</u> : Moustiques prenant leurs repas sanguin à travers une membrane artificielle.....	23
<u>Figure 6</u> : Les différentes étapes de l'ELISA CSP.....	25
<u>Figure 7</u> : Relation entre densité gamétocytaire et infectivité dans les infections expérimentales de <i>An. gambiae</i> avec <i>P. falciparum</i>	31
<u>Figure 8</u> : Variabilité dans la détection de moustiques infectés par la technique de dissection.....	32
<u>Figure 9</u> : Variabilité du taux d'infection anophelienne en fonction du temps d'incubation depuis la prise du repas sanguin	34

Résumé

Le paludisme est un problème de santé publique. Chaque année il cause des milliers de décès surtout chez les femmes enceintes et les enfants de moins de 5 ans. Plusieurs décennies après l'apparition de la maladie et malgré les efforts consentis dans la recherche anti paludisme l'humanité continue de payer un lourd tribut. La lutte passe certes par la maîtrise des cas cliniques de la maladie mais aussi par une maîtrise du réservoir de transmission du *Plasmodium* de l'homme au vecteur moustique. Notre étude a pour objectif général d'évaluer le réservoir infectieux des enfants de 2 à 10 ans.

Pour atteindre nos objectifs, des lames de gouttes épaisses et de frottis sanguin de 225 enfants de Laye ont été confectionnés au cours d'une enquête transversale afin d'évaluer la prévalence du parasite. Un total de 50 enfants d'entre eux, porteurs de gamétocytes ont donné leur sang pour la réalisation de l'infection expérimentale de moustique (Direct Membrane Feeding Assay). Le sang de chaque sujet était soumis à 4 lots de 400 moustiques de la même génération repartis dans des gobelets de 100.

La confection des lames de gouttes épaisses et de frottis nous a renseignés sur la prévalence du *Plasmodium* en fonction de l'âge. En effet, la prévalence des porteurs de trophozoïtes (formes asexuées du plasmodium) était plus élevée chez les enfants de 5 à 10 ans que chez les enfants de 2 à 5 ans. La prévalence des porteurs de gamétocytes par contre était plus importante chez les enfants de 2 à 5 ans. Cependant dans toutes les tranches d'âge, la prévalence des porteurs de trophozoïtes était plus élevée que la prévalence des porteurs de gamétocytes. La densité parasitaire a aussi évolué en fonction de l'âge. Les fortes parasitémiées aussi bien pour les trophozoïtes que pour les gamétocytes étaient observées chez les sujets âgés de 2 à 5 ans.

La dissection réalisée au 7^{ème} de l'infection expérimentale donne un pourcentage d'enfants infectieux pour les moustiques de 66% ; les enfants de 2 à 5 ans infectant plus les moustiques que ceux qui avaient plus de 5 ans.

Entre les 3 lots de moustiques disséqués au 7^{ème} jour il n'y a pas eu de variation significative dans la proportion de moustiques infectés. Par conséquent le DMFA peut être un outil d'évaluation des stratégies visant à réduire la transmission homme vecteur (moustique).

Quant au test ELISA il donne un pourcentage de sujets infectieux et de moustiques infectés augmentant avec la durée d'incubation des moustiques.

La comparaison entre le pourcentage des sujets infectieux ainsi que le pourcentage de moustiques infectés détectés à la dissection et au test ELISA montre des pourcentages plus importants à l'ELISA. L'ELISA serait donc un bon moyen pour évaluer les résultats d'une infection expérimentale et l'idéal serait d'attendre au 14^{ème} du repas sanguin avant de conditionner les moustiques pour l'effectuer.

Mots clés : Paludisme, réservoir infectieux, DMFA, Dissection, ELISA, transmission

Introduction

Le paludisme est une parasitose causée par un protozoaire du genre *Plasmodium*. Cinq espèces sont à l'origine de la maladie chez l'homme : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax* et *Plasmodium knowlesi*. *Plasmodium falciparum* est l'espèce la plus pathogénique et responsable de la forme grave de la maladie en Afrique sub-saharienne. En 2010, environ 216 millions de cas de paludisme ont été enregistrés dans le monde dont près de 81 % en Afrique subsaharienne. Environ 655 000 décès dans le monde étaient imputables au paludisme ; 91 % de ces décès étaient enregistrés en Afrique subsaharienne et 86% de ces décès ont été observés chez les enfants de moins de 5 ans (OMS, 2011).

Le paludisme est un problème de santé publique au Burkina Faso. Il est la cause de près de 2 millions d'hospitalisation. Les statistiques du système national d'information sanitaire révèlent que le paludisme est la cause de 48% des motifs de consultation, de 58% des motifs d'hospitalisation, de 42% des causes de décès et de 79,7% de décès chez les enfants de moins de 5 ans. Les populations les plus touchées sont les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes (DGISS, 2011).

Pour faire face à cette pandémie, des moyens de contrôle ayant pour objectifs la réduction de la morbidité, de la mortalité et de la propagation de la maladie ont été mis en œuvre. Il s'agit entre autres de la prise en charge précoce et appropriée des cas et la réduction du contact homme-vecteur par l'utilisation de matériaux imprégnés d'insecticide ou par pulvérisation intra domiciliaire à base d'insecticide.

Malgré ces mesures de contrôle, le paludisme demeure un problème de santé publique dû à l'émergence de la résistance du *Plasmodium* aux antipaludiques usuels (Le Bras et al. 1993 ; Del Nero et al., 1993; Guiguemdé et al., 1994; Basco et al., 1999 ; Sharma et al., 1999 Henrik et al. 2001). Cette résistance provoque un accroissement de la gravité de la maladie et par conséquent une augmentation de la mortalité (Ndifor et al., 1992 ; Saidu et al., 2000). La résistance des moustiques aux insecticides est également un problème majeur pour le contrôle des vecteurs de la maladie d'autant plus que la résistance aux pyréthrinoïdes (seule classe d'insecticide recommandé pour l'imprégnation des moustiquaires) a été aussi rapportée (Diabaté et al. 2002; Dabiré et al. 2009 ; 2012 ; Badolo et al. 2012). Cette résistance pourrait être liée à l'utilisation exagérée des pyréthrinoïdes dans l'agriculture qui aurait contribué à sélectionner des souches de moustiques résistants, capable de transmettre le *Plasmodium* (Diabaté et al. 2002).

Il devient alors urgent de mettre au point un vaccin qui soit efficace et à la portée de la population la plus démunie. Dans le domaine de la recherche vaccinale contre le paludisme, de nombreuses études ont été menées et ont abouti à l'élaboration trois types de candidat-vaccins correspondants aux différents stades de développement du parasite : les vaccins dirigés contre les stades hépatocytaires du parasite (sporozoïtes), les vaccins dirigés contre les stades sanguins du parasite (mérozoïtes) et les vaccins dirigés contre les stades sexués du parasites (gamétocytes). Le candidat-vaccin dirigé contre les gamétocytes est celui bloquant la transmission du paludisme. Ce type de vaccin contribuerait à induire et à maintenir chez l'être humain une immunité bloquant la transmission du parasite de l'homme vers le moustique. Le développement de ce type de vaccin a notablement évolué et pourrait être testé dans les pays endémiques d'ici quelques années. L'infection expérimentale de moustiques élevés à l'insectarium est aujourd'hui l'outil disponible permettant de mesurer l'efficacité d'une intervention visant à réduire la transmission homme-moustique, tel que dans le cas d'un vaccin bloquant la transmission.

Aussi les traitements avec les Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA), actuellement recommandés par l'Organisation Mondiale de la Santé sont actuellement efficaces sur les formes asexuées du *Plasmodium* et indirectement réduirait la prévalence de la forme transmissible (gamétocyte) chez le moustique. L'évaluation de l'efficacité de tels traitements sur la transmission peut être réalisée en utilisant des infections expérimentales de moustiques en donnant le sang de sujets traités aux CTA aux moustiques d'élevage et à observer l'évolution du parasite chez les moustiques.

Des vastes campagnes de distribution de moustiquaires imprégnées d'insecticides ont été initiées afin de réduire la transmission du paludisme. L'évaluation de leur niveau de protection pourrait être réalisée en utilisant des infections expérimentales de moustiques. Les moustiquaires si elles sont bien utilisées, au bout d'un certain temps on peut évaluer leur efficacité par l'apparition des cas de paludisme et de porteurs de gamétocytes dans la zone. En effet si toute la population utilise bien les moustiquaires les nouveaux cas de paludisme devraient diminuer car les moustiquaires empêcheraient le contact homme-vecteur et donc réduirait la dissémination de la maladie par les moustiques.

La technique d'infection expérimentale du vecteur consiste à donner aux moustiques du sang total d'un sujet (porteurs des formes sexués du *Plasmodium* : gamétocytes) et à évaluer la capacité de l'individu à transmettre le parasite aux moustiques. La mise en évidence des

moustiques infectés au cours de l'expérience se fait par la dissection de l'estomac du moustique suivi de l'identification de l'infection à *Plasmodium* par la microscopie. La détection de l'infection chez le moustique par la microscopie peut s'avérer très variable d'une expérience à une autre due à la sensibilité de la technique de recherche d'oocystes dans l'estomac du moustique ou à une variation inter-moustique dans l'apparition de l'oocyste. Une telle variabilité aurait une conséquence directe dans l'évaluation des interventions visant à réduire la transmission du paludisme et par conséquent compromettre d'éventuelles améliorations.

En termes de lutte contre le paludisme la majeure partie des études est basée sur le paludisme clinique ; pourtant les porteurs de parasite qui ne présentent pas de signes cliniques (porteurs de gamétocytes) contribuent à la dissémination de la maladie et sont moins pris en compte dans la lutte. La lutte efficace contre le paludisme en vue de son éradication passe par la maîtrise du réservoir infectieux et la mise en place d'outils de mesures efficaces des interventions visant à réduire la transmission.

La présente étude a pour objectif général d'évaluer le réservoir infectieux du paludisme chez l'enfant de 2 à 10 ans dans la province du Kourwéogo au Burkina Faso.

Les objectifs spécifiques ont consisté à :

- Evaluer la prévalence et la densité des formes asexuées et sexuées de *Plasmodium falciparum* chez les enfants de 2 à 10 ans.
- Evaluer la proportion de sujets infectants les moustiques en fonction de l'âge.
- Evaluer la proportion de moustiques infectés en fonction de l'âge.
- Comparer la performance de la microscopie à celle de l'ELISA dans la détection de moustiques infectés au cours d'une infection expérimentale.

I. Revue bibliographique

I.1.L'agent pathogène

L'agent responsable du paludisme est le *Plasmodium*. C'est un protozoaire de la famille des *Plasmodidae*, du sous ordre des *Haemosporina*, de la sous classe des *Coccidia*, de la classe des *Sporozoea*, de l'embranchement des *Apicomplexa*.

Le genre *Plasmodium* renferme plusieurs espèces. Sur plus d'une centaine d'espèces de *Plasmodium* parasitant les mammifères, les rongeurs, les oiseaux ou même les batraciens, cinq sont spécifiques à l'homme et peuvent déclencher la maladie sous des formes plus ou moins graves. Ce sont :

- ❖ *Plasmodium falciparum* (Welch, 1887) à l'origine de la fièvre tierce maligne. Elle est l'espèce prédominante et est responsable des formes graves de la maladie et de la quasi-totalité de la mortalité. *Plasmodium falciparum* est l'espèce majoritairement rencontrée au Burkina avec 90% des cas, suivi de *P. malariae* 8% des cas et de *P. ovale* 2% (Habluetzel et al. 1999).
- ❖ *Plasmodium vivax* (Grassi et Felletti, 1890), à l'origine de la fièvre tierce bénigne (tous les 48 heures) avec des rechutes à long terme dues à l'existence de formes dormantes dans le foie appelées hypnozoïtes.
- ❖ *Plasmodium ovale* (Stephens, 1922), à l'origine de la fièvre tierce bénigne (tous les 48 heures) avec des rechutes à long terme avec la présence ici aussi d'hypnozoïtes.
- ❖ *Plasmodium malariae* (Laveran, 1881), à l'origine de la fièvre quarte (tous les 72 heures).
- ❖ *Plasmodium knowlesi* (Peter et al. 2009), récemment découvert chez l'homme.

I.2. Les vecteurs

Le paludisme est transmis à l'Homme par la piqûre d'un moustique du genre *Anopheles* qui est l'hôte définitif. Les moustiques sont des arthropodes qui appartiennent à la classe des *Insecta*, à l'ordre des *Diptera*, au sous-ordre des *Nematocera*, à la famille des *Culicidae*. Cette famille renferme plusieurs sous familles dont trois représentent un intérêt médical:

- Sous famille des *Culicinae* avec le genre *Culex*.
- Sous famille des *Anophelinae* avec le genre *Anopheles*.
- Sous famille des *Aedinae* avec le genre *Aedes*.

Le genre *Anopheles* est le plus important. Il regroupe 400 espèces dont 70 sont vectrices de maladies humaines (Bruce-chwatt et *al.* 1985). Les principales espèces d'anophèles vectrices du paludisme chez l'homme sont : *An. gambiae.s.s*, *An. arabiensis*, *An. Funestus.s.l.*, *An. moucheti*, *An. sinensis* (Gentilini, 1993; Costantini et *al.* 1999). Au Burkina Faso *An. Gambiae.s.s*, *An. Arabiensis*, *An. Funestus.s.l.* sont considérés comme les principaux vecteurs du paludisme (Majori et *al.* 1987 ; Petrarca et *al.* 1996).

I.3. Biologie du parasite

Le cycle biologique du *Plasmodium* se déroule successivement chez l'homme (cycle asexué) et le moustique (cycle sexué).

I.3.1. Cycle asexué

Le cycle asexué du parasite chez l'homme comprend deux phases que sont : la phase exo érythrocytaire et la phase érythrocytaire.

I.3.1.1. Phase exo érythrocytaire

La phase exo érythrocytaire du cycle asexué correspond à la phase hépatique de la maladie. Elle est asymptotique ; on parle alors de portage asymptotique. Le cycle parasitaire chez l'homme commence lorsqu'un anophèle femelle infectieux se gorge du sang d'un individu. Les sporozoïtes se concentrent dans les glandes salivaires et sont émis au site de piqûre lorsque le moustique envoie sa salive avant et pendant le repas sanguin. Les sporozoïtes

passent dans la circulation sanguine (Vanderberg et *al.* 2004; Amino et *al.* 2006) et atteignent le foie, où ils pénètrent dans les hépatocytes (Frevet et *al.* 2006). Rapidement le sporozoïte se transforme en mérozoïtes, entouré d'une membrane plasmique (le plasmalemme) au sein d'une vacuole parasitophore. Commence alors une période de réplication intense : la schizogonie hépatique. Pendant cette période qui dure entre 5 à 6 jours pour *P. falciparum* et 15 jours pour *P. malariae*, il y a formation de plusieurs milliers de mérozoïtes hépatiques. La cellule hépatique distendue, gonflée, éclate et libère les mérozoïtes dans la circulation sanguine (**Figure 1**). Ces mérozoïtes ne peuvent cependant pas envahir les hépatocytes. Dans les infections à *P. vivax* ou à *P. ovale* certaines formes intra hépatocytaires ne se divisent pas immédiatement mais restent inactives pendant des mois avant que cette multiplication ne commence. Ces formes endormies ou hypnozoïtes seraient responsables des rechutes qui caractérisent l'infection de ces deux espèces.

I.3.1.2. La phase érythrocytaire

Après leur libération dans la circulation, les mérozoïtes hépatiques envahissent rapidement les érythrocytes et initient le stade sanguin. Une fois entré dans l'hématie le mérozoïte se transforme en anneau, caractérisé par un cytoplasme très fin entourant la vacuole parasitophore. Ensuite le cytoplasme s'épaissit et le parasite augmente de taille. Le parasite à ce stade est appelé trophozoïte ; apparaissent des grains de pigment dans le cytoplasme, qui résultent de la dégradation de l'hémoglobine en hémozoïne. Ce trophozoïte entame une série de mitoses jusqu'à la formation d'un schizonte mûre (rosace) qui éclate en rompant la membrane du globule rouge pour libérer, selon l'espèce, 8 à 32 mérozoïtes. Ces derniers peuvent ensuite envahir d'autres érythrocytes. Ce cycle érythrocytaire est de 48 heures pour *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale* et de 72 heures pour *P. malariae*. Quelques parasites auront un développement différent (gamétocytogenèse) aboutissant aux gamétocytes, formes sexuées du parasite chez l'homme (**Figure 1**).

I.3.1.3. La gamétocytogenèse

Les gamétocytes de *P. malariae*, *P. ovale* et *P. vivax* se développent en 1 à 3 jours et sont le plus souvent contemporains de la poussée asexuée qui leur a donné naissance. Par contre la gamétocytemie de *P. falciparum* présente une longue période de maturation de 7 à 12 jours (Day et *al.* 1998).

La gamétocytogenèse se fait par cinq stades :

Au stade I, le gamétocyte est morphologiquement semblable à un trophozoïte ; puis il s'individualise progressivement en prenant une forme allongée chez *P. falciparum* et arrondie chez les autres espèces, riche en pigment, avec un gros noyau unique. Le développement des gamétocytes de *P. falciparum* du stade I à IV se fait dans les organes profonds du fait d'une cytoadhérence à l'endothélium des capillaires, en particulier ceux de la moelle osseuse. Le stade V de *P. falciparum* est le seul à être présent dans le sang périphérique. Il faut généralement un délai de 2 à 3 jours avant qu'un gamétocyte de stade V, nouvellement apparu dans la circulation sanguine périphérique, soit infectant pour le moustique. La capacité d'exflageller est le signe de la maturation du gamétocyte mâle. La présence des gamétocytes mâle et femelle est indispensable pour la suite du cycle chez le moustique. Généralement on observe trois à quatre fois plus de gamétocytes femelles que de gamétocytes mâles.

I.3.2. Cycle sexué

Le cycle parasitaire chez l'anophèle commence quand un moustique femelle prend son repas sanguin chez un individu porteur de gamétocytes. Alors que les formes sanguines asexuées sont détruites par les enzymes digestives, les gamétocytes mâles et femelles s'échappent rapidement de leur enveloppe érythrocytaire en se transformant en microgamètes (pour les mâles) ou macro-gamètes (pour les femelles). De la gamétogenèse mâle résulte la formation de 4 à 8 gamètes rendus très mobiles par un processus d'exflagellation alors que de chaque gamétocyte femelle va sortir un seul gamète. La rencontre du gamète mâle avec le gamétocyte femelle aboutit à la formation d'un zygote dans la demi-heure suivant la piqûre. Le zygote se transforme en ookinète allongé et mobile, puis en oocyste. A l'intérieur de cet oocyste se forme plusieurs sporoblastes, dans lesquels se forment des milliers de sporozoïtes. Au bout d'environ 10 jours, ces sporozoïtes perforent la coque de l'oocyste avant de passer dans l'hémolymph pour aboutir au niveau des glandes salivaires, prêts à être transmis au prochain individu, lors du prochain repas sanguin de l'anophèle femelle devenu infectieux. Il convient de rappeler que le temps de maturation chez l'anophèle est dépendant de la température extérieure du milieu dans lequel elle se trouve. Celui-ci s'établissant entre 10 et 20 jours (à 30°C et 20°C respectivement) avec une température minimale de 18°C nécessaire à la maturation.

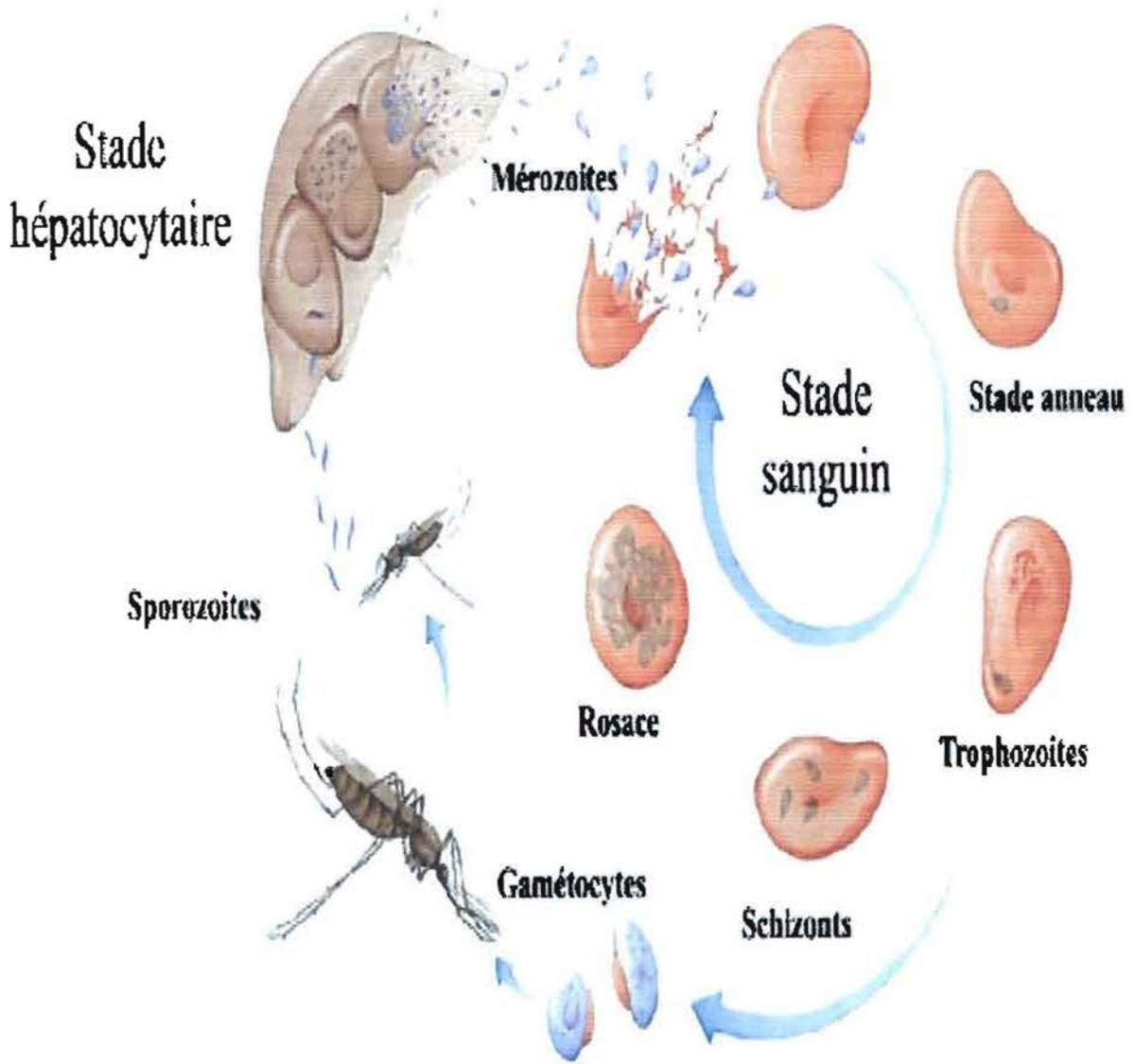


Figure 1 : Cycle biologique du *Plasmodium*

Source : www.pasteur.fr/recherche/unite

I.4. Cycle du vecteur

Les moustiques sont des insectes qui passent par 4 stades de développement caractérisés par une phase aérienne et une phase aquatique. La durée du cycle est de 10 à 15 jours et est fortement influencée par la température.

La phase aquatique commence quand le moustique femelle pond ses œufs à la surface de l'eau, à la suite d'une fécondation suivi d'un repas sanguin. Les œufs se développent en un ou deux jours et donnent des larves de stade 1. Puis les larves passent par trois autres stades durant une semaine, caractérisés par une augmentation de taille et se métamorphosent en nymphes. Des nymphes émergeront des adultes au bout de 3 à 5 jours.

La phase aérienne commence avec l'apparition des moustiques adultes. Ces derniers sont constitués de mâles et de femelles qui s'accouplent quelques temps après leur émergence. Après la fécondation, la femelle procède à un repas sanguin et au bout de deux jours elle pond ses œufs dans l'eau et le cycle reprend (Figure 2).

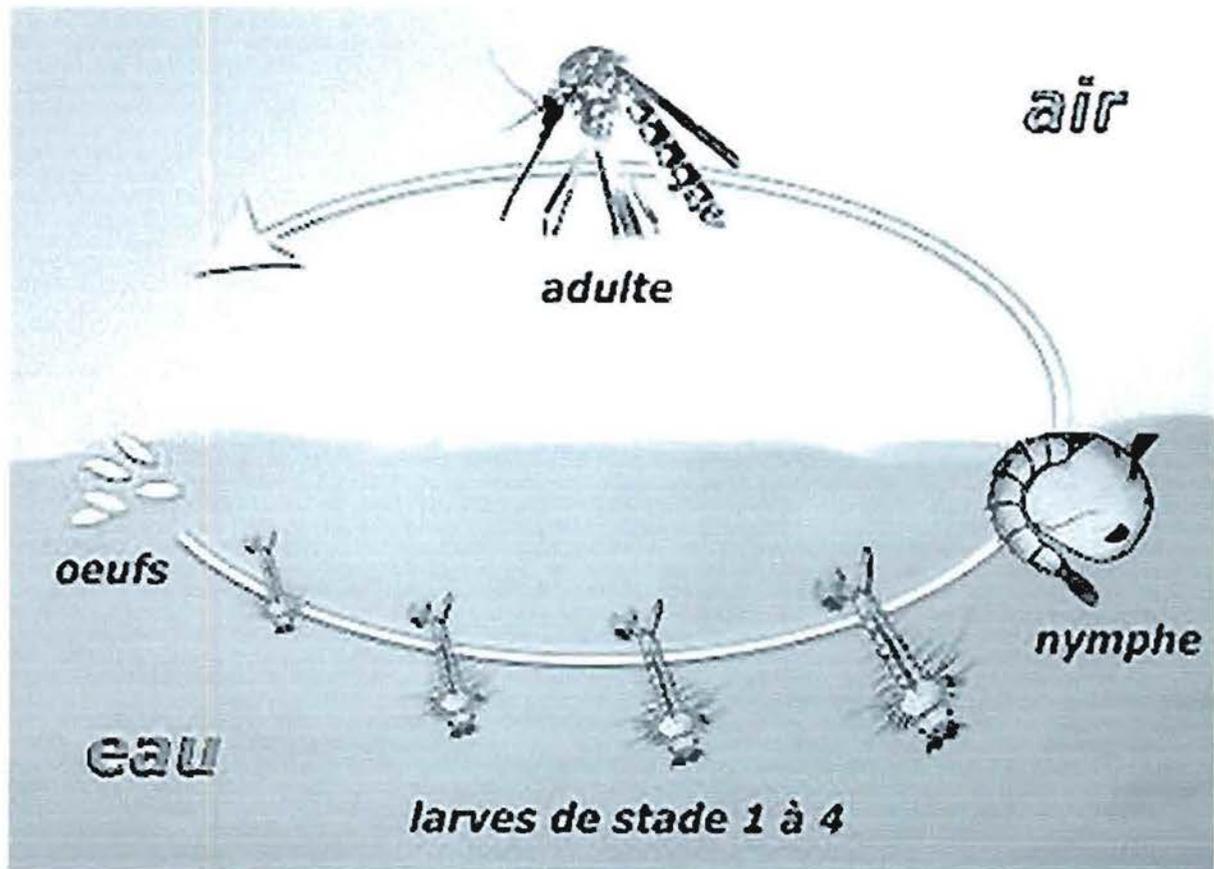


Figure 2 : Cycle de vie de moustique

Source : Cours du Pr Dabiré

I.5. Faciès épidémiologiques du paludisme au Burkina Faso

Le paludisme est une maladie qui sévit durant toute l'année au Burkina. Il existe 3 faciès de transmission du paludisme en fonction de la zone climatique :

- ❖ Une transmission permanente dans les régions du Sud et du Sud-ouest qui dure toute l'année.
- ❖ Une transmission saisonnière longue au centre d'une durée de 4 à 6 mois.
- ❖ Une transmission saisonnière courte au Nord du pays d'une durée de 2 à 3 mois avec des risques potentiels d'épidémies de paludisme (PNLP 2007).

C'est donc un paludisme de type stable au Centre ; Sud et Sud-Ouest du pays et faible au Nord. La recrudescence du vecteur pendant la saison pluvieuse (Mai à Octobre) commence avec les premières pluies et l'apparition des retenues d'eaux favorisant la prolifération des moustiques. Ces derniers restent permanents le long de la saison et accroissent la transmission du paludisme par l'augmentation du taux d'inoculation entomologique. Ce sont essentiellement *Anopheles gambiae*. Cependant la transmission durant la saison sèche ne s'interrompt pas et est assurée par *An. arabiensis* et *An. Funestus*.

I.6. Contrôle du paludisme

Les stratégies actuelles de lutte contre le paludisme s'articulent autour de quatre points que sont : le traitement efficace des cas de paludisme, la chimio prophylaxie, la lutte anti vectorielle et le développement des vaccins.

I.6.1. La prise en charge précoce des cas de paludisme

- ❖ Paludisme simple

En cas de paludisme simple l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommande l'utilisation des Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA). Cette indication est due aux nombreuses résistances aux antipaludiques observées en monothérapie. Le traitement est administré par voie orale et les CTA recommandés sont : l'Artemether + Lumefantrine, l'Artesunate + Amodiaquine, l'Artesunate + Mefloquine, l'Artesunate + sulfadoxine-pyriméthamine, Dihydroartémisinine + Piperaquine (OMS, 2006).

❖ Paludisme grave

En cas de paludisme grave, le traitement de première intention recommandé est l'Artesunate ou l'Artemether, ou la Quinine par voie intra musculaire ou intra veineuse (OMS, 2006).

I.6.2. La chimio prophylaxie

C'est l'ensemble des médicaments pris en vue de prévenir l'apparition des formes cliniques du paludisme. Elle est généralement conseillée aux femmes enceintes, aux enfants de moins de cinq ans et les personnes vivant dans les zones non impaludées et désirant se rendre dans les zones d'endémie palustre. De nos jours, elle est déconseillée par l'OMS pour les populations africaines. En effet, elle est difficile à mettre en œuvre à grande échelle et favorise la diffusion de souches résistantes aux médicaments.

Le Traitement Préventif Intermittent (TPI) du paludisme est un outil promoteur pour le contrôle du paludisme. Il consiste à l'administration d'une dose curative de traitement antipaludique (Sulfadoxine/Pyriméthamine) aux personnes à risque de contracter le paludisme. Le TPI à base de SP est recommandé chez les femmes enceintes dans les zones endémiques comme le Burkina Faso (PNLP, 2007 ; OMS, 2007 ; OMS, 2011).

I.6.3. La lutte anti vectorielle

C'est l'ensemble des méthodes visant à réduire le contact vecteur hôte. Cette lutte passe par :

- ❖ L'élimination des gîtes larvaires par l'aménagement de l'environnement et du cadre de vie, drainage des eaux.
- ❖ La pulvérisation intra domiciliaire.
- ❖ L'utilisation des répulsifs à effet rémanent.
- ❖ Le port de vêtements protecteurs les nuits.
- ❖ La pose d'écran anti moustique sur les ouvertures des habitations.
- ❖ L'utilisation de moustiquaire imprégnée d'insecticide.

Au Burkina Faso, la stratégie la plus promue dans la lutte contre le vecteur est l'utilisation de moustiquaire imprégnée d'insecticide à longue durée d'action (MILDA). Une large campagne de distribution gratuite de MILDA a été initiée par l'OMS et suivie par les autorités burkinabè. Cette stratégie fort louable demeure insuffisante vue que l'insecticide utilisé pour

l'imprégnation a une efficacité de trois ans (OMS, 2011). Il faudrait donc renouveler la distribution des MILDA, tenir compte des résistances qui apparaissent, éduquer la communauté et combiner les différentes stratégies de lutte. Afin de contrôler la résistance aux pyréthrinoïdes, d'autres méthodes telles que des pulvérisations intra domiciliaires de Bendiocard ont été introduites dans certaines localités du Burkina Faso.

I.6.4. La vaccination anti palustre

Plusieurs candidats vaccins sont élaborés mais jusqu'à présent restent au stade d'essai. Ces vaccins ont pour cible les stades de développement du *Plasmodium* dans le corps humain. Ainsi on a :

- ❖ Les vaccins anti-stade exo-érythrocytaire (anti-sporozoïtes) : ils visent à empêcher les sporozoïtes de pénétrer ou de se développer dans les cellules hépatiques. Par Exemple : les candidats AMA-1, CSP, LSA...
- ❖ Les vaccins anti-stade sanguin asexué (anti-mérozoïtes) : ils visent à empêcher les mérozoïtes de pénétrer ou de se développer dans les hématies. Comme exemple on a MSP 1, MSP2, MSP3 ...
- ❖ Les vaccins anti-gamétocytes: ils induisent des anticorps empêchant la poursuite du cycle de vie du *Plasmodium* chez le moustique (Arévalo et *al.* 2011). Ces anticorps empêchent la fécondation des zygotes (Quakyi et *al.* 1987 ; Roeffen et *al.* 1995) et sont essentiellement dirigés contre Pfs 25, Pfs 28, Pfs 45/48 et Pfs 230.

I.6.5. La réponse immunitaire anti palustre

L'infection par *Plasmodium*, responsable du paludisme, engendre des réponses immunitaires de l'hôte. Ces réponses immunes sont régulées aussi bien par le système immunitaire non spécifique dit inné que par le système immunitaire spécifique ou acquis. Les deux types d'immunité sont complémentaires. L'immunité innée se mobilise dès le début (dans les premières heures) de toute infection en attendant la mise en place de l'immunité « acquise » qui est opérationnelle dans les dix jours suivant l'infection.

L'immunité acquise, est tout à la fois spécifique des stades de développement du parasite que des espèces parasitaires :

Ainsi nous aurons une immunité dirigée contre les stades asexués du *Plasmodium* qui est aussi bien cellulaire qu'humorale. En effet les neutrophiles, les macrophages, les NK mais aussi des anticorps interviendraient dans l'élimination du *Plasmodium* au stade asexué.

❖ Cas de l'immunité naturelle bloquant la transmission

En zone endémique certaines personnes développent des anticorps contre les antigènes de gamétocytes, gamètes et stades sporogoniques (stades du parasite chez le vecteur) du *Plasmodium*. Les anticorps dirigés contre ces antigènes jouent un rôle non chez l'homme mais chez le moustique. Certains anticorps monoclonaux dirigés contre Pfs 48/45 (antigène gamétocytaire) seraient capables de bloquer le développement sporogonique du parasite (Roeffen et al. 1994 ; 1996 ; Bousema et al. 2006a ; Ouédraogo et al. 2011).

Aussi des anticorps monoclonaux dirigés contre deux des cinq épitopes de Pfs 230 peuvent entraîner la lyse du gamète ou du zygote en présence du complément (Quakyi et al. 1987 ; Graves et al. 1988b ; Roeffen et al. 1995). La réponse immunitaire naturelle bloquant la transmission du paludisme est la base du développement de vaccins bloquant la transmission. Ce type de vaccin, s'il voyait le jour pourrait être utilisé en masse au cours d'interventions visant à réduire la transmission du paludisme et par conséquent réduire le taux de morbidité et de mortalité lié à l'infection.

I.7. Les outils d'évaluation de l'efficacité des interventions visant à réduire la transmission du paludisme de l'homme au moustique vecteur

L'évaluation de l'efficacité des interventions visant à réduire la transmission du paludisme est essentielle dans la mesure où elle permettra un suivi objectif de l'impact de l'intervention sur l'ampleur de la transmission afin de prendre des mesures correctives afin de garantir l'efficacité de l'intervention.

Il existe plusieurs moyens pour mesurer l'efficacité d'une intervention visant à réduire ou bloquer la transmission du parasite de l'Homme au vecteur:

I.7.1. Le xénodiagnostique

Ce test consiste à faire gorger des moustiques sains d'élevage, directement sur la peau du sujet (Muirhead-Thomson, 1957). C'est probablement la méthode qui se rapproche le plus des

conditions naturelles, cependant elle est difficilement applicable en médecine de masse pour des raisons d'éthique.

I.7.2. L'Infection artificielle

I.7.2.1. Le SMFA (Standard Membrane Feeding Assay)

Le SMFA utilise des gamétocytes infectants de *P. falciparum* obtenus en culture. Par l'intermédiaire d'un gorgement expérimental sur membrane, deux lots de moustiques d'élevage ingèrent ces gamétocytes en présence soit du sérum à tester soit d'un sérum témoin négatif non immun. Ce test a été soigneusement standardisé et procure des résultats reproductibles (Ponnudurai *et al.* 1982,1989 ; Boudin *et al.* 1993 ; Roeffen *et al.* 1994 ; Lensen *et al.* 1996 ; Arévalo *et al.* 2005).

Le protocole utilisant des gamétocytes de culture (SMFA) permet de tester tous les sérums, qu'ils soient de porteurs de gamétocytes ou non. Par contre, il n'est réalisable que dans les rares laboratoires capables de maintenir en culture des gamétocytes infectants de *P. falciparum*. En outre, il coûte cher et ne peut être réalisé en grandes séries (Ponnudurai *et al.* 1989).

I.7.2.2. Le DMFA (Direct Membrane Feeding Assay)

Le principe du DMFA ou infection expérimentale de moustiques en région endémique est différent de celui du SMFA. Des moustiques d'élevage sont infectés avec les globules rouges parasités d'un porteur de gamétocytes, en présence du plasma autologue du porteur, ou en substituant ce plasma par un sérum témoin non immun (Boudin *et al.* 1993 ; Mulder *et al.* 1994 ; Muirhead-Thomson *et al.* 1999 ; Drakeley *et al.* 2004 ; Schneider *et al.* 2007). Ce test est réalisable dans un laboratoire modestement équipé et est peu coûteux (**Figure 3**).



Figure 3 : Dispositif pour l'infection expérimentale

Source : Photo prise à l'insectarium du Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme (CNRFP)

II. Méthodologie

II.1. Site d'étude

L'étude s'est déroulée dans le village de Laye (province du Kourwéogo) de Septembre à Décembre 2011. Laye est situé à 30 km au Nord-Ouest de Ouagadougou (**Figure 4**). Ce village est situé dans la zone soudanienne avec une saison pluvieuse allant de Juin à Octobre et une saison sèche et chaude durant tout le reste de l'année.

Les principaux vecteurs du paludisme sont *An. Gambiae s.l*, *An. arabiensis* et à un moindre degré *An. Funestus s.l* (Costantini et al. 1999). L'espèce *Plasmodium falciparum* est la plus prévalente dans les infections palustres (90%) suivie de *P. malariae* (8%) et *P. ovale* (2 %) (Habluetzel et al. 1999).

La population est majoritairement de l'ethnie Mossi vivant essentiellement de l'agriculture et de l'élevage. La majorité des habitations est constituée de cases rondes.

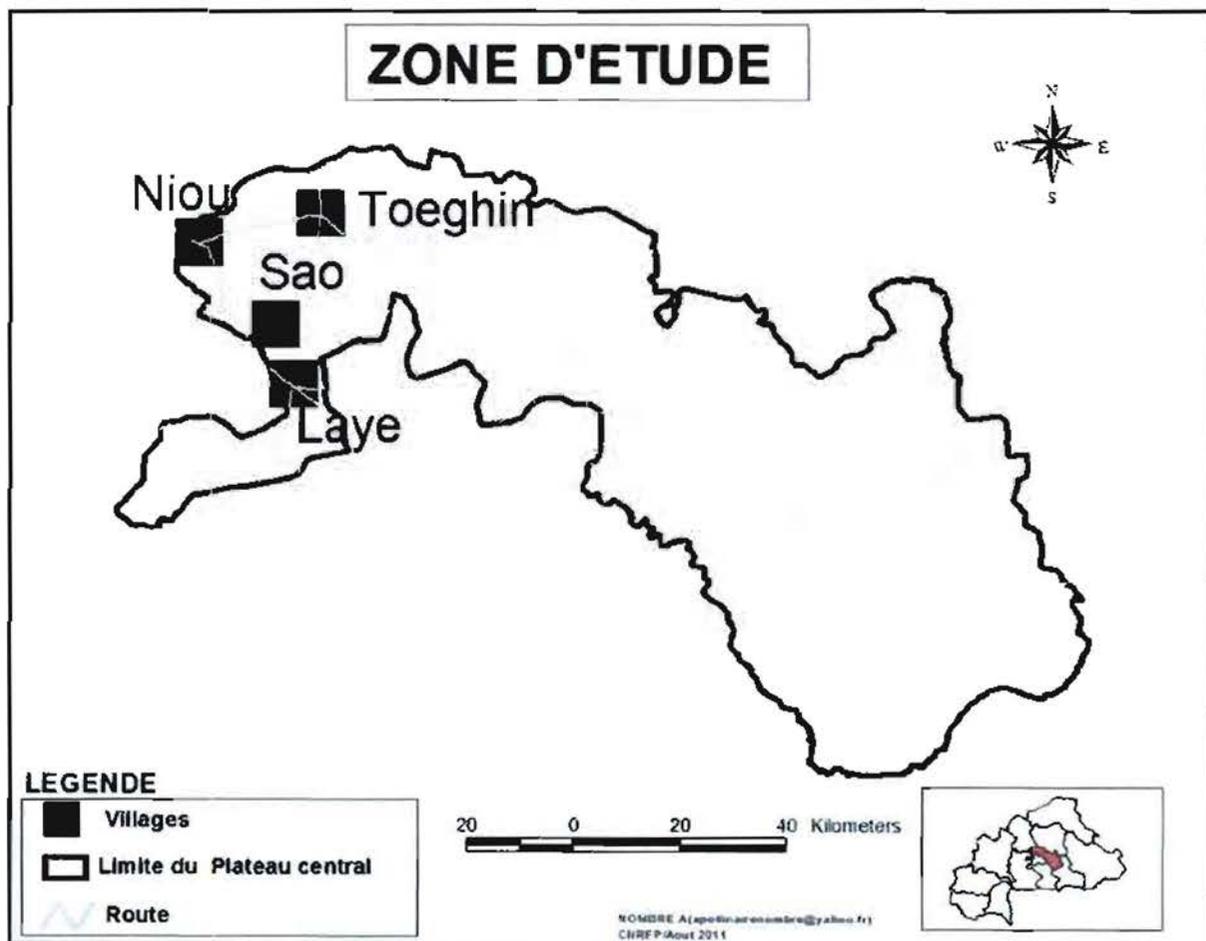


Figure 4 : Carte de la zone d'étude

II.2. La population d'étude

L'étude a concerné 225 enfants de 2 à 10 ans des deux sexes avec un sexe ratio de 1,34. Les enfants résidaient de façon permanente dans la zone et répondaient aux critères suivants :

II.2.1. Critères d'inclusion / exclusion

II.2.1.1. Critères d'inclusion

Les enfants inclus dans l'étude remplissaient les conditions suivantes:

- Obtention du consentement informé communautaire et du consentement informé écrit individuel ou empreinte digitale du chef de famille.
- Etre âgé (e) d'au moins 2 ans et 10 ans au plus.
- Etre porteur de gamétocytes avec ou sans la présence de formes asexuées après observation au microscope de la goutte épaisse.

II.2.1.2. Critères d'exclusion

Les critères qui ne permettaient l'inclusion dans l'étude étaient :

- Toutes maladies chroniques (cardiovasculaire, hépatique et rénale) suspectées par le médecin comme pouvant être un risque pour le volontaire.
- Toute autre circonstance ou condition suspectée par le médecin comme pouvant être un risque pour le volontaire.
- Etre drépanocytaire
- Absence de consentement.

II.3. Considérations éthiques

L'étude s'est déroulée dans le cadre d'un projet conduit par le Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme. L'étude a reçu l'approbation du comité d'éthique institutionnelle du CNRFP et du ministère de la santé burkinabè et l'anonymat a été garanti lors du traitement des données par l'utilisation d'un code d'identification.

Tous les amendements au protocole ont été soumis au même comité. Les volontaires de cette étude ont été des enfants d'au moins deux ans et d'au plus dix ans des deux sexes.

Avant le début de l'étude, les investigateurs ont rencontré les autorités administratives et politiques de la zone d'étude pour les informer des objectifs de l'étude. Chaque participant, parent ou tuteur des enfants de l'étude a été informé individuellement des procédures de

l'étude. Une fiche d'information du patient et un formulaire de consentement leur a été soumis. Ceux qui ont consenti de la participation de leur enfant dans l'étude ont signé ou ont apposé leurs empreintes digitales.

II. 4. Collecte des échantillons

Les données ont été collectées au cours d'une enquête transversale. Au cours de cette enquête, deux types de prélèvements ont été réalisés chez chacun des enfants, un au screening et l'autre le jour de l'infection expérimentale. Ces prélèvements ont consisté à :

- ❖ la confection d'une goutte épaisse et d'un frottis sanguin pour le diagnostic microscopique de la présence des gamétocytes et la détermination de la densité parasitaire des deux stades de *Plasmodium falciparum*.
- ❖ prélever un volume de 4ml de sang veineux de chaque volontaire dans un tube hépariné pour l'infection expérimentale de moustiques élevés au sein du CNRFP.

II.5. Analyse des données au laboratoire

II.5.1. Détermination de la densité parasitaire

Les lames collectées ont été séchées et acheminées au laboratoire du CNRFP où elles ont été colorées au Giemsa 6% pendant 35 minutes.

La lecture s'est faite au microscope optique à l'objectif 100 sous fond d'huile à immersion. Chaque lame a été lue par deux microscopistes indépendants et la moyenne des deux lectures est retenue. Lorsqu'il y a une différence de lecture excédant 30% entre les deux microscopistes, celle d'un troisième est incluse et la moyenne des deux valeurs les plus proches est retenue. Le nombre de parasites (stade asexué et sexué) et de leucocytes est compté simultanément sur la goutte épaisse. La parasitémie est déterminée au microlitre de sang en fonction du nombre de leucocytes compté par microlitre. La lame est considérée négative si aucun parasite n'est détecté sur 100 champs microscopiques. Seuls les volontaires ayant eu une lame positive au gamétocyte étaient définitivement enrôlés pour les séances d'infections expérimentales.

II.5.2. Réalisation des infections expérimentales

A l'issue de la lecture des lames, les porteurs de gamétocytes sont identifiés et sont conduits au laboratoire du Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme (CNRFP) pour la séance d'infection expérimentale. Avant chaque séance d'infection, une lame de goutte épaisse et frottis sanguin est confectionnée à nouveau, colorée et lue pour confirmer que l'individu est toujours porteur de gamétocytes au moment de l'infection. Sur les 225 enfants qui ont participé au screening qui s'est fait le long de l'étude, 50 parmi eux ont participé à l'infection expérimentale.

Les moustiques (*Anopheles gambiae*) élevés à l'insectarium du CNRFP ont été utilisés pour les infections expérimentales. A l'insectarium, les conditions étaient de 25-30°C pour la température, 70-90% d'humidité (Hurtado et *al.* 1997) et environ 12 heures d'éclairage. Les femelles agressives ont été présélectionnées, rassemblées dans des gobelets en carton d'une capacité de 250 mm³ et étiquetés avant le test.

La sélection des femelles agressives a été effectuée à l'insectarium sur une génération initiale de moustiques. Ainsi des moustiques sont nourris au jus sucré. Après la fécondation on leur offre un repas sanguin (lapin). Les femelles capables de se gorger en 15 minutes sont sélectionnées. Elles sont ensuite nourries au jus sucré (solution de glucose) puis pondent leurs œufs dans des petits bacs contenant de l'eau qui sont entretenus au laboratoire afin de permettre l'émergence des nymphes. Ces derniers, à leur tour nourris et entretenus, deviennent des moustiques adultes.

Après plusieurs générations de sélections, on aboutit à une génération de femelles agressives capable de prendre un repas sanguin en peu de temps.

Pour le test nous avons utilisé le sang des porteurs de gamétocytes. Pour ce faire nous prélevons 4 ml de sang dans un tube contenant de l'anticoagulant (héparine) de chaque sujet. Ce sang est immédiatement utilisé comme repas sanguin des moustiques âgés de 2-5 jours et mis à jeun pendant 12 à 15 heures. Environ 400 moustiques de la même génération ont été utilisés pour mesurer l'infectivité du sang de chaque sujet. Les 400 moustiques sont repartis dans des gobelets étiquetés A, B, C et D à raison de 100 moustiques par gobelet. Le repas sanguin par gobelet est de 1 ml de sang. Le matériel de prélèvement (tube et épicrotène) a été préalablement conditionné à 37°C. Les moustiques prennent leur repas à travers une membrane artificielle (para film) pendant 15 minutes (**Figure 5**). A l'issue du repas les moustiques gorgés sont retirés et gardés dans des cages codées en fonction du sang de chaque

sujet. La dissection s'est faite au septième jour de l'infection en vue de la recherche des oocystes dans l'estomac des moustiques.



Figure 5 : Moustiques prenant leurs repas sanguins à travers une membrane artificielle

Source : Photo prise à l'insectarium du CNRFP

II.5.3. Détection des moustiques infectés par la technique de la dissection à l'issue des infections expérimentales

Les 50 moustiques des gobelets A, B et C toujours vivants au 7ème jour après leur prise de repas sanguin sont disséqués pour la recherche d'oocystes au microscope. La dissection est faite sous une loupe binoculaire. Chaque moustique est disséqué sur une lame porte objet, dans une goutte d'une solution de Phosphate Buffered Saline (PBS) à 1%. L'estomac est isolé dans une goutte de mercurochrome placée sur la même lame. L'estomac ainsi obtenu est visualisé entre lame et lamelle au microscope optique à l'objectif 40 pour la recherche et le comptage des oocystes. Les moustiques infectés d'oocystes sont lues par deux microscopistes. Les estomacs infectés sont lavés avec 100 ml de PBS et conservés dans du tampon de lyse au congélateur (-20°C) pour une confirmation ultérieure de l'infection par la Polymerase Chain Reaction (PCR).

II.5.4. Détection de moustiques infectés par la technique de l'ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

A la suite de la dissection au 7^{ème} jour, le reste des moustiques des gobelets A et B, toujours vivants sont tués et placés dans un tube contenant du silicagel. Le silicagel assure la conservation du moustique à l'abri de l'humidité, donc des champignons. Le silicagel est également utilisé pour conserver le restant des moustiques des gobelets C (10^{ème} jour de l'infection) et ceux du gobelet D (14^{ème} jour de l'infection). Quelques temps après ils sont utilisés pour la recherche des antigènes CSP (Circum Sporozoïtique Protein) par le test ELISA.

Le dosage des anticorps dirigés contre la CSP (Circum Sporozoïtique Protein) a été réalisé par un ELISA en sandwich qui consiste à sensibiliser les puits des plaques avec l'anticorps anti CSP (anticorps monoclonal). Au bout de trois heures, les plaques sont lavées avec du PBS, on y ajoute du Blocking Buffer et on incube les plaques pendant une heure. Les plaques sont de nouveau lavées avec du PBS. On procède à l'ajout de l'antigène (broyat de moustique entier) dans les puits et en duplicata. On prend le soin de mettre dans les quatre derniers puits de la plaque un témoin négatif (moustiques mâles) et un témoin positif synthétique (CSP Genova). On laisse incuber les plaques la nuit à 4°C. Le lendemain, elles sont lavées avec du PBS. On ajoute le conjugué d'anticorps anti-CSP couplé à la peroxydase. Trois heures après les plaques sont de nouveau lavées avec du PBS, on ajoute le substrat de la peroxydase qu'est le Tétraméthyle Benzidine (TMB) dans chaque puits et on incube à l'obscurité pendant 20 minutes (**Figure 6**). De l'acide sulfurique est enfin ajoutée à la fin des 20 minutes pour arrêter la réaction. On procède à la mesure de la densité optique de chaque puits par la lecture des plaques au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 450 nm. L'échantillon est considéré positif si sa densité optique est supérieure à 2 fois la moyenne de la densité optique des témoins négatifs.

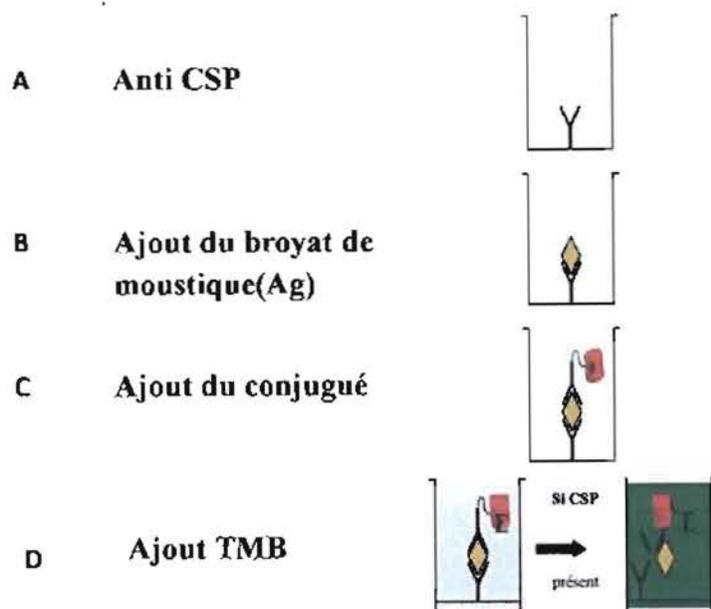


Figure 6 : Les différentes étapes de l'ELISA CSP

II.6. Gestion et analyse des données

Les données parasitologiques et celles de l'infection expérimentale ont été saisies en double et analysées avec les logiciels Excel 2007 et SPSS 20.0

Pour l'analyse des données en fonction de l'âge nous avons regroupé les enfants de l'étude en deux groupes d'âge :

- 1^{er} groupe : Les enfants âgés de 2 à 5 ans inclus.
- 2^{ème} groupe : Les enfants âgés de plus de 5 ans à 10 ans inclus.

Étant donné que les densités parasitaires ne respectent pas la distribution normale, les médianes de densités des formes asexuées et sexuées ont été calculées.

La comparaison entre les pourcentages de sujets infectieux et de moustiques infectés en fonction de l'âge a été réalisée grâce au test de χ^2 .

Toutes les comparaisons statistiques étaient significatives si et seulement si la valeur de p était supérieure à 0,05.

III. Résultats

III.1. Caractéristiques démographiques et palustres de la population d'étude

Le sexe ratio de la population d'étude était de 1,34 et la moyenne d'âge était de 3,91 [3,24-4,89] pour les enfants âgés d'au plus 5 ans et de 8,2 [6,81-9,27] pour les enfants de plus de 5 ans (**Tableau I**). Les lames de goutte épaisse et de frottis sanguin ont permis d'estimer la prévalence de l'infection palustre dans la population d'étude (**Tableau I**). Parmi les enfants inclus dans l'étude 11,5% étaient fébriles (température supérieure à 37,5° C). Ce fait a été observé aussi bien chez les porteurs de trophozoïtes, mais aussi chez les porteurs de gamétocytes ou des deux à la fois.

La prévalence de *Plasmodium falciparum* était supérieure à 70% dans l'ensemble de la population d'étude. Cette prévalence était moins élevée chez les enfants de 2 à 5 ans (64%) comparativement à ceux qui avaient plus de 5 ans (81,6%). La prévalence des trophozoïtes (formes asexuées du parasite), était elle aussi moins élevée chez les enfants de 2 à 5 ans (59%) comparativement à ceux qui avaient plus de 5 ans (80,8%). Quant à la prévalence des gamétocytes (formes sexuées du parasite), elle était plus importante chez les enfants de 2 à 5 ans (39%). En outre, nous avons observé que la prévalence de gamétocytes est largement inférieure à celle des trophozoïtes dans toutes les tranches d'âge de l'étude (**Tableau I**).

Pour évaluer la parasitémie en fonction de l'âge, la moyenne géométrique par tranche d'âge a été calculée. Les fortes densités des trophozoïtes étaient rencontrées dans le groupe d'âge de 2 à 5 ans (4452/ μ L [696-13267]), les plus jeunes de l'étude. L'évaluation de la densité des gamétocytes a montré qu'elle était également plus élevée chez les enfants de 2 à 5 ans (125/ μ L [20-125]) comparativement aux enfants plus âgés (32/ μ L [20-64]) (**Tableau I**).

Tableau I : Indices démographiques et paludométriques de la population d'étude

	Age			Valeur de P
	[2-5 ans]]5-10 ans]	Total	
Médiane Age (IC)	3,91 (3,24-4,89)	8,2 (6,81-9,27)		
Sexe ratio (M/F)	1,2	1,5	1,34	
Prévalence des cas de fièvre (n/N)	12% (12/100)	11,4% (14/125)	11,55%	
Prévalence de l'infection à <i>P. falciparum</i> (n/N)	64 (64/100)	81,6 (102/125)	74,6 (168/225)	0,03
Prévalence des porteurs de trophozoïtes (n/N)	59 (59/100)	80,8 (101/125)	71 (160/225)	0,01
Prévalence des porteurs de gamétocytes (n/N)	39 (39/100)	32 (40/125)	35 (79/225)	0,27
Densités de trophozoïtes (IC)	4452 (696-13267)	1087 (389-12057)		0,04
Densité de gamétocytes (IC)	125 (20-125)	32 (20-64)		0,3

III.2. Le réservoir infectieux humain déterminé par dissection de moustiques après l'infection expérimentale

Au total, 50 enfants ont été donneurs d'échantillons pour la réalisation des infections expérimentales dont les résultats sont présentés dans le **Tableau II**.

A l'issue de la dissection au septième jour de l'infection expérimentale, environ 7500 moustiques ont été disséqués dont 150 estomacs par expérimentation. Un total de 1059 moustiques infectés a été identifié dont un pourcentage général de 14,12%. Le pourcentage des sujets infectieux de notre population d'étude est de 66%. Un total de 33 enfants a infecté au moins un moustique. Par contre 34% (17) des enfants porteurs de gamétocytes n'ont pas été capable d'infecter un moustique.

Le pourcentage de sujets infectieux était plus élevé chez les enfants de 2-5 ans (75%) comparé aux enfants qui avaient plus de 5 ans (57,7%) (**Tableau II**).

Tableau II : Pourcentage des enfants infectieux en fonction de l'âge et de la densité des gamétocytes

	Age		Total	Valeur de P
	[2-5 ans]]5-10 ans]		
Densité de gamétocytes (IC)	125 (20-125)	32 (20-64)		0,3
% Individus infectieux à J7 par dissection (n/N)	75 (18/24)	57,7 (15/26)	66 (33/50)	0,19

De plus la dissection nous a permis de déterminer la proportion de moustiques que les enfants de 2 à 10 ans peuvent infecter lors d'une infection expérimentale.

Le pourcentage de moustiques infectés dépend de la charge gamétocytaire de l'individu qui donne son sang pour l'infection expérimentale. Le pourcentage de moustiques infectés augmente avec la gamétocytémie (**Figure 7**).

Aucun test n'a donné 100% d'infection de moustiques mais le taux le plus élevé de moustiques infectés a été de 78%. Des infections positives ont été obtenues chez certains porteurs de très faible densité gamétoctaire de 16 gamétoctes/ μL .

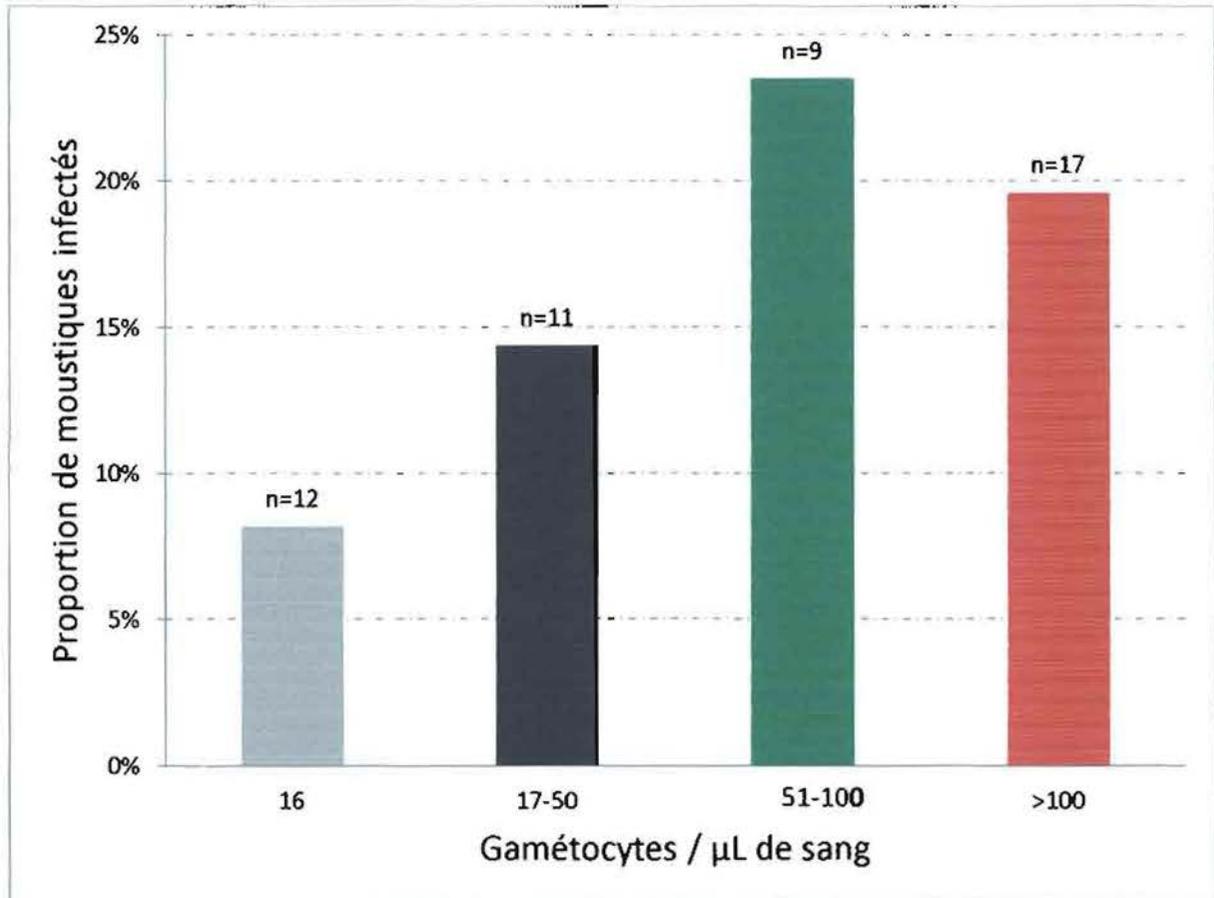


Figure 7 : Relation entre la densité des gamétoctes et infectivité dans les infections expérimentales d'*Anopheles gambiae* avec *P. falciparum*

III.3. Variation intra-test de la technique de dissection dans la détection de moustiques infectés après l'infection expérimentale

Afin d'évaluer la variation intra test le sang de chaque volontaire a été testé avec 3 lots de moustiques de la même génération.

La dissection au septième jour après le repas sanguin nous donne un pourcentage de moustiques infectés allant de 5 % pour certains enfants jusqu'à 78% pour d'autres. Le pourcentage de moustiques infectés était pratiquement le même entre les 3 lots de moustiques que chaque volontaire a infecté.

En deçà de 5% de moustiques infectés pour au moins un gobelet, le pourcentage de moustiques infectés variait entre les 3 gobelets. Cette variation n'était plus significative lorsque la proportion de moustiques infectés par un lot était supérieure à 5 %. Cette variation a pratiquement disparu lorsque le pourcentage de moustiques infectés était élevé (**Figure 8**).

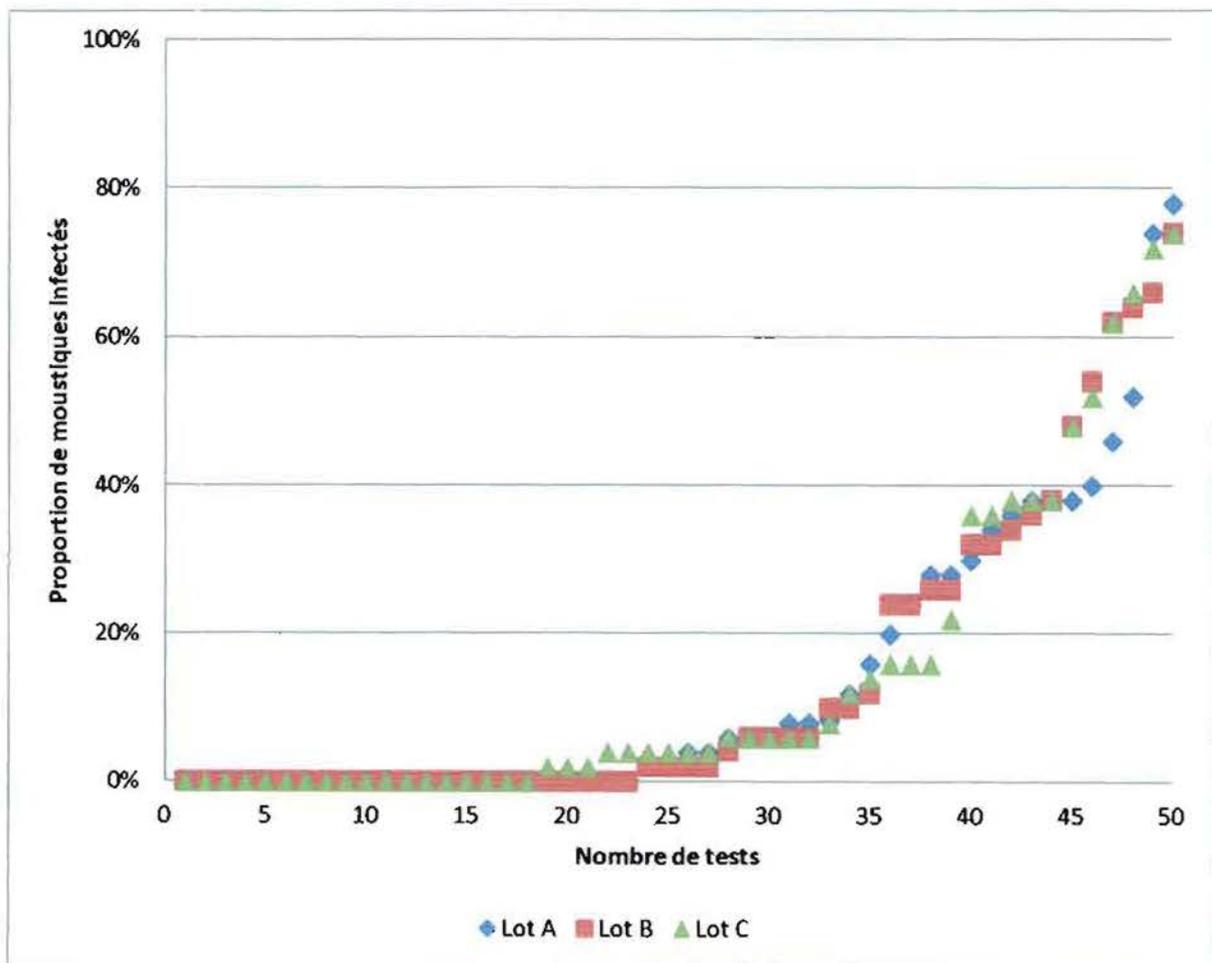


Figure 8 : Variabilité dans la détection de moustiques infectés par la technique de la dissection

III.4. Le réservoir infectieux déterminé par ELISA du moustique après l'infection expérimentale

Les moustiques conditionnés pour l'ELISA étaient répartis en trois lots en fonction de la date d'infection :

- 980 moustiques conditionnés dans le silicagel au septième jour de l'infection
- 980 moustiques conditionnés dans le silicagel au dixième jour de l'infection
- 980 moustiques conditionnés dans le silicagel au quatorzième jour de l'infection

A l'issue du test ELISA le pourcentage de personnes infectant au moins un moustique au septième jour de l'infection est de 59,2%. Il augmente au dixième jour de l'infection à 63,26% et atteint 71,42% au quatorzième jour de l'infection (**Tableau III**).

Tableau III : Pourcentage d'enfants infectieux en fonction du temps d'incubation des moustiques après l'infection expérimentale

Durée incubation (jours)	7	10	14	Valeur de P
Lot	AB	C	D	
Nombre de Moustiques	980	980	980	
% enfants infectieux (n/N)	59,2 (29/49)	63,3 (31/49)	71,4 (35/49)	NS

Le pourcentage de moustiques infectés dans l'ensemble de l'étude a varié entre 5% et 85%. Le pourcentage de moustiques qu'un individu infectait variait en fonction de la durée d'incubation après le repas sanguin. Ce pourcentage augmentait avec la durée d'incubation. Il était plus élevé au 14^{ème} jour après l'infection qu'au 10^{ème} jour qui, aussi, était plus important que le pourcentage au 7^{ème} jour après l'infection (**Figure 9**).

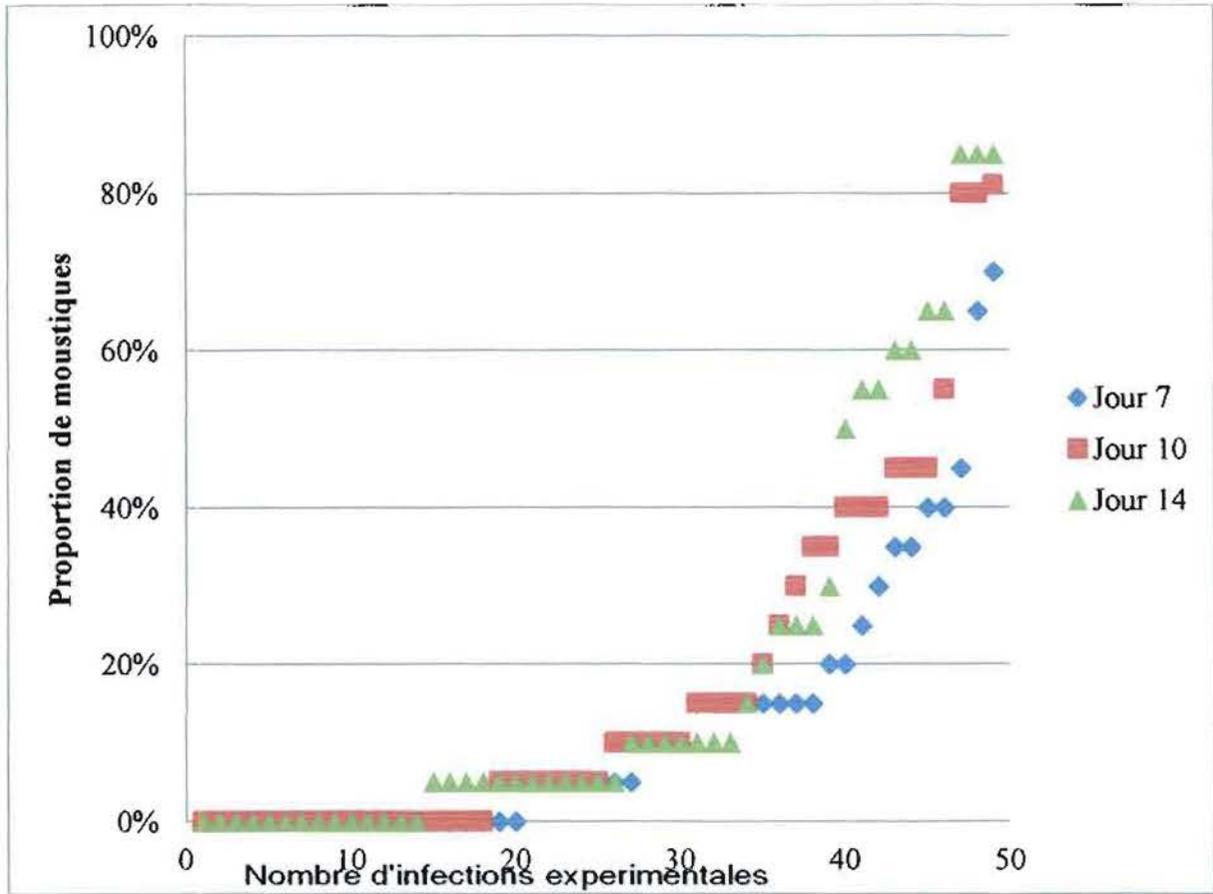


Figure 9 : Variabilité de la proportion de moustiques infectés en fonction du temps d'incubation depuis la prise du repas sanguin

III.5. Analyse comparative entre la technique de dissection et de l'ELISA dans l'évaluation du réservoir infectieux

La comparaison faite entre la dissection au septième jour de l'infection pour la recherche des oocystes et l'ELISA CSP montre une prévalence des enfants infectieux à la dissection microscopique supérieure à celle des enfants infectieux au test ELISA au septième jour après le repas sanguin (66% contre 59,2%) (Tableau IV).

Tableau IV : Caractéristiques du réservoir infectieux en fonction de la technique utilisée

	Nombre de Jours depuis la prise du repas sanguin	Technique de détection de l'infection chez le moustique	Age		Total	Valeur de P
			[2-5 ans]]5-10ans]		
Prévalence d'enfants infectants (n/N)	7	Dissection	75 (18/24)	57,7 (15/28)	66 (33/50)	0,19
Prévalence d'enfants infectants (n/N)	7	ELISA	50 (12/24)	68 (17/25)	59,2 (29/49)	0,2
Prévalence d'enfants infectants (n/N)	14	ELISA	62,5 (15/24)	80 (20/25)	71,5 (35/49)	0,17
Prévalence cumulée d'enfants infectants (n/N)	14	ELISA	83,3 (20/24)	92,3 (24/26)	88 (44/50)	0,32

Par contre la prévalence des enfants infectieux à la dissection était inférieure à celle des enfants infectieux au test ELISA réalisé au quatorzième jour après le repas sanguin (66% contre 72,5%).

A la microscopie on a observé les enfants de 2 à 5 ans plus infectieux que ceux qui avaient plus de 5 ans. Par contre l'ELISA réalisé au septième et au quatorzième jour après la prise de repas sanguin indique les enfants de 2 à 5 ans moins infectieux que ceux âgés de plus de 5 ans.

Tableau V : Evaluation du taux d'infection anophelienne au cours de l'infection expérimentale de moustiques en fonction de la technique de détection

		Méthode de détection								
		Dissection				ELISA				
Durée incubation (jours)	7				Valeur de P	7	10	14	Valeur de P	
Lot	A	B	C	Total		AB	C	D	Total	
Nombre de Moustiques	2498	2497	2497	7492		980	980	980	2940	
% moustiques infectés (n/N)	13,7 (343/2498)	14,48 (352/2497)	14,5 (362/2497)	14,11 (1057/7492)	NS	12,45 (122/980)	17,55 (171/980)	19,08 (186/980)	16,29 (479/2940)	0,005
Médiane oocystes (IC)	3 (2-8)	4 (2-8)	4 (2-9)	4(2-9)	NS	-	-	-	-	-

Le pourcentage de moustiques infectés détectés à la dissection était de 14,12 %. La variation du pourcentage de moustiques infectés entre les 3 lots de moustiques n'était pas significative.

Aussi la densité d'oocystes contenus dans l'estomac des moustiques n'a pas varié de façon significative entre les 3 lots de moustiques que chaque volontaire infectait (**Tableau V**).

Par contre le pourcentage de moustiques infectés détectés au test ELISA variait en fonction du jour du test. Il a considérablement augmenté du septième jour (12,45%) au quatorzième jour (19,08%).

Une comparaison entre le pourcentage de moustiques infectés à la dissection et au test ELISA donne un pourcentage élevé à la dissection (14,12%) qu'au test ELISA réalisé au septième jour après le repas sanguin (12,45%). Mais le résultat des moustiques infectés au dixième jour (17,55%) et au quatorzième jour après le repas sanguin (19,08%) est chacun supérieur au pourcentage de moustiques infectés détectés à la dissection (**Tableau V**).

IV. Discussion

IV.1. Le réservoir infectieux du paludisme chez l'enfant de 2 à 10 ans

Nos résultats montrent que pendant la période de forte transmission 75% des enfants de l'étude sont infectés par *Plasmodium falciparum*. En plus d'être porteur de parasite la majorité ne présentait pas de signes cliniques à part 11,5% d'entre eux qui avaient une fièvre supérieure à 37,5°C ; montrant ainsi qu'en zone d'endémie des individus peuvent être porteurs asymptomatiques. Ce résultat est comparable à celui de Drakeley et al. 2000 ; Bousema et al. 2004 ; Eksi et al. 2006. Ce qui s'expliquerait par le fait que le système immunitaire au cours du temps parvient à contrôler l'infection à *Plasmodium*. L'exposition permanente leur a permis de développer une immunité les protégeant contre les formes cliniques de la maladie.

Parmi les porteurs de parasites, des porteurs de gamétocytes ont été identifiés ; suggérant que les enfants constituent un réservoir infectieux dans la transmission du *Plasmodium* (Drakeley et al. 2000, 2006 ; Ouédraogo et al. 2010).

La prévalence des trophozoïtes (formes asexuées) était supérieure à celle des gamétocytes. Ce qui est logique dans la mesure où les gamétocytes dérivent des trophozoïtes alors que tous les trophozoïtes ne donneront nécessairement pas de formes sexuées au cours de leur cycle de développement. Cette observation pourrait s'expliquer par le fait qu'au cours d'une infection le système immunitaire dirigé contre les formes asexuées, réduit ainsi leur charge. Par conséquent un très faible nombre seulement, qui aura échappé au système immunitaire serait capable d'évoluer jusqu'au stade gamétocyte. De même le processus de maturation des gamétocytes est tel que seul un très faible nombre de gamétocytes pourrait atteindre le stade mûre et être visible dans le sang périphérique.

Nous avons observé que la densité des gamétocytes et des trophozoïtes est plus élevée chez les plus jeunes. Cela s'explique par le fait que cette tranche d'âge ne bénéficie pas encore d'un système immunitaire mature et par conséquent le parasite peut se développer et atteindre souvent même des fortes densités parasitaires qui peuvent exposer ces jeunes enfants à des paludismes graves. A l'inverse, les sujets âgés qui ont été constamment exposés au *Plasmodium* pendant plusieurs années développent une immunité leur permettant de réduire considérablement les formes asexuées et conséquemment le risque de développer la maladie. Nos résultats montrent que la prévalence des gamétocytes diminue avec l'âge. Ce résultat est similaire à celui rapporté par Boudin et al. 1991 ; Githeko et al. 1992 ; Touré et al. 1998 ; Drakeley et al. 2000 ; Ouédraogo et al. 2007 ; Mabunda et al. 2008 . Cela pourrait s'expliquer

par le fait que chez les sujets jeunes le système immunitaire n'est pas suffisamment mature pour éliminer les gamétocytes. Contrairement aux sujets plus âgés, qui du fait de leur état de prémunition luttent mieux contre le parasite. Ce qui fait ainsi des sujets jeunes un réservoir infectieux non négligeable dans la chaîne de transmission du *Plasmodium* aux moustiques.

Dans cette étude, l'infectivité des gamétocytes a été définie comme leur capacité à infecter les moustiques. Lors des séances expérimentales d'infection de moustiques, nous avons obtenu à l'issue de la dissection un pourcentage de personnes infectants les moustiques de 66%, ce qui est comparable aux 62,3% trouvé par Sattabongkot *et al.* 1991, aux 62 % de Tchuinkam *et al.* 1994 et aux 62,5% de Ouédraogo *et al.* 2009 qui avait travaillé dans la même zone.

Le pourcentage de sujets infectants variait en fonction de l'âge. Les enfants de 2 à 5 ans étaient plus infectieux (75%) que les plus âgés (57,7%). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la prévalence et la densité des gamétocytes diminuent également avec l'âge.

L'analyse de nos résultats a également montré que le pourcentage de moustiques infectés augmentait avec la gamétocytémie de sujets naturellement exposés au paludisme. Des résultats similaires avaient déjà été apportés (Mulder *et al.* 1993 ; Gouagna *et al.* 2003 ; Schneider *et al.* 2006 ; Ouédraogo *et al.* 2009). Cela démontre que les gamétocytes constituent un facteur déterminant dans l'infection des moustiques. Des études utilisant des gamétocytes de culture confirment nos résultats (Schneider *et al.* 2006).

Cependant, nous avons observé qu'aucun repas infectant de moustiques n'a donné un taux d'infection de 100%. Ceci peut être dû au faible nombre de gamétocytes réellement ingérés par les anophèles ou à la présence de facteurs bloquant la transmission chez l'homme ou chez le vecteur. A l'inverse de faibles gamétocytémies (16 gamétocytes/ μ L) ont été souvent infectantes. Des études antérieures ont montrés que mêmes les gamétocytémies sub_microscopiques peuvent être infectantes pour les moustiques. (Schneider *et al.* 2007; Ouédraogo *et al.* 2009).

Un sujet apparemment non porteur de gamétocyte (non détectable au microscope) pourrait constituer un réservoir infectieux pour les moustiques.

Un total de 34% des sujets de l'étude n'était pas en mesure d'infecter les moustiques. Ces résultats sont comparables aux 38% de Tchuinkam *et al.* 1994 et aux 37% trouvés par Ouédraogo *et al.* 2009 ; suggérant la présence de facteurs bloquant la transmission tels que l'immunité naturelle bloquant la transmission.

En zone endémique certaines personnes développent des anticorps dirigés contre les antigènes sexués qui bloqueraient la transmission du *Plasmodium* de l'homme au moustique (Van der Kolk et al. 2006; Bousema T et al. 2010). Ces anticorps anti gamétocyte seraient capables de bloquer la suite du cycle du *Plasmodium* chez le moustique. Ainsi Graves et al. (1988a), Mulder et al. (1994) ; Bousema et al. 2010 ; Ouédraogo et al. 2011 ont montré la présence d'une immunité bloquant la transmission chez les sujets vivant en zone endémique d'Afrique et d'Asie.

Les anticorps dirigés contre Pfs 230 seraient capables de bloquer cette transmission (Graves et al. 1988b) mais aussi ceux dirigés contre Pfs 45/48 (Roeflen et al. 1994, 1996 ; Healer et al. 1999; Bousema et al. 2006a; Ouédraogo et al. 2011).

IV.2. Etude comparative entre la Microscopie et l'ELISA dans l'évaluation du réservoir infectieux

Au cours de l'infection expérimentale le sang de chaque participant a été testé avec trois lots de moustiques du même âge afin de déterminer la variation intra test du taux d'infection de moustiques. Cette variation n'était pas significative pour l'infection de moustiques car la proportion de moustiques infectés était similaire dans les gobelets du test. Vu ces résultats, le DMFA et en l'occurrence la technique de dissection pourrait être considéré comme une technique reproductible dans l'évaluation du réservoir infectieux.

L'ELISA réalisé sur des moustiques au 7^{ème}, 10^{ème} et 14^{ème} de l'infection montre une prévalence de l'infection quasi identique aux résultats de la dissection ; 64,62 % par le test ELISA contre 66% par la dissection. Ces résultats sont similaires à ceux déterminés par la dissection dont 62,3% trouvé par Sattabongkot et al. 1991, 62 % par Tchuinkam et al. 1994 et 62,5% par Ouédraogo et al. 2009 .

L'augmentation de la prévalence des sujets infectieux avec la durée d'incubation est due à une maturation des oocystes en sporozoïtes du 7^{ème} au 14^{ème} jour après la prise de repas sanguin. Un sujet déclaré non infectieux au 7^{ème} jour, peut le devenir avec la maturation des oocystes des moustiques qu'il a infectés. Les antigènes CSP deviendront facilement détectables et le sujet se trouve alors être infectieux pour les moustiques.

La durée d'incubation de moustiques expérimentalement infectés devient alors un élément à prendre en compte dans l'évaluation du réservoir infectieux. Plus on dure, plus on augmente les chances de trouver un moustique infecté et donc d'identifier les sujets infectieux.

Dans la présente étude nous avons effectivement montré que la proportion de sujets infectieux déterminés par ELISA a augmenté de 59 à 88% du 7^{ème} au 14^{ème} jour respectivement. Les résultats sur la proportion de sujets infectieux obtenus par ELISA au 10^{ème} et 14^{ème} jour comparativement à ceux au 7^{ème} jour de la dissection montrent que l'ELISA pourrait être une meilleure technique pour estimer le réservoir infectieux. Notre conclusion s'appuie sur le fait que l'ELISA permet d'aller jusqu'au 14^{ème} jour après le repas sanguin pour détecter les moustiques infectés alors qu'après le 7^{ème} jour la recherche d'oocystes par dissection devient quasi impossible pour estimer ce réservoir due à la transition de l'oocyste vers le sporozoïte.

Le choix de l'ELISA est renforcé au vu de sa sensibilité supérieure dans la détection de moustiques de moustiques infectés comparé à la dissection.

En plus de sa spécificité parce que qualitative, l'ELISA est plus rapide parce qu'il traite de plusieurs moustiques à la fois. Ce qui permet de gagner en temps dans le diagnostic de l'infection des moustiques. Aussi il ne demande pas une implication en nombre élevé de personnel comme dans le cas de la dissection et la lecture microscopique.

La présente étude visait à évaluer le réservoir infectieux chez les enfants de moins de 10 ans dans la province du Kourwéogo mais aussi de comparer deux techniques utiles dans la détermination du pourcentage de moustiques infectés au cours des infections expérimentales de moustiques. Nos résultats déterminés par la technique de la dissection du moustique montrent que 66% des sujets de l'étude constituent un réservoir infectieux du paludisme alors qu'il passe à 88% si les moustiques sont examinés par ELISA. Ces résultats montrent à quel point le paludisme est un problème de santé publique dans la population infantile mais également montre comment la transmission du paludisme est entretenue par cette même population infantile qui constitue un réservoir potentiel pour la dispersion du parasite dans la population. Des mesures de contrôle efficaces de l'infection et de sa transmission en particulier sont nécessaires pour en venir à bout et l'utilisation des infections expérimentales couplées de préférence à l'ELISA sera utile quand à l'évaluation de leur efficacité.

Conclusion

L'étude réalisée à Laye chez les enfants de 2 à 10 ans pendant la saison de forte transmission nous indique qu'environ 70% des enfants étaient porteurs de *Plasmodium* dont 35% de porteurs de formes sexuées du parasite (gamétocytes). Ce qui signifie que les enfants de 2 à 10 ans dans cette zone constituent un réservoir infectieux non négligeable dans la transmission du *Plasmodium*. La prévalence ainsi que la densité des gamétocytes a diminué avec l'âge. Par contre pour mieux détecter ce réservoir il serait judicieux d'associer les méthodes moléculaires de détection de gamétocytes sub_microscopiques tels que la QT_NASBA aux séances d'infections expérimentales de moustiques.

Parmi les porteurs de gamétocytes, 66% étaient infectieux pour les moustiques à la dissection réalisée au 7^{ème} jour de l'infection expérimentale. La proportion de personnes infectant les moustiques Ainsi que la proportion de moustiques infectés était plus important chez les enfants de 2 à 5 ans comparativement à leurs aînés. Par conséquent les enfants surtout les plus jeunes devront dormir sous les moustiquaires imprégnées d'insecticide pendant la période de forte transmission pour éviter de contracter le *Plasmodium* mais aussi pour éviter de le transmettre aux autres personnes de la localité.

Le dosage des antigènes CSP par la technique ELISA montre une prévalence de l'infection supérieure à celle trouvée par la dissection et augmentant avec la durée de l'incubation. Ce qui fait de l'ELISA la technique déterminant au mieux les moustiques infectés et les personnes infectieux.

La faible variation enregistrée entre les résultats d'un même individu permet de dire que le DMFA est reproductible. IL pourrait par conséquent être une solution palliative dans le suivi de l'efficacité des vaccins bloquant la transmission lorsqu'ils seront mis en essai sur le terrain ; mais aussi d'évaluer l'efficacité d'un traitement ou toute méthode de lutte visant la réduction de la transmission.

Le DMFA aura l'avantage de pouvoir être utilisé dans les pays en voies de développement, pays où les moyens logistiques et financiers ne permettent pas l'utilisation du SMFA à large échelle.

Pour comprendre pourquoi nos 34% de porteurs de gamétocytes n'infectaient pas les moustiques on pourrait doser les anticorps anti gamétocytes avec le sang des mêmes donneurs.

L'étude nous a montré une prévalence des sujets infectieux variant avec l'âge. Un échantillon plus important qui inclurait toutes les groupes d'âges jusqu'aux adultes permettrait de mieux appréhender cette variation en fonction de l'âge des porteurs.

Perspectives

Pour la suite de l'étude nous envisageons de :

- ❖ Faire une comparaison entre la performance de l'ELISA CSP dans le diagnostic d'une infection expérimentale et celle de la PCR.

- ❖ Doser les anticorps anti antigène gamétoctaire dans le sang des personnes vivants en zone endémique.

- ❖ Rechercher d'autres fractions d'antigènes gamétoctaires capable de bloquer la transmission de l'homme au moustique afin de pouvoir les inclure dans les candidats vaccins.

Bibliographie

1. **Amino R, Sabine Thiberge, Béatrice Martin, Susanna Celli, Spencer Shorte, Friedrich Frischknecht & Robert Ménard.** Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nat. Med.* 2006 12:220–224

2. **Athanase Badolo, Alphonse Traoré, Christopher M Jones, Antoine Sanou, Lori Flood, Wamdaogo M. Guelbégo, Hilary Ranson, N'Falé Sagnon.** Three years of insecticide resistance monitoring in *Anopheles gambiae* in Burkina Faso: resistance on the rise? *Malaria Journal* 2012, 11:232

3. **Arévalo-Herrera M, Solarte Y, Marin C, Santos M, Castellanos J, Beier J.C, Valencia S.H.** Malaria transmission blocking immunity and sexual stage vaccines for interrupting malaria transmission in Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011 ;106 Suppl 1:202-11

4. **Arévalo-Herrera M, Solarte Y, Zamora F, Mendez F, Yasnot M.F, Rocha L, Long C, Miller L.H, Herrera S.** *Plasmodium vivax*: transmission-blocking immunity in a malaria-endemic area of Colombia . *Am J Trop Med Hyg* 2005 ; 73: 38 – 43 .

5. **Boudin C, Olivier M, Molez J.F, Chiron J.P, Ambroise-Thomas P.** High human malarial infectivity to laboratory-bred *Anopheles gambiae* in a village in Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48(5):700-6

6. **Bousema T, Sutherland C.J, Churcher T.S, et al.** Human immune responses that reduce the transmission of *Plasmodium falciparum* in African populations. *Int J Parasitol* 2011.

7. **Bousema T, Drakeley C.J, Sauerwein R.W.** Sexual-stage antibody responses to *P. falciparum* in endemic populations. *Curr Mol Med* 2006; 6 (2):223-9

8. **Bruce-chwatt L.J and Zulueta J.** (1985). *Essential Malariology*. 2^e edition. Londres: William Hememann. Medical books 452p

9. **Costantini C, Ilboudo-Sanogo E, Couluzzi M. and Boccolini D.** (1999). Chromosomal and heterogeneities suggest incipient speciation in *Anopheles funestus* from BURKINA FASO. *Parasitologia*, 41,595-611

10. **Day K.P Hayward and Dyer M** The biology of *Plasmodium falciparum* transmission stages. *Parasitology* .1998,116, suppl.,S95-S109
11. **Dabiré K.R, Diabaté A, Namountougou M, Toé K.H, Ouari A, Kengne P, Bass C, Baldet T.** Distribution of pyrethroid and DDT resistance and the L1014F kdr mutation in *Anopheles gambiae* s.l. from Burkina Faso (West Africa). *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 2009 103(11):Epub1113-20.
12. **Diabate A, Baldet T, Chandre F, Akoobeto M, Guiguemde T.R, Darriet F, Brengues C, Guillet P, Hemingway J, Small G.J, Hougard J.M.** The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae*.s.l. in Burkina Faso *Am J Trop Med Hyg.* 2002, 67 (6):617-22.
13. **Drakeley C.J, N.I. Akim, R.W. Sauerwein, B.M. Greenwood, and G.A Targett.** Estimates of the infectious reservoir of *Plasmodium falciparum* malaria in The Gambia and in Tanzania. *Trans. R. Soc. Trop. Med.Hyg.* 2000, 94: 472–476.
14. **Drakeley C.J, Eling W, Teelen K, Bousema J.T, Sauerwein R, Greenwood B.M, Targett G.A.** Parasite infectivity and immunity to *Plasmodium falciparum* gametocytes in Gambian children. *Parasite Immunol.* 2004, 26: 159–165.
15. **Drakeley C.J, Sutherland C, Bousema J.T, Sauerwein R.W, Targett G.A.** The epidemiology of *Plasmodium falciparum* gametocytes: weapons of mass dispersion. *Trends Parasitol* 2006;22 (9):424-30.
16. **Del Nero L, Lamizana L, Pietra V, Rotigliano G.** A national survey of the prevalence of Chloroquine resistance *Plasmodium falciparum* in Burkina Faso. *J. Trop. Med. Hyg.*,1993 96:186-190.
17. **Frevert U, Usynin I, Baer K, and Klotz C.** Nomadic or sessile: can Kupffer cells function as portals for malaria sporozoites to the liver? *Cell.Microbiol*, 2006, 8:1537–1546

18. **Gentilini M.** Le paludisme: Médecine tropicale. 5^e édition. Paris : Flammarion, 1993,91-122
19. **Gouagna L.C, Okech B.A, Kabiru EW, Killeen G.F, Obare P, Ombonya S, Bier J.C, Knols B.G, Githure J.I, Yan G.** Infectivity of *Plasmodium falciparum* gametocytes in patients attending rural health centres in western Kenya. *East Afr Med J* 2003; **80(12):627-34**
20. **Guiguemde T.R.** Evaluation de la chimiorésistance, paludisme. *Ellipses /Aupelf, Marketing / Ellipses*, 1994,193-195.
21. **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** .Measurement of malarial infectivity of human populations to mosquitoes in the Madang area, Papua, New Guinea. *Parasitology* 1988; **96 (Pt 2):251-63**
22. **Githeko A.K, Bennett A.D, Beier M, Atieli F, Owaga M, Collins F.H:** The reservoir of *Plasmodium falciparum* malaria in a holoendemic area of western Kenya. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1992, **86:355-358.**
23. **Habluetzel A, Cuzin N, Diallo A, Nebie I, Cousens S.N and Esposito F,** Insecticide – treated curtains reduce the prevalence and intensity of malaria infection in Burkina Faso. *Trop Med Int Health* 1999(4) :557-564
24. **Healer J, Mc Guinness D, Carter R, Riley E.** Transmission-blocking immunity to *Plasmodium falciparum* in malaria-immune individuals is associated with antibodies to the gamete surface protein Pfs230. *Parasitology* 1999; **119 (Pt 5):425-33**
25. **Hurtado S , Salas M.L , Romero JF , Zapata J.C , Ortiz H , Arévalo-Herrera M , Herrera S.** Regular production of infective sporozoites of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* in laboratorybred *Anopheles albimanus*. *Ann Trop Med Parasitol* , 1997, **91: 49– 60.**
26. **Lensen A, Van Druten J, Bolmer M, Van Gemert G, Eling W and Sauerwein R.** Measurement by membrane feeding of reduction in *Plasmodium falciparum* transmission induced by endemic sera. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 1996 (**90**) : 20-22.

27. **Mabunda S, S. Casimiro, L. Quinto, and P. Alonso.** A country-wide malaria survey in Mozambique. I. Plasmodium falciparum infection in children in different epidemiological settings. *Malar.J.*, 2008, 7:216
28. **Majori G, Sabatinelli G. and Coluzzi M.** Efficacy of permethrin impregnated curtains for malaria vector control. *Medical veterinary Entomology*, 1987(1) :185-192
29. **Mulder B, Tchuinkam T, Dechering K, Verhave J.P, Carnevale P, Meuwissen J.H, Robert V.** Malaria transmission-blocking activity in experimental infections of *Anopheles gambiae* from naturally infected *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; **88** (1):121-5.
30. **Mulder B, Lensen T, Tchuinkam T, Roeffen W, Verhave J.P, Boudin C, Sauerwein R.** Plasmodium falciparum : membrane feeding assays and competition ELISAs for the measurement of transmission reduction in sera from Cameroon. *Exp Parasitol* 1999; **92** (1):81-6
31. **Ouedraogo A.L, Schneider P, De Kruijf M et al.** 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* 2007; **76** (4):626-30.
32. **Ouedraogo A.L, Bousema T, Schneider P, et al.** Substantial contribution of submicroscopical *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage to the infectious reservoir in an area of seasonal transmission. *PLoS One* 2009; **4** (12):e8410
33. **Ouédraogo A.L, Roeffen W, Luty AJ, de Vlas SJ, Nebie I, Ilboudo-Sanogo E, Cuzin-Ouattara N, Teelen K, Tiono AB, Sirima SB, Verhave J.P, Bousema T, Sauerwein R.** Naturally acquired immune responses to *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens Pfs48/45 and Pfs230 in an area of seasonal transmission. *Epub* 2011; **79** (12):4957-64.
34. **Organisation Mondiale de la Santé:** Directives pour le traitement du paludisme (1^{ère} édition) 2006
35. **Organisation Mondiale de la Santé, rapport** 2007
36. **Organisation Mondiale de la Santé, rapport** 2011
37. **Petraca V, Petrangelli G, R Ossi P, Sabatinelli G.** Antimalarial campaign program in Ouagadougou (Burkina Faso): The *Anopheles gambiae* complex in the city of

OUAGADOUGOU and surrounding villages. *Annali Dell Istituto Superiore Di Sanita*, 1996
22 (1) : 189-191

38. Programme National de Lutte contre Paludisme (BF) 2007

39. Ponnudurai T, Lensen A.H, Bensink M.P.E and Meuwissen J.H. - Infectivity of cultured *Plasmodium falciparum* gametocytes to mosquitoes. *Parasitology*,1989, **98**, 165-173.

40. Ponnudurai T, Lensen A.H, van Gemert G.J, Bolmer M.G, Meuwissen J.H. Feeding behaviour and sporozoite ejection by infected *Anopheles stephensi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1991;**85** (2):175-80.

41. Ponnudurai T, Verhave J.P, Meuwissen J.H. Mosquito transmission of cultured *Plasmodium falciparum*.*Trans R Soc Trop Med Hyg* 1982;**76**(2):278-9.)

42. Quakyi LA, Carter R, Rener J, Kumar N, Good M.F, Miller L.H. The 230-kDa gamete surface protein of *Plasmodium falciparum* is also a target for transmission-blocking antibodies. *J Immunol* 1987;**139** (12):4213-7.

43. Roch K Dabiré, Moussa Namountougou, Simon P Sawadogo, Lassina B Yaro, Hyacinthe K Toé, Ali Ouari, Louis-Clément Gouagna, Frédéric Simard, Fabrice Chandre, Thierry Baldet, Chris Bass and Abdoulaye Diabaté. Population dynamics of *Anopheles gambiae*.s.l. in Bobo-Dioulasso city: bionomics, infection rate and susceptibility to insecticides.*Parasites & Vectors* 2012, **5**:127

44. Roeffen W, Lensen T, Mulder B, 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 Cruz* 1994;**89** Suppl 2:13-5

45. Roeffen W, Geeraedts F, Eling W, et al. Transmission blockade of *Plasmodium falciparum* malaria by anti-Pfs230-specific antibodies is isotype dependent. *Infect Immun* 1995;**63** (2):467-71)

- 46. Roeffen W, Mulder B, Teelen K, Bolmer M, Eling W, Targett G.A, Beckers P.J, Sauerwein R.** Association between anti-Pfs48/45 reactivity and *P. falciparum* transmission-blocking activity in sera from Cameroon. *Parasite Immunol* 1996; 18(2):103-9.
- 47. Schneider P, Bousema J.T, Gouagna L.C, Otieno S, van de Vegte-Bolmer M, Omar S.A, Sauerwein R.W** Submicroscopic *Plasmodium falciparum* gametocyte densities frequently result in mosquito infection. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 76 (3): 470-4
- 48. Toure Y.T, Doumbo O, Toure A, Bagayoko M, Diallo M, Dolo A, Vernick K.D, Keister D.B, Muratova O, Kaslow D.C.** 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.* 1998; **59**: 481–486.
- 49. Van der Kolk M, de Vlas S.J, Sauerwein R.W.** Reduction and enhancement of *Plasmodium falciparum* transmission by endemic human sera. *Int J Parasitol* 2006; **36**(10-11):1091-5.
- 50. Vanderberg J.P, and Frevert U,** Intravital microscopy demonstrating antibody-mediated immobilisation of *Plasmodium berghei* sporozoites injected into skin by mosquitoes. *Int. J. Parasitol* 2004; **34**:991–996.

Annexes

Formulaire de consentement informé

Titre de l'étude : Transmission de *Plasmodium falciparum* de l'Homme au moustique : La PCR comme outil moléculaire de mesure du taux d'infection anophelienne au cours des infections expérimentales de moustiques

L'équipe de recherche m'a expliqué le but et les procédures de l'étude, ainsi que les risques et les bénéfices auxquels je puis m'attendre. J'ai compris et accepte adhérer ou que mon enfant adhère à ce qui suit :

1. C'est à moi de décider de participer ou que l'enfant participe à cette étude et je peux me retirer ou retirer l'enfant à chaque moment sans aucun préjudice.
2. L'étude durera le temps qu'il faudra et j'ai besoin d'être disponible pendant cette période
3. J'ai lu (écouté) l'information et j'ai reçu une copie des explications du consentement et l'équipe de recherche m'a donné l'opportunité de poser des questions pour ma compréhension.
4. Si j'ai d'autres questions, je devrais contacter Dr. Ouédraogo André Lin au Standard : 50 32 46 95/96

Nom du participant..... **Age** :ans

Nom du parent/tuteur légal :

Numéro de la concession : **Nom du village** :

Date : / / 2007 **Signature /Empreinte digitale du parent/tuteur**

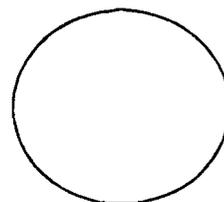
Nom du témoin:..... **Age** : ans

Date : / / 2007 **Signature** du **témoin**

.....

Nom de l'investigateur ayant recueilli le consentement :

Date : / / 2007 **Signature de l'investigateur**



PROTOCOLE D'ELEVAGE DE MOUSTIQUE

Le protocole d'élevage des moustiques comporte quatre grandes parties :

I. Les conditions de la maison

II. Le matériel

III. L'alimentation

IV. La fiche technique appliquée par jour

I. CONDITIONS

L'élevage des moustiques à l'insectarium se fait dans les conditions suivantes :

- **L'humidité doit être de 70% à 80%**

Un courant d'air permet d'augmenter l'humidité dans la salle. Ce courant d'air est provoqué par la ventilation d'un bassin d'eau situé au plafond du bâtiment. Un hygromètre permet de contrôler l'humidité chaque jour.

- **La température doit être de 27 à 30°C**

Elle est réglée pendant le froid par un chauffage électrique et pendant la chaleur par un climatiseur. Le contrôle de la température se fait à l'aide d'un thermomètre.

- **La lumière**

La lumière électrique est programmée de 6H à 18H et éteinte de 18H à 6H. Le temps est mesuré à l'aide d'un chronomètre.

II. Matériel

Le matériel d'élevage des moustiques est composé comme suit :

- Cages couvertes de moustiquaires fines pour garder les moustiques
- Bacs en plastiques pour la ponte des œufs et le développement larvaire
- Tamis pour recueillir les larves quand l'eau est sale
- Pipettes pour prélever les nymphes (dernier stade de la larve)
- Aspirateur électrique pour transférer les moustiques dans une nouvelle cage afin de laver les toiles des cages sales
- Piles pour aspirateur
- Coton pour l'imbibition d'eau sucrée pour l'alimentation des moustiques
- Eau de javel pour désinfecter les bacs
- Savon pour laver les toiles, les bacs et les couvercles

PROTOCOLE D'ELEVAGE DE MOUSTIQUE

Le protocole d'élevage des moustiques comporte quatre grandes parties :

I. Les conditions de la maison

II. Le matériel

III. L'alimentation

IV. La fiche technique appliquée par jour

I. CONDITIONS

L'élevage des moustiques à l'insectarium se fait dans les conditions suivantes :

- **L'humidité doit être de 70% à 80%**

Un courant d'air permet d'augmenter l'humidité dans la salle. Ce courant d'air est provoqué par la ventilation d'un bassin d'eau situé au plafond du bâtiment. Un hygromètre permet de contrôler l'humidité chaque jour.

- **La température doit être de 27 à 30°C**

Elle est réglée pendant le froid par un chauffage électrique et pendant la chaleur par un climatiseur. Le contrôle de la température se fait à l'aide d'un thermomètre.

- **La lumière**

La lumière électrique est programmée de 6H à 18H et éteinte de 18H à 6H. Le temps est mesuré à l'aide d'un chronomètre.

II. Matériel

Le matériel d'élevage des moustiques est composé comme suit :

- Cages couvertes de moustiquaires fines pour garder les moustiques
- Bacs en plastiques pour la ponte des œufs et le développement larvaire
- Tamis pour recueillir les larves quand l'eau est sale
- Pipettes pour prélever les nymphes (dernier stade de la larve)
- Aspirateur électrique pour transférer les moustiques dans une nouvelle cage afin de laver les toiles des cages sales
- Piles pour aspirateur
- Coton pour l'imbibition d'eau sucrée pour l'alimentation des moustiques
- Eau de javel pour désinfecter les bacs
- Savon pour laver les toiles, les bacs et les couvercles bacs

- Scotch et marqueurs pour l'étiquetage des cages selon l'espèce et la souche
- Papier buvard pour la préparation des pontes
- Des pots et des assiettes de pontes (les pots servent à recueillir les nymphes et les assiettes pour la préparation des pontes)
- Incubateur pour l'éclosion rapide des œufs
- Une bassine pouvant contenir 40 à 50 bacs pour la désinfection à l'aide d'eau de javel.

II. ALIMENTATION DES MOUSTIQUES

Pour l'élevage des larves de moustiques, on utilise des croquettes de chat encore appelé Friski.

Les adultes sont nourris à l'aide d'eau sucrée. Le moustique a besoin de sang pour la maturation des ovaires. Le lapin et le poulet sont utilisés pour le repas sanguin.

On remarque généralement que les moustiques prennent leur repas sanguin la nuit entre 18H 30 et 22H 30. Le coton imbibé d'eau sucrée est placé au-dessus de la cage contenant les moustiques et doit être remplacé chaque deux jours.

Pour le repas sanguin le coton imbibé d'eau sucrée est retirée 12H à l'avance pour permettre la digestion complète du sucre. Le lapin ou le poulet immobilisé à l'aide d'un piège est rasé au niveau de l'abdomen pour faciliter la prise de repas sanguin. Le lapin ou le poulet est ensuite placé au-dessus de la cage jusqu'à ce que les moustiques se gorgent.

IV. FICHE TECHNIQUE APPLIQUEE PAR JOUR

Le matin le technicien contrôle l'hygromètre, le thermomètre et le chronomètre pour voir s'ils n'ont pas été déprogrammés par une panne d'électricité. Une fois que les conditions expérimentales sont réunies, le travail se déroule selon les étapes suivantes :

➤ Elevage des larves :

- Enlever les couvercles selon l'espèce et la souche
- Prélever les nymphes à l'aide d'une pipette et les placer dans des pots. Ces pots sont ensuite déposés dans des cages préalablement étiquetées.
- Recueillir les larves avec des tamis correspondant à chaque stade larvaire et les transférer dans de nouveaux bacs contenant de l'eau de forage.

NB : Pour accélérer le développement des larves on peut augmenter le nombre de bacs.

- Mettre une quantité suffisante de croquette dans chaque bac.

➤ **Elevage des adultes**

Préparer l'eau sucrée selon les indications suivantes : 5 carreaux de sucre pour un litre d'eau de forage.

- Tremper des morceaux de coton dans l'eau sucrée et les placer au-dessus des cages contenant les moustiques.
- Retirer les assiettes de ponte dans les cages où les moustiques ont pondus.
- Prélever les moustiques morts et ajouter un peu d'eau de forage dans les assiettes.
- Placer les assiettes de ponte et les œufs dans l'incubateur pendant 24 heures pour l'éclosion.
- Préparer des bacs désinfectés à l'eau de javel en fonction du nombre de ponte mis dans l'incubateur la veille.
- Mettre dans chaque bac 2 litres d'eau de forage, d'eau de robinet, d'eau distillée selon l'espèce à élever.

NB : L'eau de forage est utilisée pour *An. gambiae*, l'eau distillée pour *An. funestus* et l'eau de robinet pour les autres espèces.

- Coller du papier buvard au bord du bac pour éviter que les œufs ne touchent le plastique qui entraîne un faible taux d'éclosion.
- Retirer soigneusement la ponte d'œufs de l'assiette à l'aide d'une pince plongée dans l'eau de bac.
- Mettre un morceau de croquette dans chaque bac et les couvrir avec les couvercles bacs.
- Le soir avant la descente : vérifier si il ya des nymphes à prélever ou si il faut ajouter les croquettes par bac.
- Aspirer les moustiques morts et laver les cages s'il le faut.

Observations sur l'alimentation

Nous utilisons deux types d'aliments pour les larves : les croquettes et Tétramin Baby. Cependant on a remarqué que les croquettes présentent plusieurs avantages par rapport au Tétramin Baby. Elles favorisent la croissance rapide des larves et les adultes sont en bonne santé.