

La liste des abréviations

% : pourcentage

ACL2: arthropod containment level II

An: *Anopheles*

C: Combinaison

CD4 : Cluster de Différenciation 4

CD8 : Cluster de Différenciation 8

CNTS: Centre National de Transfusion Sanguine

CSP : protéine majeure de surface du sporozoïte

DMFA: Direct Membrane Feeding Assay

DSF: Direct Skin Feeding

EGF: *epidermal growth factor*

Fig: figure

FMOS : Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie

FVR: Fièvre de la Vallée du Rift

GE: goutte épaisse

J1: premier jour

J2: deuxième jour

L1: larve stade I

L2: larve stade II

L3: larve stade III

L4: larve stade IV

LSA1: Liver Stage Antigen 1

Max: maximum

Min: minimum

ml: millilitre

MRTC: Malaria Research and Training Center

MSP1: Mérozoïte Surface Antigen 1

MSP3: Mérozoïte Surface Antigen 3

MSP4: Mérozoïte Surface Antigen 4

N : nombre de moustique

NIH: National Institutes of Health (*Instituts américains de la santé*)

O.H.V.N: Office de la Haute Vallée du Niger

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

P: *plasmodium*

P19: partie de la protéine de la MSP1

Pfs230: protéine de surface de *plasmodium falciparum* de 230 kDa

Pfs25: protéine de surface de *plasmodium falciparum* de 25 kDa

Pfs48/45: combinaison de protéines de surface de *plasmodium falciparum* de 48 kDa et 45 kDa

RTS, S : Région centrale de la CSP, cellules T, Surface d'hépatite B et la protéine « S »

s.l: *sens large*

s.s: *sens strict*

TBV: Vaccins de Blocage de la Transmission

TDR: Test Diagnostic Rapide

TMJ : Temps de mise à jeun

Ug: microgramme

UI : microlitre

UNICEF: Fonds des Nations Unies pour l'enfance

USA: United States of America

VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine

Table des matières

<i>Dédicaces</i>	III
<i>Remerciements</i>	VI
HOMMAGE AUX MEMBRES DU JURY	XII
La liste des abréviations	XVII
La liste des figures	XXI
La liste des tableaux	XXII
1. Introduction	1
Objectif général	4
Objectifs spécifiques :	4
Gorgement direct sur la peau	4
Gorgement direct sur membrane	4
2. Généralité	5
2.1. Population anophelienne et transmission du paludisme	5
2.1.1. Le complexe <i>Anopheles gambiae</i>	5
2.1.2. La population vectrice au Mali	5
2.2. Cycle de vie du moustique anophèle	6
2.2.1. La reproduction - la ponte	6
2.2.2. La vie aquatique	6
2.2.3. L'adulte	6
2.3. Le cycle biologique des plasmodies	7
2.3.1. La schizogonie	7
2.3.1.1. La phase hépatique	7
2.3.1.2. La Phase sanguine	8
2.3.2. La sporogonie – cycle du parasite chez l'anophèle femelle	9
2.4. Infestations expérimentales	10
2.4.1. Définitions	10
2.4.2. Buts	11
2.4.3. Intérêts	11
2.4.4. Historique et applications	11
2.4.5. Les méthodes de détermination de l'infectivité	13
2.5. Les antigènes de l'immunité du blocage de la transmission du paludisme	13
2.5.1. Les antigènes de pré-fécondation	14
2.5.2. Les antigènes de post-fécondation	14
2.5.3. La chitine comme antigène	16
2.6. Les candidats vaccins au stade hépatique	16
2.6.1. Le Candidat vaccin des cellules immunitaires CD4 et CD8	16
2.6.2. La CSP ou Circumsporozoite Protein	16
2.6.3. Les autres candidats au stade mérozoïte	17
2.7. Les candidats vaccins au stade érythrocytaire	17
2.7.1. Antigène de surface du mérozoïte - MSP3	17
2.7.2. Antigène de surface du mérozoïte - MSP1	17
2.7.3. Antigène de surface du mérozoïte - MSP4	18
3. Méthodologie	19
3.1. Type et période d'étude	19
3.2. Site d'étude	19
3.2.1. Description et justification du site d'étude	19

3.2.2. Historique	20
3.2.3. Caractéristiques climatiques et relief	21
3.2.4. Démographie	21
3.2.5. Économie	22
3.2.6. Infrastructures	22
3.3. Personnel de l'étude	22
3.4. Population d'étude	22
3.4.1. Description	22
3.4.2. Échantillonnage	23
3.4.3. Critères d'inclusion et critères de non inclusion	23
3.5. Élevage des moustiques et mesures de biosécurité de la fourniture de sang	24
3.6. Optimisation des essais de gorgement direct	26
3.6.1. Tri des moustiques pour le gorgement	26
3.6.2. Transport et conservation des moustiques sur le terrain	27
3.6.3. Mise à jeun	28
3.6.4. Sélection des porteurs de gamétocytes	28
3.6.4. Gorgement	29
3.6.4.1. Localisation anatomique (l'avant-bras, le mollet et la cheville)	29
3.6.4.2. Période de gorgement	29
3.6.4.3. Retrait des moustiques non gorgés	30
3.6.4.4. Technique de dissection	30
3.6.4.5. Détermination de la taille des moustiques	31
3.7. Optimisation de gorgement sur membrane	32
3.7.1. Catégorie d'âge des moustiques	32
3.7.2. Mise à jeun des moustiques ou « Starvation » en anglais	32
3.7.3. Type de membrane	33
3.7.4. Gorgement	33
3.8. Les paramètres à mesurer pour les comparaisons	34
3.9. Considérations éthiques	35
3.10. Saisie et analyse des données	35
4. Résultats	36
4.1. Gorgement direct sur la peau	36
4.1.1. Localisation anatomique (l'avant-bras, le mollet et la cheville)	36
4.1.2. Période de gorgement	37
4.2. Gorgement direct sur membrane	37
4.2.1. Mesure des variabilités liées à l'âge, au temps de mise à jeun et la taille pouvant influencer sur la susceptibilité à l'infection	37
4.2.2. Comparaison des types de membrane (parafilm et baudruche)	41
5. Discussion	42
5.1. Gorgement	42
5.2. Survie	43
5.3. Infection	44
5.4. Comparaison taille / l'infection	45
6. Conclusions et recommandations	45
6.1. Conclusions	45
6.2. Recommandations	46
Résumé	47
Références bibliographiques	50

La liste des figures

Figure 1: cycle biologique des moustiques _____	7
Figure 2: cycle des Plasmodium _____	9
Figure 3: Photos montrant les oocystes présents dans l'estomac de moustique coloré au mercurochrome. _____	12
Figure 4: carte schématique du village de Bancoumana montrant la localisation des concessions et les différentes infrastructures _____	19
Figure 5: photo montrant une séance de tri des moustiques _____	27
Figure 6: photo montrant le mode de conservation des moustiques sur le terrain _____	28
Figure 7 : photo montrant une séance de gorgement direct sur la peau des volontaires _____	29
Figure 8: photo d'une aile d' <i>Anopheles gambiae</i> s.l montrant la distance mesurée pour la détermination de la taille de l'anophèle. (Photo de Hervy et al., CD ROM IRD) _____	31
Figure 9: photo montrant une séance de gorgement direct sur membrane _____	34

La liste des tableaux

<i>Tableau 1: comparaison des taux de gorgement, de survie et d'infection en fonction des différentes localisations anatomiques</i>	36
<i>Tableau 2: comparaison des taux de gorgement, de survie et d'infection en fonction des périodes de gorgement</i>	37
<i>Tableau 3: comparaison des taux de gorgement, de survie et d'infection en fonction de l'âge.</i>	37
<i>Tableau 4: comparaison des taux de gorgement, de survie et d'infection en fonction de temps de mise à jeun (8H, 14H et 20H) pour les moustiques de 3 jours</i>	38
<i>Tableau 5: comparaison des taux de gorgement, de survie et d'infection en fonction de temps de mise à jeun (8H, 14H et 20H) pour les moustiques de 6 jours</i>	39
<i>Tableau 6: comparaison des taux de gorgement, de survie et d'infection en fonction de temps de mise à jeun (8H, 14H et 20H) pour les moustiques de 9 jours</i>	39
<i>Tableau 7: comparaison des taux de gorgement, de survie et d'infection en fonction de temps de mise à jeun</i>	40
<i>Tableau 8: Comparaison des taux de gorgement, de survie et d'infection en fonction de types de membrane (parafilm et baudruche)</i>	41
<i>Tableau 9: Comparaison entre la taille des moustiques infectés et non-infectés</i>	41

1. Introduction

Le paludisme constitue un problème majeur de santé publique dans le monde et en particulier au Mali. Il est dû à un hématozoaire du genre *Plasmodium*, qui est transmis par la piqûre infectante d'un anophèle femelle à l'être humain. Il existe d'autres modes de transmission: la transfusion sanguine, la voie transplacentaire (de la mère au fœtus) et la voie congénitale (OMS, 1964).

Il existe cinq espèces plasmodiales pathogènes pour l'être humain: *P. malariae* (Laveran, 1881), *P. vivax* (Grassi et Feletti, 1890), *P. falciparum* Welch 1897, *P. ovale* Stephens 1922 (OMS, 1964) et *P. knowlesi* Knowles 1932 (Servonnet et al., 2012). En Afrique elles sont majoritairement transmises par cinq espèces d'anophèles : *Anopheles (An) gambiae s.l.*, *An. funestus*, *An. nili*, *An. moucheti* et *An. mascarensis* (Fontenille et al., 2003). Au Mali, la transmission est hétérogène du fait des variations écoclimatiques et est assurée par *An. gambiae s.l.* (vecteur principal) et *An. funestus* (Touré, 1979).

En 2015, l'OMS a rapporté environ 3,2 milliards de personnes exposées au paludisme dans 96 pays et territoires. Les estimations font état de 214 millions d'épisodes palustres en 2015. Le nombre de décès dû au paludisme est estimé à 438 000 décès en 2015, dont 90 % dans la région Afrique de l'OMS (OMS, 2015). A l'échelle mondiale, 70 % de ces décès imputables au paludisme frappent les enfants âgés de moins de 5 ans (OMS, 2015).

Au Mali, pays d'endémie palustre, 90% de la population soit 15 400 000 personnes sont exposées à une forte transmission ($> 1/1000$ cas) et 10% à une faible transmission (0-1/1000 cas) en 2015. Les évaluations ont dénombré 2 039 853 cas confirmés de paludisme et qui ont conduit à 2 309 décès signalés en 2015 (OMS, 2015).

L'impact socio-économique du paludisme est très important, il peut se mesurer par la morbidité et la mortalité. L'appauvrissement des populations (avec une baisse du produit intérieur brut de près de 1,3 % dans les pays à forte transmission) est dû à la morbidité et la mortalité ou à une perte de main d'œuvre. Les coûts financiers sont très élevés (40% des dépenses publiques de santé dans les pays de forte endémicité). Le financement de la lutte antipalustre a été multiplié par 10 depuis 2010, s'élevant à 1,5 milliards de dollars US (Aubry, 2014).

L'OMS, dans ses recommandations pour la prévention et la réduction de la morbidité, a proposé un ensemble d'interventions de base qui sont : la lutte antivectorielle, la chimioprévention, les

tests de diagnostic et le traitement. L'accroissement de la résistance des parasites aux médicaments antipaludiques, la difficulté à adopter et à mettre en œuvre une chimioprevention suffisante, une couverture large en moustiquaires imprégnées et la résistance accrue des moustiques aux insecticides nécessitent la mise au point de nouvelles approches de lutte en vue d'aboutir à une élimination et une éventuelle éradication du paludisme.

L'une des approches nouvelles est le développement des vaccins antipaludiques qui doivent venir compléter l'arsenal d'outils disponibles et y occuper une place importante. Plusieurs vaccins candidats aux modes d'action distincts sont actuellement à différents stades de développement. Parmi ces vaccins, figurent les vaccins bloquant la transmission (TBV) du parasite de l'hôte humain au moustique: Ces vaccins induisent des anticorps qui empêchent la maturation des stades sexués du parasite chez le moustique. De tel vaccin contribuerait également à empêcher l'apparition des parasites pharmacorésistants et/ou de variants susceptibles d'échapper à d'autres vaccins, ciblant les stades sanguins asexués et les stades pré-érythrocytaires qui sont partiellement efficaces (Engers, 2001). Ainsi un vaccin qui pourra interrompre la transmission de *P. falciparum* serait une ressource précieuse dans le combat contre le paludisme (Greenwood *et al.*, 2009).

A la surface de *Plasmodium falciparum* au stade sexuel sont exprimés les antigènes Pfs25, Pfs48/45 et Pfs230. Les anticorps contre ces antigènes ont montré une activité de blocage du développement du parasite. Ces candidats vaccins peuvent être une stratégie réalisable pour réduire le fardeau du paludisme dans les zones endémiques (Coutinho-Abreu et Ramalho-Ortigao, 2010). Avec une couverture large, ces vaccins pourraient réduire la transmission du paludisme dans les régions d'endémie en réduisant le nombre de moustiques infectants (Engers, 2001). Cependant ces vaccins sont à des premières phases de test et leur évaluation reste une question essentielle. En effet à la date d'aujourd'hui ce sont les infections expérimentales qui restent les outils disponibles pour l'évaluation des TBV.

Deux types de technique d'infection sont couramment utilisés pour détecter l'activité de blocage de la transmission: le gorgement direct sur la peau du porteur de gamétocyte appelé gorgement direct sur la peau ou « direct skin feeding » en anglais (DSF) et le gorgement direct à travers une

membrane ou « direct membrane feeding assay » (DMFA). Le DSF a l'avantage de simuler plus la situation naturelle tandis que le DMFA utilise le sang prélevé sur le porteur de gamétocytes (Bousema et al., 2006a). Un autre type d'infection appelé gorgement standard sur membrane est utilisé mais uniquement au laboratoire, cette dernière technique utilise les parasites de culture. S'ils restent pour le moment les seuls outils disponibles d'évaluation des vaccins de blocage de la transmission. Il a été constaté qu'il y a nécessité de les améliorer malgré quelques résultats solides. L'infection expérimentale des anophèles par les *plasmodies* est une technique difficile, mais ce n'est pas une fin en soi (Klein et al., 1991). Il s'agit d'un outil mis au point pour étudier les facteurs qui déterminent la transmission hôte humain-vecteur du parasite (Boudin et al., 1993). Ainsi, une étude multicentrique d'infestation de cinq pays d'endémie palustre dont le Mali a réussi à infester au moins un moustique dans 62,0 % des essais de gorgement. Dans les gorgements directs sur la peau et par membrane, 66,8% d'infestation ont été infectieux pour au moins un moustique. Les taux d'infection ont été plus élevés dans le gorgement direct, mais il y avait une forte association positive entre les gorgements directs sur la peau et par membrane. Environ 66,0 % de porteurs de gamétocytes ont été infectants pour les moustiques (Bousema et al., 2012).

Cependant, ces méthodes présentent un faible taux d'infection et souffrent de quelques insuffisances pour nous permettre de confirmer de manière fiable l'existence de l'activité de blocage de la transmission dans les populations endémiques (Bousema et al., 2006b). A cet effet, plusieurs questions fondamentales sur les variabilités liées aux essais (la période de la journée, la localisation anatomique ou la partie du corps exposée, l'âge des moustiques, le temps de mise à jeun et le type de membrane) restent jusqu'ici sans réponses. Ces variabilités rendent difficile l'évaluation des vaccins bloquant la transmission (TBV) et la comparaison des résultats entre les laboratoires. D'où la nécessité d'optimiser les paramètres cités ci-dessus. Ces rendements permettront l'acquisition des compétences pour améliorer les essais de gorgement, enfin d'augmenter le taux d'infection. Les résultats obtenus permettront d'améliorer l'évaluation des vaccins bloquant la transmission du paludisme et de compléter les études d'infestations précédentes.

Ainsi donc, le but de ce travail est d'optimiser les essais de gorgement pour une meilleure évaluation des candidats vaccins bloquant la transmission du paludisme. Pour atteindre ce but les

objectifs suivants ont été fixés.

Objectif général

- Optimiser les essais de gorgement d'*Anopheles gambiae* pour une meilleure évaluation des vaccins bloquant la transmission du paludisme.

Objectifs spécifiques :

Gorgement direct sur la peau

- Déterminer la meilleure localisation anatomique (l'avant-bras, le mollet et la cheville) pour un meilleur gorgement des moustiques
- Déterminer la période de gorgement des moustiques

Gorgement direct sur membrane

- Déterminer l'âge idéal, le temps de mise à jeun et la taille des moustiques qu'il faut pour un meilleur gorgement et une meilleure infection des moustiques
- Comparer le gorgement sur membrane en baudruche et le gorgement sur membrane en parafilm.

2. Généralité

2.1. Population anophélienne et transmission du paludisme

La transmission des *Plasmodium* et la biologie des principaux vecteurs en Afrique sont connues dans leurs grandes lignes depuis plus de 50 ans (Macdonald, 1957).

2.1.1. Le complexe *Anopheles gambiae*

Le complexe *An. gambiae* regroupe aujourd'hui neuf espèces : *An. gambiae s.s* (Giles 1902), et *Anopheles arabiensis* (Patton 1905), sont les deux vecteurs majeurs de *Plasmodium* en Afrique ; il y a d'autres espèces comme :

An. colluzzi Coetzee & Wilkerson 2013

An. amharicus Hunt, Wilkerson & Coetzee 2013

An. merus (Dönitz 1902)

An. melas (Theobald 1903)

An. quadriannulatus (Theobald 1911)

An. bwambae (White 1985)

An. comorensis (Brunhes le Goff & Geoffroy 1997)

Les espèces *An. melas*, *An. merus*, *An. bwambae*, *An. quadriannulatus*, ont un rôle faible ou nul dans l'épidémiologie de la transmission du paludisme. Leur distribution à l'échelle de l'Afrique est localisée. En revanche, *An. gambiae* et *An. arabiensis* ont une aire de répartition extrêmement vaste sur tout le continent africain, *An. gambiae s.s.* étant plutôt adapté aux zones de forêt et de savane humide alors qu'*An. arabiensis* peuple les environnements plus secs jusqu'en bordure du Sahara (Coetze *et al.*, 2000).

Le potentiel adaptatif d'*An. gambiae s.s* à des environnements très différents est en grande partie lié à la présence d'inversions chromosomiques polymorphes observées notamment sur le chromosome 2. Cinq « formes chromosomiques » ont ainsi été définies en Afrique de l'Ouest: les formes Forêt, Savane, Bamako, Bissau et Mopti (Coluzzi *et al.*, 1979; Gillies, 1987 ; Toure *et al.* 1998) qui se répartissent principalement en fonction du degré d'aridité du milieu.

Ainsi, la forme Forêt, caractérisée par l'arrangement standard (pas d'inversion) sur les deux bras du chromosome 2, peuple les environnements de forêt et de savane les plus humides, les formes Savane ou Mopti se retrouvant quant à elles dans des environnements plus secs, voire très arides (Fontenille , 2003).

2.1.2. La population vectrice au Mali

Au Mali, la population vectrice des parasites du paludisme est composée d'*An. gambiae s.s*, *An. arabiensis* et *An. funestus*, avec une prédominance d'*An. gambiae s.s* durant la saison pluvieuse (juin-octobre), *An. arabiensis* durant la saison chaude (mars-mai), *An. funestus* durant la saison froide (décembre-janvier). Il y a aussi *An. rufipes* bien qu'il soit zoophile (Dolo *et al.* 2003).

Au Mali, trois formes chromosomiques d'*An. gambiae s.s* ont été décrites par Coluzzi *et al.*, 1985 : Bamako, Savanna et Mopti. Bamako et Savanna prévalaient dans les zones relativement humides (savanne sud-soudanienne) et menacent la saison pluvieuse. Tandis que la forme Mopti s'étend dans toutes les zones écologiques du Mali et est présente toute l'année (Toure *et al.*

1998). Sur la base des évidences bionomique et moléculaire, la forme moléculaire M (M form) d'*An. gambiae* a été récemment érigée en espèce et est appelé *An. Coluzzii* (Coetzee *et al.*, 2013).

2.2. Cycle de vie du moustique anophèle

Le développement de l'anophèle est caractérisé par la succession de deux phases. La première est aquatique et recouvre la vie pré-imaginale, c'est à dire l'œuf, les stades larvaires et la nymphe. La seconde est aérienne et concerne l'adulte ou imago.

2.2.1. La reproduction - la ponte

Bien que la femelle moustique soit capable de pondre à plusieurs reprises au cours de sa vie d'adulte, elle ne s'accouplera, généralement, qu'une seule fois avec un mâle. En effet, elle dispose de spermathèques permettant le stockage d'une quantité suffisante de spermatozoïdes nécessaire à la fécondation de ses œufs. Mais, pour porter ces derniers à maturité, elle doit effectuer un repas sanguin, c'est-à-dire piquer un être vivant dont le sang contient les protéines dont elle a besoin. Après la digestion du sang ingéré et la maturation ovarienne; elle va pondre à la surface de l'eau des œufs groupés en nacelles de 50 à 200 éléments (les œufs mesurent environ 1 mm de long). Suivant les conditions climatiques, les œufs éclosent au bout de 2 à 3 jours en climat tropical (dès que l'embryon est complètement développé), pour donner naissance à des larves dont le mode de vie est exclusivement aquatique (Carvenale *et al.*, 2009).

2.2.2. La vie aquatique

La vie de la larve alterne entre le besoin de manger du microplancton et celui de venir respirer en surface par l'intermédiaire d'un siphon respiratoire situé à l'extrémité de l'abdomen. L'eau est indispensable à son développement qui passe par 4 stades successifs, séparés par des mues, (variation de la taille de 2 à 15 mm environ).

Après le 4ème stade, la dernière mue donne une nymphe. Phase au cours de laquelle les organes du futur adulte peuvent se mettre en place. Durant ce stade, qui est de courte durée (24 à 48 heures), la nymphe ne se nourrit plus et puise dans les réserves stockées au stade larvaire. La nymphe respire par l'intermédiaire de deux trompettes situées sur le céphalothorax (Carvenale *et al.*, 2009).

2.2.3. L'adulte

La dernière transformation, qui aboutit à un moustique adulte, est la métamorphose. Au moment de l'émergence la cuticule se fend longitudinalement, l'adulte se gonfle d'air et s'extrait de l'exuvie à la surface de l'eau. Libre, l'adulte peut enfin voler de ses propres ailes. Mâles et femelles pourront s'accoupler et le cycle pourra recommencer (Carvenale *et al.*, 2009) fig.1.

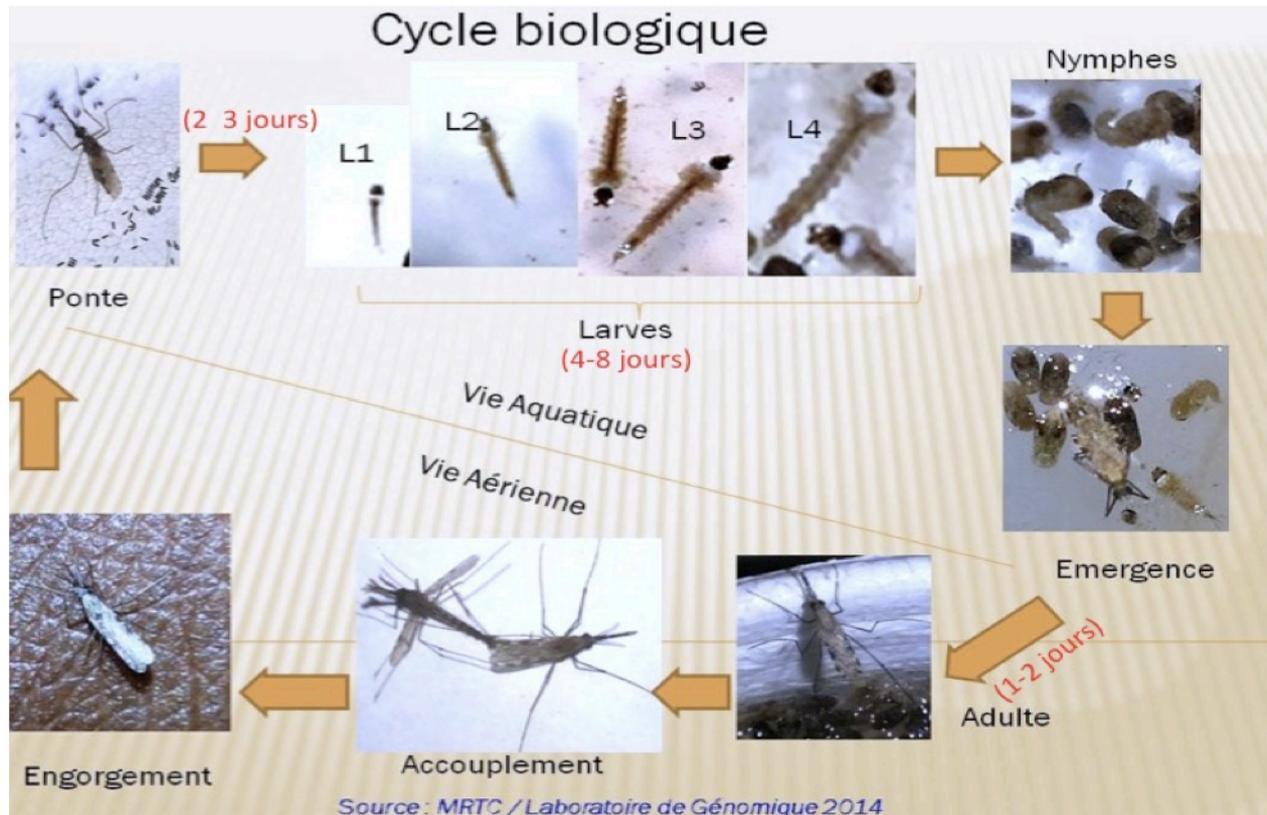


Figure 1: cycle biologique des moustiques
Source: Malaria Research and Training Center

2.3. Le cycle biologique des plasmodies

Dans le cycle biologique des plasmodies comprend : une étape de développement du parasite chez l'être humain (hôte intermédiaire) et une seconde étape qui a lieu chez le moustique (hôte définitif) appelée sporogonie.

2.3.1. La schizogonie

2.3.1.1. La phase hépatique

Au cours de la piqûre, l'anophèle femelle infecté injecte dans les capillaires des sporozoïtes. Il est à noter que moins de 20% des piqûres de moustiques contenant des sporozoïtes dans leurs glandes salivaires sont responsables d'infections en zone d'endémie (Carnevale, 2009). Les sporozoïtes transitent dans la circulation générale en quelques minutes, ils envahissent les hépatocytes grâce à une interaction spécifique entre la protéine majeure de surface du sporozoïte (CSP) et un récepteur spécifique situé sur la membrane plasmique de l'hépatocyte du côté de l'espace de Disse, espace directement en contact avec le sang circulant.

Le sporozoïte entre alors dans une phase de réplication, au sein de la vacuole parasitophore, et de prolifération intracellulaire qui repousse en périphérie le noyau de la cellule et finit par constituer une masse multinucléée appelée schizonte qui conduit à la libération de plusieurs dizaines de milliers de mérozoïtes dans la circulation. Cette phase de multiplication est asymptomatique et

dure de 8 à 15 jours, selon les espèces. Contrairement à *P. vivax*, *P. falciparum* ne possède pas de formes de persistance hépatique ou hypnozoïtes (Staudt, 2009) fig.2.

2.3.1.2. La Phase sanguine

Seule cette phase est responsable des symptômes qui peuvent être d'intensité variable. Les mérozoïtes libérés lors de la rupture de l'hépatocyte vont débiter le cycle sanguin asexué de prolifération de *P. falciparum* en infectant les érythrocytes.

Le mérozoïte pénètre grâce à un processus parasitaire actif et se différencie au sein de la vacuole parasitophore en anneau, puis en trophozoïte, stade à partir duquel une intense phase répllicative commence. Il donne alors naissance au schizonte, celui-ci après une segmentation montre une forme caractéristique de rosace, puis libère 8 à 32 mérozoïtes qui rapidement réinfectent des érythrocytes sains. L'ensemble de ce cycle dure 48 heures chez *P. falciparum*. L'apparition des gamétocytes a lieu, en général la deuxième semaine qui suit l'infection et ces formes peuvent persister plusieurs semaines après la guérison. A la suite d'une nouvelle piqûre par une femelle anophèle, les gamétocytes mâles et femelles (au dimorphisme sexuel marqué) sont ingérés avec le repas sanguin (Staudt, 2009) fig.2.

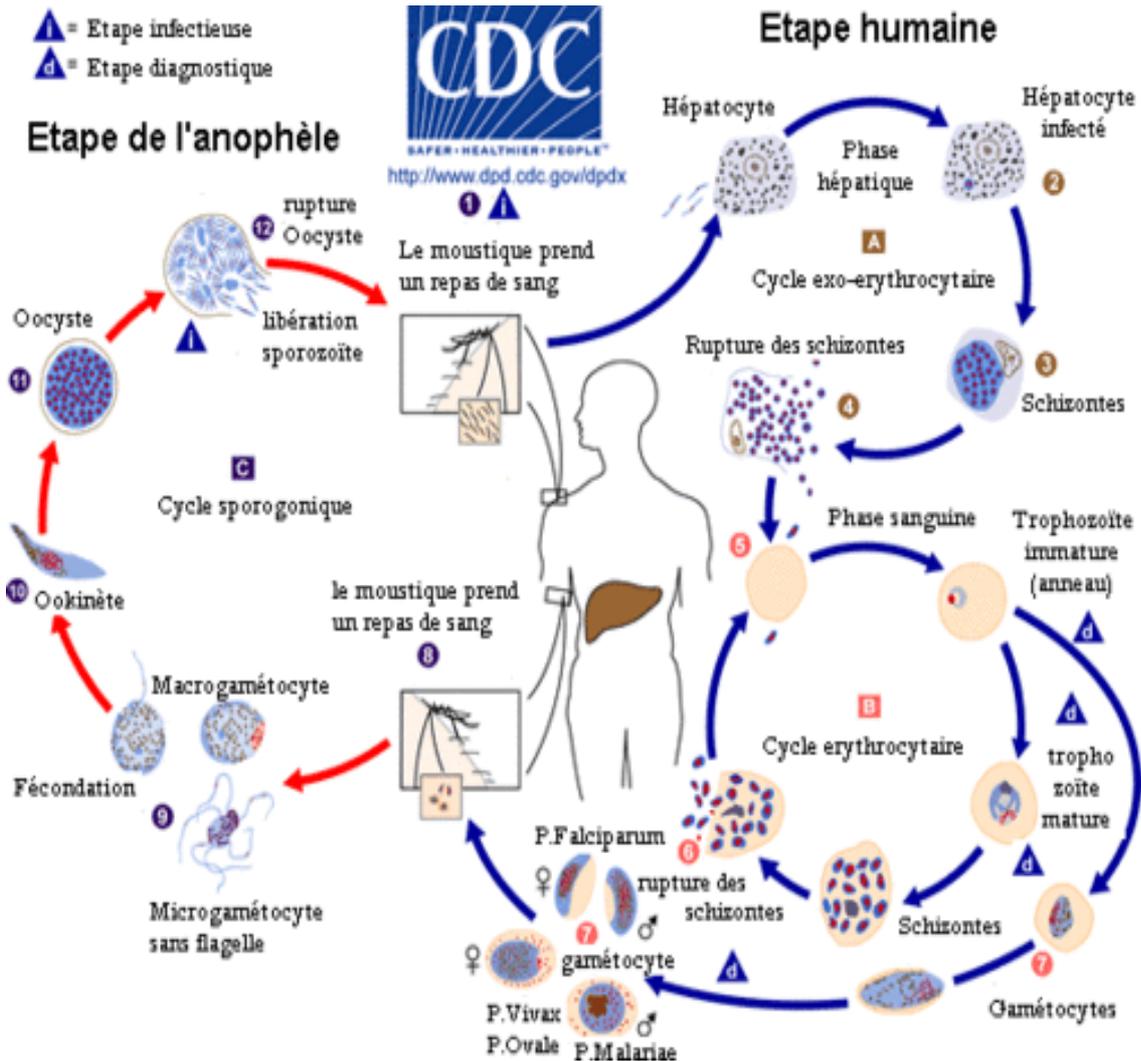


Figure 2: cycle des Plasmodium

Source: http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/ImageLibrary/malaria_LifeCycle.GIF: le 21 dec. 15

2.3.2. La sporogonie – cycle du parasite chez l’anophèle femelle

En pratique, la transmission entomologique désigne surtout l’inoculation aux sujets humains des sporozoïtes présents dans les glandes salivaires de l’anophèle. Pour s’infecter, à la faveur d’une piqûre, un anophèle doit ingérer au moment de son repas de sang un certain nombre de gamétocytes matures mâles et femelles.

Au cours de la demi-heure suivant leur ingestion dans l’estomac de l’anophèle les micro et macrogamètes subissent une activation (passage à une forme sphérique) comparable chez les deux sexes et ils sortent de la membrane plasmique de l’érythrocyte qu’ils parasitent le microgamétocyte évolue par fissions multiples (i.e. schizogonie) en microgamètes; ce phénomène a été décrit sous le terme d’exflagellation avec production de jusqu’à huit flagelles qui constituent autant de gamètes mâles. De façon contrastée le macrogamétocyte évolue en un unique gamète femelle (Carvenale *et al.*, 2009). Dans l’heure qui suit l’ingestion du sang, la fécondation a lieu

avec l'entrée du noyau, petit et dense, du microgamète dans le macrogamète suivi de la fusion des deux noyaux. Cette fusion est accompagnée de l'appariement des chromosomes qui permet la recombinaison entre les génomes paternel et maternel (Sinden *et al.*, 1999).

Entre 5 et 7 heures après le repas, le zygote diploïde subit une endoméiose qui débute comme une méiose classique qui ne se termine pas une division cellulaire, le produit final étant une seule cellule.

Entre 9 et 24 heures après le repas, ce zygote entreprend une différenciation en un oocinète en passant par une forme dite retort vu sa forme en virgule.

Dans les 24 heures suivant l'ingestion du sang infectant, l'oocinète traverse la matrice péritrophique qui entoure le sang dans l'estomac, puis passe dans le faible espace entre cette matrice et les cellules de l'épithélium stomacal, adhère à ces cellules dans la zone distale de l'estomac, puis passe entre elles (ou à travers elles).

Entre 24 et 36h après le repas de sang, l'oocinète se positionne entre la couche cellulaire et la membrane basale de l'estomac et se transforme en un oocyste (Carvenale *et al.*, 2009). Entre 9 et 15 jours après le repas infectant, l'oocyste, situé sous la membrane basale, grossit régulièrement pour atteindre un diamètre de l'ordre de 20 à 60µm (Coatney *et al.*, 1971). Le noyau du jeune oocyste entreprend une série d'endomitoses synchrones et vont produire les sporoblastes, puis les sporozoïtes haploïdes (n=14), selon Beier *et al.* (1998).

Les sporozoïtes quittent l'oocyste, soit individuellement à travers des micro-perforations de la paroi oocystique, soit massivement à la faveur d'une rupture importante de cette paroi ; les facteurs déclenchant cette rupture (mécanique et enzymatique) ne sont pas encore connus. Les sporozoïtes rejoignent les glandes salivaires via l'hémolymphe et les facteurs conditionnant ce tropisme ne sont pas élucidés. Les sporozoïtes libérés par l'oocyste sont morphologiquement matures, mais ils sont moins infectants que ceux des glandes salivaires (Naitza *et al.*, 1998).

2.4. Infestations expérimentales

2.4.1. Définitions

L'infection expérimentale des anophèles par les plasmodies est une technique difficile, mais ce n'est pas une fin en soi (Klein 1991), ce sont des infections provoquées des moustiques. Il en existe deux méthodes.

- Infection directe sur la peau ou encore « Direct Skin Feeding»

Il s'agit de gorger directement les moustiques d'élevage contenus dans un pot (30 moustiques/pot) sur les avant-bras, les jambes (mollets) ou les chevilles du porteur de gamétocytes pendant 15 min. Cette technique est aussi souvent appelée en anglais « **Direct Skin Feeding**» (Coulibaly, 1999).

- **Infection directe sur membrane ou « encore Direct Membrane Feeding »**

C'est le test de gorgement direct des moustiques d'élevage avec du sang à travers une membrane (baudruche ou parafilm) dans un feeder connecté au "feeder-machine" pendant 30min (Coulibaly, 1999). Lorsqu'on utilise du sang infecté prélevé chez un porteur de gamétocytes, cette technique prend l'appellation de anglo-saxon « **Direct Membrane Feeding Assay** » (Diallo et al., 2006).

2.4.2. Buts

L'infestation expérimentale est une technique mise au point pour plusieurs buts :

- évaluer les vaccins bloquant la transmission du parasite ;
- évaluer la susceptibilité des espèces d'anophèles aux différentes espèces plasmodiales (Klein, 1991) ;
- estimer l'infection d'une population humaine pour une souche de moustiques (Boudin, 1993) ;
- étudier les facteurs qui déterminent la transmission hôte humain-vecteur du parasite (Gamage-Mendis 1992) ;
- elle est aussi utilisée pour déterminer l'effet des médicaments antipaludiques sur les stades sexués de *Plasmodium*.

2.4.3. Intérêts

Ces deux méthodes ont permis de comprendre et d'expliquer plusieurs phénomènes dans la problématique du paludisme, et constituent de bons outils de travail.

2.4.4. Historique et applications

Ross, sous l'impulsion de Manson, débute ses expériences aux Indes en août 1897, il lui écrit pour l'informer de sa découverte. Il fit se nourrir des moustiques sur des patients dont le sang contenait de nombreux gamétocytes et les disséqua à différents jours d'incubation, pour avoir la preuve de leur infection. Au 4ème jour, il note des « *peculiar pigmented cells* » dans la paroi de l'estomac ; dans les jours qui suivent, ces cellules augmentent en taille (fig.3). Ce fut la première démonstration du développement de *P. falciparum* chez le moustique (Ross, 1897). Puis, dans les mois qui suivirent, il découvrit le développement de l'oocyste en sporozoïte chez *P. relictum*, (Snounou, 1997) et la concentration de ceux-ci dans les glandes salivaires du moustique. C'est suite à ces constatations, qu'il entreprit d'infecter des oiseaux sains à l'aide de moustiques nourris sur des oiseaux impaludés ; démontrant ainsi que le paludisme était transmis par la piqûre de l'anophèle femelle (Ross, 1898). Malheureusement, pour lui, il ne put faire la même démonstration chez l'être humain, suite à un changement d'affectation.

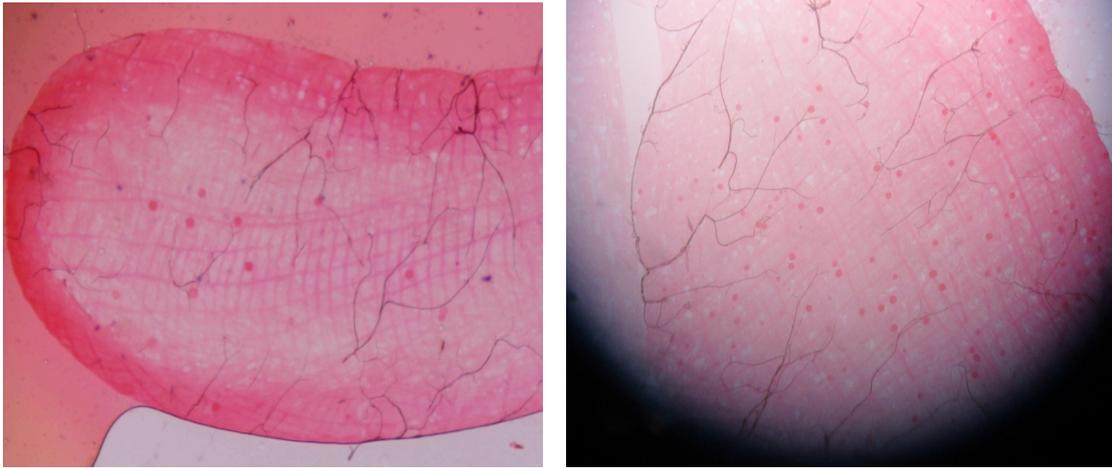


Figure 3: Photos montrant les oocystes présents dans l'estomac de moustique coloré au mercurochrome.
Source: Malaria Research and Training Center: le 29 Jul. 14

En effet, la même année, Bignami réussit à infecter un volontaire sain par la piqûre de moustiques prélevés dans les environs de Rome. Il ne restait qu'à décrire le cycle de *P. falciparum* chez le moustique ; il s'adressa donc à l'entomologiste italien Grassi, spécialiste des moustiques. Pour cela, Grassi envoyait régulièrement son technicien collecter des *Culex sp.*, qu'il donnait à Bignami et Bastianelli pour qu'ils soient nourris sur des patients infectés. Mais jamais, Grassi n'observa le développement de parasites chez ces moustiques. En octobre 1898, les *Culex* se firent rares et son technicien lui ramena des *Anopheles claviger*. Grassi, mécontent, donna tout de même les moustiques à ses collaborateurs. A sa grande surprise, le parasite se développait chez ce nouveau moustique. Il ne leur fallut que deux mois pour suivre le cycle complet de *P. falciparum* et *P. vivax* chez le moustique (Grassi et al., 1898). En 1899, la sporogonie de *P. malariae* fut décrite (Grassi et al., 1899) et en 1900 parut la désormais célèbre « Studi di un zoologo sulla Malaria » (Grassi). La même année, Schaudinn met au point la nomenclature des différents stades de développement parasitaire ; nomenclature toujours en vigueur de nos jours (Schaudinn, 1900 et Bischoff, 2001).

Le premier gorgement d'un arthropode hématophage (*Glossina palpalis*) par la technique de membrane a été réalisé par Rodhain en 1912 (Tarshis et al., 1958).

En 1950, Muirhead-Thomson a publié les premières études qui ont permis de déterminer dans des zones de paludisme, la proportion de personnes qui sont infectieuses pour les moustiques. Ainsi, il trouva à Goal Coast (actuel Ghana) que 10-11% des individus étaient infectieux pour les moustiques (Muirhead-Thomson, 1954).

Les méthodes d'infestation directe et sur membrane ont été utilisées pour l'évaluation de l'immunité de blocage de la transmission du paludisme en cherchant les facteurs influents (Tchuinkam et al., 1993).

2.4.5. Les méthodes de détermination de l'infectivité

Deux méthodes permettent de déterminer expérimentalement ce facteur K (la probabilité K à un moustique de s'infester en prenant un repas de sang). La méthode directe, la plus adaptée à la zone rurale, consiste à gorger des moustiques sur un échantillon démographiquement représentatif de la population générale sans s'intéresser au préalable à la parasitémie, soit directement sur les sujets (Githeko, 1992), soit par l'intermédiaire d'une cellule d'alimentation artificielle (Gamage-Mendis, 1992). Le pouvoir infectant de la population exprimé comme le taux moyen de moustiques infectés par rapport au nombre gorgé représente alors la probabilité K. Une approche indirecte, plus simple dans la pratique en milieu urbain, consiste à rechercher d'abord les porteurs de gamétocytes, à déterminer ainsi le réservoir infectant potentiel (indice gamétocytaire), puis à infecter expérimentalement les moustiques d'élevage avec le sang de ces porteurs pour déterminer la susceptibilité des anophèles aux différentes souches plasmodiales (Graves, 1988). Dans ce deuxième cas, le facteur K est défini comme le produit de la prévalence gamétocytaire par le taux moyen de moustiques infestés (Tchuinkam et *al.*, 1995).

2.5. Les antigènes de l'immunité du blocage de la transmission du paludisme

Les vaccins bloquant la transmission induisent des anticorps empêchant la maturation des stades sexués du parasite chez le moustique. Les formes sexuées se développent dans les globules rouges quelques semaines après infestation et deviennent infectantes pour les moustiques qui piquent des sujets infestés. Avec une large couverture de la vaccination, ces vaccins pourraient réduire la transmission du paludisme dans les régions d'endémie en diminuant le nombre de moustiques infectant. Un vaccin bloquant la transmission contribuerait également à empêcher l'apparition de parasites pharmacorésistants et/ou de variants susceptibles d'échapper au vaccin, sélectionnés sous l'effet de vaccins de stades sanguins asexués et de stades pré-érythrocytaires partiellement efficaces (Engers, 2001).

Au stade des formes sexuées du parasite dans le sang, les chercheurs tentent d'obtenir un vaccin dit « altruiste ». En effet, il ne s'agit pas de protéger l'individu, mais d'empêcher la transmission du parasite au moustique. Ainsi, la transmission du parasite à un autre hôte sera interrompue et le cycle du paludisme aussi. Ces candidats vaccins ne concernent pas l'être humain dans un premier temps car les TBV ou Transmission Blocking Vaccins agissent dans le moustique. Le paludisme se transmet dans un périmètre de quelques centaines de mètres de la source infectée et le TBV apparaît comme le moyen de protéger toute une communauté (Dumay, 2003). Le TBV cible les antigènes présents dans les gamètes et la production d'anticorps est stimulée. Ces derniers, qui circulent librement dans le sang, sont ingérés par le moustique pendant son repas sanguin et détruisent les différentes étapes du parasite dans le système alimentaire du moustique.

Ce type d'immunité est utilisé par les anticorps contre les antigènes des protéines de surface du parasite, qui ont émergé des globules rouges nouvellement infectés dans l'intestin du moustique. Les anticorps sont provoqués par la vaccination de l'hôte intermédiaire et ingérés par le

moustique. Les gamétocytes dans les globules rouges de l'hôte intermédiaire immunisé ne seront pas infectés. Les anticorps contre les gamètes empêchent leur fécondation, détruisent les gamètes ou zygotes dans les 10 à 15 minutes après l'entrée dans le système alimentaire du moustique. Les anticorps agissant sur les ookinètes sont efficaces 12 à 24 heures au plus tard pour les empêcher de pénétrer l'intestin de devenir des oocystes et de former les sporozoïtes, lesquels pourraient éventuellement infecter un autre hôte intermédiaire (Dumay, 2003).

2.5.1. Les antigènes de pré-fécondation

Plusieurs antigènes ont été identifiés comme étant présents majoritairement sur les surfaces des gamètes mâles et femelles. Les plus fréquemment étudiés sont Pfs230 et Pfs48/50 contre lesquels des anticorps agissent pour bloquer la transmission in vitro. C'est une preuve que ces protéines peuvent être impliquées dans le processus de fécondation. Cependant, un travail important est nécessaire avant que le blocage de la transmission du parasite soit pleinement efficace in vivo. Le développement de ces antigènes pour un vaccin est toujours au stade initial de la recherche. Pendant une infection naturelle, ces antigènes de pré-fécondation sont aussi présents dans l'hôte intermédiaire, lequel dans un individu vacciné peut entraîner une augmentation naturelle des anticorps (Dumay, 2003).

- Pfs48 / 45

Un autre candidat TBV pour contrôler la propagation de *P. falciparum* est Pfs 48/45. Le *Pfs 45/48* gène code pour une unique protéine qui migre comme une double bande dans des conditions non-réductrices (Milek *et al.*, 2000). Cette protéine est exprimée aux surfaces des gamétocytes et gamètes de *P. falciparum* et a un rôle central dans la fertilité des gamètes mâles (Van Dijk *et al.*, 2001).

Les tentatives pour exprimer cette protéine dans sa forme native en utilisant différents systèmes, tels que bactériémie (Milek *et al.*, 1998), le virus de la vaccine (Milek *et al.*, 1998b) et la levure (Milek *et al.*, 2000) ont échoué en raison de pliage incorrect. Cependant, l'expression de la forme recombinante de Pfs 48/45 (Pfs48/45-10C) dans *E. coli* suit ou les étapes de repliement correct dans 10-20%, induite chimiquement [Outchkourov *et al.*, 2007].

- Pfs 230

Une protéine de 230kDa exprimée sur la surface de gamétocytes. L'activité de blocage des anti-Pfs-230 anticorps n'a été détectée, qu'en présence des protéines du complément uniquement [Quakyi *et al.*, 1987].

2.5.2. Les antigènes de post-fécondation

La deuxième classe des antigènes consiste en protéines exprimées exclusivement ou en prédominance sur les zygotes ou les ookinètes, lesquels ne sont pas présents dans l'hôte intermédiaire. Les réponses des anticorps ne peuvent donc pas être décuplées après une infection naturelle. Une étude d'ADN génomique, a localisé 10 descendances de gènes de Pfs28 et Pfs25

sur le chromosome 10 ayant le même mode de transmission génétique [Duffy et Kaslow, 1997]. Ces protéines sont des cibles pour les anticorps qui interfèrent avec la maturation des ookinètes et la formation des oocystes. Bien qu'elles ne montrent aucune synergie, P25 et P28 ont partiellement des fonctions redondantes. La même étude a suggéré que ni l'une ni l'autre de ces molécules doivent être utilisées individuellement en ce qui concerne la survie du parasite mais l'absence de résultats communs à P25 et P28 subsistent. Il apparaît donc essentiel de cibler ces molécules simultanément dans un vaccin.

Le candidat TBV-Pfs25 est disponible, au Mali en cours d'essai de phase Ib/IIa sur des volontaires humains. Après avoir été réalisé chez des adultes non exposés au paludisme aux Etats Unis.

- **Pfs25**

Pfs25 est une protéine de 25 kDa exprimée sur la surface de zygote et ookinète stades de *P. falciparum* et composée de quatre tandem facteur de croissance épidermique dans les domaines l'EGF en anglais « *epidermal growth factor* » est une hormone protéique (Kaslow et al., 1988). Le potentiel de TBV-Pfs25 a été démontré à l'aide du virus de la vaccine (*virus à ADN bicaténaire, linéaire qui appartient à la famille des Poxviridae*) en insérant dans le virus de la vaccine le gène codant des protéines Pfs25, l'infectivité des *An. freeborni* avec *P. falciparum* à l'aide d'un repas de sang total infecté, a réduit artificiellement à 40% l'infectiosité lorsque 25 ug / ml d'anticorps monoclonaux Pfs25 étaient ajoutés au sang total. L'infectiosité était presque éliminée quand la concentration d'anticorps monoclonaux a été portée à 200 ug / ml et de l'activité de blocage de la transmission était complète (Kaslow et al., 1991).

- **Pfs28**

Pfs28 est une protéine de 28 kDa exprimée et conservée sur les surfaces cornues de *P. falciparum*, dans une phase transitoire entre zygote et ookinète. Cet antigène également a été testé dans les essais de blocage de la transmission d'activité aux Etats unis. Les anticorps produits par l'injection de la levure exprimée Pfs28 (yPfs28), avec de l'alun (c'est un sel d'aluminium, immunoactivateur et un système de délivrance chez l'être humain pour une utilisation appropriée) réduit de manière significative l'infectivité de *A. freeborni* avec *P. falciparum*. Une faible infectivité a été démontrée lors de la vaccination avec yPfs28 et yPfs25 antigènes ensemble (Duffy et Kaslow 1997).

L'activité de blocage de la Transmission contre *P. falciparum* a été encore améliorée lorsque Pfs25 et Pfs28 étaient exprimées comme une seule protéine chimique dans la levure, la 25-28c protéine recombinante. La vaccination avec 25-28c protéine recombinante a arrêté complètement le développement des oocystes plus tôt, en utilisant une dose plus faible et pendant une grande période, que la vaccination soit avec Pfs25 ou Pfs28 seul ou une combinaison des deux (Gozar et al., 1998).

2.5.3. La chitine comme antigène

Après que le sang qui ait servi de repas au moustique atteigne le système alimentaire de ce dernier, les cellules épithéliales dans l'intestin sécrètent une chitine qui va entourer complètement la nourriture. Pour traverser cette barrière, le parasite sécrète aussi une chitine. La chitine qui est sécrétée par l'intestin du moustique sert à réguler les propriétés (perméabilité et épaisseur) de la poche. Si les anticorps contre le moustique inhibent la chitine alors la poche sera plus difficile à traverser par le parasite. Ceci peut être utilisé dans le cadre d'un TBV. Des expériences sur ces anticorps sont en progrès (Dumay, 2003).

2.6. Les candidats vaccins au stade hépatique

Un vaccin qui ciblerait le stade hépatique du parasite serait le seul vaccin capable d'empêcher les manifestations cliniques du paludisme. Un tel vaccin serait bénéfique pour les individus qui n'ont jamais été exposé au parasite (populations locales et voyageurs) et qui représentent une population à haut risque (Dumay, 2003).

La réponse immunitaire qui doit neutraliser les sporozoïtes est spécifique et différente de ce qui est demandé pour détruire le parasite dans les autres stades de son évolution. Un vaccin efficace devra neutraliser chaque sporozoïte parce que chacun a la potentialité de devenir plus de 30 000 merozoïtes. C'est particulièrement difficile car les sporozoïtes ne circulent que quelques minutes dans le sang. Il est donc nécessaire qu'une forte concentration d'anticorps soit présente dans le sang. Une fois que les sporozoïtes sont à l'intérieur du foie, ils sont protégés contre les attaques du système immunitaire humain et sont donc plus difficiles à détruire (Dumay, 2003).

2.6.1. Le Candidat vaccin des cellules immunitaires CD4 et CD8

Il a été découvert des protéines à la surface du sporozoïte qui provoquent une réponse immunitaire et offrent une protection contre le parasite en empêchant sa progression. Ce candidat vaccin contient les cellules immunitaires CD4 et CD8 qui reconnaissent dans le sang le parasite et oeuvrent à sa destruction. Cette opération a déjà été réalisée in vitro (Dumay, 2003).

2.6.2. La CSP ou Circumsporozoite Protein

Une autre protéine du sporozoïte a été identifiée. Celle-ci se développe essentiellement dans les glandes salivaires du moustique. Il s'agit de la CSP ou Circumsporozoite Protein. Les résultats positifs des études sur la réponse immunitaire de CSP ont montré que cette protéine pouvait être utilisée dans l'élaboration d'un vaccin [Dumay, 2003].

2.6.3. Les autres candidats au stade mérozoïte

Peu de temps après que le sporozoïte ait envahi le foie, un nouvel antigène appelé LSA1 (liver stage antigen 1) est synthétisé par le parasite. Il est visible sur la surface du merozoïte qui se développe. LSA1 (liver stage antigen 1) est proposé comme candidat vaccin parce qu'il peut être utilisé pour développer une réponse immunitaire au parasite dans le foie. LSA1 a une séquence relativement uniforme présente dans toutes les variétés du paludisme, suggérant ainsi un rôle crucial dans le développement de ce dernier. Il apparaît donc comme un ingrédient prometteur dans l'élaboration d'un vaccin candidat (Dumay, 2003).

Le RTS, S est le nom scientifique donné à ce candidat vaccin antipaludique et en reflète la composition. Le « R » représente la région répétée centrale de la protéine de circumsporozoïte du *Plasmodium falciparum* (CSP), le « T » se réfère aux cellules T des épitopes du CSP, et le « S » correspond à l'antigène de surface d'hépatite B (HBsAg). Ceux-ci sont combinés dans une seule protéine de fusion (« RTS ») et sont co-exprimés dans des cellules de levure avec le HBsAg libre. La protéine de fusion « RTS » et la protéine « S » s'assemblent spontanément en particules « RTS,S ». AS01A et AS02A (émulsion propriétaire huile dans eau et tampon de phosphate salin avec lipidique A et le QS21 des immunostimulants) ont été utilisés comme adjuvants.

C'est le vaccin candidat le plus avancé, en phase III de l'essai clinique, dont les résultats ont été publiés en 2012, dernière étape avant un potentiel feu vert pour la commercialisation. Mais ce vaccin n'a permis de protéger que 31 % des nourrissons et 56 % des enfants un peu plus âgés (Genton, 2001).

2.7. Les candidats vaccins au stade érythrocytaire

Créer un vaccin pour sensibiliser le système immunitaire aux globules rouges infectés est difficile. La raison principale étant le manque de connaissance sur la réaction du système immunitaire avec la cellule infectée. Deux types de vaccins sont envisagés : ceux qui empêchent le parasite d'envahir le globule rouge ou de s'y développer et ceux qui miment l'état de prémunition. Ces derniers sont aussi nommés « vaccins anti-maladie », car ils luttent contre les pathologies induites par le parasite (Dumay, 2003).

2.7.1. Antigène de surface du mérozoïte - MSP3

Un antigène de surface du mérozoïte, MSP3 (merozoïte surface antigen 3) a été identifié comme étant la cible du mécanisme de défense majeure contre l'infection au stade érythrocytaire. Des études en zone endémique (Sénégal) ont largement confirmé l'intérêt de cette molécule : il existe en effet une très forte corrélation entre la présence d'anticorps dirigés contre MSP3 et la protection acquise par l'exposition naturelle à l'infection. Des essais d'immunisation par MSP3 ont donné des résultats encourageants chez le primate, qui ont justifié la mise en route d'essais chez l'être humain (Dumay, 2003).

2.7.2. Antigène de surface du mérozoïte - MSP1

De plus, un groupe de chercheurs étudie une protéine de surface du parasite présente au stade érythrocytaire: la MSP1 (merozoïte surface antigen 1) et plus particulièrement une partie de cette

protéine nommée P19 (Ghosh et Malhotra, 2002). Il a été démontré que si on bloquait la P19, le parasite ne pouvait plus continuer son cycle, d'où l'intérêt de tenter de stimuler le système immunitaire contre elle. La P19, produite dans un virus d'insecte, a déjà fait l'objet d'une dizaine d'essai d'immunisation chez le singe Saïmiri, à l'Institut Pasteur de Guyane et à l'université de New York. D'excellentes protections ont été obtenues en utilisant P19. Mais les résultats devront être nuancés lorsque l'immunisation sera réalisée chez l'être humain.

2.7.3. Antigène de surface du mérozoïte - MSP4

MSP4 (merozoïte surface antigen 4) est une autre protéine de surface du mérozoïte qui a été identifiée comme un candidat vaccin. En effet, plus de 94% des individus d'une population vivant dans une aire du Vietnam où le paludisme est hautement endémique ont des anticorps correspondants à MSP4 (Dumay, 2003). Cette protéine peut donc être vue comme un candidat vaccin. Les Vaccins efficaces au stade sanguin pourraient avoir un effet bloquant sur la transmission, en réduisant la densité parasitaire et la durée de la parasitémie mais moins qu'ils ne soient très efficaces, il est peu probable qu'ils auraient un rôle majeur de blocage de la transmission (Greenwood et *al.*, 2009).

3. Méthodologie

Cette méthodologie décrit les procédures pour optimiser les essais de gorgement afin d'évaluer les vaccins bloquant la transmission du paludisme au Mali.

3.1. Type et période d'étude

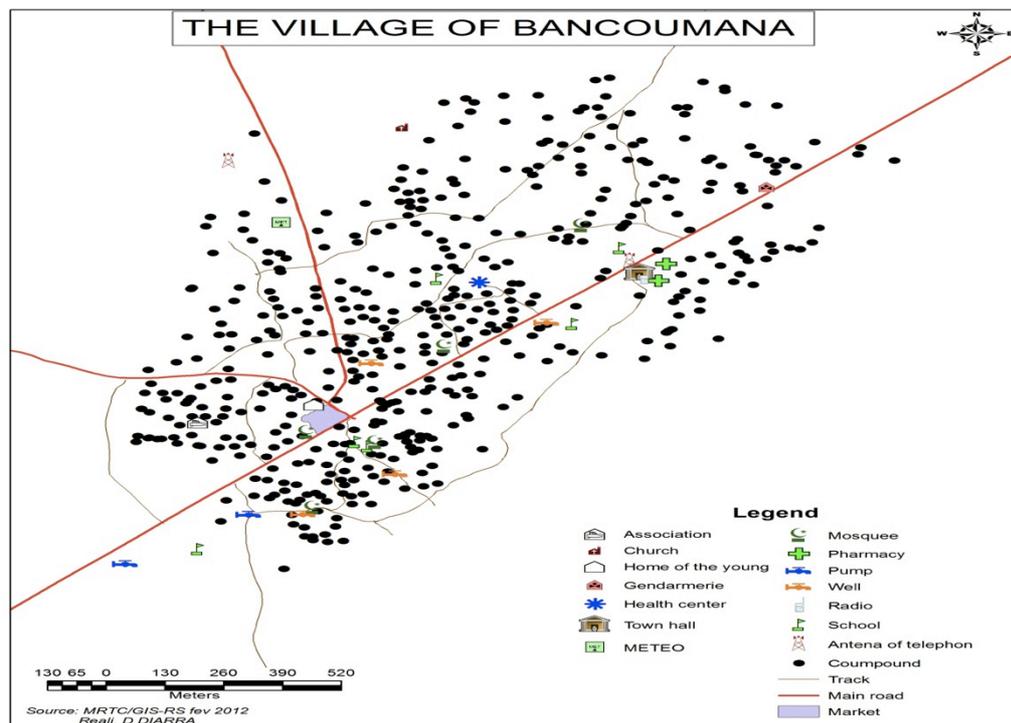
Il s'agissait d'une étude transversale avec des passages hebdomadaires répétés, qui se sont déroulés de janvier 2014 à Janvier 2015.

3.2. Site d'étude

3.2.1. Description et justification du site d'étude

- Description

Cette étude s'est déroulée à Bancoumana, village situé à 60 km de Bamako au Sud-Ouest, le village couvre une superficie de 2,5 de Km². Le village s'étend le long de la route reliant Bamako à Kankan en Guinée. Bancoumana est limité au Nord par le village de Siby, au Nord-Est par le village de Kollé et Bally, au Nord-Ouest par le village de Samako, au Sud-Ouest par le village de Nanguilabougou et au Sud-Est par le fleuve Niger. Le village est accessible en toute saison. Bancoumana est à 8°20 longitude Ouest et 12°20 latitude Nord (fig.4).



Source: MRTC /GIS-RS fév. 2012

Figure 4: carte schématique du village de Bancoumana montrant la localisation des concessions et les différentes infrastructures

- **Justification**

Le choix du village de Bancoumana comme site potentiel de cette étude se justifie par :

- la bonne coopération avec la population depuis 1993 à nos jours, de la présence d'infrastructures adéquates et l'engagement de la communauté. Des études de gorgement direct des moustiques ont été conduites à Bancoumana par le passé et la population est familière avec le concept.
- le village de Bancoumana est situé dans une zone soudano-guinéenne à 60 km de Bamako, d'accès facile et se caractérise par une transmission saisonnière du paludisme couvrant une période de 4 à 5 mois (juillet à novembre).
- les études entomologiques conduites dans la zone ont révélé que le complexe *An. gambiae* (vecteur majeur de la transmission) représente 95,8 % de la faune anophelienne tandis qu'*Anopheles funestus* et *Anopheles rufipes* ne représentent respectivement que 3,4 % et 0,7 %.
- les indices plasmodiques et gamétocytiques sont respectivement de l'ordre de 70 - 80% et 10-15% (paludisme holoendémique) pendant la période de transmission (Touré, 1996). La formule parasitaire montre une forte prédominance de *P. falciparum* (86,1% à 94,9 %), souvent en association avec *P. malariae* (1,0 % et 3,4 %), *P. malariae* entre 4,0 % et 10,5 % et quelques cas de *P. ovale* (Dolo et al., 2003).

3.2.2. Historique

Le village de Bancoumana a été fondé par trois frères Camara venus de Niagama ; ils se sont d'abord installés à Siby (actuel chef de lieu de sous préfecture). Le deuxième site qu'ils ont occupé est Bally situé à 3 km de Bancoumana. Le site de Bancoumana les a attiré à cause des potentialités de chasse fructueuse qu'il offrait. Ces trois frères portent les prénoms de Soridian pour l'aîné, Faran pour le cadet et Kolowilé pour le benjamin. Les trois secteurs de Bancoumana portent leur prénom : il s'agit de Soridiana, Farana et Kolowiléna.

3.2.3. Caractéristiques climatiques et relief

- Caractéristiques climatiques

Le climat de Bancoumana est de type soudanien avec des températures très variables au cours de l'année. Les plus basses (19°C) sont observées au mois de janvier et les plus fortes au mois de mai (40°C). La mousson, le vent maritime, et l'harmattan, le vent continental, définissent les saisons le long de l'année. Ainsi on observe une saison pluvieuse de mai à octobre correspondant à la rentrée de la mousson, et une saison sèche divisée en sèche-froide (de novembre à janvier) et une saison sèche chaude (de février à mai) caractérisée par l'harmattan.

La végétation est de type savane herbeuse avec quelques galeries forestières le long du fleuve Niger et de son affluent. On y rencontre de grands arbres tels que : le karité (*Vitellaria paradoxa*), le Néré (*Parkia biglobosa*), et des arbustes recouvrant une strate herbacée. La faune est constituée surtout par de petits mammifères notamment les lièvres, les hérissons et quelques phacochères. Les reptiles sont représentés par quelques espèces venimeuses et les scorpions.

Du point de vue hydrographie, Bancoumana est arrosé par le fleuve Niger situé à l'Est et à 5 Km du village et son affluent appelé Kôba. Il faut noter la présence d'une grande plaine rizicole de plus de 900 hectares qui s'étale entre le village et le fleuve.

- Relief

Le relief de Bancoumana est peu accidenté. La plaine s'étend de l'Est à Ouest et est large d'environ 5 km. La présence de cette plaine confère au village de Bancoumana, une potentialité agro-pastorale confortable. Cela lui a même prévalu son choix pour abriter la direction de l'Office de la Haute Vallée du Niger (O.H.V.N).

3.2.4. Démographie

La population de la commune de Bancoumana s'élève à 33471 habitants environ (y compris les hameaux de culture et de pêche) dont 9 000 vivant à Bancoumana selon le recensement général de la population en 2014. Cette population est composée majoritairement de Malinké cultivateurs (85%), puis de Peulh éleveurs (10%) et quelques Bozo pêcheurs, Bambara, Sarakolé et Somono (5%). Les activités de ces populations se résument essentiellement à l'agriculture, l'élevage, la pêche et le commerce. Les vieilles coutumes animistes ont été abandonnées au profit de l'islam qui est la religion dominante. Une petite communauté chrétienne y est également présente.

3.2.5. Économie

Agriculture

On note la présence de techniciens de développement.

Les cultures vivrières sont : le petit mil, le sorgho, le riz, le maïs et le haricot.

Les cultures maraîchères sont : l'arachide, la pastèque, la tomate, l'aubergine et le tabac.

- Ressources naturelles

Le sous-sol de Bancoumana, en sa partie du fleuve recèle des traces du métal jaune (or) non encore prospecté. Le fleuve donne en outre du sable et du gravier.

Les produits de cueillette sont : le noix de karité, les fruits du néré, le tamarin.

Les manguiers, les bananiers, les citronniers, les anacardiens, le manioc et les papayiers constituent les cultures de plantation.

3.2.6. Infrastructures

Le village de Bancoumana possède une école fondamentale (1er et second cycles) ; un centre de santé communautaire dirigé par un médecin. Il existe aussi une école franco-arabe primaire très fréquentée. Le village est accessible en toutes saisons grâce à la route nationale reliant Bamako et Kangaba.

3.3. Personnel de l'étude

Cette étude a été réalisée par deux équipes de recherche. L'équipe parasito-clinique qui s'occupait du dépistage des volontaires par la technique de la goutte épaisse et l'équipe entomologique de l'élevage des moustiques, de leur conditionnement et de leur gorgement sur ou avec le sang prélevé des volontaires sélectionnés sur la base du résultat de la goutte épaisse.

3.4. Population d'étude

3.4.1. Description

L'étude a porté sur les enfants d'âge égal ou supérieur à 5 ans ainsi que sur des adultes hommes et femmes dont la goutte épaisse était positive en gamétocytes de *P. falciparum* lors du dépistage. La population a été répartie en quatre groupes avec un passage mensuel. Quatre porteurs de charges de gamétocytes étaient choisis par passage.

Les anophèles, *Anopheles gambiae* élevés dans l'insectarium à Bamako, ont été gorgés directement sur les porteurs ou avec leur sang prélevé. Pour chaque essai de gorgement le nombre de moustiques a varié entre 60 -720 femelles.

3.4.2. Échantillonnage

La population d'étude a été répartie en quatre groupes, en raison d'un groupe par passage successif par semaine. Tous les volontaires du groupe ont été examinés par les cliniciens et dépistés à la goutte épaisse et au Test Diagnostic Rapide (TDR) par l'équipe de parasitologie. Les porteurs de gamétocytes étaient convoqués et conduits par les guides locaux au Centre de Santé pour les essais de gorgement. Chaque volontaire était ensuite identifié et un numéro d'enregistrement lui était affecté après l'obtention de son consentement éclairé ou de celui d'un de ses parents. La taille de l'échantillon des volontaires était liée à la disponibilité des moustiques et à la capacité de l'insectarium.

3.4.3. Critères d'inclusion et critères de non inclusion

Critères d'inclusion

- âge \geq 5ans ;
- Être un résident permanent du village de Bancoumana;
- Avoir une goutte épaisse (GE) positive en gamétocyte de *P. falciparum* ;
- Avoir consenti pour le gorgement ;

Critères de non inclusion

- Grossesse attestée par un interrogatoire ou un test d'urine ;
- Participation dans une autre étude de vaccin ou de médicament simultanément ;
- Réception d'un vaccin expérimental antipaludique dans le passé ;
- Taux d'hémoglobine $<$ à 8,5 g/dl ;
- Antécédent ou réaction sévère aux piqûres de moustiques avec démangeaison ou tuméfaction ;
- Avoir dépassé le nombre de gorgement /an, 4 pour les enfant et 8 pour les adultes.

3.5. Élevage des moustiques et mesures de biosécurité de la fourniture de sang

- Élevage des moustiques

Les moustiques utilisés dans notre étude étaient issus d'une colonie de laboratoire. Ils étaient élevés dans un laboratoire de confinement de niveau II de sécurité (ACL2) du « Malaria Research and Training Center » (MRTC). Cette colonie a été établie à partir de femelles *An. coluzzii* (Coetzee *et al.*, 2013). Des expériences ont montré que cette espèce s'adapte mieux aux conditions d'insectarium (température 25 ± 2 °C et 75 - 85% d'humidité relative).

Les anophèles femelles étaient gorgés sur membrane avec du sang (groupe O+) de donneurs sains du Centre National de Transfusion Sanguine (CNTS). Cet apport de sang est indispensable pour la maturation des œufs de moustiques. Les femelles étaient gorgées une fois par jour pendant deux jours successifs pour leur permettre de développer des œufs. Après leur gorgement sur membrane, les femelles sont gardées au repos pendant deux jours successifs nécessaires pour la digestion du repas de sang et la maturation des œufs. Le troisième jour, des pots contenant un peu d'eau (pour simuler les gîtes de reproduction de la nature dans lesquels les femelles d'*Anopheles gambiae* pondent leurs œufs) sont placés dans les cages pour deux jours afin que les femelles viennent y pondre. La collecte des œufs se faisait deux jours après la mise en ponte. L'utilisation des pots comme pondoirs a l'avantage de permettre aux larves qui vont éclore les premiers, d'être dans l'eau et de rester en vie. Comme pondoirs, on peut utiliser des boîtes de pétri contenant du papier filtre imbibé. Dans ce cas, il faut prendre soins de placer du coton imbibé d'eau sous le papier filtre afin d'éviter son dessèchement rapide.

Les pots sont retirés et les œufs sont repartis dans des plateaux étiquetés (#date de ponte, #génération, # souche de la colonie) contenant de l'eau désionisée pour leur éclosion. Les larves issues de l'éclosion sont nourries à la Tetramine® ou au Koi Food®. La densité moyenne de larves par plateau était d'environ 200 individus pour un litre d'eau. Elles vont poursuivre leur développement du stade L1 à L4 par des mues successives tous les deux jours. Une fois, au stade L4, elles se métamorphosent en nymphes. Dans les conditions de notre insectarium, les nymphes étaient observées entre le 10^{ème} et le 14^{ème} jour après la ponte des œufs dont elles sont issues. Les nymphes étaient collectées quotidiennement et placées dans une cage d'émergence sur laquelle était écrite la date de leur émergence, le rang de la génération ainsi que la provenance de la souche. Le lendemain, les nymphes non-émergées sont retirées des cages et ajoutées aux nymphes du jour, placées dans une nouvelle cage s'il y a beaucoup de moustiques dans la

précédente. Les moustiques d'une des cages d'émergence (cubiques de 30x30x30cm faites de tulle moustiquaire de chaque côté) sont sélectionnés et gorgés deux à trois jours après leur émergence, pour le maintien de la colonie.

- **Mesures de biosécurité de la fourniture de sang**

Les poches de sang utilisées pour le gorgement des moustiques sont au préalable testées pour plusieurs affections incluant la syphilis, l'hépatite B, l'hépatite C et le VIH. Seules les poches testées négatives à toutes ces affections étaient utilisées pour gorger les moustiques. En plus, d'autres conditions supplémentaires étaient requises pour s'assurer de la qualité du sang à savoir :

- Interviewer le donneur avant le prélèvement pour s'assurer qu'il n'a pas pris d'ivermectine qui peut affecter la survie des moustiques ;
- Garder les poches au CNTS pendant 5 jours à compter de la date de prélèvement du sang. Au terme de ce délai, le donneur est interviewé pour s'assurer qu'il ne présente pas de signes, de fièvre ou de céphalées qui sont généralement des symptômes de la fièvre de la vallée du Rift dont le virus a été isolé chez *An. gambiae* au laboratoire.

Les moustiques anophèles peuvent rarement transmettre le virus de la fièvre de la vallée de Rift (FVR), et la transmission transovarienne a été décrite (Seufi & Galal, 2010). La FVR est surtout transmise à l'être humain par le contact direct avec les animaux infectés, bien que la transmission par les moustiques soit possible, avec les moustiques *Aedes* comme principaux vecteurs. La période d'incubation est de 2-6 jours (Ericsson, 2001). Aucune épidémie de FVR n'a été rapportée au Mali jusqu'ici, et la transmission transovarienne est rare et il est très peu probable de voir la persistance d'infection des moustiques de plusieurs générations (par exemple les colonies de moustiques de laboratoire du MRTC ou d'ailleurs).

Pour documenter l'absence de contamination, les colonies de laboratoire ainsi que ceux capturés sur terrain ont été testés pour la FVR par les méthodes moléculaires et la confirmation d'isolation virale. Puisque le test de routine pour ce virus n'est pas faisable, nous avons mis en place les procédures pour nous rassurer que le sang qui sera utilisé comme repas aux moustiques de l'insectarium ne contienne pas ce virus.

Ces échantillons d'anophèle de colonie de laboratoire, de terrain (collectés dans le village d'étude) et d'échantillons de sang utilisés lors du gorgement sont périodiquement envoyés aux USA pour être analysés. Tous les tests effectués ont été négatifs à ce jour.

3.6. Optimisation des essais de gorgement direct

Les humains peuvent être infectieux pour les moustiques s'ils ont des gamétocytes matures mâles et femelles dans le sang périphérique. En raison de la sensibilité limitée de la microscopie pour détecter les gamétocytes, des études épidémiologiques qui visent à inclure toutes les potentialités ont été menées par différents auteurs. Par exemple, on peut choisir d'inclure tous les individus avec des signes d'infection du paludisme (gamétoctémie ou non) ou d'inclure les individus indépendamment du résultat de la goutte épaisse. Les études dans lesquelles tous les individus potentiellement infectieux ne sont pas inclus, pourraient être plus restrictives car il faut imposer une densité de gamétocytes minimum pour procéder à un gorgement sur membrane.

3.6.1. Tri des moustiques pour le gorgement

Le tri des moustiques était une étape très importante qui demandait beaucoup de précautions pour ne pas les endommager et les rendre inaptes au moment du gorgement. A été résumé ici de manière sommaire le tri:

- L'opérateur utilisait un aspirateur à bouche : tenant le tube dans la main et la gaine dans la bouche, aspirait un petit nombre de moustique dans le tube. Il plaçait son index sur le bout du tube (pour éviter que les moustiques ne s'échappent) et comptait leur nombre ;
- Il les transférait doucement dans les pots par expiration ; puis il fermait le trou de la base du pot avec un tampon de coton sec. Ces gestes étaient répétés jusqu'à avoir le nombre de moustiques requis par pot (fig.5).



Figure 5: photo montrant une séance de tri des moustiques

Source: Malaria Research and Training Center: le 25 nov.15

3.6.2. Transport et conservation des moustiques sur le terrain

Pour le conditionnement des moustiques après le tri afin de les assurer un transport sans dommage : les pots étaient placés dans les caisses en bois bien fixés dans leurs loges et recouverte d'une serpillière mouillée pour y maintenir l'humidité optimale.

La climatisation du véhicule était mise en marche 15 mn avant le départ et le chauffeur devait rouler doucement pour éviter les secousses.

Arrivé à Bancoumana, les moustiques étaient gardés dans une salle de 4mx4m équipée d'un humidificateur et d'un climatiseur pour maintenir constantes l'humidité relative et la température de la salle, enregistrées par un thermo-hygromètre HOBO (fig.6).



Figure 6: photo montrant le mode de conservation des moustiques sur le terrain

Source: Malaria Research and Training Center: le 24 aout. 14

3.6.3. Mise à jeun

Les moustiques triés étaient nourris avec des tampons de coton imbibés de jus sucré à 10% posés sur le tulle moustiquaire qui couvre la partie supérieure des pots. Huit heures avant le gorgement, ces tampons de coton ont été remplacés avec d'autres tampons imbibés d'eau simple. Les moustiques étaient mis à jeun quatre heures avant le gorgement pour augmenter le taux de gorgement.

3.6.4. Sélection des porteurs de gamétocytes

Après l'examen clinique de tous les volontaires, nous avons procédé à leur dépistage par le TDR et la goutte épaisse. Les porteurs de gamétocytes de *P. falciparum* remplissant les autres critères d'éligibilité et ayant consentis ont été sélectionnés pour le gorgement des moustiques.

3.6.4. Gorgement

3.6.4.1. Localisation anatomique (l'avant-bras, le mollet et la cheville)

Elle a constitué à gorger sur trois parties du corps (avant-bras, jambe et cheville) des moustiques d'élevage pendant des périodes différentes de la journée (l'aube et crépuscule). Six pots de 20 moustiques ont été appliqués sur chacune des localisations pendant une durée de 15 minutes. Le soir du jour 1 (J₁) un pot était appliqué au niveau de l'avant-bras droit, un au niveau du mollet gauche et un au niveau de la cheville droite. Le matin du J₂ un pot était appliqué au niveau de l'avant-bras gauche, un au niveau du mollet droit et un au niveau de la cheville gauche.

3.6.4.2. Période de gorgement

Elle a consisté à gorger sur les deux mollets pendant des périodes différentes de la journée (l'aube et crépuscule). Quatre pots de 30 moustiques ont été appliqués sur les deux mollets pendant une durée de 15 minutes. Le soir du J₁ et le matin du J₂ un pot a été appliqué sur chaque mollet du volontaire (Fig.7).



Figure 7 : photo montrant une séance de gorgement direct sur la peau des volontaires

Source: Malaria Research and Training Center: le 10 Août. 15

3.6.4.3. Retrait des moustiques non gorgés

Après le gorgement, les moustiques ont été gardés au repos à l'insectarium de Bancoumana dans les conditions optimales (température 25 ± 2 °C et 75 - 85% d'humidité relative). Deux heures après, les moustiques non-gorgés ont été doucement retirés des pots à l'aide d'un aspirateur à bouche et placés dans un autre pot. Les moustiques ainsi gorgés ont été transportés le lendemain du gorgement à Bamako, où ils ont été gardés à l'insectarium. Le huitième jour après leur gorgement, ils ont été disséqués sous une loupe binoculaire dans une goutte de mercurochrome et examinés au microscope à la recherche d'oocystes sur l'estomac.

3.6.4.4. Technique de dissection

- Préparation du mercurochrome

- Peser et transférer 0,5 g de merbromine dans un flacon.
- Ajouter 100 ml d'eau distillée.
- Transférer la solution dans deux tubes de 50 ml.
- Secouer les tubes pour rendre la solution homogène.
- Enrouler ces bouteilles avec du papier aluminium pour éviter la dégradation de la solution par la lumière.

- Technique

Une semaine après le gorgement, les moustiques ont été disséqués. La dissection consistait à extraire l'estomac du moustique sous une loupe binoculaire dans une goutte de mercurochrome ainsi que suit :

- Secouer plusieurs fois le pot contenant les moustiques pour les assommer.
- Préparer une lame pour deux moustiques et déposer une gouttelette de mercurochrome pour chaque moustique sous la loupe.
- Étaler le moustique dans la gouttelette de mercurochrome.
- Poser le moustique est sur sa face dorsale et piquer avec la seringue à insuline le milieu du thorax, pincer l'abdomen postérieur au niveau du 5ème anneau terminal à l'aide d'une pince de dissection et tirer postérieurement pour enlever le thorax, on verra l'œsophage et le tiers supérieur de l'estomac en haut.

- Piquer avec la seringue à insuline au niveau du 5ème anneau terminal, pincer l'œsophage avec la pince de dissection, tirer vers le haut et l'estomac sort entièrement sans tubes de Malpighi.
- Si les tubes de Malpighi restent coller à l'estomac, pincer les avec la pince de dissection et couper aux extrémités internes avec la seringue à insuline.

- **Lecture**

Elle a consisté à examiner au microscope les estomacs de moustiques pour la présence d'oocystes à un grossissement de 10x ; confirmer si incertain à 40x.

3.6.4.5. Détermination de la taille des moustiques

De façon conventionnelle, les entomologistes admettent que la dimension de l'aile d'un insecte correspond à sa taille. Sur cette base, la taille de l'ensemble des moustiques a été déterminée en mesurant une de leurs ailes. Cette mesure a été faite sous une loupe binoculaire dont l'un des oculaires comportait une règle millimétrée. Les ailes étaient d'abord bien étalées dans le sens horizontal sur la face ventrale, sur une lame porte objet puis recouvertes d'une lamelle, une goutte de vernis incolore et collant permettait de les maintenir intact. Les repères de mesure ont été les mêmes que celles utilisées par Briegel (1990 ; Jahan et Hurd 1997; Yaro et *al* 2006b). Il s'agissait de mesurer la distance séparant le point ALULA (creux au niveau du bout de l'aile rattachée au thorax) du bout inférieur de l'aile (vers l'abdomen). La taille a été mesurée dans les expériences de gorgement infectant les moustiques (fig.8).

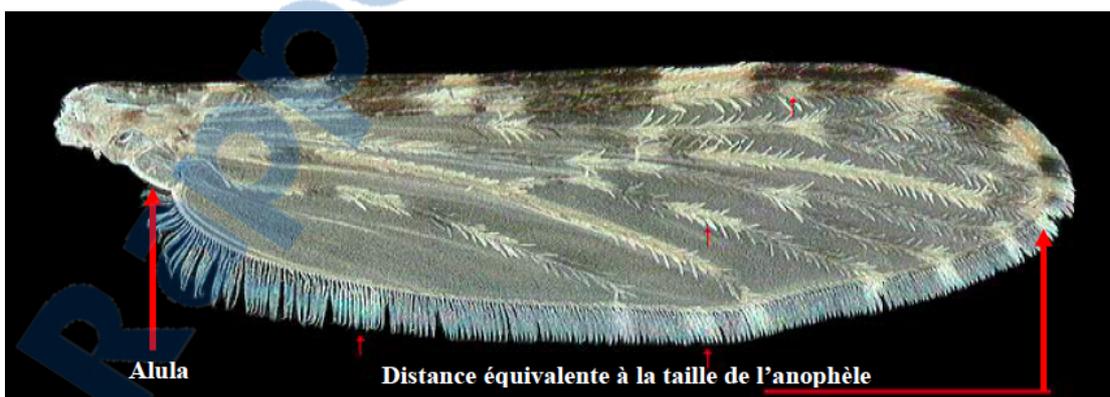


Figure 8: photo d'une aile d'*Anopheles gambiae s.l* montrant la distance mesurée pour la détermination de la taille de l'anophèle (Photo de Hervy et al., CD ROM IRD) : le 21 dec. 15

3.7. Optimisation de gorgement sur membrane

La sélection, le tri, le transport et la conservation sur le terrain, la sélection des porteurs de gamétocytes, le retrait des moustiques non gorgés, la dissection, la lecture et la détermination de la taille des ailes, les processus se font exactement comme décrits ci-dessus.

3.7.1. Catégorie d'âge des moustiques

Trois catégories d'âge de moustiques ont été utilisées en vue de l'optimisation des paramètres basés sur l'âge c'est-à-dire, le jour d'émergence à la date d'infestation. Ainsi trois groupes d'âge ont été retenus :

- 3 jours : les plus jeunes, sont triés dans 6 pots contenant chacun 30 femelles.
- 6 jours : d'âges moyens, sont triés dans 12 pots contenant chacun 30 femelles.
- 9 jours : les plus âges, aussi repartis en 6 pots de 30 femelles chacune.

3.7.2. Mise à jeun des moustiques ou « Starvation » en anglais

Les moustiques sont nourris sur les morceaux de coton imbibés de jus sucré 10 %. Conformément au protocole la combinaison suivante a été utilisé :

- 2 pots de femelles âgées de 3 jours sont mis à jeun 8 heures, 2 pots à 14 heures et les 2 autres pots à 20 heures avant le gorgement.
- 2 pots de femelles âgées de 6 jours sont mis à jeun 8 heures, 2 pots à 20 heures et les 8 autres pots à 14 heures avant le gorgement.
- Pour les moustiques femelles âgés de 9 jours, 2 pots sont mis à jeun à 8 heures, 2 pots à 14 heures et les deux autres pots à 20 heures avant le gorgement.

3.7.3. Type de membrane

Deux types de membrane ont été utilisés pour gorger les moustiques : le parafilm qui est une mince bande de caoutchouc élastique, et la baudruche qui est l'intestin de porc dont la composition ressemble à celle de l'épiderme du corps humain.

- ❖ **Parafilm** : cette membrane mince en bande de caoutchouc élastique, était coupée environ 2x2cm et étirée au maximum avant de couvrir les bases du feeder. Le parafilm était utilisé pour couvrir 12 des 24 bases du feeder prévues dont 3 pour les moustiques de âgés 3 jours, 6 pour les moustiques de âgés 6 jours et 3 pour les moustiques âgés de 9 jours.
- ❖ **Baudruche** : l'intestin de porc, de composition ressemblant à l'épiderme humain, est coupé et étiré aussi pour couvrir les autres 12 bases restantes du feeder, soit 3 pour les moustiques âgés de 3 jours, 6 pour les moustiques âgés de 6 jours et 3 pour les moustiques âgés de 9 jours.

3.7.4. Gorgement

Pour gorger les moustiques, ces deux membranes étaient découpées en petits morceaux de 2x2 cm, et étirées pour couvrir la base des « feeder ». Ainsi 24 pots de 30 moustiques chacun ont été gorgés dont :

- 2 pots de femelles âgées de 3 jours mis à jeun pendant 8 heures, 2 pots pendant 14 heures et 2 autres pots pendant 20 heures avant le gorgement.
- 2 pots de femelles âgées de 6 jours mis à jeun pendant 8 heures, 2 pots pendant 14 heures et 2 autres pots pendant 20 heures avant le gorgement.
- 2 pots de femelles âgées de 9 jours, mis à jeun pendant 8 heures, 2 pots pendant 14 heures et 2 autres pots pendant 20 heures avant le gorgement.

La moitié de ces pots a été gorgée à travers la membrane baudruche et les 12 autres à travers la membrane parafilm pendant après 30 minutes d'application dans chaque cas. Nous avons utilisé le culot cellulaire lavé du volontaire, reconstitué avec un volume égal de sérum de sujets humains naïfs non exposés (fig.9).



Figure 9: photo montrant une séance de gorgement direct sur membrane

Source: Malaria Research and Training Center: le 30 oct.15

3.8. Les paramètres à mesurer pour les comparaisons

Les paramètres suivants ont été mesurés pour les tous essais de gorgement : qui ont permis d'observer les différentes variables.

- **taux de gorgement** : le rapport du nombre de moustiques gorgés sur le nombre de moustiques exposés ;
- **taux de survie** : le rapport du nombre de moustiques survivant le 8^{ème} jour après le gorgement sur le nombre de moustiques gorgés ;
- **taux d'infection** : le rapport du nombre de moustiques infectés sur le nombre de moustiques disséqués ;
- **charge oocystique** : c'est le nombre moyen d'oocystes par estomac de moustique ;
- **la taille des moustiques** : correspond à la taille des ailes en mm ;

Gorgement direct

Les variations ont été comparées selon

- **la période de gorgement** : le crépuscule et l'aube
- **les localisations anatomiques** (la cheville, l'avant-bras et le mollet)

Gorgement sur membrane

Les variations ont été comparées selon

- **âge des moustiques** : 3 jours, 6 jours et 9 jours
- **temps de mise à jeun** : 8 heures, 14 heures et 20 heures
- **type de membrane** : baudruche et parafilm

3.9. Considérations éthiques

Le formulaire de consentement éclairé, d'autres informations remplies par les participants tels que les questionnaires et tous les matériels de recrutement / publicités ou lettres aux participants ont été approuvés après la soumission aux comités d'éthique du NIAID (N°11-I-N143), de la FMPOS (N°2011_43_FMPOS).

Les échantillons et les données collectés dans ce protocole ont été utilisés pour étudier le paludisme et les maladies apparentées. L'accès aux échantillons de recherche a été limité en utilisant soit une pièce fermée à clé ou un congélateur fermé à clé. Les échantillons et les données ont été stockés en utilisant des codes assignés par les investigateurs ou leurs délégués. Les données ont été gardées dans des ordinateurs protégés avec des mots de passe. Seuls les investigateurs ou leurs délégués avaient accès aux échantillons et aux données.

3.10. Saisie et analyse des données

Les données ont été enregistrées sur des fiches de base et saisies dans Excel. Les analyses ont été faites dans SPSS 20 et EPI06. Les tests statistiques suivants ont été réalisés avec un risque alpha de 5%.

- Les χ^2 de Pearson et de Yates ont été utilisés pour comparer les taux de gorgement, de survie et d'infection.
- La régression logistique a été utilisée pour comparer le taux d'infection.
- Le test ANOVA a été utilisé pour comparer la taille des ailes.

4. Résultats

4.1. Gorgement direct sur la peau

4.1.1. Localisation anatomique (l'avant-bras, le mollet et la cheville)

Tableau 1: comparaison des taux de gorgement, de survie et d'infection en fonction des différentes localisations anatomiques

Localisation anatomique	Taux de gorgement		Taux de survie		Taux d'infection		Charge oocystique en moyenne	Charge oocystique Min – Max
	%	N	%	N	%	N		
Avant-bras	89,1	340	71,6	299	12,0	214	8,0	1 – 25
Mollet	88,2	670	62,2	590	11,0	367	3,4	1 – 7
cheville	81,3	610	73,0	478	7,0	349	4,8	1 – 9

%= pourcentage N = nombre de moustique Min = minimum Max = maximum

La comparaison des taux de gorgement a montré une différence significative entre les différentes localisations anatomiques. Les taux de gorgement sur l'avant-bras et sur le mollet ont été supérieurs à celui sur de la cheville ($X^2=26,9$, $ddl=2$, $P<10^{-3}$). Toute fois le taux de gorgement sur l'avant-bras était comparable au taux de gorgement obtenu sur le mollet (X^2 de Yates=0,0 ; $ddl=1$, $P=0,956$).

Les taux de survie des moustiques gorgés sur l'avant-bras et sur la cheville ont été significativement plus élevés que celui sur le mollet ($X^2=16,39$ $ddl=2$ $P<10^{-3}$) 8 jours après le gorgement. Mais il n'y avait pas de différence significative entre ceux de l'avant-bras et de la cheville (X^2 de Yates= 0,13 ; $ddl=1$, $p=0,723$).

Il n'y avait pas de différence significative entre les taux d'infection des moustiques gorgés sur la cheville et ceux gorgés sur l'avant-bras ($P=0,74$) et la cheville au mollet ($P=0,98$). Les taux d'infection suggèrent une élévation au niveau de l'avant-bras. Les comparaisons ont été faites en prenant la cheville comme la valeur de référence par la régression logistique. La charge oocystique moyenne a été plus élevée chez les moustiques gorgés sur l'avant-bras avec des extrêmes de 1 à 25 oocystes.

4.1.2. Période de gorgement

Tableau 2: comparaison des taux de gorgement, de survie et d'infection en fonction des périodes de gorgement

Période de la journée	Taux de gorgement		Taux de survie		Taux d'infection		Charge oocystique en moyenne	Charge oocystique Min – Max
	%	N	%	N	%	N		
Aube	88,9	360	71,9	320	1,7	230	1,5	1-2
Crépuscule	90,6	360	66,6	326	0,9	217	31	1-60

%= pourcentage N = nombre de moustique Min = minimum Max = maximum

Il n'y avait pas de différence statistique significative entre le taux de gorgement des moustiques à l'aube et celui du crépuscule (X^2 de Yates =0,4 ; $ddl=1$; $P= 0,540$).

Aucune différence statistique n'a été observée entre les taux de survie à l'aube et celui du crépuscule ($X^2=1,9$; $ddl=1$; $P=0,169$). La même observation a été faite au niveau des taux d'infection (X^2 de Yates = 0,1 ; $ddl=1$; $P=0,734$). La charge oocystique moyenne a été plus élevée chez les moustiques gorgés au crépuscule avec des extrêmes de 1 à 60 oocystes.

4.2. Gorgement direct sur membrane

4.2.1. Mesure des variabilités liées à l'âge, au temps de mise à jeun et la taille pouvant influencer sur la susceptibilité à l'infection

Tableau 3: comparaison des taux de gorgement, de survie et d'infection en fonction de l'âge.

Age,	Taux de gorgement		Taux de survie		Taux d'infection		Charge oocystique en moyenne	Charge oocystique Min – Max
	%	N	%	N	%	N		
3 jours	95,2	1800	83,9	1709	4,8	1433	1,34	1 – 29
6 jours	87,2	3600	72,3	3148	3,3	2258	2,83	1 – 80
9 jours	78,1	1800	54,2	1412	1,9	724	2,53	1 – 22

%= pourcentage N= nombre de moustique Min = minimum Max = maximum

Le taux de gorgement de moustiques a varié selon l'âge. Il a été plus élevé avec les moustiques de 3 jours que les moyens (6 jours) et plus âgés (9 jours, $X^2=85,8$; $ddl=2$; $P<10^{-3}$), et également les moustiques de 6 jours ont été plus gorgés que ceux de 9 jours ($X^2=73,3$; $ddl=1$; $P<10^{-3}$).

Le taux de survie après 8 jours après le gorgement a varié également avec l'âge des moustiques. Il était plus élevé avec les moustiques de 3 jour que ceux de 6 jours et de 9 jours ($X^2= 388,4$; $ddl=2$; $P<10^{-3}$), et également les moustiques de 6 jours ont plus survécu que ceux de 9 jours (X^2 de Yates =179,3 ; $ddl=1$, $P<10^{-3}$).

L'analyse de régression a confirmé une différence significative entre les lots des différents âges en terme d'infection. Les moustiques de 3 jours ont été plus infectés que les moyens (6 jours ; $P=0,018$) et plus âgés (9 jours ; $P<10^{-3}$). Cette comparaison a pris les moustiques de 3 jours comme la valeur de référence. La charge oocystique moyenne a été plus élevée chez les moustiques de 3 jours avec des extrêmes de 1 à 80 oocystes.

Tableau 4: comparaison des taux de gorgement, de survie et d'infection en fonction de temps de mise à jeun (8H, 14H et 20H) pour les moustiques de 3 jours

TMJ	Taux de gorgement		Taux de survie		Taux d'infection		Charge oocystique en moyenne	Charge oocystique Min – Max
	%	N	%	N	%	N		
8 Heures	96,0	600	83,7	576	3,7	482	1,83	1 – 4
14 Heures	95,5	600	85,5	573	5,3	490	2,92	1 – 29
20 Heures	93,3	600	82,3	560	5,2	461	2,79	1 – 21

TMJ = Temps de mise à jeun % = pourcentage N = nombre de moustique Min = minimum Max = maximum

Les taux de gorgement en fonction des temps de mise à jeun (8H, 14H et 20H) ont été respectivement 96,0 % (n=576), 95,3 % (n=573) et 93,3% (n=560). Il n'y avait aucune différence statistiquement significative entre ces différents taux ($X^2=5,0$; $ddl=2$, $P=0,081$).

Au niveau de la survie, les taux en fonction des temps de mise à jeun (8H, 14H et 20H) ont été respectivement 83,7 % (n=482), 85,3 % (n=490) et 82,3 % (n=461) pour les moustiques de 3 jours. Ces taux n'ont présenté aucune différence statistiquement significative les uns des autres ($X^2=2,1$; $ddl=2$; $P=0,341$).

Comparativement à leurs taux de gorgement et de survie, les taux d'infection entre les moustiques de 3 jours, n'ont pas présenté de différence statistiquement significative ($P=0,433$).

La charge oocystique moyenne a été plus élevée chez les moustiques mis à jeun de 14 heures avec des extrêmes de 1 à 29 oocystes.

Tableau 5: comparaison des taux de gorgement, de survie et d'infection en fonction de temps de mise à jeun (8H, 14H et 20H) pour les moustiques de 6 jours

TMJ	Taux de gorgement		Taux de survie		Taux d'infection		Charge oocystique en moyenne	Charge oocystique Min – Max
	%	N	%	N	%	N		
8 Heures	91,0	600	76,7	546	4,1	419	2,65	1-17
14 Heures	88,6	2400	72,6	2126	3,1	1544	1,83	1-5
20 Heures	79,3	600	65,5	476	3,8	312	5,54	1-80

TMJ = Temps de mise à jeun % = pourcentage N = nombre de moustique Min = minimum Max = maximum

Le taux de gorgement a varié avec le temps de mise à jeun. Les taux de gorgement de 8H et 14H ont été hautement supérieurs à celui de 20H ($X^2=45,7$; $ddl=2$; $P=10^{-3}$). Mais les taux de gorgement ont été comparables statistiquement entre 8H et 14H ($X^2=2,6$; $ddl=1$; $P=0,104$) pour les moustiques de 6 jours.

Comparativement à leur taux de gorgement, les moustiques de 6 jours ont présenté des taux de survie comparables entre 8H et 14H (X^2 de Yates=3,6 ; $ddl=1$; $P=0,059$) 8 jours après le gorgement. Ces taux ont été significativement supérieurs à celui de 20H ($X^2= 16,3$; $ddl=2$; $P=0,001$).

Contrairement à leurs taux de gorgement et de survie, les taux d'infection des moustiques de 6 jours n'ont pas présenté de différence significative ($P=0,565$) entre les temps de mise à jeun (8H, 14H et 20H). La charge oocystique moyenne a été plus élevée chez les moustiques mis à jeun de 20 heures avec des extrêmes de 1 à 80 oocystes.

Tableau 6: comparaison des taux de gorgement, de survie et d'infection en fonction de temps de mise à jeun (8H, 14H et 20H) pour les moustiques de 9 jours

TMJ	Taux de gorgement		Taux de survie		Taux d'infection		Charge oocystique en moyenne	Charge oocystique Min – Max
	%	N	%	N	%	N		
TMJ	83,8	600	55,3	503	1,8	278	1	1 – 1
8 Heures	80,5	600	54,9	483	1,1	265	8	1- 22
14 Heures	71,0	600	52,1	426	3,2	222	1,29	1 – 3
20 Heures								

TMJ = Temps de mise à jeun % = pourcentage N = nombre de moustique Min = minimum Max = maximum

Pour les moustiques de 9 jours, il a été constaté que les taux de gorgement de 8H et de 14H ont été significativement supérieurs à celui de 20H ($X^2= 31,5$; $ddl=2$; $P<10^{-7}$), et il n'y avait aucune différence statistiquement significative entre les temps de mise à jeun de 8H et de 20H ($X^2=2,0$; $ddl=1$; $P=0,152$).

Les taux de survie en fonction de temps de mise à jeun (8H, 14H et 20H) ont été respectivement 55,3 % (n=278), 54,9 % (n=265) et 52,1 % (n=222) 8 jours après le gorgement. La comparaison des différents taux n'a révélé aucune différence statistiquement significative ($X^2=1,1$; $ddl=2$; $P=0,587$) pour les moustiques de 9 jours.

Le taux d'infection de 8H a été significativement comparable à ceux de 14H et 20H ($P=0,269$) pour les moustiques de 9 jours. La charge oocystique moyenne a été plus élevée chez les moustiques mis à jeun de 8 heures avec des extrêmes de 1 à 22 oocystes.

Tableau 7: comparaison des taux de gorgement, de survie et d'infection en fonction de temps de mise à jeun

TMJ	Taux de gorgement		Taux de survie		Taux d'infection		Charge oocystique en moyenne	Charge oocystique Min - Max
	%	N	%	N	%	N		
8 Heures	90,3	1800	72,6	1625	2,9	1162	2,1	1-17
14 Heures	88,2	3600	72,3	3182	3,3	2277	2,4	1-29
20 Heures	81,2	1800	68,1	1462	3,9	976	4,1	1-80

TMJ = Temps de mise à jeun % = pourcentage N = nombre de moustique Min = minimum Max = maximum

Le taux de gorgement de 8H a été significativement supérieur à ceux de 14H et 20H ($X^2=76,7$; $ddl=2$; $P<10^{-3}$) et également entre 14H et 20H ($X^2=4,2$, $ddl=1$; $P=0,04$).

Les moustiques de 8h et 14H de mise à jeun ont plus survécu que ceux de 20H. Cette différence a été statistiquement significative ($X^2=17,1$, $ddl= 2$ $P<10^{-3}$). Cependant entre 8H et 14H, la différence n'a pas été de significative (X^2 de Yates=0,1; $ddl=1$; $P=0,850$).

Les temps de mise à jeun n'ont pas montré de différence significative entre (8 heures et 14 heures ; $P=0,49$) et entre (8 heures et 20 heures ; $P=0,15$). Les taux d'infection suggèrent une élévation à 20 heures. Les comparaisons ont été faites en prenant 8 heures comme la valeur de référence par la régression logistique. La charge oocystique moyenne a été plus élevée chez les moustiques mis à jeun de 20 heures avec des extrêmes de 1 à 80 oocystes.

4.2.2. Comparaison des types de membrane (parafilm et baudruche)

Tableau 8: Comparaison des taux de gorgement, de survie et d'infection en fonction de types de membrane (parafilm et baudruche)

Membrane	Taux de gorgement		Taux de survie		Taux d'infection		Charge oocystique en moyenne	Charge oocystique Min - Max
	%	N	%	N	%	N		
Parafilm	86,9	3600	71,3	3128	3,3	2230	2,8	1-8
Baudruche	87,3	3600	71,4	3141	3,5	2185	3,4	1-80

%= pourcentage N = nombre de moustique Min = minimum Max = maximum

Le taux de gorgement des moustiques au niveau du parafilm a été comparable à celui sur la baudruche. Il n'y avait pas de différence statistiquement significative (X^2 de Yates =0,2; $ddl=1$; $P=0,673$) entre les deux membranes. La même observation a été faite au niveau des taux de survie ($X^2=0,0$; $ddl=1$; $P=0,851$). En prenant la baudruche comme la valeur de référence, la relation entre les taux d'infection et le type de membrane n'a eu aucun effet sur l'infection (baudruche 3,5 % et parafilm 3,3% ; $P=0,86$). La charge oocyste moyenne a été plus élevée chez les moustiques gorgés à travers la membrane baudruche avec des extrêmes de 1 à 80 oocystes.

4.2.3. Comparaison taille et infection

Tableau 9: Comparaison entre la taille des moustiques infectés et non-infectés

	Taille des ailes mm \pm Std.	Nombre de moustique
Infectés	6,3 \pm 0,3	110
Non infectés	6,3 \pm 0,4	2762
P-valeur		0,852

mm=millimètre Std. Déviation=standard de déviation

La comparaison de la taille moyenne des moustiques infectés (6,3 \pm 0,3, N=110) [One-way ANOVA test] et non-infectés (6,3 \pm 0,4, N=2762) n'a révélé aucune différence statistiquement significative ($F=0,03$; $ddl=1$ $P=0,852$).

5. Discussion

L'optimisation des essais de gorgement a toujours été une préoccupation majeure en entomologie médicale. Elle constitue un préalable indispensable à l'évaluation des vaccins bloquant la transmission (TBV). En effet, nos expériences ont mis en évidence l'importance concernant la localisation anatomique, l'effet de l'âge et du temps de mise à jeun des moustiques dans le succès de leur gorgement. L'utilisation d'outils optimisés a augmenté les taux de gorgement, de survie et d'infection des moustiques. Cette approche contribuera à donner un nouvel élan aux études d'infestation expérimentale. Les tendances observées seront utilisées afin d'évaluer les vaccins bloquant la transmission du paludisme ainsi que d'éventuelles essais cliniques impliquant des molécules à effet gamétocide.

5.1. Gorgement

Plusieurs facteurs propres aux moustiques et à l'infestation expérimentale interviennent dans le gorgement. Ce sont la période de gorgement, la localisation anatomique (l'avant-bras, le mollet et la cheville), l'âge des moustiques et le type de membrane.

Gorgement direct sur la peau

Il est possible d'augmenter la proportion des moustiques gorgés en optimisant certains paramètres. Le but étant d'augmenter le taux de gorgement afin d'avoir plus de moustiques infectés. Dans nos conditions de laboratoire, tout en simulant la nuit (l'obscurité), la comparaison de période de gorgement n'a pas montré de différence entre l'aube et le crépuscule. La période de gorgement ne semble pas avoir d'effet sur l'infestation expérimentale.

Le site de gorgement des moustiques sur l'hôte diffère selon l'espèce culicidienne. Plusieurs espèces ont montré une préférence significative pour les jambes et les pieds. Les sites de piqûres de *Anopheles gambiae* ont été guidés par le courant de convection le long du corps de l'hôte selon Dekker et al (1998). Dans les expériences, l'avant-bras (89,1 %) et le mollet (88,2 %) ont eu les meilleurs taux de gorgement. Il est préférable de gorger soit au niveau de l'avant-bras, soit au niveau du mollet. Nos résultats concordent avec ceux de Jong et Knols (1995). La préférence des moustiques pour ces régions (l'avant-bras et le mollet) sont respectivement en corrélation avec les combinaisons particulières de la température de la peau et de la densité de la glande sudoripare exocrine (de Jong & Knols, 1995).

Gorgement direct sur membrane

Dans nos conditions optimales de l'élevage d'*An. gambiae*, il est préférable de gorger les moustiques de 3 jours (95,2 %). Cette performance diminue en fonction de l'augmentation de l'âge des moustiques 6 jours (87,7%) et 9 jours (78,1%). Cela pourrait être dû à des facteurs naturels liés aux moustiques. L'âge de 3 jours a été retenu, ces résultats concordent avec ceux de Boudin et al (Boudin et al, 1993) et rejoint la conclusion de Robert Vincent (Robert, 2006).

Le taux de gorgement a été maximum pour les moustiques mise à jeun de 8 heures (90,3 %), il diminue avec l'accroissement de temps de mise à jeun 14 heures (88,2 %) et 20 heures (81,2%).

Les temps de mise à jeun (8H, 14H et 20H) n'ont pas eu d'effet sur le taux de gorgement des moustiques de 3 jours. Donc les moustiques de 3 jours peuvent être gorges entre 8 et 20 heures.

Les observations sur les moustiques de 6 jours et 9 jours ont montré que plus le temps de mise à jeun augmente plus le taux de gorgement devient faible. A 20 heures de mise à jeun les taux de gorgement sont inférieurs à 80 %. Il est préférable de les gorger entre 8 et 14 heures de mise à jeun.

Il n'y a pas eu de différence significative entre les deux types de membrane (parafilm et baudruche) en terme de gorgement. La membrane baudruche est préférable qui avait montré une légère augmentation sur le taux de gorgement.

5.2. Survie

La longévité est un paramètre important, car il faut que les moustiques survivent assez longtemps pour permettre le développement du parasite. Le taux de survie est plus élevé au niveau de l'avant-bras et la cheville qu'au niveau du mollet. Ce fait pourrait être dû à un ou des facteurs liés à l'hôte humain.

Les *Anopheles* femelles, forme M vivent en moyenne 19 jours au sein de l'insectarium (Dao et al, 2010). La survie des moustiques diminue avec la mortalité qui affecte l'âge (Clements & Paterson, 1981). Les travaux de Charlwood et collaborateurs ont montré que la survie affecte le taux d'infection des moustiques (Charlwood, 2012). La plupart des moustiques n'avaient pas atteint l'âge de transmettre, le taux de mortalité augmentait avec l'âge des moustiques.

Il a été observé dans cette étude que les moustiques de 3 jours (83,9 %) ont plus survécu que ceux de 6 jours et 9 jours. En effet a été constaté une mortalité accrue avec l'augmentation de l'âge des moustiques le 8^{ème} jour après le gorgement. L'utilisation des moustiques de 3 jours

permet d'avoir un nombre plus important de femelles survivantes le jour de la dissection. Ces résultats sont similaires à ceux de Robert Vincent, qui a trouvé 2, 3, 4 jours pour les moustiques sauvages et 4 jours pour ceux de l'insectarium.

Le taux de survie a été meilleur à 8H et 14H de mise à jeun par rapport à 20H. Il est préférable de gorger les moustiques mis à jeun de 8 et 14 heures afin d'augmenter leur longévité.

Le temps de mise à jeun (8H, 14H et 20H) n'a pas eu d'effets sur les taux de survie des moustiques de 3 et 9 jours. Donc les moustiques de 3 et 9 jours peuvent être gorgés entre 8 et 20 heures. Cependant, il a eu un effet négatif sur la survie des moustiques de 6 jours au delà de 20 heures de mise à jeun. Il a été soutenu de les gorger entre 8 et 14 heures.

Il n'y a pas eu de différence entre les moustiques exposés à l'aube et au crépuscule en terme de longévité.

Selon Robert VINCENT, les moustiques à gorger doivent être âgés de trois ou de quatre jours pour la souche sauvage et de quatre jours pour la souche d'insectarium afin d'obtenir le meilleur rendement en moustiques gorgés qui survivent huit jours après le gorgement (Robert, 1998).

5.3. Infection

Plusieurs facteurs peuvent éventuellement jouer sur le pouvoir infectant des moustiques. Dans cette étude, il n'y a pas eu de différence entre les gorgements à l'aube et du crépuscule en terme d'infection. L'infestation étant expérimentale peut être effectuée à n'importe quel moment de la journée pour obtenir l'infection des moustiques.

Il n'y a pas eu de différence significative entre les localisations anatomiques (l'avant-bras, le mollet et la cheville). Mais il est préférable d'utiliser l'avant-bras qui a montré une augmentation de taux d'infection par rapport au mollet et la cheville.

Cependant les moustiques jeunes (3 jours) ont été plus infectés que les moyens (6 jours) et plus âgés (9 jours). Il a été soutenu le gorgement des moustiques de 3 jours pour augmenter le taux d'infection. Selon Lensen (1996), les moustiques âgés digèrent leur repas de sang plus rapidement que les plus jeunes.

Les observations n'ont pas trouvé l'influence des temps de mise à jeun sur l'infection des moustiques. Dans l'étude, l'âge a été le seul facteur important pouvant jouer un rôle sur le pouvoir infectant des moustiques.

5.4. Comparaison taille / l'infection

Cette étude n'a révélé aucune corrélation entre le pouvoir infectant et taille des moustiques. Nos résultats concordent avec ceux des travaux de Yaro et al (2011). Ce fait pourrait s'expliquer par les conditions du laboratoire et l'absence de compétition au moment du gorgement.

6. Conclusions et recommandations

6.1. Conclusions

Les taux de gorgement ont été élevés chez les moustiques gorgés sur l'avant-bras et sur le mollet que ceux gorgés sur la cheville. Les moustiques gorgés sur l'avant-bras et sur la cheville ont plus survécu que ceux sur le mollet. Il n'y a pas eu de différence entre les localisations anatomiques. Cependant le taux d'infection était plus élevé au niveau de l'avant-bras.

L'aube et le crépuscule ont été comparables en terme des taux de gorgement, de survie et d'infection. On reste dans la réserve où notre effectif était faible cela peut s'avérer plus important avec l'accroissement de l'effectif.

Les moustiques âgés de trois jours se sont gorgés, ont survécu et se sont infectés plus que les moustiques de 6 et 9 jours.

Le taux de gorgement était plus élevé chez les moustiques mis à jeun de 8 heures que les temps de mise à jeun de 14 et 20 heures. Les moustiques mis à jeun de 8 et 14 heures ont plus survécu que ceux de 20 heures de mise à jeun. Il n'y a pas eu de différence entre les différents temps de mise à jeun en terme d'infection. Cependant le taux d'infection était plus élevé chez les moustiques mis à jeun de 20 heures.

Il n'y a eu pas de différence entre les membranes baudruche et parafilm en terme de gorgement, de survie et d'infection. Cependant le taux d'infection était légèrement élevé chez les moustiques gorgés à travers la membrane baudruche.

6.2. Recommandations

- Au PNLP

De renforcer la collaboration avec les structures de recherche telles que la section d'entomologie du MRTC pour les sujets de lutte contre les vecteurs de maladies.

- Aux structures de recherche

Standardiser la nouvelle méthode optimisée pour faciliter l'évaluation, la comparaison et la collaboration entre les laboratoires.

D'appliquer et standardiser cet outil dans l'évaluation des vaccins bloquant la transmission du paludisme et d'autres médicaments etc. Il serait donc souhaitable que les études puissent se poursuivre pour évaluer les vaccins bloquant la transmission du paludisme

- Aux populations des sites d'étude

De bien renforcer la coopération pour les activités de recherche.

Nom : **SINABA**

Prénom : **youssef**

Titre : Optimisation des essais de gorgement d'*Anopheles gambiae* en prélude d'une évaluation des vaccins bloquant la transmission du paludisme à Bancoumana, Mali

Année de Soutenance : **2015**

Ville de Soutenance : **Bamako**

Lieu de dépôt : **Bibliothèque de la Faculté de Médecine et d'Odonto-Stomatologie (FMOS), Bamako, Mali.**

Secteur d'intérêt : **Santé publique, Paludisme, Lutte anti vectorielle.**

Résumé

Le paludisme constitue un problème majeur de santé publique dans le monde. L'accroissement de la résistance des médicaments antipaludiques et des moustiques aux insecticides suscitent une nouvelle approche. L'espoir se focalise sur les vaccins. Les vaccins bloquant la transmission du paludisme (TBV) y figurent mais ils posent encore d'énormes difficultés dans l'évaluation sur le terrain. L'activité de blocage de la transmission est mesurée par le gorgement direct sur la peau du porteur de gamétocyte et le gorgement direct à travers une membrane. Dans le but d'optimiser les essais de gorgement pour une meilleure évaluation des vaccins candidats. Ses séries de gorgement d'*Anopheles gambiae* ont été effectuées à Bancoumana, Mali. Les porteurs de gamétocytes en plasmodium étaient sélectionnés aux essais de gorgement lors des passages hebdomadaires transversaux. Les taux d'infection ont été significativement comparables entre les localisations anatomiques ($P=0,74$ pour la cheville à l'avant-bras et $P=0,98$ pour la cheville au mollet). Les périodes de gorgement ont été comparables 1,7% pour l'aube et 0,9 % pour le crépuscule en terme d'infection. Le taux d'infection a été maximum pour les moustiques de 3 jours (95,2 %) que ceux de 6 jours (87,2 %) et 9 jours (78,1 %). Les taux d'infection ont été comparables entre les différents temps de mise à jeun 8 heures (2,9 %), 14 heures (3,3 %) et 20 heures (3,9%). Le type de membrane n'a eu aucun effet sur l'infection 2,8 % pour parafilm et 3,4 % pour baudruche ($P=0,86$). La comparaison de la taille moyenne des moustiques infectés ($6,3 \pm 0,3$) et non-infectés ($6,3 \pm 0,4$) n'a révélé aucune différence statistiquement significative ($P=0,852$). Cette étude a permis l'optimisation des essais de gorgement des moustiques. Ce travail ouvre des perspectives intéressantes pour la standardisation et l'évaluation des vaccins bloquant la transmission du paludisme.

Il n'y a pas eu de différence entre les localisations anatomiques de l'être humain. Les gorgements de l'aube et du crépuscule ont été comparables. Les moustiques à gorger doivent être âgés de trois jours, mis à jeun de 8 heures pour un meilleur gorgement.

Mots clés: Paludisme, *Anopheles gambiae*, essais de gorgement et vaccins bloquant la transmission.

Name: **SINABA**

First name: **Youssouf**

Title: Optimization of *Anopheles gambiae* feeding assay prior to malaria blocking vaccines evaluation in Bancoumana, Mali.

Year of defense: **2015**

City of defense: **Bamako**

Place of deposit: **Library of the Faculty of Medicine and Dentistry (FMOS), Bamako, Mali.**

Sector of interest: **Public Health, Malaria, and vector control.**

Abstract

Malaria is a major public health problem worldwide. Parasites resistance to drugs is on the rise, so does vector resistance to insecticides. Hope are now focused on vaccines. Vaccines blocking malaria transmission (TBV) are within this hope, however there are enormous challenges related to their field evaluation. The transmission blocking activity is measured by direct blood feeding on the skin of gametocyte carrier and direct feeding through a membrane. In order to optimize blood feeding trials for a better evaluation of vaccine candidates: a set of feeding series of *Anopheles gambiae* were made in Bancoumana, Mali. The carriers of Plasmodium's gametocytes were selected for feeding assay during a cross weekly passages. The infection rates were significantly comparable between anatomical localizations ($P = 0.74$ for the ankle to the forearm and $P = 0.98$ for the ankle to the calf). The feeding time were comparable 1.7% and 0.9% respectively for dawn and dusk in term of infection. The maximum infection rate was observed for 3 days old mosquitoes (95.2%) compare to those of 6 days (87.2%) and 9 days (78.1%). The infection rate were comparable between the time of starvation 8 hours (2.9%), 14 hours (3.3%) and 20 hours (3.9%). The type of membrane had no effect on infection and were 2.8% for parafilm and 3.4% for baudruche with no statistically difference ($P = 0.86$). The comparison of the average size of infected mosquitoes (6.3 ± 0.3) and non-infected (6.3 ± 0.4) revealed no statistically significant difference ($P = 0.852$). This study allowed the optimization of mosquito's blood feeding assays. This work opens interesting perspectives for the standardization and evaluation of transmission-blocking vaccines of malaria.

There was no difference between the anatomical localization of body of the human being. The feeding during dawn and dusk were comparable. Mosquitoes must be fed at 3 days old, and starved for eight hours for a better feeding.

Références bibliographiques

1. Aubry, P. (2014). Paludisme Actualités 2014. *Med. Trop*, 1-24. Beier, J. C., & Vanderberg, J. P. (1998). Sporogonic development in the mosquito. *Malaria: parasite biology, pathogenesis and protection*, 49-62.
2. Bischoff, E. (2001). Etude de deux membres de la superfamille multigénique Pf60/var de *Plasmodium falciparum*, exprimés par recodage traductionnel programmé (Thèse de Ph.D. Université de Paris 7, Paris, France).
3. Boudin, C., Olivier, M., Molez, J. F., Chiron, J. P., & Ambroise-Thomas, P. (1993). High human malarial infectivity to laboratory-bred *Anopheles gambiae* in a village in Burkina Faso. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 48(5), 700-706.
4. Bousema, J.T., Drakeley, C.J., Sauerwein, R.W., 2006a. Sexual-Stage Antibody Responses to *P. Falciparum* in Endemic Populations. *Curr. Mol. Med.* 6, 223–229.
5. Bousema, J.T., Roeffen, W., Van Der, K.M., De Vlas, S.J., Van, D.E.V., Bangs, M.J., Teelen, K., Kurniawan, L., Maguire, J.D., Baird, J.K., Sauerwein, R.W., 2006b. Rapid onset of transmission-reducing antibodies in Javanese migrants exposed to Bousema, T., Dinglasan, R.R., Morlais, I., Gouagna, L.C., van Warmerdam, T.V., Awono-Ambene, P.H., Bonnet, S., Diallo, M., Coulibaly, M., Tchuinkam, T., Mulder, B., Targett, G., Drakeley, C., Sutherland, C., Vincent Robert, V., Doumbo, O., Toure, Y., Graves, P.M., Roeffen, W., Sauerwein, R., Birkett, A., Locke, E., Morin, M., Wu, Y., Churcher, T.S. (2 August 2012). Mosquito feeding assays to determine the infectiousness of naturally infected *plasmodium falciparum* gametocyte carriers. *Plosone*, 7 (8), 1-13.
6. Briegel, H. (1990). Fecundity, metabolism, and body size in *Anopheles* (Diptera: Culicidae), vectors of malaria. *Journal of Medical Entomology*, 27(5), 839-850.
7. Carnevale, P., Goff, G., TOTO, J. C., & Robert, V. (1992). *Anopheles nili* as the main vector of human malaria in villages of southern Cameroon. *Medical and veterinary entomology*, 6(2), 135-138.
8. Carnevale, P., Robert, V., Manguin, S., Corbel, V., Fontenille, D., Garros, C., ... & Roux, J. (2009). Les anophèles: *Biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle*. Marseille: IRD Editions

9. Charlwood, J. D., Tomas, E. V., EGYIR-YAWSON, A., Kampango, A. A., & Pitts, R. J. (2012). Feeding frequency and survival of *Anopheles gambiae* in a rice-growing area in Ghana. *Medical and veterinary entomology*, 26(3), 263-270.
10. Clements, A.N. & Paterson, G.D. (1981). The analysis of mortality and survival rates in wild populations of mosquitoes. *Journal of Applied Ecology*, 18, 373–399.
11. Coatney, G. R., Collins, W. E., Warren, M., & Contacos, P. G. (1971). The primate malarias. *The primate malarias*. Washington: US Gov. Print. Off.
12. Coetzee, M., Hunt, R. H., Wilkerson, R., Della Torre, A., Coulibaly, M. B., & Besansky, N. J. (2013). *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. *Zootaxa*, 3619(3), 246-274.
13. Coluzzi, M., Petrarca, V., & di Deco, M. A. (1985). Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Italian Journal of Zoology*, 52(1-2), 45-63.
14. Coluzzi, M., Sabatini, A., Petrarca, V., & Di Deco, M. A. (1979). Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 73(5), 483-497.
15. Coulibaly, M. B. (1999). Comparaison de deux méthodes d'infection expérimentale des moustiques comme moyens d'évaluation des vaccins de blocage de la transmission du paludisme à Bancoumana, Mali (Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako, Mali).
16. Coutinho-Abreu, I. V., & Ramalho-Ortigao, M. (2010). Transmission blocking vaccines to control insect-borne diseases: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(1), 1-12.
17. Dao, A., Kassogue, Y., Adamou, A., Diallo, M., Traore, S. F., & Lehmann, T. (2010). Reproduction-longevity trade-off in *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 47(5), 769-777.
18. de Jong, R., and B. G. J. Knols. "Selection of biting sites on man by two malaria mosquito species." *Experientia* 51.1 (1995): 80-84.

19. Dekker, T., Takken, W., Knols, B. G., Bouman, E., Laak, S., Bever, A., & Huisman, P. W. (1998). Selection of biting sites on a human host by *Anopheles gambiae* ss, *An. arabiensis* and *An. quadriannulatus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 87(3), 295-300.
20. Diallo, S., Vivares, C. (Mai, 2006). Paludisme en Afrique. Communication présentée au [22 mai 2006]. La société ouest Africaine de parasitologie et le groupement des protistologues de langue française, Dakar. disponible : http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241596756_eng.pdf
21. Dolo, A., Camara, F., Poudiogo, B., Touré, A., Kouriba, B., Bagayogo, M., ... & Doumbo, O. (2003). Epidémiologie du paludisme dans un village de savane soudanienne du Mali (Bancoumana). *Bull Soc Pathol Exot*, 96(4), 308-312.
22. Duffy, P. E., & Kaslow, D. C. (1997). A novel malaria protein, Pfs28, and Pfs25 are genetically linked and synergistic as falciparum malaria transmission-blocking vaccines. *Infection and Immunity*, 65(3), 1109-1113.
23. Dumay, K. (2003). Les avancées de la recherche dans l'élaboration d'un vaccin contre le paludisme (Thèse de doctorat. Université de Lyon 1, France).
24. Engers, H.D. (2001). Situation et perspectives en prophylaxie antipaludique. *Bull Soc Pathol Exot*, 94,2 bis, 147-14.
25. Ericsson, C. D., Steffen, R., & Isaäcson, M. (2001). Viral hemorrhagic fever hazards for travelers in Africa. *Clinical infectious diseases*, 33(10), 1707-1712.
26. Fontenille, D., Cohuet, A., Awono-Ambene, P. H., Antonio-Nkondjio, C., Wondji, C., Kengne, P., & Simard, F. (2003). Systématique et biologie des anophèles vecteurs de *plasmodium* en Afrique, données récentes. *Médecine tropicale*, 63(3), 247.
27. Gamage Mendis, A. C., Rajakaruna, J., Carter, R., & Mendis, K. N. (1992). Transmission blocking immunity to human *Plasmodium vivax* malaria in an endemic population in Kataragama, Sri Lanka. *Parasite immunology*, 14(4), 385-396.
28. Genton, B. (2001). Vaccins antimalariques: développement de nouvelles technologies pour l'immunisation: Médecine des voyages. *Médecine et hygiène*, 59(2348), 1176-1184.

29. Ghosh, S., Malhotra, P., Lalitha, P. V., Guha-Mukherjee, S., & Chauhan, V. S. (2002). Expression of *Plasmodium falciparum* C-terminal region of merozoite surface protein (PfMSP1 19), a potential malaria vaccine candidate, in tobacco. *Plant Science*, 162(3), 335-343.
30. Gillies, M. T., & Coetzee, M. (1987). A Supplement to the Anophelinae of Africa South of the Sahara. *Publications of the South African Institute for Medical Research*, 55, 1-143.
31. Githeko, A. K., Brandling-Bennett, A. D., Beier, M., Atieli, F., Owaga, M., & Collins, F. H. (1992). The reservoir of *Plasmodium falciparum* malaria in a holoendemic area of western Kenya. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(4), 355-358.
32. Gozar, M. M. G., Price, V. L., & Kaslow, D. C. (1998). Saccharomyces cerevisiae-secreted fusion proteins Pfs25 and Pfs28 elicit potent *Plasmodium falciparum* transmission-blocking antibodies in mice. *Infection and immunity*, 66(1), 59-64.
33. Grassi, B. (1900). Studi un zoologo sulla Malaria. Rome.
34. Grassi, B., Bignami, A. and Bastianelli, G. (1898). Ulteriore ricerche sul ciclo parassiti. *Rend. Accad. Reale. Lincei*.8(ser.5a, fasc 9): p. 5.
35. Grassi, B., Bignami, A. and Bastianelli, G. (1899). Ulteriore ricerche sul ciclo parassiti. *Atti. Accad. Reale. Lincei*. 8:21-28.
36. Graves, P. M., Burkot, T. R., Carter, R., Cattani, J. A., Lagog, M., Parker, J., ... & Alpers, M. P. (1988). Measurement of malarial infectivity of human populations to mosquitoes in the Madang area, Papua New Guinea. *Parasitology*, 96(02), 251-263.
37. Greenwood, B., & Targett, G. (2009). Do we still need a malaria vaccine?. *Parasite immunology*, 31(9), 582-586.
38. Jahan, N., & Hurd, H. (1997). The effects of infection with *Plasmodium yoelii nigeriensis* on the reproductive fitness of *Anopheles stephensi*. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 91(4), 365-370.
39. Kaslow, D. C., Isaacs, S. N., Quakyi, I. A., GwADz, R. W., Moss, B. E. R. N. A. R. D., & Keister, D. B. (1991). Induction of *Plasmodium falciparum* transmission-blocking antibodies by recombinant vaccinia virus. *Science*, 252(5010), 1310-1313.

40. Kaslow, D. C., Quakyi, I. A., Syin, C., Raum, M. G., Keister, D. B., Coligan, J. E., ... & Miller, L. H. (1988). A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains. *Nature*, 333(6168), 74-76.
41. Klein, T. A., Lima, J. B., Tada, M. S., & Miller, R. (1991). Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes in Rondonia, Brazil to infection by *Plasmodium vivax*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 45(4), 463-470.
42. Knols, B. G., W. Takken, and R. de Jong. "Influence of human breath on selection of biting sites by *Anopheles albimanus*." *Journal of the American Mosquito Control Association* 10.3 (1994): 423.
43. Lensen, A.H.W. (1996). Infectivity of malarial parasites to mosquitoes: the interdependent roles of parasite, vector and host. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 90, 359-365.
44. Macdonald, G. (1957). The epidemiology and control of malaria. *The Epidemiology and Control of Malaria*. Oxf. Univ Press ed, Londres, 201 p. malaria in Papua. Indonesia Am. J. Trop. Med. Hyg. 74, 425-431.
45. Milek, R. L., DeVries, A. A., Roeffen, W. F., Stunnenberg, H., Rottier, P. J., & Konings, R. N. (1998). *Plasmodium falciparum*: heterologous synthesis of the transmission-blocking vaccine candidate Pfs48/45 in recombinant vaccinia virus-infected cells. *Experimental parasitology*, 90(2), 165-174.
46. Milek, R. L., Roeffen, W. F., Kocken, C. H., Jansen, J., Kaan, A. M., Eling, W., ... & Konings, R. N. (1998). Immunological properties of recombinant proteins of the transmission blocking vaccine candidate, Pfs48/45, of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* produced in *Escherichia coli*. *Parasite immunology*, 20(8), 377-385.
47. Milek, R. L., Stunnenberg, H. G., & Konings, R. N. (2000). Assembly and expression of a synthetic gene encoding the antigen Pfs48/45 of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in yeast. *Vaccine*, 18(14), 1402-1411.
48. Muirhead-Thomson, R. C. (1954). Factors determining the true reservoir of infection of *Plasmodium falciparum* and *Wuchereria bancrofti* in a West African village. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 48(3), 208-225.

49. Naitza, S., Spano, F., Robson, K. J. H., & Crisanti, A. (1998). The thrombospondin-related protein family of apicomplexan parasites: the gears of the cell invasion machinery. *Parasitology today*, 14(12), 479-484.
50. OMS. (1964). Terminologie du paludisme et de l'éradication du paludisme.
51. Outchkourov, N., Vermunt, A., Jansen, J., Kaan, A., Roeffen, W., Teelen, K., ... & Stunnenberg, H. G. (2007). Epitope analysis of the malaria surface antigen pfs48/45 identifies a subdomain that elicits transmission blocking antibodies. *Journal of Biological Chemistry*, 282(23), 17148-17156.
52. Quakyi, I. A., Carter, R. I. C. H. A. R. D., Rener, J. O. A. N., Kumar, N. I. R. B. H. A. Y., Good, M. F., & Miller, L. H. (1987). The 230-kDa gamete surface protein of *Plasmodium falciparum* is also a target for transmission-blocking antibodies. *The Journal of Immunology*, 139(12), 4213-4217.
53. Robert, Vincent. "Age grading *Anopheles arabiensis*: their gorging and surviving responses using a membrane feeding system." *Parasite* 5.1 (1998): 87-90.
54. Ross, R. (1897). On some peculiar pigmented cells found in two mosquito fed on malaria blood. *British Medical Journal*. 2: 1786-1788.
55. Ross, R. (1898). The rôle of the mosquito in the evolution of the malarial parasite. *The lancet*. 2:488-489.
56. Schaudinn, F. (1900). "Untersuchungen über den Generationswechsel bei Coccidien", *Zool. Jahrb., Anat. Abt.* 1 3: 197-292.
57. Servonnet, A., Rapp, C., Delacour, H., Bigaillon, C., Pilo, J. E., & Mérens, A. (2012). *Plasmodium knowlesi*: une espèce émergente chez l'homme?. *Médecine et Santé Tropicales*, 22(4), 417-421.
58. Seufi, A. M., & Galal, F. H. (2010). Role of *Culex* and *Anopheles* mosquito species as potential vectors of rift valley fever virus in Sudan outbreak, 2007. *BMC infectious diseases*, 10(1), 65. doi: 10.1186/1471-2334-10-65
59. Sinden, R. E. (1999). *Plasmodium* differentiation in the mosquito. *Parassitologia*, 41(1-3), 139-148.

60. Snounou, F. A. G., Rooth, I. N. G. E. G. E. R. D., & Bjorkman, H. (1997). Daily dynamics of *Plasmodium falciparum* subpopulations in asymptomatic children in a holoendemic area. *Am J Trop Med Hyg*, 56, 538-547.
61. Staudt, E. A. (2009). Un Vaccin contre le Paludisme : obstacles, espoirs et avancées (thèse de doctorat en pharmacie. Université Henri Poincaré, Nancy1).
62. Tarshis, I. B. (1958). Feeding techniques for bloodsucking arthropods. In *Proceedings of the Tenth International Congress of Entomology, Montreal, August 17-25, 1956. Section on medical and veterinary entomology*. (Vol. 3, pp. 767-783).
63. Tchuinkam, T., Mulder, B., Dechering, K., Stoffels, H., Verhave, J. P., Cot, M., ... & Robert, V. (1993). Experimental infections of *Anopheles gambiae* with *Plasmodium falciparum* of naturally infected gametocyte carriers in Cameroon: factors influencing the infectivity to mosquitoes. *Tropical medicine and parasitology: official organ of Deutsche Tropenmedizinische Gesellschaft and of Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ)*, 44(4), 271-276.
64. Tchuinkam, T., Mulder, B., Verhave, J. P., Boudin, C., Carnevale, P., & Robert, V. (1995). Infections expérimentales d'*Anopheles gambiae* avec des gametocytes de *Plasmodium falciparum*: Epidémiologie de la transmission homme-vecteur du paludisme en milieu urbain. *Médecine tropicale*, 55(4), 101-104.
65. Touré Yéya. (1979). Bio-écologie des anophèles (DIPTERA-CULICIDEA) dans une zone rurale de savane soudanienne au Mali; Incidence sur la transmission du paludisme et de la filariose de bancroft (Village de Banambani, arrondissement de Kati). Centre Pédagogique Supérieur de Bamako, thèse de 3e cycle Entomologie: Bamako, Mali.
66. Touré, A.M. (1996). Étude du potentiel infectieux des populations humaines et mécanismes naturels de résistance d'*Anophèles gambiae s.l* au développement de *Plasmodium falciparum* dans le village de Bancoumana. Mémoire de DEA, ISFRA, Entomologie et Parasitologie Médicales, Bamako.
67. Touré, Y. T., Petrarca, V., Traore, S. F., Coulibaly, A., Maiga, H. M., Sankare, O., ... & Coluzzi, M. (1998). The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognized taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. *Parassitologia*, 40(4), 477-511.

68. van Dijk, M. R., Janse, C. J., Thompson, J., Waters, A. P., Braks, J. A., Dodemont, H. J., ... & Eling, W. (2001). A central role for P48/45 in malaria parasite male gamete fertility. *Cell*, 104(1), 153-164.
69. World Health Organization. (1964). Terminología del paludismo y de la erradicación del paludismo.
70. World Health Organization. World malaria report 2015. (En ligne). 2015 (le 09 décembre 2015). Disponible : <http://www.who.int/bookorders@who.int>.
71. Yaro, A. S., Dao, A., Adamou, A., Crawford, J. E., Traore, S. F., Toure, A. M., ... & Lehmann, T. (2006). Reproductive output of female *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae): comparison of molecular forms. *Journal of medical entomology*, 43(5), 833-839.
72. Yaro, A. S., Touré, A. M., Guindo, A., Coulibaly, M. B., Dao, A., Diallo, M., & Traoré, S. F. (2012). Reproductive success in *Anopheles arabiensis* and the M and S molecular forms of *Anopheles gambiae*: Do natural sporozoite infection and body size matter?. *Acta tropica*, 122(1), 87-93.

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des maîtres de cette faculté, de mes chers condisciples, devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'être suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail, je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que les considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine dès la conception.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobres et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Je le jure.

