Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

République Du Mali
Un Peuple-Un But-Une Foi

Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako

FACULTE DE PHARMACIE (FAPH)

Année universitaire 2019-2020 **N……**

Titre :

CULTURE DES GAMÉTOCYTES DE *P. FALCIPARUM* ET INFECTION DES MOUSTIQUES AU LABORATOIRE D'IMMUNOGÉNÉTIQUE DU MRTC/FMOS-FAPH/USTTB DE BAMAKO : EFFET DE L'HbS ET DE L'HbC

Présentée et soutenue publiquement le 10/08/2021 devant la Faculté de Pharmacie

Par M. Job KONE

Pour l'obtention du titre de Docteur en Pharmacie

(Diplôme d'Etat)

JURY

Président : **Pr Ag Safiatou NIARE DOUMBO**

Membres : **Dr Bourama TRAORE**

Dr Cheick Amadou COULIBALY

Co-directeur : Dr Seidina A. S. DIAKITE

Directeur : **Pr Mahamadou DIAKITE**

Louanges à DIEU le Tout Puissant, le Clément et le **Tout Miséricordieux** de m'avoir donné la santé, le courage et la chance d'étudier dans cette Faculté de Pharmacie et de m'avoir donné l'inspiration nécessaire pour rédiger cette thèse. Qu'il guide mes pas vers le droit chemin

DEDICACES

Je voudrais très humblement dédier ce travail à :

A mon papa, Tièbakuy Koné, Cher papa, les mots me manquent ici pour t'exprimer toute ma gratitude. Si j'en suis là aujourd'hui c'est bien grâce à toi. Tu es à l'origine de ce que je deviens aujourd'hui car c'est toi qui m'a inscrit à l'école et tu as suivi mes pas jusqu'à maintenant, toute ma vie tu as été une source d'inspiration pour moi par ta rigueur, ta persévérance et ton courage dans le travail. Papa je ne pourrai jamais te récompenser. Que DIEU te donne une longue vie afin que tu puisses profiter de tous les efforts fournis pour l'éducation de mes frères, mes sœurs et moi. (Amen)

A ma mère, Tabitha Kéïta, Maman chérie, je ne trouve pas de mots qui pourront me satisfaire pour t'exprimer mes sentiments. Les mots ne me suffiront jamais pour te qualifier et exprimer ce que tu représentes et continueras de représenter pour moi. Tu m'as mis au monde et m'as couvert d'amour. Tu as investi dans mon éducation pour que je sois un meilleur garçon. Tu m'as cru et tu as investi en moi pour que je sois là aujourd'hui, Maman je ne te remercierai jamais assez et je prie DIEU qu'il te donne longue vie, pleine de santé et de bonheur. (Amen)

A mon grand frère, Patouma Marc Koné, Tu m'as cru quand j'ai décidé de faire des études de Pharmacie merci pour tes conseils précieux. Retrouve à travers ce travail mes sincères remerciements. Que DIEU t'accorde une longue vie. (Amen)

REMERCIEMENTS

A mes frères, Boniface Coulibaly, Nicodème Koné, Daquin simon Kéita, Joseph Koné, Réné Kéita, pour votre amour et votre compréhension qui m'ont toujours aidé. Que les désirs de fraternité et de solidarité familiale qu'ont toujours souhaité nos parents à notre endroit, soit une force afin que nous soyons unis pour toujours. Ce travail est aussi le vôtre, restons toujours solidaires, je souhaite un grand destin.

A mes sœurs, Lydie Koné, Marthé Koné, Ephrasé Koné, Ruth Koné, Petité Kéita, Jaquiline Koné, pour vos soutiens, votre affection, et votre confiance mutuelle tout au long de ce travail. De tout cœur je vous souhaite les merveilles du monde. Que DIEU renforce ce lien.

A mes oncles et tantes, merci à tous pour vos soutiens, vos bénédictions et vos conseils.

A mes cousins et cousines, ce travail m'offre l'occasion de vous réitérer mon amour et c'est aussi l'occasion de vous rappeler que le lien de parenté est sacré et qu'il ne sera que ce que nous en ferons.

A mes amis, Dr Moussa Dénou, Dr Boro, Dr Youssouf Guindo, Dr Siaka Doumbia, Dr Alaye Diah, Dr Sékou Korka, Dr Salif Zigmé, Dr Arafaou Dicko, Dr Issiaka Diabaté, Dr Diakaridia Konaté, Dr Yaya Sylla, Dr Siaka Konaté, Dr Younoussa Diabaté, Dr Younoussa Zigmé, Gd Sylla, Chiaka Dembélé, Youssouf Goita, Gaoussou Denso, Séydou Sanogo, Sidi Bouaré, Cheick Oumar Koné, Souleymane Coulibaly, Salifou Sylla, Seydou Kanté, Yaya Coulibaly, Souleymane Maïga, Souleymane Dembélé, Salif Fomba, Abou Boubacar Sidiki Fomba, Ali Fané, Djadjè Barry, Drissa Fomba, Moussa Fomba, Moussa Fané, Souleymane Diakité, Nouhoum Fomba, Nouhoum Diabaté, Souleymane Traoré, Bakary Sidibé, Sidiki Mory Fomba, Amadou Samassekou, Assan Karambé, Amadou Guindo, Salimata Konaté, Fidèle Guindo, Aïcha Konaté, Rosa Déna, Djénéba Dougnon. Vous avez toujours pris mes problèmes comme les vôtres, ce travail est également le vôtre.

A toutes l'équipe de l'unité immunogénétique et parasitologie du MRTC : Dr Sory Diawara, Dr Angès Guindo, Dr Karim Traoré, Dr Mory Doumbouya, Dr Ibrahim Sanogo, Dr Fouseyni Doukouré, Dr Oumou Coulibaly, Dr Fatoumata Kassé, Dr Boubacar Fomba, Dr Larisa Dénou, Mr Bakaina Diarra, Mr Cheick Oumar Traoré, Mr Fayçal, Mr Abdouramane Traoré, Mr Abdramane Cissé, Mr Kathrino Mouhamedou, Mr Mohamed Traoré, Mlle Kadidiatou Koné, Mlle Salimata Kanté, Mlle Assy Dembélé, Mlle Maya**.** Sans vous, cette thèse ne serait pas ce qu'elle est, car vous avez tous participé à sa réalisation de par vos conseils et vos encouragements. Merci pour votre gentillesse et votre disponibilité. Recevez ici mes sincères salutations ainsi que ma reconnaissance.

Au Pr Mahamadou Diakité, pour m'avoir accueilli à bras ouvert au sein de son unité de recherche. Merci pour votre humanisme et votre encouragement.

Au Dr Séidina A. S. Diakité, qui m'a accueilli à bras ouvert et qui a eu confiance en moi en me donnant ce sujet de thèse malgré mes faibles connaissances dans le domaine. Merci cher maitre pour votre humilité, votre disponibilité et vos encouragements. Que le Tout-puissant vous bénisse et vous accorde longue vie.

Au Dr Drissa Konaté, pour votre générosité, votre sympathie, votre dévouement, votre formation et votre soutien sans limite.

Au Dr Bourama Traoré, pour votre sens de travail bien fait, votre apport scientifique et moral ne m'ont jamais manqué, l'amour et l'attention particulière avec lesquels vous m'avez traite depuis mon arrivé resteront gravés dans ma mémoire.

Au Dr Bourama Kéita, grand frère, formateur courageux, engagé, ayant le souci du travail bien fait, merci pour votre soutien.

A toute la 11 promotion du numérus clausus *Feu Prof. Moussa Harama*, merci pour les bons moments partagés, que cette union nous suive pendant toute notre carrière professionnelle, amen.

A tous mes camarades de la FMOS/FAPH, pour les bons moments que nous avons passés ensembles durant nos années d'études.

A tous les membres de CPC, ASPC, PARISI, RASERE ; Merci pour vos soutiens incomptables.

A toute l'équipe de MRTC/FMOS-FAPH/USTTB merci pour votre soutien.

HOMMAGES AUX HONORABLES MEMBRES DU JURY

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENTE DE THESE,

Pr DOUMBO Safiatou NIARE

- Pr agrégé en Parasitologie-Mycologie à la FMOS/USTTB
- Conseiller chargé de la prospection du PTR-SANTE du CAMES au Mali,
- Responsable du laboratoire biologie de l'unité d'immunogénétique du MRTC
- Chef de laboratoire de diagnostic mycologie du MRTC/ Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaire (DEAP)
- Secrétaire générale de l'Association des Femmes Scientifique du Mali (AFSM)

Chère maitre

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury de thèse malgré vos multiples occupations.

Votre bonne humeur, votre désir de vouloir toujours l'excellence et votre rigueur dans le travail font de vous un modèle admiré de tous. Que ce travail soit le témoin de notre sincère reconnaissance et de notre profonde estime.

A NOTRE MAITRE ET JUGE,

Dr Bourama Traoré

- Docteur en Pharmacie
- Attaché de recherche à l'hôpital de Dermatologie de Bamako (HDB) et à l'ICER-Mali
- Responsable adjoint de laboratoire d'analyse biomédicale de l'hopital de Dermatologie de Bamako (HDB)

Cher maitre

Tout au long de ce travail, nous avons apprécié vos qualités humaines et scientifiques. Votre disponibilité constante et votre amour pour le travail bien fait nous ont beaucoup impressionnés.

Permettez-nous cher Maître de vous adresser l'expression de notre gratitude et de notre reconnaissance.

A NOTRE MAITRE ET JUGE,

Dr Cheick Amadou COULIBALY

- Maitrise en Microbiologie et Biochimie
- PhD en Entomologie médicale et parasitologie médicale
- Chargé de recherche à la Faculté de pharmacie de Bamako

Cher maitre

C’est un privilège que vous nous accordez en acceptant de juger cette thèse, nous en sommes très honorés. Merci pour vos corrections et suggestions très utiles qui ont permis d’améliorer notre travail. Trouvez ici l’expression de nos sincères remerciements.

A NOTRE MAITRE ET CO-DIRECTEUR DE THESE,

Dr Seidina A. S. DIAKITE

- Docteur en pharmacie
- PhD en immunologie
- Maître-Assistant en Immunologie à la Faculté de Pharmacie / USTTB

Cher Maitre,

Votre simplicité, votre gentillesse et surtout votre esprit de collaboration nous ont beaucoup marqué. Les mots nous manquent pour qualifier tout ce que vous avez fait pour nous. Merci pour l'instruction reçue, merci pour les conseils que vous n'avez cessés de nous prodiguer. Pour nous vous êtes un chercheur de référence. Que DIEU le tout puissant vous donne longue vie et pleine de santé.

A NOTRE MAITRE ET DIRECTEUR DE THESE,

Pr Mahamadou DIAKITE

- Docteur en Pharmacie
- PhD en immunologie
- Vice-recteur de l'USTTB
- Responsable du laboratoire d'Immunogénétique et d'hémoglobinopathie de Parasitologie (MRTC)
- Directeur scientifique adjoint du centre universitaire de recherche clinique de l'USTTB
- Secrétaire permanent du comité d'éthique (FMOS /FAPH) et Membre du Comité national d'éthique pour la santé et les sciences de la vie

Cher Maitre,

Vous nous avez honorés en acceptant de nous confier ce travail. Votre large ouverture d'esprit, votre gentillesse et votre clairvoyance font de vous un homme et un chercheur exceptionnel. La rigueur scientifique, la perspicacité et le gout de formation que vous avez font de vous un grand scientifique. Nous sommes fiers d'être cités parmi vos élèves. Nous n'oublierons jamais vos conseils et ne cesserons de vous en remercier. Cher Maitre, soyez rassuré de notre profonde reconnaissance.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide DesoxyriboNucléique
AP2	Apicomplexa AP2
AP2-G	Apicomplexa AP2 gamétocyte
AS	Hétérozygotes
DMFA	*Direct membrane-feeding assay* (Essai d'alimentation directe sur membrane)
EDSM	Enquête Démographique et de Santé MALI
FAPH	Faculté de pharmacie
FMOS	Faculté de médecine et d'odonto-stomatologie
GR	Globule Rouge
GRP	Globule rouge parasité
H3K9me3	Histone H3_triméthyle
HBA1	*Hemoglobin Subunit Alpha1 (Sous-unité Alpha1 de l'hémoglobine)*
HBA2	Hemoglobin Subunit Alpha2 (Sous-unité Alpha2 de l'hémoglobine)
HBB	Hemoglobin Subunit Beta (Sous-unité beta de l'hémoglobine)
HbC	Hémoglobine C
HbS	Hémoglobine S
HbSS	Hémoglobine homozygote SS
LMVR	Laboratory of Malaria and Vector Research
MCC	Milieu de culture complet
MCI	Milieu de culture incomplet
MRTC	Malaria Research and Training Center
NIH	*National Institutes of Health* (Instituts nationaux de la santé)
OMS	Organisation mondiale de la santé
PfHda2	*P. falciparum* histone deacetylase 2 (Histone désacétylase 2 de *P. falciparum*)
PfHP1	*P. falciparum* heterochromatin protein 1 (Protéine 1 de l'hétérochromatine de *P. falciparum*)
PNLP	Programme national de lutte contre le paludisme
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute medium*
SMFA	Standard membrane-feeding assay (Essai standard d'alimentation sur membrane)

TNF	*Tumour Necrosis Factor* (Facteur de nécrose tumorale)
USTTB	Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION **1**

2. OBJECTIFS **3**

2.1. Objectif général 3

2.2. Objectifs spécifiques 3

3. GENERALITES **4**

3.1. Vecteurs du paludisme 4

3.2. Agents pathogènes du paludisme : le *Plasmodium* 5

3.2.1. Systématique 5

3.2.2. Différentes espèces plasmodiales responsables du paludisme humain 5

3.2.3. Cycle évolutif du *Plasmodium* 10

3.2.3.1. Cycle chez l'homme 11

3.2.3.1.1. Cycle hépatique ou cycle exo-érythrocytaire 11

3.2.3.1.2. Cycle sanguin ou cycle endo-érythrocytaire 11

3.2.3.2. Cycle chez l'anophèle femelle 12

3.3. Gamétocytes du *Plasmodium* : Biologie et facteurs influençant la gamétogenèse 14

3.3.1. Définition 14

3.3.2. Gamétocytogenèse 14

3.3.2.1. Induction de la gamétocytogenèse ou engagement des parasites pour la production des gamétocytes 15

3.3.2.2. Maturation et morphologie des gamétocytes 17

3.3.3. Facteurs favorisant la gamétocytogenèse de *P. falciparum* 18

3.3.4. Déterminants de l'infectiosité des moustiques 19

3.4. Variants hémoglobiniques et protection contre le paludisme 21

3.4.1. Hémoglobine normale et hémoglobinopathies 21

3.4.2. Hémoglobine S (trait drépanocytaire) et paludisme 21
3.4.3. Hémoglobine C et paludisme 23
3.4.4. Hémoglobinopathies et portage des gamétocytes 24
3.5. Culture *in-vitro* de *Plasmodium falciparum* 24
3.5.1. Historique et intérêt 24
3.6. Les souches de moustiques 25
4. MATERIEL ET METHODES **27**
4.1. Type et période d'étude 27
4.2. Lieu d'étude 27
4.3. Matériel de culture *in-vitro* de *Plasmodium falciparum* 28
4.3.1. Equipements de base du laboratoire 28
4.3.2. Souches de parasite utilisées 28
4.3.3. Collecte des globules rouges de culture 28
4.4. Techniques de laboratoire utilisées. 29
4.4.1. Préparation du milieu de culture 29
4.4.2. Décongélation et congélation du parasite 29
4.4.3. Préparation des hématies non parasité 30
4.4.4. Culture de *Plasmodium falciparum* 30
4.4.5. Induction et le suivi de la maturation des gamétocytes 30
4.4.6. Comptage des parasites 30
4.4.7. Essais d'infection d'anophèles par les gamétocytes de culture 31
4.4.8. Extraction et examen des estomacs des anophèles infectés avec les gamétocytes de culture 32
4.5. Saisie et analyse des données 33
4.6. Définitions opperationnelles 33
4.7. Considérations éthiques 34
5. RESULTATS **35**

5.1. Résultats globaux 35
5.2. Résultats relatifs à l'impact des souches de *Plasmodium falciparum* 35
5.3. Résultats relatifs à l'impact des types d'hémoglobines 36
5.4. Résultats relatifs à l'infestation des moustiques 43
6. COMMENTAIRES ET DISCUSSION **46**
6.1. Induction de gamétocyte 47
6.2. Maturation des gamétocytes 51
6.3. Infection des moustiques 52
6.4. Limites de notre étude 54
7.1. Conclusion 55
7.2. Recommandations 55
7.3. Perspectives 55
8. REFERENCES **56**
9. FICHE SIGNALETIQUE **69**
10. ANNEXES **71**
10.1. Modes Opératoires Normalisés 71
10.1.1. Annexe 1 : Préparation du milieu de culture 71
10.1.2. Annexe 2 : Décongélation de *Plasmodium falciparum* 72
10.1.3. Annexe 3 : Congélation des hématies parasitées 73
10.1.4. Annexe 4 : Préparation des hématies non parasité 73
10.1.5. Annexe 5 : Mise en culture du parasite 74
10.1.6. Annexe 6 : Fiche technique 75
10.2. Annexe 7 : Images illustratives du travail 76

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Tableau récapitulatif de l'issu des cultures d'essai d'induction de gamétocytes 35
Tableau 2 : Taux d'engorgement, de survie et d'infestation des souches Anophèles L3-5 avec les gamétocytes NF54 produits au laboratoire 43
Tableau 3 : Taux d'engorgement, de survie et d'infestation des souches Anophèles N'Gaba avec les gamétocytes NF54 produits au laboratoire 44
Tableau 4 : Taux d'engorgement, de survie et d'infestation des souches Anophèles Kisumu avec les gamétocytes NF54 produits au laboratoire 44

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Gamétocytes de P. falciparum sur frottis sanguin vus au microscope optique 6
Figure 2 : Gamétocytes de P. vivax sur frottis sanguin vus au microscope optique .. 7
Figure 3 : Gamétocyte de P. ovale sur frottis sanguin vus au microscope optique.... 8
Figure 4 : Gamétocyte de P. malariae sur frottis sanguin vus au microscope optique9
Figure 5 : Gamétocyte de P. knowlesi sur frottis sanguin vus au microscope optique 10
Figure 6 : Cycle de vie de Plasmodium falciparum et développement des gamétocytes 13
Figure 7 : Schéma de gamètes femelle (A) et mâle (B) de P. falciparum 14
Figure 8 : Proposition de mécanisme d'induction des parasites pour la production des gamétocytes 15
Figure 9 : Illustration des globules rouges falciformes sur frottis mince..... 22
Figure 10 : Image illustrative du dispositif d'engorgement des anophèles sur membrane 32
Figure 11 : Image illustrative des moustiques au repose après l'engorgement 32
Figure 12 : Taux d'induction des gamétocytes en fonction du type d'hémoglobine des globules rouges 36
Figure 13 : Evolution de gamétocytes de stade I en fonction du type d'hémoglobine du globule rouge de culture 37
Figure 14 : Evolution de gamétocytes de stade II en fonction du type d'hémoglobine du globule rouge de culture 38
Figure 15 : Evolution de gamétocytes de stade III en fonction du type d'hémoglobine du globule rouge de culture 39
Figure 16 : Evolution de gamétocytes de stade IV en fonction du type d'hémoglobine du globule rouge de culture 40
Figure 17 : Evolution de gamétocytes de stade V en fonction du type d'hémoglobine du globule rouge de culture 41
Figure 18 : Taux de maturation des gamétocytes en fonction des types d'hémoglobine des globules rouges 42
Figure 19 : Taux de maturation des gamétocytes en fonction des souches du parasite 43

Figure 20 : Recaptulatif des taux d'engorgement et de survie des differentes souches de moustiques 45
Figure 21 : Image illustrative des conditions de travail au laboratoire d'immunogénétique 76
Figure 22 : Illustration d'un frottis de culture montrant des formes asexuées de *P. falciparum* 76
Figure 23 : Illustration d'un frottis de culture montrant différents stades de gamétocyte de *P. falciparum* 77
Figure 24 : Illustration d'un estomac de moustique disséqué (sans oocystes) 77

1. INTRODUCTION

Le paludisme est causé par des parasites *Plasmodium,* qui est transmis à leurs hôtes vertébrés par la piqûre infectieuse de moustiques anophèles femelles. Selon le rapport 2020 de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), on estime à 405 000 le nombre de décès, sur un total de 228 millions de cas de paludisme (OMS, World malaria report 2020). La plupart des décès liés au paludisme étaient concentrés dans la région africaine, en particulier chez les enfants de moins de cinq ans. Si le taux d'incidence global du paludisme a diminué à l'échelle mondiale depuis 2010, ces dernières années, le déclin a atteint un plateau et des stratégies de contrôle supplémentaires sont nécessaires de toute urgence pour éliminer la maladie [1]

Au Mali, le paludisme représente 39% de l'ensemble des motifs de consultation dans les services de santé. Il est la première cause de mortalité chez les enfants de moins de 5 ans et de morbidité dans la population générale. Le nombre de cas de paludisme recensé dans le système d'information sanitaire a été estimé à 2 614 104 cas avec 1 001 décès [2]. Le niveau de transmission varie considérablement d'une région à une autre et dans la même région, d'une localité à une autre, suivant les conditions écologiques et climatiques. Dans ce contexte, le programme national de lutte contre le paludisme au Mali (PNLP) s'est fixé comme objectif de réduire d'au moins 75% de la mortalité et la morbidité imputables au paludisme [3].

La lutte contre le paludisme repose sur plusieurs volets comprenant la lutte anti vectorielle, le diagnostic et le traitement précoce des cas. La recherche vaccinale constitue elle aussi un volet important de la stratégie d'élimination du paludisme. Le développement de vaccin ainsi que des médicaments antipaludiques nécessite une compréhension approfondie de la biologie du *Plasmodium*. En effet, le cycle de vie du *Plasmodium* chez l'homme passe par plusieurs stades développement comme le stade asexué impliqué dans la pathogenèse de la maladie et les stades sexués (gamétocytes) assurant la transmission de la maladie.

Les stades sanguins asexués cycliques des parasites du paludisme sont à l'origine de la pathogenèse de la maladie et un petit sous-ensemble d'entre eux se différencie en gamétocytes femelles et mâles. Les gamétocytes de *P. falciparum* sont uniques dans la nature car ils mettent 7 à 10 jours pour se développer en passant par cinq stades

morphologiquement distincts. Les gamétocytes immatures des stades I à IV sont séquestrés dans le parenchyme de la moelle osseuse et restent largement absents de la circulation périphérique [4-7]. Les érythrocytes infectés par les gamétocytes matures de stade V sont libérés dans la circulation sanguine et circulent librement pour être absorbés par les moustiques. Une fois à l'intérieur de l'intestin moyen du moustique, les gamétocytes sont activés, par un changement de température et une exposition à l'environnement de l'intestin moyen, se transforment en gamètes femelles et mâles et commencent le développement des stades du moustique, qui culmine avec les stades infectieux des sporozoïtes dans les glandes salivaires du moustique [8, 9].

Depuis que Trager et Jenson [10] ont décrit une méthode standardisée de culture de *P. falciparum*, les études sur les stades sanguins asexués ont beaucoup progressé. Cependant, l'absence d'un système de culture fiable pour les stades sexuels a rendu difficile l'étude des gamétocytes de *P. falciparum*, de la biologie de la transmission et des stades du moustique. Ces dernières années, plusieurs méthodes ont été publiées qui ont aidé les laboratoires à établir des cultures de gamétocytes [11-14].

Dans ce travail, nous nous proposons de decrire le protocole détaillé de production de gamétocytes matures de *P. falciparum* et d'infection de moustiques à l'aide de mangeoires à membrane et d'étudier l'effet de certains polymorphismes de l'hémoglobine sur ces processus. Ces méthodes sont essentielles pour tout laboratoire travaillant sur les stratégies de blocage de la transmission, sur les stades sporozoïtes et sur les stades hépatiques pré-érythrocytaires de *P. falciparum*.

2. OBJECTIFS

2.1. Objectif général

Etablir la culture des gamétocytes de *P. falciparum* au Laboratoire d'Immunogénétique de Mali-ICER.

2.2. Objectifs spécifiques

1. Implémenter la technique de production et de maturation des gamétocytes de *P. falciparum* à partir des souches de laboratoire NF54, 7G8 et 3D7 ;

2. Comparer la capacité de production et de maturation des gamétocytes des souches NF54, 7G8 et 3D7 ;

3. Déterminer l'effet des hémoglobinopathies (HbAS et HbAC) sur la production et la maturation des gamétocytes de *P. falciparum ;*

4. Déterminer le taux d'engorgement en fonction des souches (N'Gaba, Kisumu, L3-5) d'*An. Gambiae* en gamétocytes cultivés au laboratoire ;

5. Déterminer le taux de survie des souches d'*An. gambiae* gorgé avec les gamétocytes cultivés au laboratoire ;

6. Déterminer le taux d'infection des souches (N'Gaba, Kisumu, L3-5) d'*An. gambiae* á partir des gamétocytes cultivés au laboratoire.

3. GENERALITES

3.1. Vecteurs du paludisme

Les vecteurs en causes sont des moustiques du genre *Anophèles* dont les femelles sont hématophages et responsables de la transmission. Les *Anophèles* appartiennent au Phylum des *Arthropoda*, à la classe des *Insecta*, à la sous-classe des *Neoptera* ; à l'ordre des *Diptera*, au sous-ordre des *Nematocera*, à la famille des *Culicidae*, à la sous-famille des *Anophelinae* qui compte 3 genres : *Chagasia*, *Bironella* et le genre *Anopheles.* Ce dernier genre comprend environ 500 espèces dont certaines sont regroupées en complexes d'espèces. Parmi la soixantaine d'espèces de vecteurs potentiels, une vingtaine est couramment impliquée. Ces espèces sont regroupées en complexes et sont chacune inféodée à des conditions climatiques et étho-écologiques qui focalisent la maladie [15, 16].

L'homme est le principal réservoir de parasites. Ces insectes vivent en milieu humide à des températures quasiment toujours supérieures à 18°C. Ils n'évoluent généralement pas au-dessus de 1500 mètre d'altitude. Les larves se développent dans une eau douce et non polluée et ne s'éloignent que de 300 mètre du lieu de leur naissance [17, 18].

Au Mali, des études conduites par Touré en 1983 ont montré qu'*An. gambiae s.I* est composé de 3 sous espèces qui sont : *An. gambiae s.s, An. arabiensis* et *An. funestus s.s.* L' *An. gambiae s.s* quant à lui est composé de 3 formes chromosomiques dénommées Bamako, Savane et Mopti. La forme Mopti se rencontre fréquemment dans les zones d'inondation du fleuve Niger. Elle coexiste avec la forme Bamako dans les régions humides du sud avec des fréquences faibles. La forme Savane se rencontre dans les zones du sud et du centre. La transmission du paludisme est assurée en saison sèche et froide (novembre - février) par *An. arabiensis* et la forme Mopti de *An. gambiae s.s* lui succède en période sèche et chaude (mars – juin). Les formes Savane et Bamako de *An. gambiae s.s* deviennent les principaux vecteurs pendant la saison des pluies (juillet – octobre). Ainsi, tout au long de l'année, les vecteurs se succèdent dans la transmission du *Plasmodium* [19].

3.2. Agents pathogènes du paludisme : le *Plasmodium*

3.2.1. Systématique

Plasmodium falciparum fait partie du Phylum des *Apicomplexa*, de la classe des *Aconoidasida, de l'*ordre des *Haemosporida,* de la famille des *Plasmodiidae,* du genre *Plasmodium* et de l'espèce *falciparum*. Le genre *Plasmodium* compte 172 espèces qui infestent non seulement les mammifères mais aussi les oiseaux et les reptiles. D'autres genres du même groupe que *Plasmodium* comme *Haemoproteus, Hepatocystis* et *Leucocytozoon* sont non pathogènes pour l'homme.

3.2.2. Différentes espèces plasmodiales responsables du paludisme humain

Le paludisme est une maladie provoquée par des hématozoaires appartenant au genre *Plasmodium*. Deux espèces parmi les cinq (*P falciparum, P. vivax, P. ovale, P. malariae et P. knowlesi*) qui infectent l'homme, *P. falciparum* et *P. vivax*, ont un impact majeur en santé publique. *P. falciparum* provoque une infection aiguë, potentiellement mortelle chez les sujets peu ou non immuns. *P. vivax*, longtemps considéré comme provoquant des infections bénignes, est maintenant reconnu comme un pathogène susceptible de provoquer des complications graves, responsables de décès [20]. *P. knowlesi* est un parasite habituel des singes d'Asie (macaques) qui vient de passer récemment chez l'homme avec une possible émergence dans les années à venir [21]. Les différentes espèces sont différenciées par des critères biologiques, cliniques, par leur répartition géographique et par leur capacité à développer des résistances aux antipaludiques. Il faut toujours différencier les autres espèces par rapport à *P. falciparum*. En effet, *P. falciparum* est celui qui est le plus largement répandu à travers le monde, qui développe le plus de résistance aux antipaludiques et qui est responsable des formes cliniques potentiellement mortelles [22].

3.2.2.1. *Plasmodium falciparum*

C'est l'espèce la plus rencontrée en Afrique sub-saharienne et la plus redoutable car responsable de la plupart des décès. Dans les régions équatoriales, ce parasite est transmis toute l'année avec cependant des recrudescences saisonnières. Dans les régions subtropicales, il ne survient qu'en période chaude et humide. Sa transmission s'interrompt lorsque la température tombe en dessous de 18°C. La phase hépatique dure 6 jours et se caractérise par l'absence d'hypnozoïtes et donc de reviviscence schizogonique. La phase érythrocytaire est caractérisée par une incubation de 7 à 15 jours. La schizogonie érythrocytaire dure habituellement 48 heures et s'effectue presque exclusivement dans les capillaires viscéraux, encéphaliques notamment. Il est responsable de la fièvre tierce maligne. La longévité de ce parasite ne dépasse pas habituellement deux mois mais peut atteindre six mois ou même un an. Il est responsable de formes cliniques graves, notamment la forme neurologique. La forme des gamétocytes en cigare, en banane ou en faux, a valu son nom à cette espèce plasmodiales [23, 24].

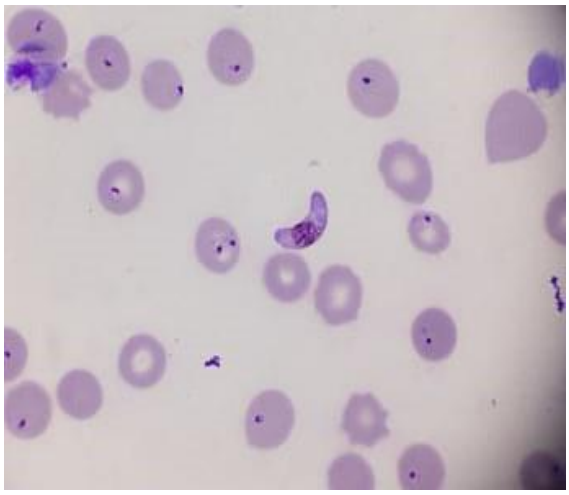


Figure 1 : *Gamétocytes de P. falciparum sur frottis sanguin vus au microscope optique*

Source : *Centre de Prévention et de Contrôle des Maladies (CDC), Atlanta, USA, 2020*

3.2.2.2. *Plasmodium vivax*

Très largement répandu en Amérique du Sud et en Asie, il est beaucoup plus rarement observé en Afrique. L'antigène Duffy érythrocytaire a été identifié comme le récepteur membranaire de *P. vivax* [25, 26]**.** Les sujets originaires d'Afrique noire ont longtemps été considérés comme réfractaires à l'infection à *P. vivax* en raison de leur statut Duffy négatif. Cependant, des cas d'infection à *P. vivax* ont été décrits récemment en Afrique chez des personnes Duffy négatives [27-32]

Sa transmission s'arrête en dessous de 15°C. Les manifestations cliniques liées à *P. vivax* sont classiquement considérées comme une fièvre tierce bénigne donc un cycle érythrocytaire de 48 heures. Sa période d'incubation est de 11 à 13 jours, mais on peut observer des rechutes (accès de reviviscence) pendant trois à quatre ans. Dans les zones d'endémie palustre il peut avoir des répercussions graves sur l'état de santé des populations, notamment par l'intermédiaire des anémies chez l'enfant [33].

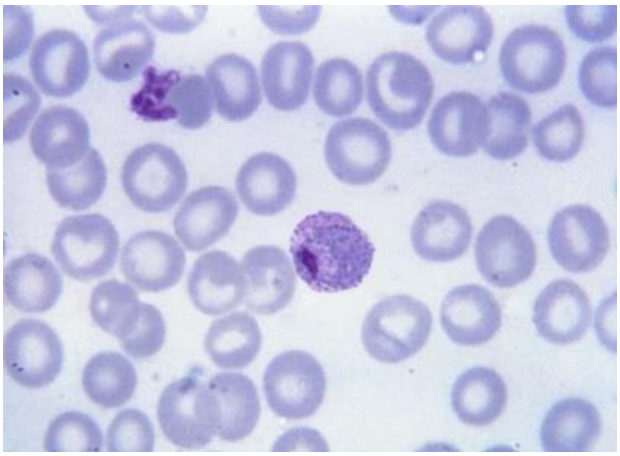


Figure 2 : Gamétocytes de *P. vivax* sur frottis sanguin vus au microscope optique
Source : *Centre de Prévention et de Contrôle des Maladies (CDC), Atlanta, USA, 2020*

3.2.2.3. *Plasmodium ovale*

Plasmodium ovale est essentiellement en zone centrale, ouest et intertropicale de l'Afrique. Les manifestations cliniques sont généralement modérées et son évolution est bénigne mais il peut persister dans le foie sous forme dormante provoquant des rechutes tardives [33]. Son incubation est de 15 jours au minimum jusqu'à 4 ans. Les études génétiques ont récemment montré que *P. ovale* se compose de deux sous-espèces : *P. ovale curtisi* et *P. ovale wallikeri* [34, 35].

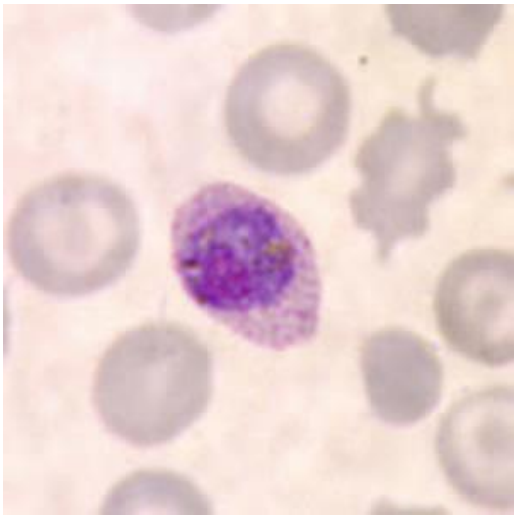


Figure 3 ***:*** *Gamétocyte de P. ovale sur frottis sanguin vus au microscope optique*

Source ***:*** *Coatney GR, Collins WE, Warren M, Contacos PG. The Primate Malarias. Bethesda: U.S. Department of Health, Education and Welfare;1971.*

3.2.2.4. *Plasmodium malariae*

Plasmodium malariae sévit en Afrique de manière beaucoup plus sporadique. Il se différencie des autres espèces par une incubation plus long (15 à 21 jours) et par une périodicité différente de la fièvre. Dans le foie, la schizogonie exo-érythrocytaire de *P. malariae* est capable de former des hypnozoïtes qui pourront entrainer des reviviscences très tardives (jusqu'à 20 ans après le retour de la zone d'endémie) [33]. Dans le sang, *P. malariae* infecte préférentiellement les érythrocytes âgés [36] et les cycles érythrocytaires (cycle érythrocytaire de 72 heures) provoquent des fièvres quartes bénigne. Il peut entrainer des complications rénales [37].

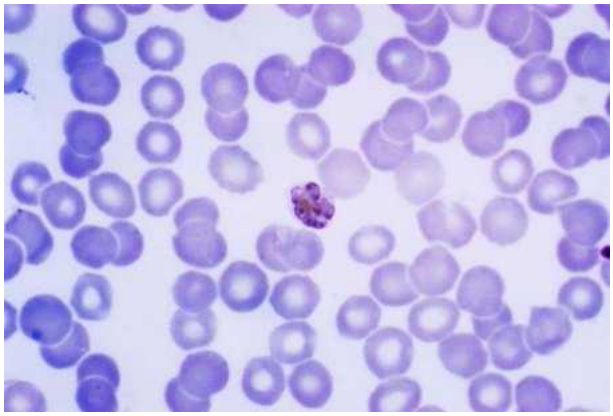


Figure 4 : Gamétocyte de *P. malariae* sur frottis sanguin vus au microscope optique
Source : *Centre de Prévention et de Contrôle des Maladies (CDC), Atlanta, USA, 2020*

3.2.2.5. *Plasmodium knowlesi*

C'est la "cinquième espèce" de *Plasmodium* humain. Parasite des primates qu'on considérait encore récemment comme exceptionnel chez l'homme, mais qu'on sait maintenant fréquent en Asie du Sud-est (Malaisie, Thaïlande, Myanmar, Philippines et Singapour), *P. knowlesi* a un cycle court de 24 heures et est responsable de très fortes parasitémies. Son cycle évolutif est identique à celui des autres espèces. Sa morphologie serait proche de celle de *P. malariae*. Il est également transmis par des *Anophèles* mais il n'a pas encore été décrit en Afrique [38, 39].

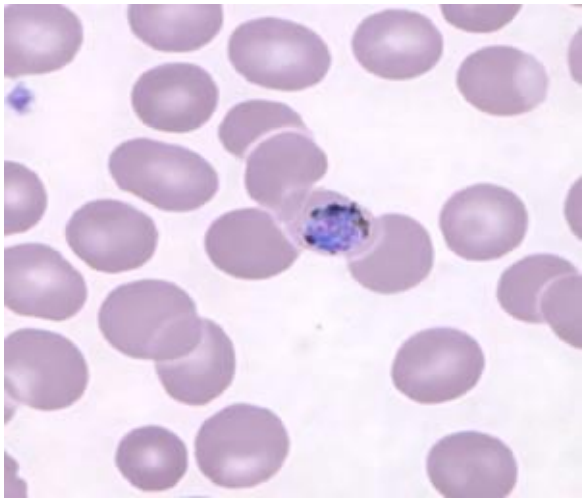


Figure 5 : Gamétocyte de *P. knowlesi* sur frottis sanguin vus au microscope optique

Source ***:*** *Bhandary N, Vikram GS, Shetty H. Thrombocytopenia in Malaria: A clinical study Biomedical Research 2011 22 (4): 489-491]*

3.2.3. Cycle évolutif du *Plasmodium*

Les plasmodies sont protozoaires ayant un cycle complexe qui se déroule successivement chez l'homme (phase asexuée chez l'hôte intermédiaire) et chez l'anophèle (phase sexuée chez l'hôte définitif) [40]. La connaissance du cycle du paludisme permet de comprendre les modalités de sa transmission. Le paludisme est transmis par la piqure infectante de l'anophèle femelle. La phase sanguine du cycle rend possible d'autres modes de contamination telles que la transmission congénitale, la transmission transfusionnelle et par greffe d'organe [41]. Les facteurs favorisant de la transmission sont la température, l'eau, l'humidité associés aux facteurs anthropiques (barrage, irrigation, transports, migration, etc.) [42].

3.2.3.1. Cycle chez l'homme

Il se déroule en deux phases : une phase hépatique (ou exo-érythrocytaire) et une phase sanguine (ou érythrocytaire)

3.2.3.1.1. Cycle hépatique ou cycle exo-érythrocytaire

Lors de son repas sanguin chez l'homme, le moustique infecté injecte avec sa salive les formes plasmodiales appelées sporozoïtes. Ce sont des éléments fusiformes mesurant 11 à 14 microns qui gagent le foie au bout d'une demi-heure environ. On les y retrouve sous forme de trophozoïtes exo-érythrocytaires mesurant deux à trois microns. Ces trophozoïtes se multiplient par schizogonie dans l'hépatocyte pour donner des schizontes exo-érythrocytaires mesurant 30 à 70 microns. Les schizontes murs ou corps bleus renferment 8 à 32 mérozoïtes qui seront libérés dans le courant sanguin après éclatement des hépatocytes. Ce cycle hépatique dure 7 à 10 jours. Chez les espèces comme *P. vivax* et *P. ovale*, parmi les sporozoïtes inoculés par l'anophèle, après pénétration dans l'hépatocyte, certains restent quiescents pendant longtemps (1 à 13 mois selon l'espèce), ce sont les hypnozoïtes. Ils reprendront le cycle de développement normal plus tard [43].

3.2.3.1.2. Cycle sanguin ou cycle endo-érythrocytaire

Les mérozoïtes libérés par l'éclatement des schizontes hépatiques arrivent dans le sang et pénètrent dans les hématies par endocytose. Le mérozoïte prend alors une forme en anneau appelé « ring », mesurant 1 à 2 microns : c'est le trophozoïte sanguin. Les trophozoïtes se développent en se nourrissant de l'hémoglobine dont les résidus sont visibles sous forme de grains de pigment dans le cytoplasme. Ces pigments s'appellent les mérozoïtes. Le noyau du trophozoïte se divise pour donner une forme à deux noyaux puis quatre, huit, etc. : ce sont les schizontes. Les schizontes murs ont 8 à 32 mérozoïtes selon les espèces : ce sont les rosaces.

La durée de maturation du trophozoïte aboutissant à la libération de nouveaux mérozoïtes est une caractéristique des différentes espèces. Elle est de 48 heures pour les espèces responsables de fièvre tierce, de 72 heures pour *P. malariae* responsable de fièvre quarte, et de 24 heures pour *P. knowlesi*. Après éclatement de la rosace, les mérozoïtes pénètrent dans de nouveaux globules rouges et le cycle érythrocytaire

recommence. Après un ou plusieurs cycles érythrocytaires, il apparait des stades sexués à la suite d'un processus encore inconnu : ce sont les gamétocytes. Le gamétocyte femelle est le macrogamétocyte, et le gamétocyte male est le microgamétocyte [44].

3.2.3.2. Cycle chez l'anophèle femelle

Chez l'anophèle femelle hématophage, se déroule un cycle sexué ou sporogonie. L'anophèle femelle s'infecte en prenant son repas sanguin chez un sujet porteur de gamétocytes. Au niveau de l'intestin moyen du moustique, le macrogamétocyte subit une division chromatinienne et se transforme en un gamète haploïde. Le microgamète subit plusieurs divisions pour donner huit noyaux fils, puis par un phénomène d'exflagellation, libère huit gamètes mâles haploïdes. Chaque gamète mâle est pourvu d'un flagelle grâce auquel il va à la rencontre d'un gamète femelle pour le féconder.

Au cours de la fécondation, les deux noyaux fusionnent pour donner un œuf diploïde appelé ookinète qui moustique quitte rapidement la lumière de l'estomac du moustique pour se retrouver à la face externe. Il perd alors sa mobilité, s'arrondit et grandit. Il subit une méiose qui le transforme en élément haploïde. Il s'entoure d'une enveloppe : c'est l'oocyste dans lequel s'individualisent les sporozoïtes. Libérés par l'éclatement de l'oocyste, ces derniers gagnent avec prédilection les glandes salivaires de l'anophèle d'où ils seront expulsés lors de la piqure infectante. Le cycle chez le moustique dure 10 à 40 jours selon la température et l'espèce plasmodiale. Cette durée est de 12 jours pour *P. falciparum* en Afrique tropicale. Le cycle s'arrête lorsque la température moyenne est inférieure à 16°C pour *P. vivax* et à 18°C pour *P. falciparum* [45].

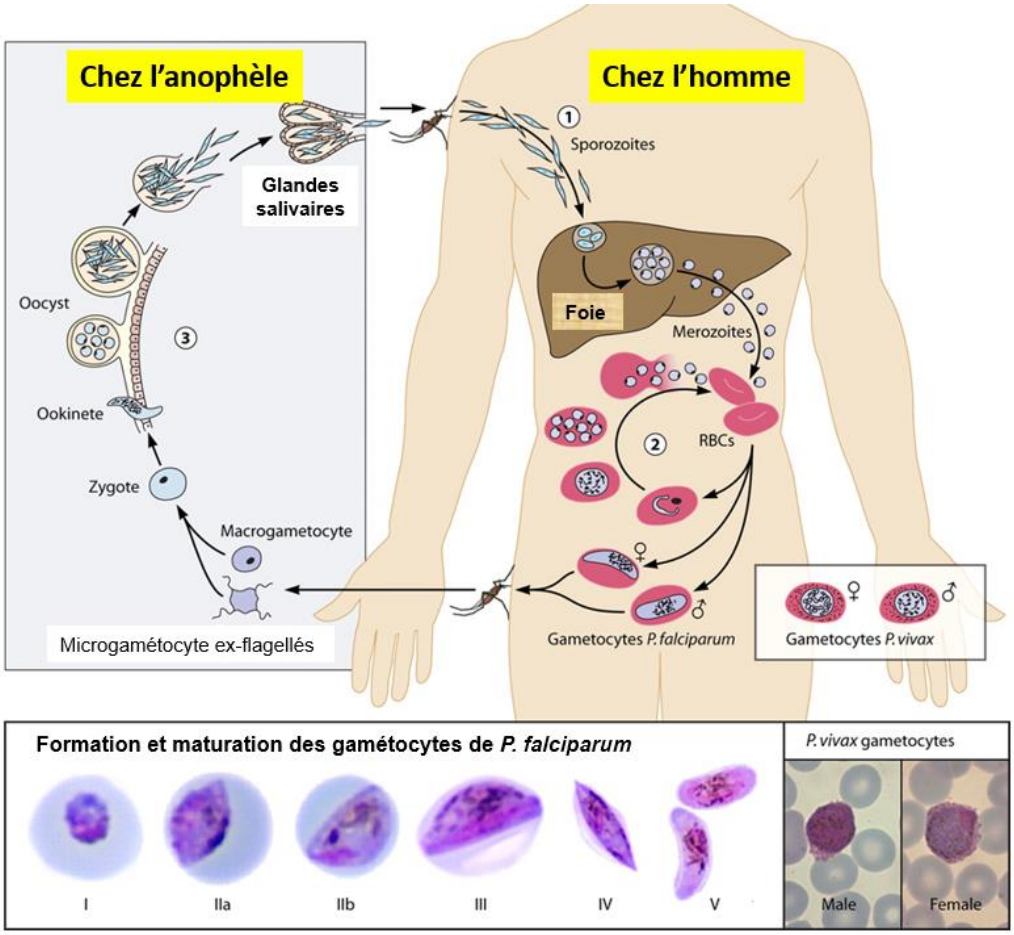


Figure 6 : Cycle de vie de *Plasmodium falciparum* et développement des gamétocytes

Source : Teun Bousema et Chris Drakeley, Clin. Microbiol. Rev. 2011 ; 24:377-410 [46].

(En haut) Cycle de vie de *P. falciparum* et développement des gamétocytes. Les parasites du paludisme pénètrent dans la circulation sanguine humaine sous la forme de sporozoïtes qui sont injectés par des moustiques anophèles femelles infectés au cours d'un repas de sang. La majorité des sporozoïtes migrent vers le foie, où ils envahissent les hépatocytes et se multiplient. Des mérozoïtes se forment et sont libérés dans la circulation sanguine, où ils envahissent les globules rouges, initiant le cycle de multiplication asexuée. Une fraction des mérozoïtes qui sont libérés des globules rouges infectés forment des gamétocytes, le stade parasitaire infectant les moustiques.

La formation et la maturation des gamétocytes se déroulent en cinq stades morphologiquement reconnaissables. Les gamétocytes de stade précoce sont

séquestrés, et seuls les gamétocytes matures de stade V circulent dans le sang périphérique, où ils peuvent être absorbés par les moustiques. Une fois ingéré par les moustiques, chaque gamétocyte individuel forme 1 macrogamète femelle ou jusqu'à 8 microgamètes mâles. Dans l'intestin moyen du moustique, la fusion des gamètes entraîne la formation d'un zygote qui se développe en un ookinète mobile capable de pénétrer la paroi de l'intestin moyen pour former des oocystes. Les oocystes grossissent avec le temps et éclatent pour libérer des sporozoïtes qui migrent vers la glande salivaire du moustique, rendant ce dernier infectieux pour l'homme.

(En bas) Les cinq stades de développement des gamétocytes de *P. falciparum* et des gamétocytes matures de *P. vivax*.

3.3. Gamétocytes du *Plasmodium* : Biologie et facteurs influençant la gamétogenèse

3.3.1. Définition

Le terme gamétocyte désigne des pré-gamètes, observés dans le sang circulant de l'homme. Les gamètes proprement dits sont observés chez le moustique et résultent de l'activation des gamétocytes ingérés avec le repas sanguin. Seuls les gamètes sont capables de se féconder et vont initier le développement sporogonique chez le vecteur si celui-ci est sensible à l'espèce parasitaire

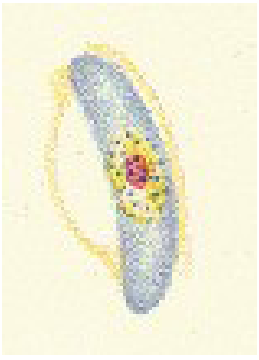
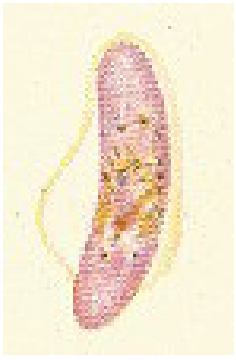
A  B 

Figure 7 : Schéma de gamètes femelle (A) et mâle (B) de *P. falciparum*

Source : [Http://www.pasteur.mg/Atelier-Palu/2004/pdf/presentations/silai_s2.pdf].

3.3.2. Gamétocytogenèse

Les gamétocytes de *P. falciparum* proviennent de stades sanguins asexués [47]. On n'observe pas chez le *Plasmodium* humain la production de gamétocytes directement

à partir des mérozoïtes hépatiques. Le nombre de gamétocytes est ordinairement très inférieur à celui des stades asexués, de l'ordre de 1 à 3 gamétocytes pour 100 trophozoïtes. On note qu'une faible gamétocytémie suffit pour assurer le développement sporogonique et, par conséquent, une transmission du *Plasmodium* du vecteur à l'homme [48].

3.3.2.1. Induction de la gamétocytogenèse ou engagement des parasites pour la production des gamétocytes

Les mécanismes par lesquels le stress induit la production des gamétocytes ne sont pas complètement élucidés. Il semble que la prise de la décision de s'engager vers la production des gamétocytes intervienne avant la schizogonie qui produit des mérozoïtes qui, par la suite, produiront les gamétocytes [49, 50]. Tous les mérozoïtes issus du même schizonte engagé sont soit mâle ou femelle et le ratio de gamétocytes femelles /gamétocytes mâles élevé est dû au pourcentage élevé de schizontes femelles par rapport aux schizontes mâles [50, 51].

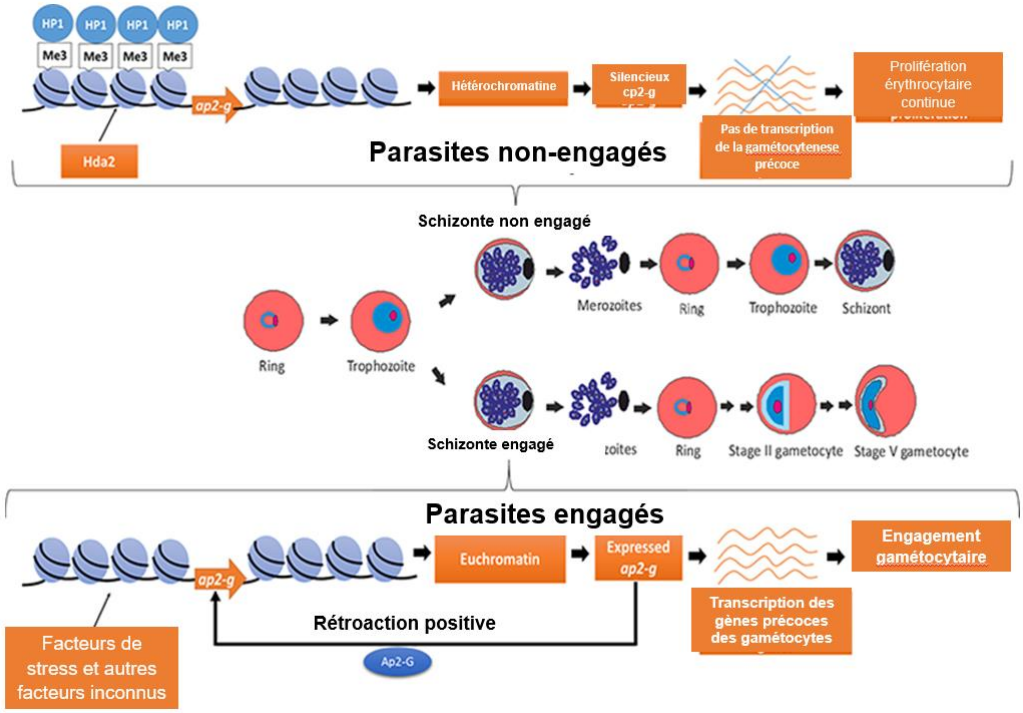


Figure 8 : Proposition de mécanisme d'induction des parasites pour la production des gamétocytes

Source: The Biology of Malaria Gametocytes [52].

Che Julius Ngwa, Thiago Ferreira de Araujo Rosa, Gabriele Pradel

Au cours du cycle intra érythrocytaire, des régulations épigénétiques et transcriptionnelles agissent ensemble pour induire la production des gamétocytes. Il existe deux populations de parasite au stade érythrocytaire : les parasites engagés (pour la production des gamétocytes) et les parasites non engagés qui poursuivent le cycle asexué.

- **Mécanisme épigénétique d'induction de la gamétocytogenèse**

Des mécanismes épigénétiques à travers des modifications d'histone semblent impliqués dans la régulation de l'expression des gènes important pour le parasite [53, 54]. Deux protéines clés de silencieusement génique interviennent dans la régulation épigénétique de l'induction de la gamétocytogenèse chez *P. falciparum : Protéine-1 de l'hétérochromatine de P. falciparum* (PfHP1) et l'histone désacétylase-2 de *P. falciparum* (PfHda2) [55, 56].

Brancucci et coll. ont rapporté que chez *P. falciparum*, PfHP1 se fixe sur la lysine 9 des résidus de l'histone H3-triméthylé (H3K9me3) pour maintenir le silencieusement du gène de l'hétérochromatine [55]. Cela entraine une expression variée des gènes *var* ainsi que de la suppression de l'induction de la gamétocytogenèse. La déplétion conditionnelle du PfHP1 entraine une hyper-induction de différents gamétocytes démontrant ainsi le rôle de cette protéine dans le blocage de l'induction de la gamétocytogenèse [57]. Une étude de Coleman et al [55] a démontré le rôle essentiel de la protéine PfHda2 dans le silencieusement global des gènes *var* ainsi que le contrôle de l'induction des gamétocytes chez *P. falciparum*. Une suppression du gène de PfHda2 entraine une surexpression des gènes associées à la gamétocytogenèse aboutissant à une augmentation de la production des gamétocytes.

- **Régulation transcriptionnelle de l'induction de la gamétocytogenèse**

- AP2-G est une protéine de la famille d'apicomplexan AP2, fixant l'ADN caractérisée par la présence d'un facteur de réponse Apetala2/éthylène (AP2 / ERF) dans le domaine fixant l'ADN [58]. Chez le parasite du paludisme, d'autres protéines AP2 ont été assignées à la transition spécifique de stade au cours du développement du

parasite, par exemple, le développement des stades de sporozoïte de l'intestin moyen du moustique et du foie [59, 60].

- Deux études chez *P. falciparum* et *P. berghei* ont montré que l'AP2-G déclenche une cascade de transcriptions qui initient l'induction des gamétocytes [54, 61, 62]. Pour déterminer initialement si AP2-G est essentiel pour l'induction et la production de gamétocytes, les deux études ont séquencé et analysé le gène ap2-g à partir de souches sous-productrices de gamétocytes à la recherche de polymorphismes, d'insertions ou mutations ponctuelles spécifiques. Leurs résultats ont montré des mutations intrigantes ou faux-sens dans le gène ap2-g, expliquant l'incapacité des souches à s'engager vers la production de gamétocytes. Leurs résultats initiaux ont été confirmés en provoquant des perturbations ciblées au niveau du locus du gène ap2-g à la fois chez *P. falciparum* et *P. berghei*, ce qui a entraîné le blocage de l'induction et de la production de gamétocytes.

- La perturbation du locus de ap2-g a également entraîné la régulation à la baisse de nombreux gènes hautement exprimés dans les gamétocytes précoces tels que Pfs16 et Pfg25 / 27. Le motif d'ADN impliqué dans la liaison AP2-G a été identifié comme GTAC et s'est avéré être localisé en amont de nombreux gènes associés à la gamétocytogenèse [61-63]. Le gène ap2-g possédant également le domaine GTAC sur sa région promotrice, cela suggère qu'il se régule par un mécanisme de rétroaction. Il a été démontré que le motif de liaison à l'ADN AP2-G interagit avec les promoteurs des gènes associés aux gamétocytes d'une manière dépendante du motif. Les mutations du motif dans la région du promoteur entraînent un blocage de l'expression génique des gènes associés aux gamétocytes, indiquant ainsi que AP2-G induit l'expression de gènes contenant le motif d'ADN AP2-G en se liant à celui-ci au niveau de la région du promoteur [61].

3.3.2.2. Maturation et morphologie des gamétocytes

La morphologie des gamétocytes varie parmi les espèces de Plasmodium. Alors que les gamétocytes matures de *P. ovale, P. malariae, P. vivax* et *P. knowlesi* possèdent une forme ronde à ovale*, P. falciparum* adopte une forme de croissant ou de falciforme à maturité [64, 65].

Le nom *P. falciparum* fait référence à la forme en croissant ou falciforme des stades matures de ses gamétocytes. Au cours de son développement le gamétocyte, de *P. falciparum* passe par 5 stades morphologiquement distincts (I – V). Les premières observations sur la morphologie des gamétocytes de *P. falciparum* ont été faites dans les années 1950, et ont permis de définir les cinq stades de développement [66]. Plus tard, en utilisant des approches de microscopie optique et électronique, les formes et les temps d'apparition des différents stades ont été déterminés [67, 68]. Des études ont montré que les stades I-IV sont séquestrés dans la moelle osseuse, tandis que le stade V circule dans les vaisseaux sanguins périphériques [5, 69].

Le gamétocyte de stade I a une forme arrondie, semblable au jeune trophozoïte asexué. Le stade IIa, par contre, se distingue du trophozoïte par son grand format rond et sa distribution granulaire de pigment dans plusieurs vacuoles digestives. Au stade IIb, le parasite commence à s'allonger en forme de D. Les gamétocytes de stade III adoptent une forme déformant légèrement le globule rouge en raison de l'allongement supplémentaire du parasite. Au stade IV, il est possible de distinguer les gamétocytes mâles et femelles. Les deux sexes ont un format mince et allongé avec des extrémités pointues. Dans les gamétocytes mâles, le pigment a tendance à être dispersé tandis que chez la femelle, il est plus dense.

Le gamétocyte de stade V est le plus distinct de tous les stades en raison de la forme en croissant ou falciforme. Alors que le gamétocyte mâle est plus épais et que le cytoplasme apparaît en bleu pâle après coloration au Giemsa, la femelle est plus allongée et courbée avec un cytoplasme coloré en bleu. Cette étape est visible dans la circulation périphérique après 10 à 12 jours de maturation [65].

3.3.3. Facteurs favorisant la gamétocytogenèse de *P. falciparum*

La gamétocytogenèse est à considérer comme un processus spontané qui accompagne une infection palustre. Cependant, toute modification environnementale occasionnant une situation de stress pour les formes asexuées circulantes peut être à l'origine d'une forte pousse gamétocytaire. Ceci fait dire que le gamétocyte est une forme d'évasion du parasite d'un environnement hostile vers un autre moins hostile. Ces facteurs favorisant la gamétocytogenèse sont très variés.

En culture, différentes techniques d'induction de la gamétocytogenèse sont utilisées comme : la réduction drastique de l'hématocrite de la culture [70], une addition de GR pauvre en hémoglobine [71] ou de GR lysés [72] ou encore la présence de réticulocytes dans la culture [73]. L'utilisation de milieu de culture déjà usé [73].

In-vivo, des facteurs liés à l'hôte comme la présence d'hormones [74, 75], de sérum immun [76], de composées chimiques comme des médicament antipaludique [77-79]. Aussi, la production des gamétocytes est contrôlée par la génétique du parasite. Certaines souches de parasite sont connues pour être des bon producteurs de gamétocytes [80].

3.3.4. Déterminants de l'infectiosité des moustiques

Chez l'hôte humain, un petit sous-ensemble de population parasitaire totale se différencie en gamétocytes matures, dont certains peuvent être ingérés par un moustique lors d'un repas sanguin. La fertilisation subséquente des gamètes et le développement en sporozoïtes chez le moustique le rend infectieux pour un autre être humain. Le réservoir infectieux humain est défini comme la proportion d'une population capable d'infecter avec succès les moustiques [81]. Le transport des gamétocytes et la transmission réussie de l'homme au moustique sont influencés par plusieurs facteurs, dont l'âge [82], la densité des gamétocytes [83, 84], le traitement médicamenteux antipaludéens [85-87], et l'immunité de l'hôte [88, 89].

Bien que la présence des gamétocytes matures dans le sang ait été longtemps considérée comme cruciale pour une transmission efficace, ces stades ont été rarement détectés par microscopie [90, 91], et on a donc supposé précédemment que seule une petite proportion de personnes atteintes de paludisme portait des gamétocytes. Avec l'utilisation de techniques moléculaires sensibles, il est maintenant clair que les gamétocytes sont présents dans la plupart des infections palustres et à des densités très variables [92, 93], qui peuvent infecter efficacement les moustiques [92, 94]. Etant donné la relation très variable et non linéaire entre la densité des gamétocytes et le taux d'infection des moustiques [94, 95], la quantification de la composante humaine du réservoir infectieux est une tâche difficile. Des essais d'alimentation des moustiques ont été systématiquement utilisés pour quantifier

l'infectiosité d'une personne et pour évaluer les effets des vaccins bloquant la transmission ou des médicaments gamétocytocides.

Dans les essais d'alimentation directe sur la peau, les moustiques Anophèles sont autorisés à prendre un repas sanguin par contact direct avec la peau d'une personne infectée naturellement. Dans les essais d'alimentation à membrane, il existe deux types : (1) Le test d'alimentation direct par membrane (*Direct membrane-feeding assay ; DMFA*) implique l'alimentation des moustiques anophèles non infectés avec un échantillon de sang prélevé chez une personne naturellement infectée par une membrane artificielle (*Parafilm*) en présence de sérums autologues, et (2) le test d'alimentation standard sur membrane (*Standard membrane-feeding assay ; SMFA*) implique l'alimentation des moustiques avec des gamétocytes cultivés *in-vitro* mélangés avec des globules rouges et du sérum humain à travers la membrane dans un dispositif [94]. On mesure l'infectiosité des moustiques dans ces tests en quantifiant le nombre d'oocystes présents dans l'intestin moyen du moustique (soit en densité moyen d'oocystes, soit en prévalence d'oocystes chez les moustiques) après une période de maturation de 7 à 8 jours.

Bien que les tests directs d'alimentation cutanée puissent donner une estimation plus précise du potentiel de transmission de l'homme, les tests à membrane sont appropriés pour comparer l'infectiosité entre les personnes et pour évaluer les interventions de réduction de la transmission [94, 96]. Le SMFA, comparé au DMFA, peut être effectué dans des conditions de laboratoire normalisées et est considéré comme l'étalon-or pour mesurer l'activité de réduction de la transmission. Une revue de la littérature plus détaillée du réservoir infectieux humain au niveau épidémiologique et des outils pour mesurer la transmission a été faite par Bousema et Drakely en 2016 [97].

Pareillement, une très forte parasitémie semble réduire l'infectivité des gamétocytes. Le mécanisme est inconnu. Il pourrait s'agir du rôle inhibiteur sur l'infectivité de certaines cytokines, comme le TNF par exemple, abondamment secrétées au cours des poussées parasitaires asexuées. Mais ce phénomène n'existe que rarement dans les infections à *P. falciparum*, du fait du retard de maturation des gamétocytes par rapport à la poussée asexuée qui leur a donné naissance.

3.4. Variants hémoglobiniques et protection contre le paludisme

Dans les zones d'endémie palustre, on observe que certains enfants font moins d'épisodes palustres pendant la saison de transmission ou rarement la forme sévère du paludisme. Dans les mêmes zones, on observe également l'existence de certaines anomalies érythrocytaires génétiques. Ce qui amène à rechercher la relation entre ces variants génétiques et la résistance au paludisme sévère.

3.4.1. Hémoglobine normale et hémoglobinopathies

Les érythrocytes sont essentiellement remplis d'hémoglobine et les parasites du paludisme ont développé un style de vie qui dépend largement de son environnement d'hémoglobine.

Les altérations de l'hémoglobine peuvent affecter la biochimie et la machinerie cellulaire du développement parasitaire. Elles pourront affecter l'habilité de la rate et d'autres mécanismes immunitaires à reconnaitre les hématies parasitées en affectant leur morphologie, leurs propriétés mécaniques ou leurs structures de surface. L'importance biologique de ces dépendances est appuyée par la très grande pression que le paludisme a exercée sur la structure et la régulation de l'alpha globine (encodée par les gènes identiques HBA1 et HBA2) et la beta globine (encodée par le gène HBB) qui, ensemble, constituent la protéine tétramérique de l'hémoglobine chez l'adulte [98]. Des perturbations peuvent survenir dans la synthèse de l'hémoglobine dues à une mutation (le plus souvent ponctuelle) ou une suppression au niveau des gènes gouvernant la synthèse de telle ou telle chaine. Ces perturbations aboutissent à des anomalies génétiques de l'hémoglobine appelées hémoglobinopathies. L'hémoglobinopathie peut être qualitative : HbS (drépanocytose), HbC, etc. ou quantitative : thalassémies.

3.4.2. Hémoglobine S (trait drépanocytaire) et paludisme

La drépanocytose ou anémie falciforme est une maladie génétique autosomique récessive. C'est une maladie rare sauf dans certaines régions notamment l'Afrique équatoriale, certaines régions de l'Inde et le pourtour méditerranéen. Au Mali, la prévalence de la drépanocytose est de 12% [99]. Cette affection est un syndrome hémolytique dû à un défaut de synthèse de la chaine bêta de l'hémoglobine.

Il s'agit d'une mutation ponctuelle au niveau de la position 6 du gène de la chaine bêta globine, c'est-à-dire la séquence GAG est remplacée par la séquence GTG (SNP rs334) ce qui conduit au remplacement de l'acide glutamique par la valine conduisant au remplacement de l'HbA par l'HbS [100]. Par conséquence, dans la condition d'hypoxie, l'hémoglobine perd sa forme et sa fonctionnalité pour prendre la forme en faucille incapable de survivre dans cette condition, d'où l'hémolyse aboutissant à une anémie.

Les personnes homozygotes (Hb SS) ont la drépanocytose généralement fatale au jeune âge. Les personnes hétérozygotes (Hb AS) n'ont généralement pas d'anomalie clinique, il a même été suggéré que cette forme pourrait conférer un avantage de protection contre certaines formes de paludisme [101]. La distribution géographique du paludisme et du gène drépanocytose supporte cette suggestion [101], mais aussi les études épidémiologiques et cliniques réalisées dans les zones endémiques du paludisme confirment cette hypothèse [102].

En effet, les premières observations entre le trait drépanocytaire et le paludisme provenaient de la Rhodésie du Nord où Beet notait que le parasite du paludisme était moins fréquent dans le sang des sujets ayant le trait drépanocytaire [103].

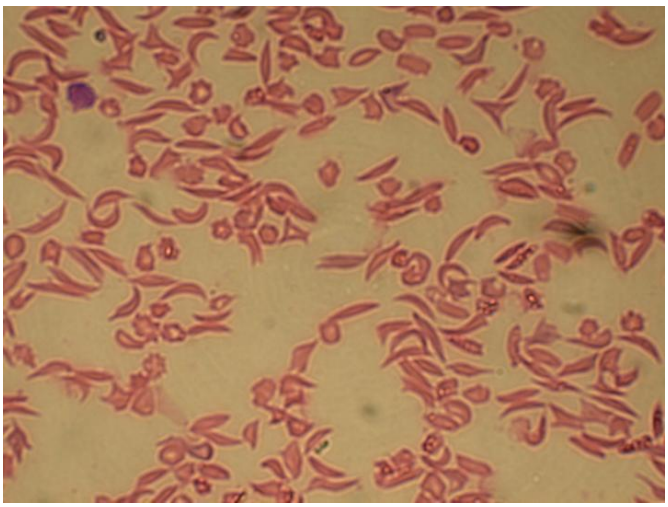


Figure 9 : Illustration des globules rouges falciformes sur frottis mince

Source : http://www.lifl.fr/~touzet/M1/Sickle-cell_anemia.jpg

Le mécanisme par lequel le trait drépanocytaire protège contre le paludisme à *P. falciparum* n'est pas totalement élucidé. Les premières hypothèses évoquée faisaient

état de falciformation accélérée facilitant l'élimination des cellules infectées de la circulation sanguine [104] et la mauvaise croissance parasitaire. Cette croissance est normale dans les hématies AS exposées à 17% d'oxygène mais les parasites meurent à 3% d'oxygène en quelques jours [105]. Aussi une réponse immunitaire acquise précoce et plus intense a été évoquée [106].

Cependant les mécanismes de cette protection semblent impliquer des altérations au niveau des interactions d'une part entre parasite et GR (sécrétion et expression des protéines parasitaires à la surface des GRP) [107, 108] d'autre part entre le GRP et les cellules de l'hôte (réductions de la cytoadhérence) [107] avec comme conséquences une réduction des phénomène inflammatoires (production des molécules inflammatoires comme le TNF [109] et une accélération de la clairance splénique [110]

3.4.3. Hémoglobine C et paludisme

L'hémoglobine C est retrouvée à travers l'Afrique de l'Ouest surtout sur le plateau Voltaïque. Elle est asymptomatique chez les sujets hétérozygotes et ne comportant qu'une hémolyse extrêmement modérée souvent accompagnée d'une grosse rate chez les sujets homozygotes. C'est une affection génétique à transmission récessive, il s'agit d'une mutation ponctuelle au niveau de la position 6 de la chaine β globine, c'est-à-dire, la séquence GAG est remplacée par AAG (SNP rs33930165) conduisant au remplacement de l'acide Glutamique par la Lysine. Par conséquent, l'HbA est remplacé par l'HbC [98].

La coïncidence de la distribution géographique de cette affection génétique érythrocytaire avec celle de l'endémie palustre passée ou présente suggère qu'elle est impliquée dans la protection contre le paludisme. En effet, l'HbC hétérozygote et homozygote protègent tous contre le paludisme sévère ; mais il semble que cette protection soit élevée pour les sujets homozygotes [111]. Une étude menée sur 4348 sujets au Burkina Faso suggère une réduction de 29 à 93% de risque de paludisme clinique chez les sujets de type d'HbC hétérozygotes et homozygotes respectivement [112].

Certaines études récentes ont démontré l'effet protecteur de cette hémoglobinopathie contre de paludisme grave, comme celle conduite au Mali chez les Dogons, qui a

démontré que l'HbAC était associée approximativement à 80% de réduction du risque de paludisme grave [113]. Aucun cas de paludisme grave n'a été observé chez les 7 sujets homozygotes HbC inclus dans cette étude.

Ce résultat montre que les sujets homozygotes sont protégés que les sujets hétérozygotes [113]. Le mécanisme de protection induite par l'HbC n'est pas élucidé mais une étude récente a démontré deux mécanismes :

- La diminution de la séquestration des globules rouges parasités dans la microcirculation sanguine reconnue comme facteur déterminant la survenue des formes graves de paludisme ;

- Une augmentation de la clairance splénique des globules rouges parasités. Le premier mécanisme semble être le mécanisme prépondérant. On expliquerait ainsi la protection conférée par l'HbC contre la plupart des formes graves du paludisme même chez les enfants de moins de cinq ans qui manquent encore d'immunité spécifique acquise antipaludique suffisante [114].

3.4.4. Hémoglobinopathies et portage des gamétocytes

L'impact des polymorphismes de l'hémoglobine sur le portage des gamétocytes de *P. falciparum* a été rapporté par certaines études. Ainsi l'évidence d'une plus grande prévalence de gamétocyte a été rapportée sur les échantillons de Sénégal et de Thaïlande en 2010 [115]. Bronner P. G et al ont rapporté une plus grande prévalence de gamétocytes chez les enfants d'âge scolaire malien porteur d'HbC en 2017 [116]. En revanche, aucune association n'a été retrouvée entre l'α-thalassémie et le portage des gamétocytes au Ghana [117]. Des études ont conclu aussi en une plus grande infectiosité des anophèles par les individus porteurs d'HbS [118, 119].

3.5. Culture *in-vitro* de *Plasmodium falciparum*

3.5.1. Historique et intérêt

Les premières tentatives de culture *in-vitro* de l'agent du paludisme sont celles de Bass et Johns (1912) : ils mettent alors, en évidence l'importance du glucose dans le milieu de culture.

Entre 1941 et 1971, Trager s'intéressa aux conditions techniques de la culture en mentionnant l'importance du milieu de culture, l'influence de la température et de l'atmosphère gazeuse, la nécessité des changements de milieu et l'apport d'hématies "fraiches". Le modèle expérimental était alors *P. lophurae*, parasite aviaire.

A cette époque, la possibilité de cultiver *in vitro* divers plasmodii étant acquise, les recherches s'orientèrent vers le perfectionnement des méthodes de culture et vers la mise au point de milieux de culture plus appropriés.

En 1976, Trager et Jensen publièrent une méthode qui s'imposa très vite par sa simplicité : nous la décrivons ultérieurement car elle est à la base de notre technique de travail.

Verne et al. (1967) ainsi, rapportaient : La culture *in vitro* met à la disposition du biologiste des souches cellulaires les plus diverses et lui permet de les soumettre aux facteurs expérimentaux les plus variés, avec cet avantage appréciable qu'une culture *in vitro* représente un système infiniment moins complexe qu'un organisme animal entier.

L'intérêt de la culture de *P. falciparum* est donc de déplacer l'expérimentation de l'animal à la cellule-hôte naturelle du parasite, le globule rouge. Elle ouvre ainsi la voie aux recherches pour la mise au point de la culture des stades exo-érythrocytaires et même des stades gamétocytaires trouvés chez le vecteur. Elle élargit les possibilités de connaissance de l'hématozoaire sur le plan morphologique, biochimique, pharmacologique et immunologique. Il en découle de nombreuses conséquences pratiques : en premier lieu, la mise au point actuelle de vaccins et en ce qui nous concerne directement, une étude sur la production de gamétocytes et infectivité de moustiques.

3.6. Les souches de moustiques

Une colonie de *Anophèles coluzzii* de la 163ème génération appelée N'gaba a été utilisée pour cette étude. Cette colonie a été établie en 2008 à partir d'une collecte effectuée aux environs du quartier de N'gabakoro Droit (commune de Moribabougou).

La souche *Anophèles coluzzii* N'gaba et la souche *Anophèles gambiae* L3-5 sont des populations naturelles résistantes aux pyréthrinoïdes, et aux dichlorodiphényltrichloroéthane.

La souche sensible de référence est l'*Anopheles gambiae* Kisumu, originaire du Kenya. Cette souche est élevée à l'insectarium du CREC [120, 121].

4. MATERIEL ET METHODES

4.1. Type et période d'étude

Nous avons mené une étude expérimentale de culture in-vitro de *Plasmodium falciparum* qui s'est déroulée entre octobre 2019 et mars 2020. L'étude comportait deux volets :

- Mise au point de la technique de production des gamétocytes
    - Evaluation de la capacité de production et de maturation des gamétocytes par différentes souches de *P. falciparum*
    - Evaluation de l'effet des différents phénotypes hémoglobiniques des globules rouges (HbAA, HbAC et HbAS) sur production et de maturation des gamétocytes de *P. falciparum*
- Infection expérimentale des souches d'anophèles.
    - Etude de la faisabilité de l'infection de souches d'*An. gambiae* par les gamétocytes de culture.

4.2. Lieu d'étude

Notre étude s'est déroulée dans les locaux du MRTC plus précisément dans l'unité immunogénétique et parasitologique.

Le laboratoire d'immunogénétique du MRTC a été créée en 2008 au sein du programme entomologie du MRTC. C'est le fruit d'une collaboration entre les chercheurs de l'USTTB et du laboratoire de recherche sur le Paludisme et les vecteurs de l'institut national de la santé des Etats Unis d'Amérique (LMVR/ NIH/USA). Le Laboratoire d'Immunogénétique a conduit de nombreuses études sur le paludisme portant sur des domaines aussi variés que l'immunité acquise et naturelles du paludisme, la résistance aux antipaludéens, l'évaluation des stratégies de lutte et de prévention. En outre, le laboratoire a appuyé de nombreux programme de recherche.

Les études ont été menées sur différentes sites géographiques du Mali comme Kéniéroba, Dangassa, Bamako, Nioro, Mopti et Bandiagara. Le laboratoire d'immunogénétique dispose d'équipements variés adaptés à ses activités comme les

équipements de biologie cellulaire, de biologie moléculaire, d'immunologie, de culture cellulaire, le tout soutenu par un réseau informatique et une chaîne de froid adapté au stockage des données et à conservation de différents types d'échantillons. Le laboratoire est animé par un personnel qualifié et diversifiés comprenant des immunologistes, un pharmacologue, des épidémiologistes, des médecins, des pharmaciens et des techniciens de laboratoire. Le laboratoire a participé à plusieurs publications dans des revues scientifiques en collaboration avec des chercheurs de renommé international.

4.3. Matériel de culture *in-vitro* de *Plasmodium falciparum*

Le matériel utilisé dans la culture étaient des consommables à usage unique, des équipements durables et des organismes vivants (parasite et globule rouge).

4.3.1. Equipements de base du laboratoire

La chaîne de froid (+4°C, -20°C et -80°C) était nécessaire pour la conservation des milieux de culture, des globules rouges et des souches de parasite.

Le bain marie était constamment à 37°C pour la décongélation du parasite et aussi le maintien de la température du milieu de culture.

L'incubateur était réglé à 37°C, pour donner une atmosphère composée de 5% de CO_2 et le taux d'humidité maintenu à 80%.

La hotte à flux laminaire était utilisée pour la préparation des différents milieux de culture et la culture parasitaire dans des conditions stériles. La surface de travail était débarrassée du matériel utilisé et nettoyée avec alcool de 70° avant et après usage.

4.3.2. Souches de parasite utilisées

Nous avons utilisé les souches de parasite 3D7, NF54 et 7G8 stocké dans le congélateur de -80°C de notre laboratoire. Les différentes souches ont été obtenues des laboratoires partenaires de France, des USA et d'Allemagne.

4.3.3. Collecte des globules rouges de culture

Les globules rouges étaient prélevés chez des volontaires après obtention de leur consentement libre et éclairé. Le génotypage des globules rouges a été réalisé en

utilisant la technique de chromatographie liquide de haute performance (HPLC) avec la machine D-10® de Bio-Rad.

4.4. Techniques de laboratoire utilisées.

Les techniques de laboratoire et leurs modes opératoires détaillés sont décrits en annexe.

4.4.1. Préparation du milieu de culture

Les milieux de culture classiques à base d'AlbuMax II™ (Catalogue #[122], Thermo Fisher Scientific) ont été employés. Le milieu de culture « incomplet » (MCI) composé de RPMI 1640 (Gibco BRL), de 5,4 g/l de HEPES (Calbiochem, CA), 0,5 g/l d'hypoxanthine (Sigma, MO) était préparé et conservé à 4ºC. Un milieu de culture « complet » (MCC) était préparé en ajoutant au MCI 2,5% d'AlbuMaxII™, 25 mM de bicarbonate de sodium (Biofluids, MD) et 0,01 % de gentamicine (Sigma, MO). Tous les milieux de culture étaient rendus stériles par filtration (Nalgene Filterware, Fisher Scientific, Pittsburgh) et conservés en aligots à 4ºC maximum une semaine avant usage (cf. annexe 1).

4.4.2. Décongélation et congélation du parasite

La congélation se réalisait avec le glycérol, les cryotubes étaient identifiés et stockés dans le frigo à -80°C (voir annexe 3). Elle permettait de constituer une réserve de souches toujours disponibles et de stocker les excédents de culture. A la congélation, il est important d'utiliser de faibles d'hématies parasitées 5% et de volumes entre 0,5-1 ml pour éviter l'hémolyse. Comme les formes en anneau survivent au mieux lors de la congélation. Il est donc préférable mais non indispensable de congeler une culture riche en stades en anneau (cf. annexe 3).

De même, une décongélation rapide est nécessaire pour réduire le phénomène d'hémolyse. Elle avait lieu suivant la technique décrite (cf. annexe 2) dans le bain marie et de lavage successif avec le RPMI 1640 incomplet (Gibco BRL) pour éviter les résidus de glycérol dans la culture (cf. annexe 2).

4.4.3. Préparation des hématies non parasité

Le sang était prélevé chez les volontaires au laboratoire d'Immunogénétique et parasitologique, et il était lavé 3 fois successive avec le RPMI incomplet pour éliminer le sérum. Les hématies étaient diluées avec le RPMI incomplet à 50% et conservées à une température de 4°C avant l'utilisation (cf. annexe 4).

4.4.4. Culture de *Plasmodium falciparum*

Le principe repose sur la technique de base décrite en premier par Trager et Jensen (1977) [123]. La culture était effectuée dans les flacons à usage unique à 37°C, dans un incubateur réglé pour donner une atmosphère composée de 5% de CO_2, avec un taux d'humidité maintenu à 80%. Un suivi quotidien était effectué pour changer le milieu de culture et noté l'aspect qualitatif et quantitatif des hématies parasitées (cf. annexe 5).

En pratique, le changement de milieu s'effectue après réchauffement à 37ºC, en inclinant légèrement le flacon et en aspirant le milieu en superficie. La lecture quotidienne d'un frottis mince coloré effectué sur chaque flacon permettait d'évaluer de la croissance du parasite. Les paramètres d'appréciation étaient l'intégrité morphologique, la densité parasitaire et l'index de multiplication.

4.4.5. Induction et le suivi de la maturation des gamétocytes

L'induction du gamétocyte était provoquée au 5 ou 6eme jour lorsque la parasitémie atteignait 5% ou plus. Elle consistait au non-renouvellement du milieu de culture pendant 24H puis au changement de la moitié du milieu aux 48eme et 72eme heures après l'induction. Ensuite, un suivi quotidien était effectué pour changer le milieu de culture et noté l'aspect qualitatif et quantitatif des stades gamétocytes (cf. annexe 6). La lecture quotidienne du frottis mince coloré effectué sur chaque flacon permettait d'évaluer de la croissance des gamétocytes.

4.4.6. Comptage des parasites

Pour apprécier la vitalité de la culture, la parasitémie était déterminée au microscope à l'immersion au grossissement x100. Après avoir changé le milieu nutritif, une goutte du mélange était prélevée du fond de flacon de culture et déposée sur une lame pour

effectuer un frottis (cf. annexe 6). On comptait le nombre d'hématies parasitées, non parasitées et les différents stades du parasite par champs et on dénombre par champs. Puis le résultat est exprimé en pourcentage. Il s'agit ici d'établir une parasitémie différentielle : sur les hématies parasitées, on dénombre les trophozoïtes, les schizontes et les stades gamétocytes après induction.

Entre 14ème au 16ème jour de la culture, la plupart des gamétocytes étaient au stade V et morphologiquement mûr. Le pourcentage des gamétocytes étaient déterminés enfin de préparer l'infestation des moustiques.

4.4.7. Essais d'infection d'anophèles par les gamétocytes de culture

Il consistait à l'engorgement des moustiques à travers une membrane avec du sang parasité. Le sang était introduit dans l'orifice supérieur de la chambre alors que l'orifice inférieur est obturé par une membrane de Parafilm étirée à la limite de la rupture. Les deux orifices horizontalement opposés, permettent la circulation de l'eau réchauffée à 40°C grâce à un bain-marie thermostaté, ce qui maintient la solution de culture gamétocytaire à 37°C. L'orifice inférieur obturé par la membrane était déposés sur le pot contenant les moustiques. Le repas de sang parasité durait environ 30 mn. Après ce délai les moustiques sont mis en repos et les femelles non gorgées étaient séparées le lendemain pour déterminer le taux d'engorgement. Les moustiques gorgés étaient gardés dans l'insectarium pour être disséquées au huitième jour après pour déterminer le taux d'infection. Leur alimentation sucrée était rétablie avant le jour de la dissection.

Les différentes souches de moustiques utilisées étaient Kisumu, L3-5 et N'Gamba. Les moustiques étaient âgés de 4 à 5 jours et nourris uniquement du jus sucré (eau sucrée à 5%). Ils étaient placés dans des cages et mises-en jeun pendant 15 à 16H avant l'infection expérimentale. Les cages portaient la date, le nom de l'espèce et le nombre de moustique était au maximum 30 femelles par cage. La culture contenant de gamétocytes était diluée avec le sang frais pour ramener la densité parasitaire à environ 3% en se référant au nombre de globules rouges initiales dans la culture. Les tubes étaient maintenus à la température de 37ºC avant l'infection.

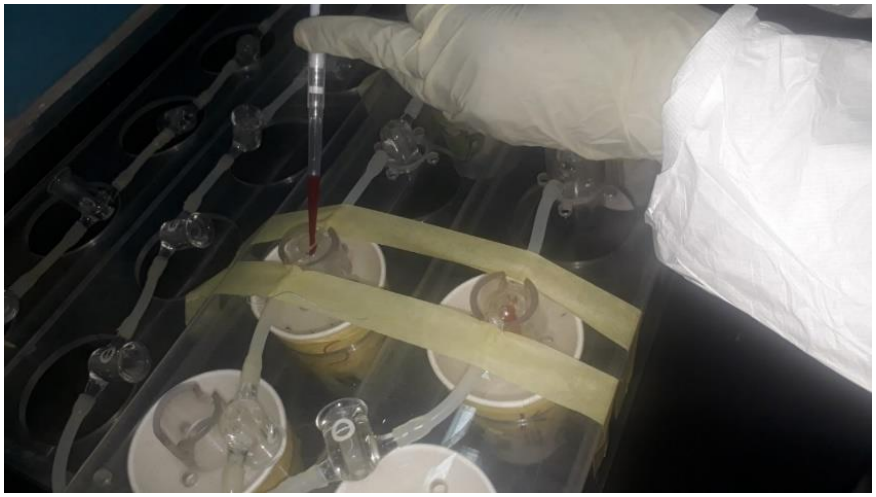


Figure 10 : Image illustrative du dispositif d'engorgement des anophèles sur membrane

Figure 11 : Image illustrative des moustiques au repose après l'engorgement

4.4.8. Extraction et examen des estomacs des anophèles infectés avec les gamétocytes de culture

Huit à dix jours après l'engorgement sur repas de sang parasité, chaque femelle était individuellement disséquée pour chercher la présence d'oocystes dans l'estomac sous microscope. Le pot était agité pour assommer les moustiques sans les écraser puis les mettre dans une boîte de Pétri qui contient du papier absorbant mouillé. Ce qui permet d'empêcher certains moustiques ayant la chance de se réveiller de s'échapper. Une goutte de mercurochrome était déposée sur la lame porte-objet. Le moustique est déposé dans la goutte sur le dos. L'estomac était extrait avec les ovaires et/ou les œufs et les tubes de Malpighi avec une pince en tirant sur les deux derniers segments

d'un mouvement continu et doux. L'estomac était bien étalé pour la lecture au microscope entre lame et lamelle pour chercher la présence ou l'absence d'oocystes.

4.5. Saisie et analyse des données

Les données ont été enregistrées sur des fiches de comptage des parasites et des fiches de dissection, saisies sur Microsoft Excel 2016 et le texte sur Microsoft Word 2016. Les analyses ont été effectuées sur SPSS 20.0.

4.6. Définitions opperationnelles

Taux d'induction : C'est le rapport de la gamétocytemie des gametocyte par rapport au parasitemie d'induction.

$$\text{Taux d'induction} = \frac{\text{Gamétocytemie de stade I}}{\text{Parasitemie d'induction}}$$

Taux de maturation : C'est le rapport de la gamétocytemie des gamétocyte de stade par rapport au gamétocytemie de stade suivant.

$$\text{Taux de maturation de stade} = \frac{\text{Gamétocytemie de stade suivant}}{\text{Gamétocytemie de stade}}$$

$$\text{Taux de maturation global} = \frac{\text{Gamétocytemie de stade V}}{\text{Gamétocytemie de stade I}}$$

Taux de gorgement : C'est le rapport du nombre de moustiques gorgés sur le nombre de moustique exposée.

Taux de survie : C'est le rapport du nombre de moustiques survivant le 8ème jour après le gorgement sur le nombre de moustiques gorgés.

Taux d'infection : C'est le rapport du nombre de moustiques infectés sur le nombre de moustiques disséqués.

Taux d'hématocrite de la culture : C'est la proportion du volume de culture occcupé par les globules rouges (infecté et non infecté).

L'exflagéllation : C'est la fécondation des gamètes males et femelles.

4.7. Considérations éthiques

Le protocole de recherche a été soumis à l'approbation du comité d'éthique des Facultés de Médecine et d'odontostomatologie et de Pharmacie. Nous avons utilisé le matériel stérile à usage unique. Nous avons également travaillé selon les bonnes pratiques de recherche clinique sur les personnes prélevées et selon les bonnes pratiques de laboratoire telles qu'énoncés dans les conventions internationales déclaration (d'Helsinki, Conférence internationale d'harmonisation des bonnes pratiques de recherche biomédicale).

5. RESULTATS

5.1. Résultats globaux

Au total, nous avons réalisé 19 cultures d'essai d'induction de gamétocyte de *P. falciparum* dont 4 avec la souche 3D7, 9 avec la souche NF54 et 6 avec la souche 7G8.

5.2. Résultats relatifs à l'impact des souches de *Plasmodium falciparum*

Tableau 1 : Tableau récapitulatif de l'issu des cultures d'essai d'induction de gamétocytes

Souche	Résultats de la culture			
	Contamination n (%)	Gamétocyte positif n (%)	Gamétocyte négatif n (%)	Total n (%)
NF54	2 (22)	7 (78)	0 (0)	9 (100)
7G8	1 (17)	5 (83)	0 (0)	6 (100)
3D7	0 (0)	0 (0)	4 (100)	4 (100)

NB : n = nombre de culture réalisée par souche

% = pourcentage

Sur les 19 cultures réalisées, La souche NF54 était arrivée aux stades gamétocytes avec 78%, 7G8 avec 83% et 3D7 avec 0%.

5.3. Résultats relatifs à l'impact des types d'hémoglobines

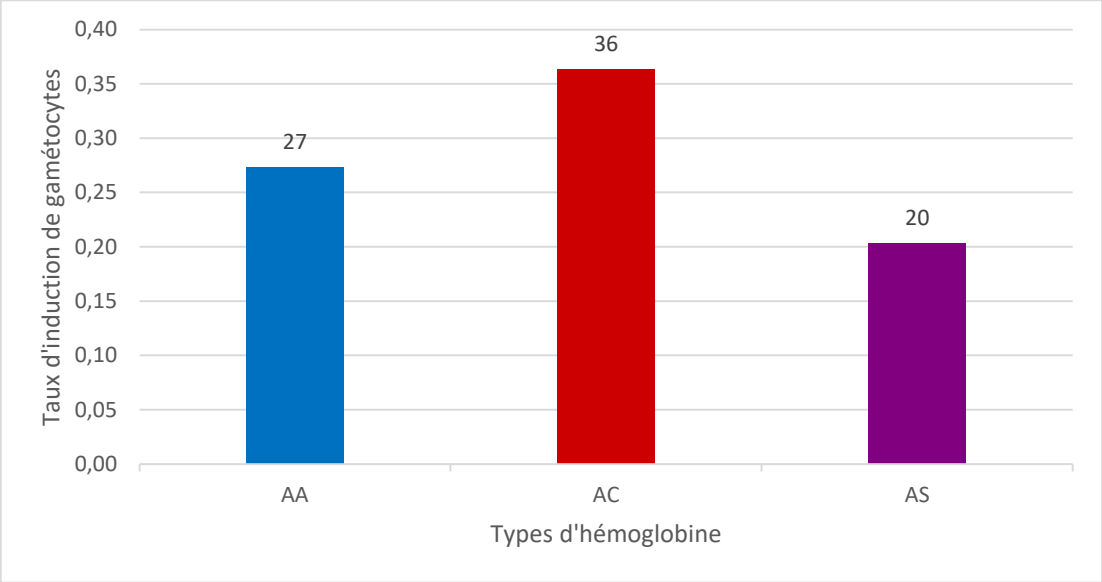


Figure 12 : Taux d'induction des gamétocytes en fonction du type d'hémoglobine des globules rouges

Le taux d'induction le plus élevé a été obtenu avec l'échantillon de GR HbAC suivi de l'échantillon de GR HbAA puis l'échantillon GR HbAS avec respectivement 36%, 27% et 20%.

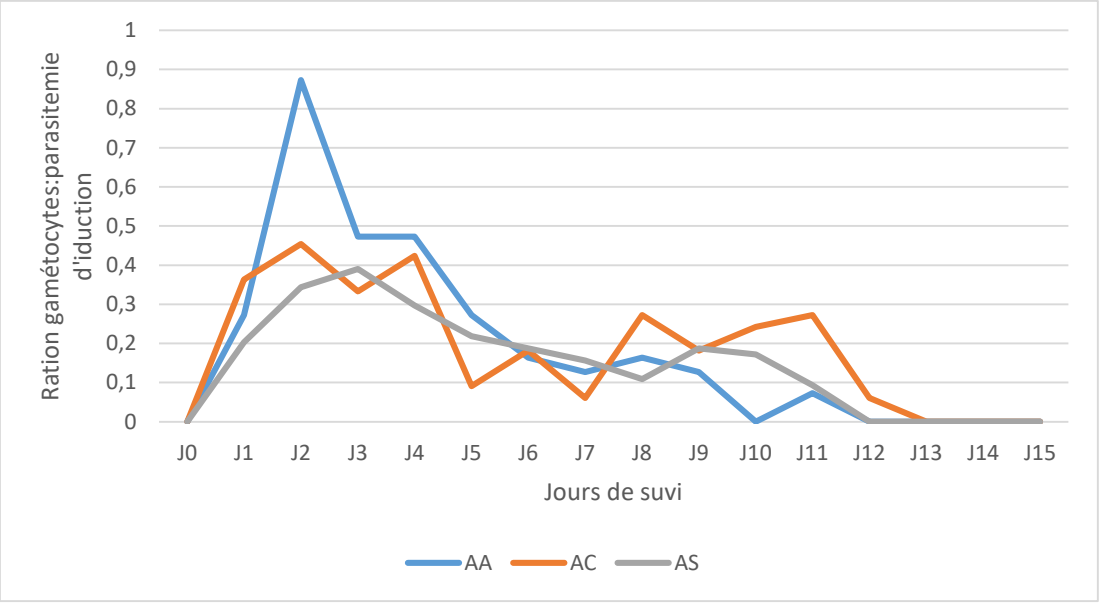


Figure 13 : Evolution de gamétocytes de stade I en fonction du type d'hémoglobine du globule rouge de culture

L'évolution du ratio de gamétocytes de stade I par rapport à la parasitémie d'induction sur les 15 jours de suivi montre un pique de production au J2 dans l'échantillon HbAA et AC avec respectivement un ratio de 87% et 45% alors que le pic de production pour l'échantillon HbAS était atteint au J3 avec 39%. Les gamétocytes I ont subsisté jusqu'au J11 pour l'échantillon Hb AA et AS et J12 pour l'échantillon HbAC. Le taux moyen d'induction obtenu au cours de ce travail était de 57%

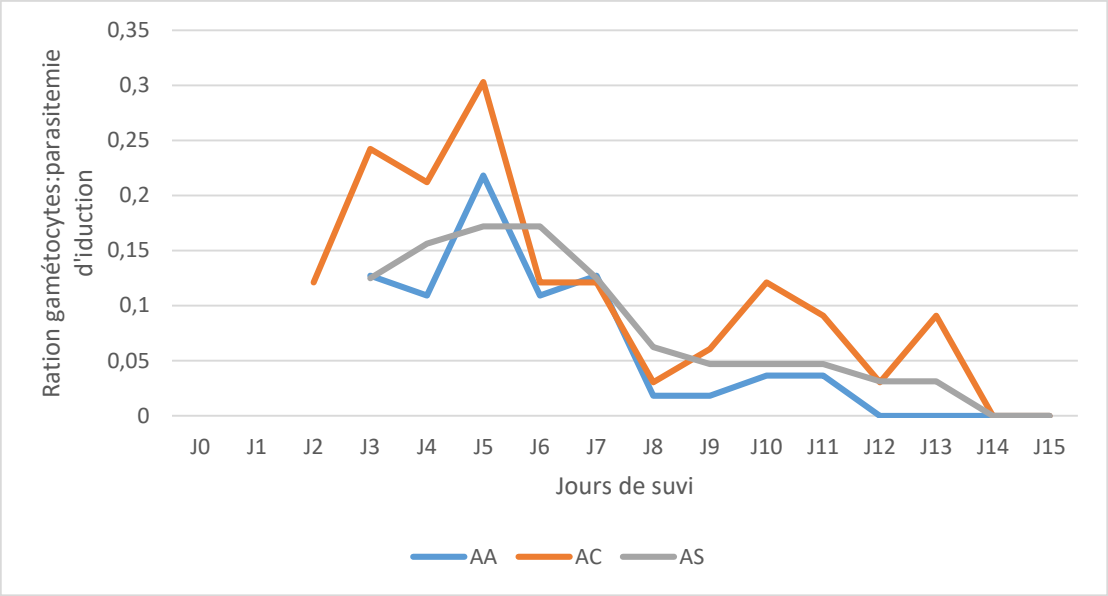


Figure 14 : Evolution de gamétocytes de stade II en fonction du type d'hémoglobine du globule rouge de culture

Les gamétocytes de stade II ont été observés dès le J2 dans l'échantillon HbAC et J3 dans les échantillons HbAA et HbAS. Les pics de production 30%, 21% et 12% respectivement pour le HBAC, HbAA et HbAS étaient obtenus J5 pour les HbAC et HbAA et J4 pour le HbAS. Les gamétocytes II ont subsisté jusqu'au J13 pour le HbAC et HbAS alors que les derniers gamétocytes étaient observés au J12 pour le HbAA

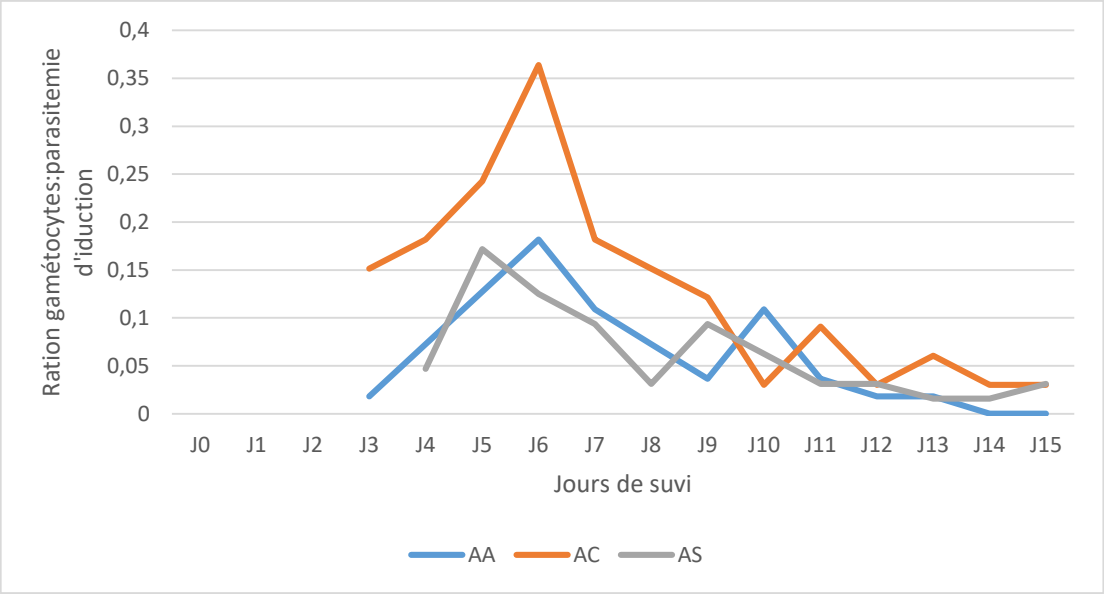


Figure 15 : Evolution de gamétocytes de stade III en fonction du type d'hémoglobine du globule rouge de culture

Les gamétocytes de stade III ont été observés dès le J3 dans les échantillons HbAA et HbAC et J4 dans les échantillons HbAS. Les pics de production 36%, 18% et 17% respectivement pour le HbAC, HbAA et HbAS étaient obtenus J6 pour les HbAC et HbAA et J5 pour le HbAS. Les gamétocytes III ont subsisté jusqu'au J15 pour le HbAC et HbAS alors que les derniers gamétocytes étaient observés au J14 pour le HbAA.

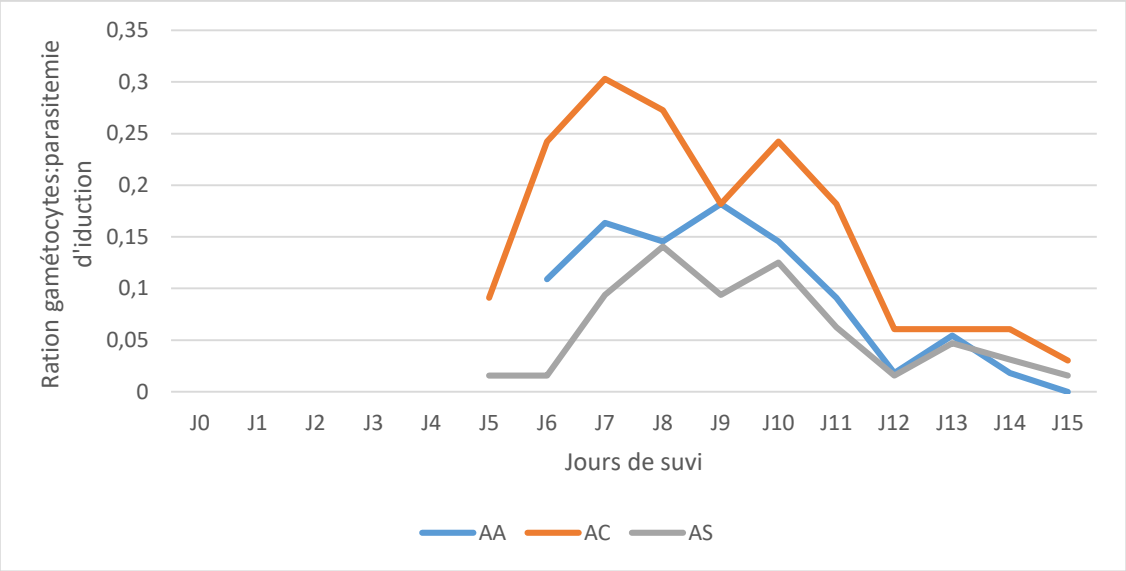


Figure 16 : Evolution de gamétocytes de stade IV en fonction du type d'hémoglobine du globule rouge de culture

Les gamétocytes de stade IV ont été observés dès le J5 dans les échantillons HbAC et HbAS et J6 dans l'échantillon HbAA. Les pics de production 30%, 18% et 14% respectivement pour le HbAC, HbAA et HbAS étaient obtenus J7 pour les HbAC, J8 pour le HbAS et J9 pour le HbAA. Les gamétocytes II ont subsisté jusqu'au J15 pour le HbAC et HbAS alors que les derniers gamétocytes étaient observés au J14 pour le HbAA.

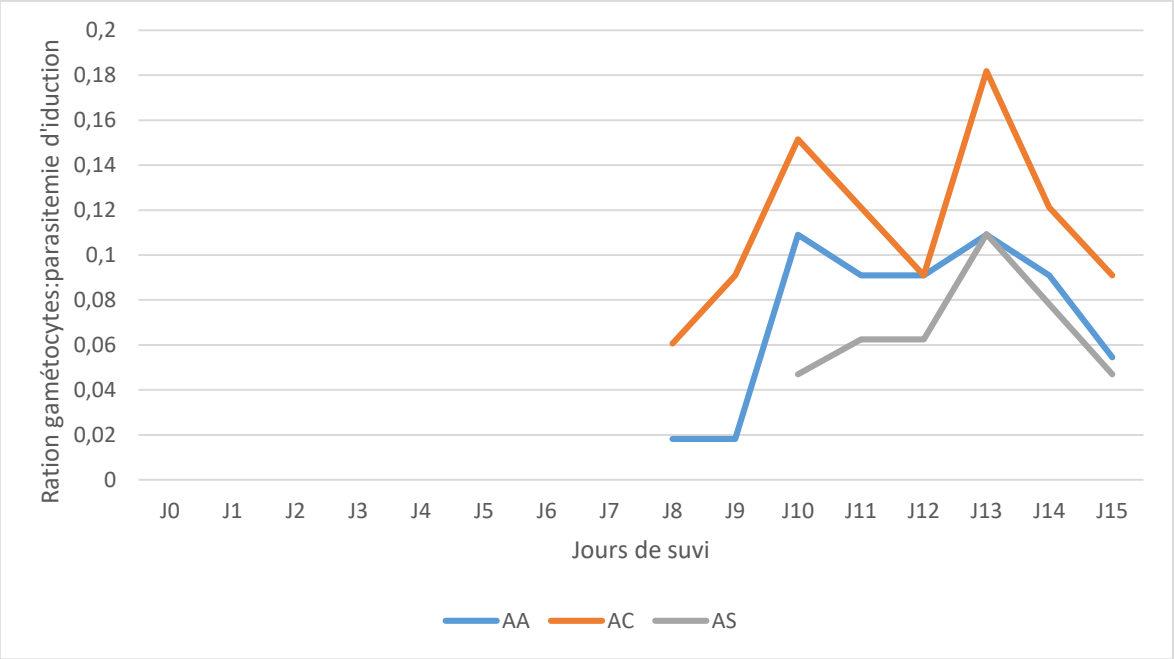


Figure 17 : Evolution de gamétocytes de stade V en fonction du type d'hémoglobine du globule rouge de culture

Les gamétocytes de stade V ont été observés dès le J8 dans les échantillons HbAC et HbAA et deux jours plus tard dans l'échantillon HbAS. Les pics de production 18% respectivement pour le HbAC, 10% respectivement pour le HbAA et le HbAS étaient obtenus J8 pour les HbAC, J8 pour le HbAA et J10 pour le HbAS. Les gamétocytes V ont subsisté jusqu'au J15 dans chacun des trois échantillons. A J15 le ratio des gamétocytes de stade V était de 9% pour le HbAC, 5% pour le HbAA et 4% pour le HbAS.

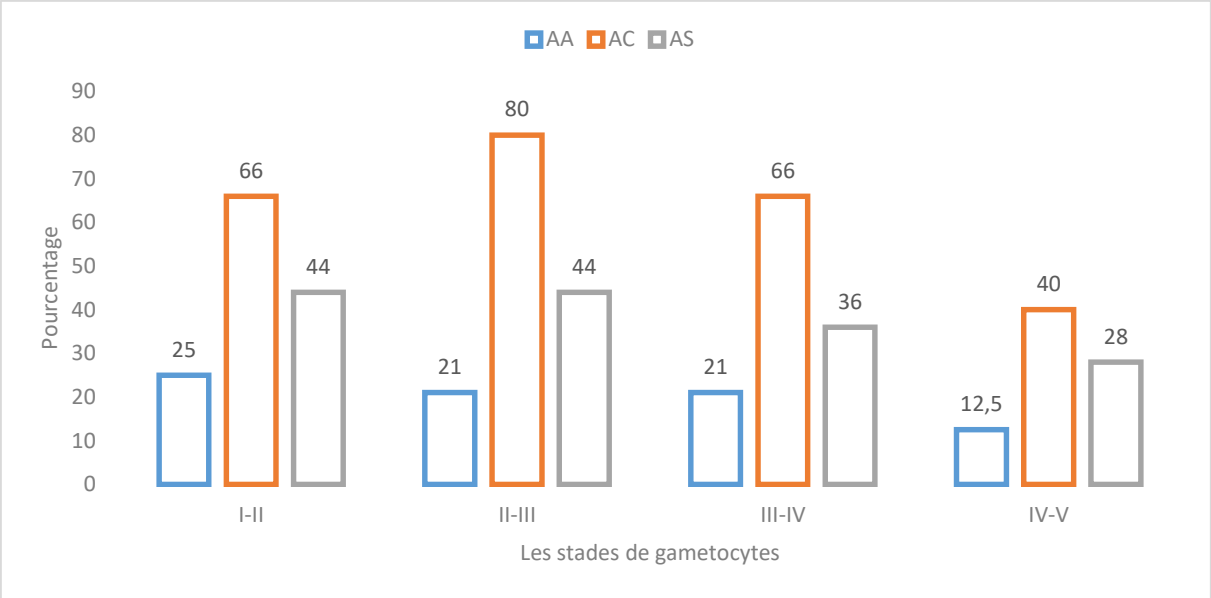


Figure 18 : Taux de maturation des gamétocytes en fonction des types d'hémoglobine des globules rouges

Les taux de maturation étaient meilleurs dans l'échantillon HbAC suivi de l'échantillon HbAS et cela a tous les stades de gamétocytes.

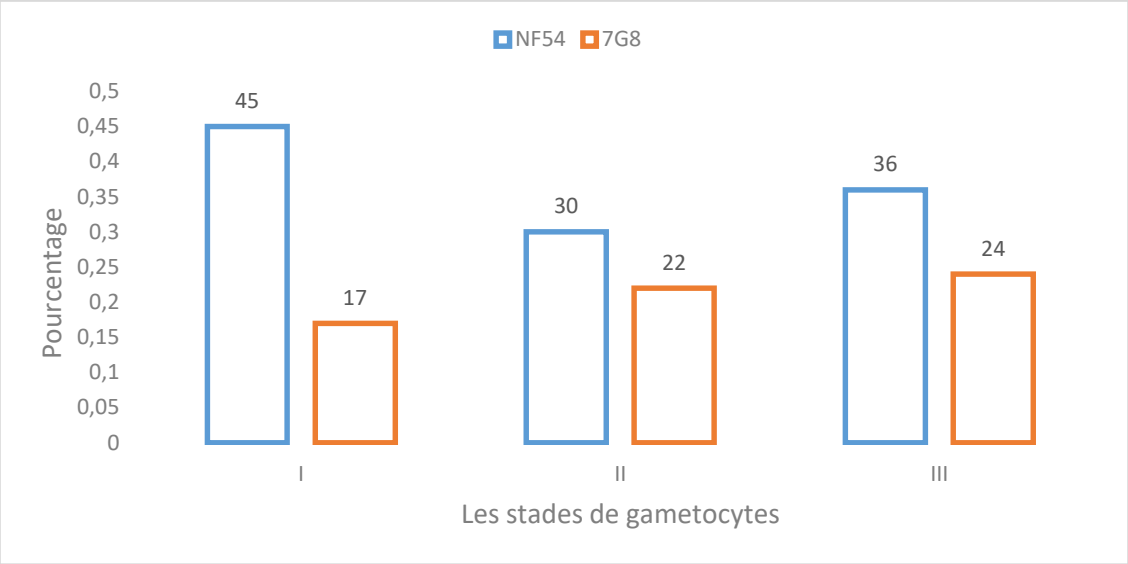


Figure 19 : Taux de maturation des gamétocytes en fonction des souches du parasite

Les taux de maturation étaient meilleurs avec la souche NF54 (45%).

5.4. Résultats relatifs à l'infestation des moustiques

Les gamétocytes de stade V mature ont été utilisés pour faire l'infestation expérimentale des moustiques de souche L3-5, N'Gaba et Kisumu.

Tableau 2 : Taux d'engorgement, de survie et d'infestation des souches Anophèles L3-5 avec les gamétocytes NF54 produits au laboratoire

Série	Nombre n	Engorgement n (%)	Survie n (%)	Infestation n (%)
1	60	31 (51,6)	24 (77,4)	0
2	25	17 (68,0)	16 (94,1)	0
3	120	69 (57,5)	36 (52,2)	0
Total	**205**	**117 (57,07)**	**76 (61,53)**	**0**

Sur une série de 3 expériences d'engorgement des moustiques L3-5, nous avons observé un taux moyen d'engorgement de 57,07% engendrant un taux moyen de survie de 61,53%. Nous n'avons observé aucun cas d'infestation par les gamétocytes.

Tableau 3 : Taux d'engorgement, de survie et d'infestation des souches Anophèles N'Gaba avec les gamétocytes NF54 produits au laboratoire

Série	Nombre n (%)	Engorgement n (%)	Survie n (%)	Infestation n (%)
1	60	34 (56,6)	30 (88,2)	0
2	25	16 (64,0)	14 (87,5)	0
Total	**85**	**50 (58,82)**	**44 (88,0)**	**0**

Les deux expériences d'engorgement effectuées avec les moustiques N'Gaba ont donné un taux d'engorgement moyen de 58,82%. Le taux moyen de survie était de 88%. Aucune infestation des moustiques par les gamétocytes n'a pu être observée.

Tableau 4 : Taux d'engorgement, de survie et d'infestation des souches Anophèles Kisumu avec les gamétocytes NF54 produits au laboratoire

Série	Nombre n (%)	Engorgement n (%)	Survie n (%)	Infestation n (%)
1	240	128 (53,3)	16 (12,5)	0

Au cours de l'unique expérience d'engorgement des moustiques Kisumu, nous avons obtenu un taux d'engorgement de 53,3% pour un taux de survie de 12,5%. Aucune infestation des moustiques par les gamétocytes n'a pu être observée.

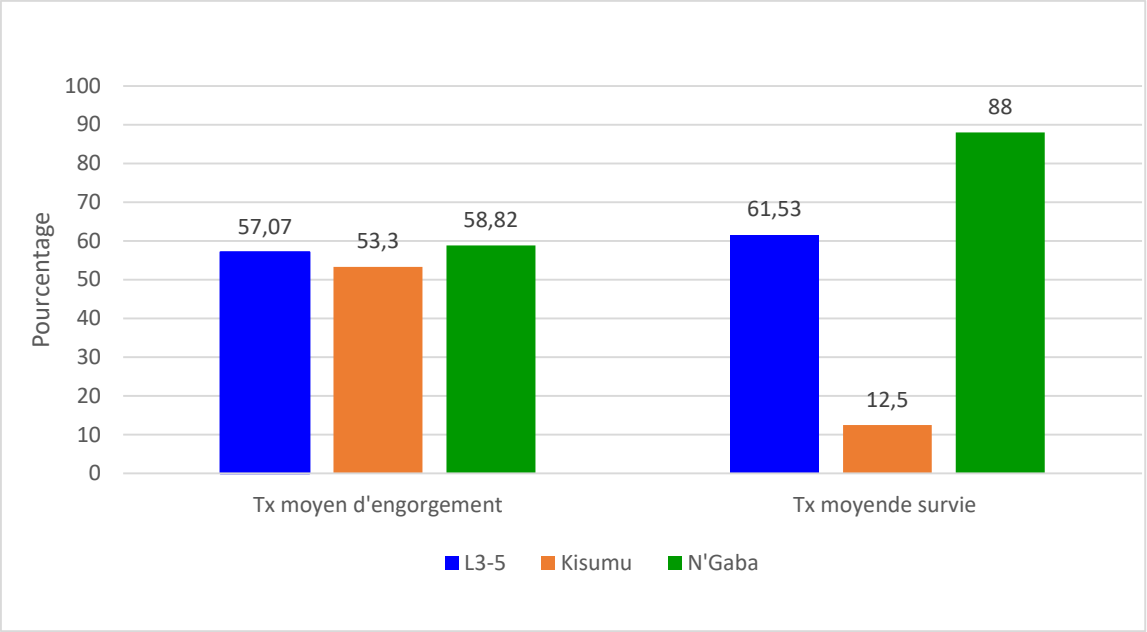


Figure 20 : Recaptulatif des taux d'engorgement et de survie des differentes souches de moustiques

Des taux similaires d'engorgement étaient observés avec les 3 souches de moustique. En revanche, nous avons observé une nette capacité de survie de souches N'Gaba (88%) par rapport aux autres souches (61,53%) pour les L3-5 et seulement 12,5% pour la souche Kisumu.

6. COMMENTAIRES ET DISCUSSION

Malgré les énormes progrès réalisés au cours des 15 dernières années, le paludisme reste une maladie dévastatrice, causant environ 409 000 décès pour la seule année 2019 [1]. Il est de plus en plus évident que l'élimination locale et l'éradication mondiale du paludisme nécessiteront l'effort concerté de multiples interventions pour être efficaces. La prévention de la transmission du parasite de l'homme au moustique est l'une de ces interventions [124, 125]. À chaque cycle asexué intraérythrocytaire, une petite proportion de parasites s'engage dans le développement sexuel par un signal encore inconnu, qui est probablement déclenché par des facteurs de stress de l'hôte et/ou du parasite qui affectent la régulation épigénétique et nécessitent le facteur de transcription AP2G [61, 62, 126, 127]. Les gamétocytes mâles et femelles sont responsables de la transmission du parasite au moustique.

La prévention de la transmission du parasite de l'hôte humain au moustique a été reconnue comme un outil vital pour les campagnes d'éradication du paludisme. Cependant, la découverte et le développement de médicaments et/ou de vaccins antipaludiques bloquant la transmission sont actuellement entravés par le coût et la difficulté de produire *in-vitro* des gamétocytes matures de *P. falciparum*, le stade parasitaire responsable de l'infection par le moustique. Les protocoles actuels pour la culture des gamétocytes de *P. falciparum* nécessitent généralement une synchronisation complexe des parasites et l'ajout de facteurs stimulants et/ou inhibiteurs, et ils peuvent ne pas avoir démontré la propriété essentielle de l'infectivité du moustique [11].

Cette étude détaille toutes les étapes nécessaires à une production fiable de gamétocytes de *P. falciparum* et met en évidence les facteurs communs qui influencent le succès de la culture notamment les hémoglobinopathies HbC et HbS. Le protocole peut être réalisé en 15 jours, et un accent particulier est mis sur l'exploitation d'une installation de culture de gamétocytes sur un cycle continu. En outre, nous montrons comment des gamétocytes fonctionnellement viables peuvent être utilisés pour évaluer des médicaments bloquant la transmission, à la fois sur le terrain et à haut débit (HTP) pour la découverte de médicaments. En outre, une raison majeure pour développer ces méthodes est d'utiliser les gamétocytes matures pour infecter les

moustiques pour des études sur les stades du moustique et les sporozoïtes [128-131]. Ce travail décrit un protocole détaillé de génération de gamétocytes de *P. falciparum* matures et d'infection de moustiques à l'aide de mangeoires à membrane. Ces méthodes sont essentielles pour tout laboratoire travaillant sur les stratégies de blocage de la transmission, les stades sporozoïtes et les stades hépatiques pré-érythrocytaires de *P. falciparum*.

Au total, nous avons réalisé 19 essais de culture de gamétocytes de *P. falciparum* au cours de cette étude. L'effet des hémoglobines sur la production des gamétocytes *in-vitro* ainsi que la faisabilité d'une infestation expérimentale de souches de moustique anophèles femelles par les gamétocytes produits au laboratoire a été évalué. Nous avons utilisé les souches de laboratoire NF54 et 7G8 de *P. falciparum* connues pour leur habilité à produire des gamétocytes en culture au laboratoire. Les souches de *P. falciparum* NF54 et 7G8 sont originaire d'Afrique et ont été adaptées à la culture *in-vitro* [132]. Il s'agit de souches chloroquino-sensible de manipulation facile utilisées dans plusieurs expériences de modification génétique.

6.1. Induction de gamétocyte

Étant donné que les parasites du paludisme deviennent progressivement résistants aux médicaments schizonticides courants [133], le blocage de la transmission est apparu comme une stratégie efficace de lutte contre le paludisme et les gamétocytes sont devenus des cibles médicamenteuses attrayantes [134]. La plupart des médicaments anti-gamétocytes disponibles ne sont actifs que contre les stades de développement (stades I-III) des gamétocytes et non contre les stades matures (stades IV-V). L'utilisation de la primaquine, qui est le seul médicament bloquant la transmission, recommandée par l'OMS, est limitée en raison des problèmes de toxicité hémolytique associés chez les personnes déficientes en Glucose-6-Phosphate-Déshydrogénase (G6PD) [135, 136].

Les chercheurs ne cessent de découvrir de nouveaux médicaments antipaludiques pour cibler efficacement les gamétocytes matures [137, 138]. Ces chercheurs utilisent des variantes d'essais de criblage à haut débit, des essais de viabilité fonctionnelle et des essais standard d'alimentation sur membrane (SMFA) pour découvrir de nouveaux

médicaments antipaludiques et évaluer le potentiel de blocage de la transmission des médicaments existants et des candidats cliniques.

Bien que la plupart des approches/essais soient différents en termes de paramètres intrinsèques (lecture, parasite, temps d'incubation et population de gamétocytes), une exigence fondamentale pour tous ces essais/approches de criblage de médicaments est d'avoir un nombre élevé de gamétocytes sains comme point de départ. L'obtention d'un nombre élevé de gamétocytes *in-vitro* est souvent l'étape la plus difficile d'une plateforme de criblage de médicaments car cette étape dépend d'une pléthore de facteurs/déclencheurs (y compris génétiques et environnementaux), dont beaucoup ne sont pas complétement connus et/ou élucidés en termes de biologie et de mécanisme d'action. La formation de gamétocytes à partir de stades érythrocytaires asexués implique un changement génétique, appelé "gamétocytogenèse" ou "engagement dans la gamétocytogenèse" [61, 62].

L'engagement dans la différenciation sexuelle chez le parasite du paludisme humain *P. falciparum* est déterminé au stade du schizonte, avant la sortie des mérozoïtes et l'invasion de nouveaux érythrocytes pour former le stade précoce de l'anneau [50]. Les parasites sexuellement engagés au stade de l'anneau se développent en trophozoïtes, mais au stade tardif du trophozoïte, ils se différencient en gamétocytes au lieu de former des schizontes et des mérozoïtes. Après le début de la gamétocytogenèse, les gamétocytes en développement présentent des caractéristiques qui les distinguent des trophozoïtes asexués, puis se différencient finalement en gamétocytes mâles et femelles qui présentent les caractéristiques du stade sexuel. Les mécanismes qui contrôlent l'engagement des schizontes à se développer en gamétocytes, qui initient la différenciation et qui médient le développement des gamétocytes à partir du stade trophozoïte tardif ne sont pas bien compris.

Des études récentes ont révélé que plusieurs facteurs de transcription (TF) de la famille Apetala-2 (AP2) sont impliqués dans les mécanismes qui contrôlent la gamétocytogenèse [61, 62, 139, 140]. Parmi eux, AP2-G est le seul TF essentiel au déclenchement de la gamétocytogenèse. Les gamétocytes ne se développent pas si le gène AP2-G est perturbé. Étant donné que AP2-G de *P. falciparum* est exprimé au

stade schizonte au moment de l'engagement et avant la gamétocytogenèse dans les érythrocytes envahis par les mérozoïtes engagés (produits par les schizontes engagés), on a émis l'hypothèse et on pense actuellement que AP2-G est impliqué dans l'engagement des schizontes vers le stade sexuel. Cependant, il n'existe actuellement pas de preuves suffisantes pour étayer cette hypothèse.

Nous avons utilisé la méthode de création de stress par hyperparasitémie associée à un arrêt de changement de milieu quotidien. Plusieurs paramètres semblent impliqués dans l'induction des gamétocytes incluant des paramètres génétiques du parasite, les conditions environnementales d'induction et aussi les méthodes d'identification des gamétocytes. En effet, nous avons principalement utilisé la souche NF54, une souche connue productrice de gamétocyte [141]. Nous avons un taux d'induction moyen de 57% au cours de notre travail. A la différence d'autres auteurs qui ont évalué la production de gamétocyte en termes de gamétocytémie [142], nous avons utilisé le rapport de la gamétocytémie maximale de stade I sur la parasitémie au moment de l'induction.

Ifediba et Vanderberg en 1981 ont décrit la culture à long terme de *P. falciparum*, en présence de 50 µg/ml d'hypoxanthine qui a produit des gamétocytes matures hautement infectieux [143]. Depuis lors, de nombreuses publications ont décrit des méthodes de production de gamétocytes pour différentes applications [5, 144-146]. La plupart de ces études ont utilisé des conditions d'induction de la gamétocytogenèse décrites précédemment pour augmenter les rendements. L'utilisation de milieux conditionnés, le stress de la culture par une augmentation soudaine de la parasitémie, la chute de l'hématocrite pour imiter l'anémie, la lyse des globules rouges et la répression de la phase logarithmique par le muselage, peuvent être utilisés pour induire la gamétocytogenèse. La méthode décrite ici est simple et a fait ses preuves. La culture des gamétocytes doit être commencer avec 0,3-1% de parasitémie de stade asexué à 4% d'hématocrite. Le milieu de culture change tous les jours jusqu'au jour 15-18. Pour obtenir des résultats cohérents, il est essentiel de commencer la culture des gamétocytes avec des parasites de stade asexué à faible passage, d'utiliser des GR frais (<1 semaine) et de s'assurer que la température de la culture ne fluctue pas pendant le changement de milieu. Puisque le processus de développement des

gamétocytes de *P. falciparum* est séquestré dans les conditions statiques des espaces extravasculaires de la moelle osseuse [61, 62], il est important de ne pas perturber les couches de GR pendant toute la période de culture.

Cette même technique a été décrite par Richard Carter et Louis H. Miller en 1979 pour évaluer la capacité de production de gamétocytes [147]. En analysant le taux d'induction de gamétocytes en fonction du type d'hémoglobine des GR de culture, nous avons observé le plus grand taux d'induction avec les GR normaux (HbAA) avec 87%. Cette proportion était respectivement de 45% et de 39% pour l'HbAC et l'HbAS. Peu d'études ont évalué l'influence du type d'hémoglobine sur la production des gamétocytes de *P. falciparum in-vitro*. Cependant, le lien entre les différents types d'hémoglobine et le portage des gamétocytes a été rapporté par certains auteurs. Ainsi, l'évidence d'une plus grande prévalence de gamétocyte a été rapportée au Sénégal et en Thaïlande en 2010 [115]. Bronner et al. ont rapporté une plus grande prévalence de gamétocytes chez les enfants maliens d'âge scolaire porteur d'HbC en 2017 [116]. En revanche, aucune association n'a été retrouvée entre l'α-thalassémie et le portage des gamétocytes au Ghana [117]. Une des raisons majeures de la faiblesse du taux d'induction de gamétocytes observé au cours de cette étude est la difficulté de discriminer les différents stades de développement des gamétocytes en utilisant la microscopie.

La formation de gamétocytes à partir de stades érythrocytaires asexués implique un changement génétique, appelé "gamétocytogenèse" ou "engagement dans la gamétocytogenèse" [61, 62]. On pense que ce changement est déclenché par des facteurs environnementaux perçus qui favorisent l'engagement des stades érythrocytaires asexués dans les gamétocytes [13]. Pour répondre à cette question fondamentale - quel(s) facteur(s) environnemental(aux) déclenche(nt) la gamétocytogenèse et dans quelle proportion - différents chercheurs ont testé de nombreux déclencheurs/agents qui pourraient agir comme des modificateurs potentiels de la voie d'engagement des gamétocytes *in-vitro* [148]. Ces déclencheurs comprennent une baisse de l'hématocrite, une parasitémie asexuée élevée [149], l'ajout de lysat de globules rouges [147], de sérum ou de lymphocytes humains [76], d'hormones mammaliennes [150] de reticulocytes [73, 151], d'anti-folates [79], de

chloroquine [152], de toxine cholérique [153] ou d'une combinaison d'un ou plusieurs agents, entre autres. Quelques rapports ont suggéré que l'addition de bérénil et de composés d'ammonium peut également stimuler les gamétocytes non producteurs à devenir des gamétocytes producteurs [78, 154]. Dans une autre étude, le nombre de gamétocytes n'a pas augmenté avec la même occurrence dans tous les isolats de parasites *P. falciparum* testés, indépendamment de l'utilisation de la même méthode d'induction/des mêmes déclencheurs [155]. Cette étude a également souligné la présence d'un ou de plusieurs composants, autres que l'influence de l'environnement, responsables de l'augmentation de la gamétocytémie de *P. falciparum* [155].

6.2. Maturation des gamétocytes

La présence de parasites au stade asexué n'a pas affecté les expériences d'alimentation des moustiques. Cependant, si les gamétocytes doivent être utilisés dans des expériences qui nécessitent des cultures pures, comme les tests de sensibilité aux médicaments et les études protéomiques ou transcriptomiques, les stades asexués résiduels peuvent être éliminés par un traitement avec 50 mM de N-acétylglucosamine. La majorité des gamétocytes atteignent le stade V au 8^{e} jour, date à laquelle ils deviennent infectieux pour les moustiques et sont prêts à être nourris. La maturation des gamétocytes était globalement bonne. Une analyse détaillée de la maturation montre une meilleure maturation des stades précoces de gamétocytes (stades I et II) comparés aux stades tardifs (stade III et IV). Ce constat pourrait s’expliquer par une plus grande fragilité des stades tardifs de gamétocytes. En effet, les gamétocytes de stade IV et V sont sensibles à des variations de température [156, 157]. Nous avons observé les meilleurs taux de maturation avec la souche NF54 à tous les stades de développement des gamétocytes (Figure 20). L’analyse de la maturation des gamétocytes en fonction des types d’hémoglobine nous montre que la maturation des gamétocytes était meilleure dans les GR HbAC (Figure 21).

Les facteurs de l'hôte, y compris les réponses immunitaires, influencent potentiellement la densité des gamétocytes pendant l'infection [118, 158]. Des mutations affectant la bêta-globine ont également été associées à différents niveaux de gamétocytes circulants et d'infectivité humaine pour les moustiques [118, 119, 159]. Ringelhann et al. [159] ont étudié des enfants asymptomatiques de moins de cinq ans

et ont montré que les individus AC avaient une prévalence de gamétocytes détectables au microscope plus élevée que les individus AA. Robert et al. [119] ont observé que les porteurs de gamétocytes AS pouvaient infecter deux fois plus de moustiques que les porteurs de gamétocytes AA. Gouagna et al. [118] ont démontré que les individus porteurs de β^C ont un potentiel plus élevé de transmission de *P. falciparum* aux vecteurs anophèles que les individus de génotype AA.

Prises ensemble, ces études suggèrent que la diversité et la fréquence des variants de la bêta-globine pourraient avoir un impact sur l'intensité de la transmission locale du paludisme. En 2004, Feng et al. [160] ont étudié les conséquences génétiques possibles sur les populations d'une transmission accrue du parasite du paludisme par les hétérozygotes drépanocytaires, montrant qu'un tel effet pourrait conduire à une sélection accrue pour β^S. Dans le modèle génétique des populations présenté ici, la pression de sélection exercée par le paludisme est liée à la fréquence de β^S ou de β^C, et les conséquences de ces rétroactions sur la relation de compétition entre β^S et β^C sont à explorer.

Les observations récentes selon lesquelles ces deux mutations sont associées à un potentiel accru de transmission du paludisme [115, 118, 119, 159] peuvent, par conséquent, aider à expliquer le fait que la β^S atteint des fréquences élevées dans toute l'Afrique subsaharienne, tandis que les fréquences élevées de β^C sont limitées à certaines parties de l'Afrique de l'Ouest. À long terme, la compréhension des mécanismes qui sous-tendent l'influence de la β^C et de la β^S sur les niveaux de gamétocytes et l'infectivité fournira des informations importantes non seulement pour comprendre la génétique évolutive du paludisme, mais aussi pour la santé publique. Si des fréquences plus élevées de β^C et β^S améliorent la transmission, des stratégies ciblées de blocage de la transmission dans les populations susceptibles d'infecter un plus grand nombre de moustiques pourraient faire partie des programmes d'intervention contre le paludisme.

6.3. Infection des moustiques

Le paludisme est causé par la réplication asexuée rapide des parasites du paludisme dans les érythrocytes, la lyse des érythrocytes et la sortie des mérozoïtes, l'invasion

de nouveaux érythrocytes et des cycles répétés de réplication asexuée. Au cours de ce cycle asexué réplicatif, un petit sous-ensemble de parasites se développe en gamétocytes, le stade sexuel non réplicatif du parasite du paludisme [161]. Les gamétocytes mâles et femelles mûrissent dans les érythrocytes et se transforment en gamètes dans le repas sanguin d'un moustique, donnant naissance à des ookinètes qui pénètrent l'épithélium de l'intestin moyen. Par conséquent, la production de gamétocytes ou gamétocytogenèse est une étape essentielle au maintien du cycle de vie du parasite.

Cultiver les gamétocytes de *P. falciparum* de manière cohérente est exigeant, mais les amener à infecter les moustiques présente un autre niveau de complexité. L'alimentation membranaire est soumise à plusieurs variables autres que les gamétocytes, comme l'âge et la forme physique du moustique, le microbiote de l'intestin moyen et le comportement alimentaire [130, 162]. Habituellement, les données SMFA montrent un haut degré de variabilité et nécessitent un grand nombre de moustiques pour identifier les effets des différentes conditions expérimentales [14, 162]. L'utilisation d'une culture à faible passage pour les gamétocytes, de moustiques sains âgés de 3 à 6 jours et d'un protocole d'alimentation par membrane optimisé peut contribuer à réduire les variations du nombre d'oocystes.

Dans notre étude, nous avons pu réaliser 4 essais d'infestation avec des cultures de 14 jours après l'induction soit 8 jours après l'apparition des stades V de gamétocytes. Un effectif de 530 anophèles dont 205 anophèles de souche L3-5, 240 de souche Kisumu et 85 de souche N'Gaba ont été gorgés au cours de cette étude. L'entretien des moustiques et l'engorgement ont été réalisés au laboratoire d'entomologie de MRTC/FMOS-FAPH/USTTB. Nous avons obtenu des taux d'engorgement de 57,07% pour la souche L3-5, 53,3% pour la souche Kisumu et 58,82% pour la souche N'Gaba. Les taux de survie observés étaient de 88% pour la souche N'Gaba contre 61,53% pour la souche L3-5 et seulement 12,5% pour la souche Kisumu.

La grande mortalité des moustiques observée au cours de cette étude pourrait être due à la composition de la suspension de culture utilisée pour l'engorgement. En effet nous avons utilisé un milieu de culture contenant l'Albumax à la place du sérum humain. Aussi, l'utilisation de la gentamicine comme agent antibiotique pourrait avoir

des impacts sur la viabilité des moustiques. Sur un total de 364 anophèles se sont gorgés, 136 moustiques ont été disséqués au huitième jour de l'engorgement, et aucun oocyste n'a été décelé sur les 136 estomacs examinés. Entre 8 et 10 jours après la prise de sang, les moustiques ont été disséqués pour déterminer la prévalence et l'intensité de l'infection. La prévalence est le pourcentage de moustiques nourris qui ont des oocystes, tandis que l'intensité est le nombre d'oocystes trouvés dans chaque moustique. Les deux sont des indicateurs importants du succès de l'alimentation.

Cette observation indique la nécessite d'améliore notre condition d'entretien des gamétocytes mature et d'engorgement des moustiques. Il nous paraît donc important de pouvoir vérifier la viabilité des gamétocytes et de s'assurer de leur exflagellation avant l'engorgement.

6.4. Limites de notre étude

Le nombre de gamétocytes *in-vitro* dépend grossièrement de la capacité génétique des parasites à produire des gamétocytes et de divers facteurs environnementaux qui ne sont pas élucidés avec précision. Dans la présente étude, nous n'avons pas testé plusieurs facteurs environnementaux qui sont rapportés, supposés ou prédits comme pouvant influencer le nombre de gamétocytes. Par exemple, dans une étude, il a été observé que l'hypoxanthine et l'utilisation de sang humain fraîchement prélevé augmentent significativement la gamétocytémie ($p < 0,05$) *in -vitro* [163].

L'étude de ces facteurs par rapport aux isolats de terrain est essentielle car ces derniers se comportent différemment *in-vitro* par rapport aux souches parasitaires telles que 3D7 et Dd2.

7. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

7.1. Conclusion

A la fin de cette étude, nous pouvons affirmer que l'implémentation de la culture *in-vitro* des gamétocytes de *P. falciparum* au laboratoire d'immunogénétique de Mali-ICER est effective. Le taux maximum de production de gamétocytes de stade V de 18% a été observé au huitième jour après l'induction. Les meilleurs taux de maturation des gamétocytes ont été observés avec les GR contenant l'HbAC et ceux à tous les stades de développement des gamétocytes.

7.2. Recommandations

Au terme de notre étude et vu nos résultats, nous pouvons formuler les recommandations suivantes à l'endroit des chercheurs :

- Optimiser la technique de culture de gamétocytes au Mali selon les facteurs environnementaux impliqués dans la production des gamétocytes ;
- Etablir une convention avec le CNTS pour permettre l'accès au produits sanguin pour la culture continue du *Plasmodium* ;
- Améliorer les conditions d'infestation expérimentale des moustiques au laboratoire.

7.3. Perspectives

L'établissement de la culture de gamétocytes de *P. falciparum* au laboratoire d'immunogénétique du MRTC nous permettra de mener des études sur les paramètres génétiques des moustiques pouvant influencer leurs capacités vectorielles.

En outre nous envisageons de mettre en place une unité d'évaluation des vaccins bloquant la transmission.

8. REFERENCES

1. OMS, *Rapport sur le Paludisme 2020.* 2020.
2. The DHS Program ICF Rockville, M., USA. *Enquete Démographique et de Santé*. 2019; Available from: https://dhsprogram.com/pubs/pdf/FR358/FR358.pdf(consulte le 15/02/2021).
3. PNLP, *Plan strategique de lutte contre le paludisme 2013-2017*. 2013.
4. Abdulsalam, A.H., N. Sabeeh, and B.J. Bain, *Immature Plasmodium falciparum gametocytes in bone marrow.* Am J Hematol, 2010. **85**(12): p. 943.
5. Joice, R., et al., *Plasmodium falciparum transmission stages accumulate in the human bone marrow.* Sci Transl Med, 2014. **6**(244): p. 244re5.
6. Sinden, R.E., *Sexual development of malarial parasites.* Adv Parasitol, 1983. **22**: p. 153-216.
7. Sinden, R.E. and M.E. Smalley, *Gametocytogenesis of Plasmodium falciparum in vitro: the cell-cycle.* Parasitology, 1979. **79**(2): p. 277-96.
8. Bennink, S., M.J. Kiesow, and G. Pradel, *The development of malaria parasites in the mosquito midgut.* Cell Microbiol, 2016. **18**(7): p. 905-18.
9. Ghosh, A.K. and M. Jacobs-Lorena, *Plasmodium sporozoite invasion of the mosquito salivary gland.* Curr Opin Microbiol, 2009. **12**(4): p. 394-400.
10. Trager, W. and J.B. Jenson, *Cultivation of malarial parasites.* Nature, 1978. **273**(5664): p. 621-2.
11. Delves, M.J., et al., *Routine in vitro culture of P. falciparum gametocytes to evaluate novel transmission-blocking interventions.* Nat Protoc, 2016. **11**(9): p. 1668-80.
12. Demanga, C.G., et al., *The development of sexual stage malaria gametocytes in a Wave Bioreactor.* Parasit Vectors, 2017. **10**(1): p. 216.
13. Duffy, S., et al., *Large-scale production of Plasmodium falciparum gametocytes for malaria drug discovery.* Nat Protoc, 2016. **11**(5): p. 976-92.
14. Habtewold, T., et al., *Streamlined SMFA and mosquito dark-feeding regime significantly improve malaria transmission-blocking assay robustness and sensitivity.* Malar J, 2019. **18**(1): p. 24.
15. White, G.B. ***Needs and progress in the application of new techniques to mosquito identification***. in *New approaches to the identification of parasites*

and their vector. 1984. Geneva. *Basle, Schwabe*: UNDP/World Bank/WHO Special Programme.

16. Carnevale, P., V. Robert, and a. et. *Les anophèles Biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle*. 2015; Available from: https://www.researchgate.net/publication/50929799 (consulte le 16/02/2021).
17. M, P., *Place de l'artésunate injectable dans la prise en charge du paludisme grave à Plasmodium falciparum au CHU de Rouen.* 2016.
18. PNLP, *rapport sur le paludisme. Guide pratique de lutte contre le paludisme en entreprise 2015*. 2015.
19. Touré, Y.T. *Etude de la sensibilité d'Anopheles funestus et d'Anopheles gambiae sensu lato aux insecticides dans une zone rurale de savane soudanienne au Mali. Cah ORSTOMSérie Entomol Médicale Parasitol.* 1982; Available from: http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/cahiers/entomo/02302.pdf (consulte le 16/02/2021).
20. OMS. *Rapport sur le paludisme*. 2019; Available from: https://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2019/fr/.
21. Cox-Singh, J. and B. Singh, *Knowlesi malaria: newly emergent and of public health importance?* Trends Parasitol, 2008. **24**(9): p. 406-10.
22. Mycologie, A.F.d.E.d.P.e., *Paludisme.* 2014.
23. Danis M., M.J., *Paludisme. URET. Ed. Ellipse/AUPELF*. 1991.
24. M., G., *Médecine Tropicale 5e édition. Médecine-Sciences Flammarion*. 1993.
25. Horuk, R., et al., *A receptor for the malarial parasite Plasmodium vivax: the erythrocyte chemokine receptor.* Science, 1993. **261**(5125): p. 1182-4.
26. Wertheimer, S.P. and J.W. Barnwell, *Plasmodium vivax interaction with the human Duffy blood group glycoprotein: identification of a parasite receptor-like protein.* Exp Parasitol, 1989. **69**(4): p. 340-50.
27. Gunalan, K., et al., *Plasmodium vivax Infections of Duffy-Negative Erythrocytes: Historically Undetected or a Recent Adaptation?* Trends Parasitol, 2018. **34**(5): p. 420-429.
28. Howes, R.E., et al., *The global distribution of the Duffy blood group.* Nat Commun, 2011. **2**: p. 266.

29. Ngassa Mbenda, H.G., I. Gouado, and A. Das, *An additional observation of Plasmodium vivax malaria infection in Duffy-negative individuals from Cameroon.* J Infect Dev Ctries, 2016. **10**(6): p. 682-6.
30. Niangaly, A., et al., *Plasmodium vivax Infections over 3 Years in Duffy Blood Group Negative Malians in Bandiagara, Mali.* Am J Trop Med Hyg, 2017. **97**(3): p. 744-752.
31. Russo, G., et al., *Molecular evidence of Plasmodium vivax infection in Duffy negative symptomatic individuals from Dschang, West Cameroon.* Malar J, 2017. **16**(1): p. 74.
32. Ryan, J.R., et al., *Evidence for transmission of Plasmodium vivax among a duffy antigen negative population in Western Kenya.* Am J Trop Med Hyg, 2006. **75**(4): p. 575-81.
33. Anofel. *Paludisme*. 2014; Available from: http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/paludisme/site/html/cours.pdf (consulte le 16/02/2021).
34. Sutherland, C.J., et al., *Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite Plasmodium ovale occur globally.* J Infect Dis, 2010. **201**(10): p. 1544-50.
35. Su, X.Z., *Human malaria parasites: are we ready for a new species?* J Infect Dis, 2010. **201**(10): p. 1453-4.
36. SONDOSS, G.M., *Paludisme*. 2012.
37. SONDOSS, G.M., *Paludisme.* 2012.
38. Babady, N.E., et al., *Detection of Plasmodium knowlesi by real-time polymerase chain reaction.* Am J Trop Med Hyg, 2009. **81**(3): p. 516-8.
39. Berry, A., et al., *Imported Plasmodium knowlesi malaria in a French tourist returning from Thailand.* Am J Trop Med Hyg, 2011. **84**(4): p. 535-8.
40. AVIQ, *Paludisme*. 2016.
41. Bricaire, F., *[Infectious diseases transmitted by animal bites].* Rev Med Interne, 1993. **14**(5): p. 313-6.
42. Sy, O. *Etude de quelques aspects épidémiologiques et environnementaux du paludisme au Sénégal. Memoire online*. 2006; Available from: https://www.memoireonline.com/05/09/2057/m_Etude-de-quelques-aspects-

epidemiologique-environnementaux-paludisme-senegal0.html (consulte le 16/02/2021).

43. Cameron, A., et al., *Plasticity in transmission strategies of the malaria parasite, Plasmodium chabaudi: environmental and genetic effects.* Evol Appl, 2013. **6**(2): p. 365-76.
44. CAUMES Eric Marc GENTILINI, D.M., BÉGUÉ Pierre. *Médecine tropicale (6e éd)*. Available from: https://www.calameo.com/read/00128213647ba851bb743 (conslte le 16/02/2021).
45. Billy, T.F. *Bio-écologie des anophèles de part et d'autre de la falaise des Mbô et leur implication dans la transmission du paludisme d'altitude. memoire online*. 2007; Available from: https://www.memoireonline.com/11/15/9299/m_Bio-ecologie-des-anopheles-de-part-et-d-autre-de-la-falaise-des-Mb-et-leur-implication-dans-la-t1.html (consulte 16/02/2021).
46. Bousema, T. and C. Drakeley, *Epidemiology and infectivity of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax gametocytes in relation to malaria control and elimination.* Clin Microbiol Rev, 2011. **24**(2): p. 377-410.
47. R.E., S., *Gametocytes and sexual development. In: Sherman IW (Ed), Malaria: parasite biology, pathogenesis, and protection. American Society for Microbiology Press, Washington DC,*. 1998. pp. 25-48.
48. Taylor, L.H. and A.F. Read, *Why so few transmission stages? Reproductive restraint by malaria parasites.* Parasitol Today, 1997. **13**(4): p. 135-40.
49. Bruce, M.C., et al., *Commitment of the malaria parasite Plasmodium falciparum to sexual and asexual development.* Parasitology, 1990. **100 Pt 2**: p. 191-200.
50. Smith, T.G., et al., *Commitment to sexual differentiation in the human malaria parasite, Plasmodium falciparum.* Parasitology, 2000. **121 (Pt 2)**: p. 127-33.
51. Silvestrini, F., P. Alano, and J.L. Williams, *Commitment to the production of male and female gametocytes in the human malaria parasite Plasmodium falciparum.* Parasitology, 2000. **121 Pt 5**: p. 465-71.
52. Che Julius Ngwa, T.F.d.A.R., Gabriele Pradel, *The Biology of Malaria Gametocytes* 2016.
53. Duffy, M.F., et al., *Epigenetic regulation of the Plasmodium falciparum genome.* Brief Funct Genomics, 2014. **13**(3): p. 203-16.

54. Josling, G.A. and M. Llinas, *Sexual development in Plasmodium parasites: knowing when it's time to commit.* Nat Rev Microbiol, 2015. **13**(9): p. 573-87.
55. Brancucci, N.M.B., et al., *Heterochromatin protein 1 secures survival and transmission of malaria parasites.* Cell Host Microbe, 2014. **16**(2): p. 165-176.
56. Coleman, B.I., et al., *A Plasmodium falciparum histone deacetylase regulates antigenic variation and gametocyte conversion.* Cell Host Microbe, 2014. **16**(2): p. 177-186.
57. Flueck, C., et al., *Plasmodium falciparum heterochromatin protein 1 marks genomic loci linked to phenotypic variation of exported virulence factors.* PLoS Pathog, 2009. **5**(9): p. e1000569.
58. Balaji, S., et al., *Discovery of the principal specific transcription factors of Apicomplexa and their implication for the evolution of the AP2-integrase DNA binding domains.* Nucleic Acids Res, 2005. **33**(13): p. 3994-4006.
59. Iwanaga, S., et al., *Identification of an AP2-family protein that is critical for malaria liver stage development.* PLoS One, 2012. **7**(11): p. e47557.
60. Yuda, M., et al., *Identification of a transcription factor in the mosquito-invasive stage of malaria parasites.* Mol Microbiol, 2009. **71**(6): p. 1402-14.
61. Kafsack, B.F., et al., *A transcriptional switch underlies commitment to sexual development in malaria parasites.* Nature, 2014. **507**(7491): p. 248-52.
62. Sinha, A., et al., *A cascade of DNA-binding proteins for sexual commitment and development in Plasmodium.* Nature, 2014. **507**(7491): p. 253-257.
63. Campbell, T.L., et al., *Identification and genome-wide prediction of DNA binding specificities for the ApiAP2 family of regulators from the malaria parasite.* PLoS Pathog, 2010. **6**(10): p. e1001165.
64. Dixon, M.W., et al., *Sex in Plasmodium: a sign of commitment.* Trends Parasitol, 2008. **24**(4): p. 168-75.
65. Sinden, R.E., *Gametocytogenesis of Plasmodium falciparum in vitro: an electron microscopic study.* Parasitology, 1982. **84**(1): p. 1-11.
66. Day, K.P., R.E. Hayward, and M. Dyer, *The biology of Plasmodium falciparum transmission stages.* Parasitology, 1998. **116 Suppl**: p. S95-109.
67. Hawking, F., M.E. Wilson, and K. Gammage, *Evidence for cyclic development and short-lived maturity in the gametocytes of Plasmodium falciparum.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 1971. **65**(5): p. 549-59.

68. Langreth, S.G., et al., *Fine structure of human malaria in vitro.* J Protozool, 1978. **25**(4): p. 443-52.
69. Tiburcio, M., et al., *Early gametocytes of the malaria parasite Plasmodium falciparum specifically remodel the adhesive properties of infected erythrocyte surface.* Cell Microbiol, 2013. **15**(4): p. 647-59.
70. Ifediba, T. and J.P. Vanderberg, *Complete in vitro maturation of Plasmodium falciparum gametocytes.* Nature, 1981. **294**(5839): p. 364-6.
71. Bennett, T.N., A.D. Kosar, and P.D. Roepe, *Plasmodium falciparum strain GC-03 exhibits hyper-gametocytogenesis in partially hemoglobin depleted red blood cells.* Mol Biochem Parasitol, 2005. **139**(2): p. 261-5.
72. Schneweis, S., W.A. Maier, and H.M. Seitz, *Haemolysis of infected erythrocytes--a trigger for formation of Plasmodium falciparum gametocytes?* Parasitol Res, 1991. **77**(5): p. 458-60.
73. Trager, W., et al., *Plasmodium falciparum: enhanced gametocyte formation in vitro in reticulocyte-rich blood.* Exp Parasitol, 1999. **91**(2): p. 115-8.
74. Lingnau, A., et al., *The effects of hormones on the gametocytogenesis of Plasmodium falciparum in vitro.* Appl Parasitol, 1993. **34**(3): p. 153-60.
75. Suzuki, S., K. Tamai, and S. Yoshida, *Enzyme-linked immunosorbent assay for distinct cyclin-dependent kinase activities using phosphorylation-site-specific anti-pRB monoclonal antibodies.* Anal Biochem, 2002. **301**(1): p. 65-74.
76. Smalley, M.E. and J. Brown, *Plasmodium falciparum gametocytogenesis stimulated by lymphocytes and serum from infected Gambian children.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 1981. **75**(2): p. 316-7.
77. Buckling, A.G., et al., *Adaptive changes in Plasmodium transmission strategies following chloroquine chemotherapy.* Proc Biol Sci, 1997. **264**(1381): p. 553-9.
78. Ono, T., et al., *Gametocytogenesis induction by Berenil in cultured Plasmodium falciparum.* Exp Parasitol, 1993. **77**(1): p. 74-8.
79. Puta, C. and C. Manyando, *Enhanced gametocyte production in Fansidar-treated Plasmodium falciparum malaria patients: implications for malaria transmission control programmes.* Trop Med Int Health, 1997. **2**(3): p. 227-9.
80. Ponnudurai, T., et al., *The production of mature gametocytes of Plasmodium falciparum in continuous cultures of different isolates infective to mosquitoes.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 1982. **76**(2): p. 242-50.

81. Drakeley, C.J., et al., *Plasmodium falciparum gametocytes in Gambian adults.* Ann Trop Med Parasitol, 2000. **94**(4): p. 399-401.
82. Ouedraogo, A., et al., *The effects of a pre-season treatment with effective antimalarials on subsequent malaria morbidity in under five-year-old children living in high and seasonal malaria transmission area of Burkina Faso.* Trop Med Int Health, 2010. **15**(11): p. 1315-21.
83. Mitri, C., et al., *Density-dependent impact of the human malaria parasite Plasmodium falciparum gametocyte sex ratio on mosquito infection rates.* Proc Biol Sci, 2009. **276**(1673): p. 3721-6.
84. Tadesse, F.G., et al., *Gametocyte Sex Ratio: The Key to Understanding Plasmodium falciparum Transmission?* Trends Parasitol, 2019. **35**(3): p. 226-238.
85. Buckling, A., et al., *Chloroquine increases Plasmodium falciparum gametocytogenesis in vitro.* Parasitology, 1999. **118 (Pt 4)**: p. 339-46.
86. Robert, V., et al., *Gametocytemia and infectivity to mosquitoes of patients with uncomplicated Plasmodium falciparum malaria attacks treated with chloroquine or sulfadoxine plus pyrimethamine.* Am J Trop Med Hyg, 2000. **62**(2): p. 210-6.
87. Sowunmi, A., et al., *Comparative effects of pyrimethamine-sulfadoxine, with and without probenecid, on Plasmodium falciparum gametocytes in children with acute, uncomplicated malaria.* Ann Trop Med Parasitol, 2004. **98**(8): p. 873-8.
88. Saeed, M., et al., *Plasmodium falciparum antigens on the surface of the gametocyte-infected erythrocyte.* PLoS One, 2008. **3**(5): p. e2280.
89. Sutherland, C.J., *Surface antigens of Plasmodium falciparum gametocytes--a new class of transmission-blocking vaccine targets?* Mol Biochem Parasitol, 2009. **166**(2): p. 93-8.
90. Bejon, P., et al., *Thick blood film examination for Plasmodium falciparum malaria has reduced sensitivity and underestimates parasite density.* Malar J, 2006. **5**: p. 104.
91. Dowling, M.A. and G.T. Shute, *A comparative study of thick and thin blood films in the diagnosis of scanty malaria parasitaemia.* Bull World Health Organ, 1966. **34**(2): p. 249-67.

92. Schneider, P., et al., *Submicroscopic Plasmodium falciparum gametocyte densities frequently result in mosquito infection.* Am J Trop Med Hyg, 2007. **76**(3): p. 470-4.
93. Shekalaghe, S.A., et al., *Submicroscopic Plasmodium falciparum gametocyte carriage is common in an area of low and seasonal transmission in Tanzania.* Trop Med Int Health, 2007. **12**(4): p. 547-53.
94. Bousema, T., et al., *Mosquito feeding assays to determine the infectiousness of naturally infected Plasmodium falciparum gametocyte carriers.* PLoS One, 2012. **7**(8): p. e42821.
95. Churcher, T.S., et al., *Predicting mosquito infection from Plasmodium falciparum gametocyte density and estimating the reservoir of infection.* Elife, 2013. **2**: p. e00626.
96. Miura, K., et al., *Functional comparison of Plasmodium falciparum transmission-blocking vaccine candidates by the standard membrane-feeding assay.* Infect Immun, 2013. **81**(12): p. 4377-82.
97. Bousema, T. and C. Drakeley, *Determinants of Malaria Transmission at the Population Level.* Cold Spring Harb Perspect Med, 2017. **7**(12).
98. Kwiatkowski, D.P., *How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria.* Am J Hum Genet, 2005. **77**(2): p. 171-92.
99. Diallo, D.A., *Epidémiologie de la drépanocytose au Mali, in Symposium sur la drépanocytose1993, AMLUD/BEUFOURD: BAMAKO (MALI)*.
100. Williams, A.W. and J.P. Mackey, *Rapid Determination of the Sickle Cell Trait by the Use of a Reducing Agent.* J Clin Pathol, 1949. **2**(2): p. 141-2.
101. Lehmann, H. and A.B. Raper, *Distribution of the sickle-cell trait in Uganda, and its ethnological significance.* Nature, 1949. **164**(4168): p. 494.
102. Beet, E.A., *Observations on haemoglobin values in African children.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 1949. **43**(3): p. 317-28.
103. Beet, E.A., *The genetics of the sickle-cell trait in a Bantu tribe.* Ann Eugen, 1949. **14**(4): p. 279-84.
104. Luzzatto, L., E.S. Nwachuku-Jarrett, and S. Reddy, *Increased sickling of parasitised erythrocytes as mechanism of resistance against malaria in the sickle-cell trait.* Lancet, 1970. **1**(7642): p. 319-21.

105. Friedman, M.J., *Erythrocytic mechanism of sickle cell resistance to malaria.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(4): p. 1994-7.
106. Verra, F., et al., *Haemoglobin C and S role in acquired immunity against Plasmodium falciparum malaria.* PLoS One, 2007. **2**(10): p. e978.
107. Cholera, R., et al., *Impaired cytoadherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes containing sickle hemoglobin.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(3): p. 991-6.
108. Fairhurst, R.M., C.D. Bess, and M.A. Krause, *Abnormal PfEMP1/knob display on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes containing hemoglobin variants: fresh insights into malaria pathogenesis and protection.* Microbes Infect, 2012. **14**(10): p. 851-62.
109. Harp, K.O., et al., *Hemoglobin Genotypes Modulate Inflammatory Response to Plasmodium Infection.* Front Immunol, 2020. **11**: p. 593546.
110. Diakite, S.A., et al., *Stage-dependent fate of Plasmodium falciparum-infected red blood cells in the spleen and sickle-cell trait-related protection against malaria.* Malar J, 2016. **15**(1): p. 482.
111. Mockenhaupt, F.P., et al., *Hemoglobin C and resistance to severe malaria in Ghanaian children.* J Infect Dis, 2004. **190**(5): p. 1006-9.
112. Modiano, D., et al., *Haemoglobin C protects against clinical Plasmodium falciparum malaria.* Nature, 2001. **414**(6861): p. 305-8.
113. Agarwal, A., et al., *Hemoglobin C associated with protection from severe malaria in the Dogon of Mali, a West African population with a low prevalence of hemoglobin S.* Blood, 2000. **96**(7): p. 2358-63.
114. Diakite, S.A.S., *Les mecanismes de protection de l'hemoglobine C contre les formes graves du paludisme a P. falciparum: resultas d'etudes preliminaires in-vitro.These de Pharmacie, Universite de Bamako, Mali 2005*.
115. Lawaly, Y.R., et al., *Heritability of the human infectious reservoir of malaria parasites.* PLoS One, 2010. **5**(6): p. e11358.
116. Goncalves, B.P., et al., *Hemoglobin variants shape the distribution of malaria parasites in human populations and their transmission potential.* Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 14267.

117. Lamptey, H., et al., *Association between alpha-thalassaemia trait, Plasmodium falciparum asexual parasites and gametocyte carriage in a malaria endemic area in Southern Ghana.* BMC Res Notes, 2019. **12**(1): p. 134.
118. Gouagna, L.C., et al., *Genetic variation in human HBB is associated with Plasmodium falciparum transmission.* Nat Genet, 2010. **42**(4): p. 328-31.
119. Robert, V., et al., *Effect of the sickle cell trait status of gametocyte carriers of Plasmodium falciparum on infectivity to anophelines.* Am J Trop Med Hyg, 1996. **54**(2): p. 111-3.
120. Corbel, V., et al., *Multiple insecticide resistance mechanisms in Anopheles gambiae and Culex quinquefasciatus from Benin, West Africa.* Acta Trop, 2007. **101**(3): p. 207-16.
121. N'Guessan, R., et al., *Chlorfenapyr: a pyrrole insecticide for the control of pyrethroid or DDT resistant Anopheles gambiae (Diptera: Culicidae) mosquitoes.* Acta Trop, 2007. **102**(1): p. 69-78.
122. Boistelle, A., *Piercing dangers.* Br Dent J, 2000. **189**(3): p. 126.
123. Trager, W. and J.B. Jensen, *Human malaria parasites in continuous culture.* Science, 1976. **193**(4254): p. 673-5.
124. Alonso, P.L., et al., *A research agenda to underpin malaria eradication.* PLoS Med, 2011. **8**(1): p. e1000406.
125. Alonso, P.L. and M. Tanner, *Public health challenges and prospects for malaria control and elimination.* Nat Med, 2013. **19**(2): p. 150-5.
126. Chaubey, S., M. Grover, and U. Tatu, *Endoplasmic reticulum stress triggers gametocytogenesis in the malaria parasite.* J Biol Chem, 2014. **289**(24): p. 16662-74.
127. Waters, A.P., *Epigenetic Roulette in Blood Stream Plasmodium: Gambling on Sex.* PLoS Pathog, 2016. **12**(2): p. e1005353.
128. Bolscher, J.M., et al., *A combination of new screening assays for prioritization of transmission-blocking antimalarials reveals distinct dynamics of marketed and experimental drugs.* J Antimicrob Chemother, 2015. **70**(5): p. 1357-66.
129. Delves, M., et al., *The activities of current antimalarial drugs on the life cycle stages of Plasmodium: a comparative study with human and rodent parasites.* PLoS Med, 2012. **9**(2): p. e1001169.

130. Miura, K., et al., *Qualification of standard membrane-feeding assay with Plasmodium falciparum malaria and potential improvements for future assays.* PLoS One, 2013. **8**(3): p. e57909.
131. Ponnudurai, T., et al., *Cultivation of fertile Plasmodium falciparum gametocytes in semi-automated systems. 1. Static cultures.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 1982. **76**(6): p. 812-8.
132. Ponnudurai, T., A.D. Leeuwenberg, and J.H. Meuwissen, *Chloroquine sensitivity of isolates of Plasmodium falciparum adapted to in vitro culture.* Trop Geogr Med, 1981. **33**(1): p. 50-4.
133. Shibeshi, M.A., Z.D. Kifle, and S.A. Atnafie, *Antimalarial Drug Resistance and Novel Targets for Antimalarial Drug Discovery.* Infect Drug Resist, 2020. **13**: p. 4047-4060.
134. Wadi, I., et al., *Recent advances in transmission-blocking drugs for malaria elimination.* Future Med Chem, 2019. **11**(23): p. 3047-3088.
135. Recht, J., E.A. Ashley, and N.J. White, *Use of primaquine and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency testing: Divergent policies and practices in malaria endemic countries.* PLoS Negl Trop Dis, 2018. **12**(4): p. e0006230.
136. Ruwende, C. and A. Hill, *Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria.* J Mol Med (Berl), 1998. **76**(8): p. 581-8.
137. Miguel-Blanco, C., et al., *Hundreds of dual-stage antimalarial molecules discovered by a functional gametocyte screen.* Nat Commun, 2017. **8**: p. 15160.
138. Peatey, C.L., et al., *Anti-malarial drugs: how effective are they against Plasmodium falciparum gametocytes?* Malar J, 2012. **11**: p. 34.
139. Yuda, M., et al., *Global transcriptional repression: An initial and essential step for Plasmodium sexual development.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(41): p. 12824-9.
140. Yuda, M., et al., *Female-specific gene regulation in malaria parasites by an AP2-family transcription factor.* Mol Microbiol, 2020. **113**(1): p. 40-51.
141. Gebru, T., et al., *Life-span of in vitro differentiated Plasmodium falciparum gametocytes.* Malar J, 2017. **16**(1): p. 330.
142. Xu, X., et al., *[Continuous cultivation of a large number of Plasmodium falciparum gametocytes in carbon dioxide incubator].* Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi, 1998. **16**(5): p. 376-9.

143. Churcher, T.S., et al., *Measuring the blockade of malaria transmission--an analysis of the Standard Membrane Feeding Assay.* Int J Parasitol, 2012. **42**(11): p. 1037-44.
144. Eziefula, A.C., et al., *Single dose primaquine for clearance of Plasmodium falciparum gametocytes in children with uncomplicated malaria in Uganda: a randomised, controlled, double-blind, dose-ranging trial.* Lancet Infect Dis, 2014. **14**(2): p. 130-9.
145. Plouffe, D.M., et al., *High-Throughput Assay and Discovery of Small Molecules that Interrupt Malaria Transmission.* Cell Host Microbe, 2016. **19**(1): p. 114-26.
146. Wang, Z., et al., *A flow cytometry-based quantitative drug sensitivity assay for all Plasmodium falciparum gametocyte stages.* PLoS One, 2014. **9**(4): p. e93825.
147. Carter, R. and L.H. Miller, *Evidence for environmental modulation of gametocytogenesis in Plasmodium falciparum in continuous culture.* Bull World Health Organ, 1979. **57 Suppl 1**: p. 37-52.
148. Roncales, M., et al., *Comparison and Optimization of Different Methods for the In Vitro Production of Plasmodium falciparum Gametocytes.* J Parasitol Res, 2012. **2012**: p. 927148.
149. Baker, D.A., *Malaria gametocytogenesis.* Mol Biochem Parasitol, 2010. **172**(2): p. 57-65.
150. Lingnau, A., et al., *Serum-free cultivation of Plasmodium falciparum gametocytes in vitro.* Parasitol Res, 1993. **79**(5): p. 378-84.
151. Trager, W., *What triggers the gametocyte pathway in Plasmodium falciparum?* Trends Parasitol, 2005. **21**(6): p. 262-4.
152. Butcher, G.A., *Antimalarial drugs and the mosquito transmission of Plasmodium.* Int J Parasitol, 1997. **27**(9): p. 975-87.
153. Hogh, B., et al., *The differing impact of chloroquine and pyrimethamine/sulfadoxine upon the infectivity of malaria species to the mosquito vector.* Am J Trop Med Hyg, 1998. **58**(2): p. 176-82.
154. Ono, T. and T. Nakabayashi, *Gametocytogenesis induction by ammonium compounds in cultured Plasmodium falciparum.* Int J Parasitol, 1990. **20**(5): p. 615-8.

155. Wadi, I., et al., *Methylene blue induced morphological deformations in Plasmodium falciparum gametocytes: implications for transmission-blocking.* Malar J, 2018. **17**(1): p. 11.
156. Dantzler, K.W., et al., *Naturally acquired immunity against immature Plasmodium falciparum gametocytes.* Sci Transl Med, 2019. **11**(495).
157. Neveu, G., et al., *Plasmodium falciparum sexual parasites develop in human erythroblasts and affect erythropoiesis.* Blood, 2020. **136**(12): p. 1381-1393.
158. Talman, A.M., et al., *Gametocytogenesis: the puberty of Plasmodium falciparum.* Malar J, 2004. **3**: p. 24.
159. Ringelhann, B., et al., *A new look at the protection of hemoglobin AS and AC genotypes against plasmodium falciparum infection: a census tract approach.* Am J Hum Genet, 1976. **28**(3): p. 270-9.
160. Feng, Z., et al., *Coupling ecology and evolution: malaria and the S-gene across time scales.* Math Biosci, 2004. **189**(1): p. 1-19.
161. C.J. Ngwa, T.F.A.d.R., G. Pradel,, *The biology of malaria gametocytes, Curr. Top. Malar.* 2016.
162. Miura, K., et al., *An inter-laboratory comparison of standard membrane-feeding assays for evaluation of malaria transmission-blocking vaccines.* Malar J, 2016. **15**: p. 463.
163. Wadi, I., et al., *Investigation of factors affecting the production of P. falciparum gametocytes in an Indian isolate.* 3 Biotech, 2021. **11**(2): p. 55.

9. FICHE SIGNALETIQUE

Nom & Prénom : KONE JOB

Faculté et Pays d'origine : Faculté de Pharmacie de Bamako, Mali

Email : konejob4@gmail.com; Tél : 00223 / 00223 77 91 36 81

Année universitaire : 2019-2020 **Ville de soutenance :** Bamako

Dépôt légal : Bibliothèque de la FMOS/FAPH de Bamako

Domaine d'intérêt : Biologie cellulaire, parasitologie, entomologie.

Titre de la thèse : Culture des gamétocytes de *P. falciparum* et infection des moustiques au laboratoire d'immunogénétique du MRTC/FMOS-FAPH/USTTB de Bamako : effet de l'HbS et de l'HbC

Résumé

Le gamétocyte est un stade de développement particulièrement important dans le cycle biologique de *P. falciparum*. C'est la forme sexuée du parasite qui assure la transmission de la maladie et aussi la survie de l'espèce. La recherche sur le gamétocyte constitue un axe très important d'investigation pour l'élimination du paludisme. La culture de gamétocytes de *Plasmodium falciparum* offre une base importante pour les investigations sur les gamétocytes.

Au cours de cette étude, nous avons entrepris de mettre au point la culture de gamétocyte au laboratoire d'Immunogénétique du MRTC tout en recherchant l'effet de certains paramètres sur la production et la maturation des gamétocytes ainsi que l'infectivité des moustiques par les gamétocytes produits.

De façon globale, nous avons obtenu une production satisfaisant de gamétocytes avec un taux d'induction globale de 57%. Ce taux était maximal avec les globules rouges HbAA avec 87%. La maturation des gamétocytes était cependant meilleure avec les GR HbAC. De toutes les souches de *P. falciparum* testées, la souche NF54 s'est révélé meilleures productrices de gamétocytes. L'infestation expérimentale des souches de moustiques avec les gamétocytes produits n'a pas réussi. Nos résultats sont encourageant y devront être consolidés surtout par rapport à l'infection des moustiques.

Mots Clés : Gamétocyte, Anophèle, *Plasmodium falciparum*, culture, infection.

First Name : JOB **Last Name** : KONE

Institution : Faculty of Pharmacy of Bamako, **Country** : Mali

Email : konejob4@gmail.com; **Tel** : 00223 / 00223 77 91 36 81

Academic year : 2019-2020 **Defense Town :** Bamako

Deposit place : Library of FMOS/FAPH of Bamako

Field of interest : Cellular Biology, parasitology, entomology.

Title of the thesis: Culture of *P. falciparum* gametocytes and mosquito infection at the MRTC immunogenetics laboratory in Bamako: effect of HbS and HbC

Abstract

The gametocyte is a particularly important developmental stage in the life cycle of *P. falciparum*. It is the sexual form of the parasite that ensures the transmission of the disease and the survival of the species. Gametocyte research is a very important line of investigation for the elimination of malaria. *P. falciparum* gametocyte culture offers an important basis for gametocyte investigations. In this study, we undertook to develop gametocyte culture at the Immunogenetics laboratory of MRTC while investigating the effect of certain parameters on gametocyte production and maturation as well as the infectivity of mosquitoes by the gametocytes produced. Overall, we obtained a satisfactory production of gametocytes with an overall induction rate of 57%. This rate was maximal with HbAA red blood cells with 87%. However, gametocyte maturation was better with HbAC RBCs. Of all *P. falciparum* strains tested, NF54 was the best gametocyte producer. Experimental infestation of mosquito strains with the produced gametocytes was not successful. Our results are encouraging and should be consolidated especially in relation to mosquito infection.

Keywords: Gametocyte, Anopheles, P. falciparum, culture, infection

10. ANNEXES

10.1. Modes Opératoires Normalisés

10.1.1. Annexe 1 : Préparation du milieu de culture

Solutions et Matériels pour la préparation du milieu de culture

-L'eau de culture

-RPMI

-Bicarbonate de sodium

-HEPES

-Hypoxantine

-Albumax

-Gentamycine 10mg ou 50mg

-Alcool

-Papier hygiénique

-Mixture

-Pèse

-Aimant magnétique

-Filtre

-Pipette

Préparation du milieu de culture complet pour 1 litre

Préparation de 1 litre d'eau de culture

Mettre un sache de RPMI 10,41g et mixer

Ajouter 5,95g de HEPES

Ajouter 0,05g de hypoxanthine en poudre et 1ml en solution

Ajouter 5g d'albumax

Ajouter 2,5g de bicarbonate sodium pour poudre et 28ml pour solution

Mixée pendant quelques heures (environ 3 heures)

Ajouter 500µl de gentamycine 10mg

Filtre dans un filtre stérile sous la hotte

Conserver le milieu de culture à une température de 4°c.

10.1.2. Annexe 2 : Décongélation de *Plasmodium falciparum*

Solutions et matériels pour décongélation

-NaCl 12%

-NaCl 1,6%

-NaCl 0,9%

-Filtration stérile avec filtre de 0,22µm

-Seringue, aiguille

-Tube de 50 ml

-Pipette de 2 ml

-Pipette de 10 ml

-Portoir des tubes

-Papier hygénique

-Alcool

Décongélation des hématies parasitées

Les parasites sont conservés dans un frigo à une température de -80°C dans un cryotube.

Sortir rapidement le tube de l'échantillon.

Mettre rapidement dans l'eau de bain marais à 37°c pendant 1 à 2 minutes (juste le temps nécessaire de décongélation) pour le ramener à la température de 37°c.

Ensuite sous une hotte préalablement nettoyée et désinfectée on transfert le contenu de cryotube contenant de l'échantillon de parasite dans un tube de 50ml.

Mesurer le volume de l'échantillon.

Ajouter 0,1% du volume mesuré de l'échantillon en NaCl 12% goutte par goutte en agitant.

Laisser à la température ambiante pendant 5 minutes sous hotte.

Ajouter 10% volumes de NaCl 1,6% goutte par goutte en agitant.

Centrifuger à 1200 RPM à 20°c pendant 5 minutes.

Eliminer le surnageant par l'aspirateur.

Ajouter 10% volumes de NaCl 0,9% goutte par goutte en agitant.

Centrifuger à 1200 RPM à 20°c pendant 5 minutes.

Eliminer le surnageant par l'aspirateur.

Resuspendre les culots parasites dans le milieu de culture et ajouté les globules rouges non parasités dans les flacons de culture (dilution non élucidé).

Les parasitémies doivent être comprises entre 0,5 à 5%.

Les flacons de culture sont conservés dans l'incubateur avec les paramètres suivants :

La température à 37°C

Le dioxyde de carbone à 5%

L'humidité à 80

Le milieu de culture change tous les 24H.

10.1.3. Annexe 3 : Congélation des hématies parasitées

Les parasitémies doivent être comprises entre 0,5 à 5% pour la congélation.

Mettre le milieu de culture dans un tube de 50ml.

Centrifuger à 1200 RPM à 20°c pendant 5 minutes à une fois.

Eliminer le surnageant par l'aspirateur.

Mesure le volume du culot.

Mettre le même volume de glycérol goutte par goutte en agitant.

Mettre dans un cryotube avec la daté et le nom de l'échantillon.

Conserver les échantillons dans un frigo à une température de -80°c.

10.1.4. Annexe 4 : Préparation des hématies non parasité

Matériel du prélèvement

-Tube contenant de l'anticoagulant (EDTA)

-Epi

-Coton sec

-Carreau

-Alcool de 70°

Lavage du sang prélever non parasite

Mettre le sang prélevé dans un tube de 50ml.

Centrifuger à 1200 RPM à 20°c pendant 5 minutes.

Eliminer le sérum.

1ier lavage du globule rouge avec RPMI en centrifugat pendant 5 minutes.

Aspirer le surnageant.

2ième lavage du globule rouge avec RPMI en centrifugat pendant 5 minutes.

Aspirer le surnageant.

3ième lavage du globule rouge avec RPMI en centrifugat pendant 5 minutes.

Aspirer le surnageant.

Diluer le globule rouge à 50% avec RPMI.

Conserver le globule rouge à une température de 4°c.

10.1.5. Annexe 5 : Mise en culture du parasite

Le parasite ainsi décongelé est transféré dans un flacon

Ajoute une quantité déterminée du milieu de culture

Ajoute une quantité de sang non parasité

Place dans un incubateur avec les caractéristiques suivantes :

- Température 37°C
- Du CO2 à 5%
- L'humidité à 80%

10.1.6. Annexe 6 : Fiche technique

FICHE TECHNIQUE														
Souche:		**Date: / / /**												
Date	**Changement de milieu**	**Hematies neuves (dilution)**	**Contamination**	**Hematies parasitees (pour 1000)**								**Parasitemie**	**Index**	**Observations**
				Forme Anneau	**Trophozoites**	**Schizontes**	**Gametocytes**							
							I	**II**	**III**	**IV**	**V**			

10.2. Annexe 7 : Images illustratives du travail

Figure 21 : Image illustrative des conditions de travail au laboratoire d'immunogénétique

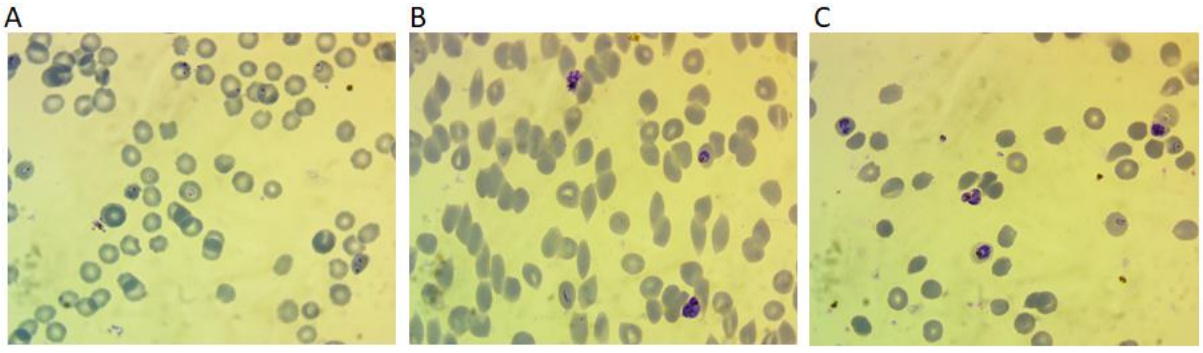


Figure 22 : Illustration d'un frottis de culture montrant des formes asexuées de *P. falciparum*

A. Anneaux de *P. falciparum*
B. Trophozoïtes matures
C. Schizontes

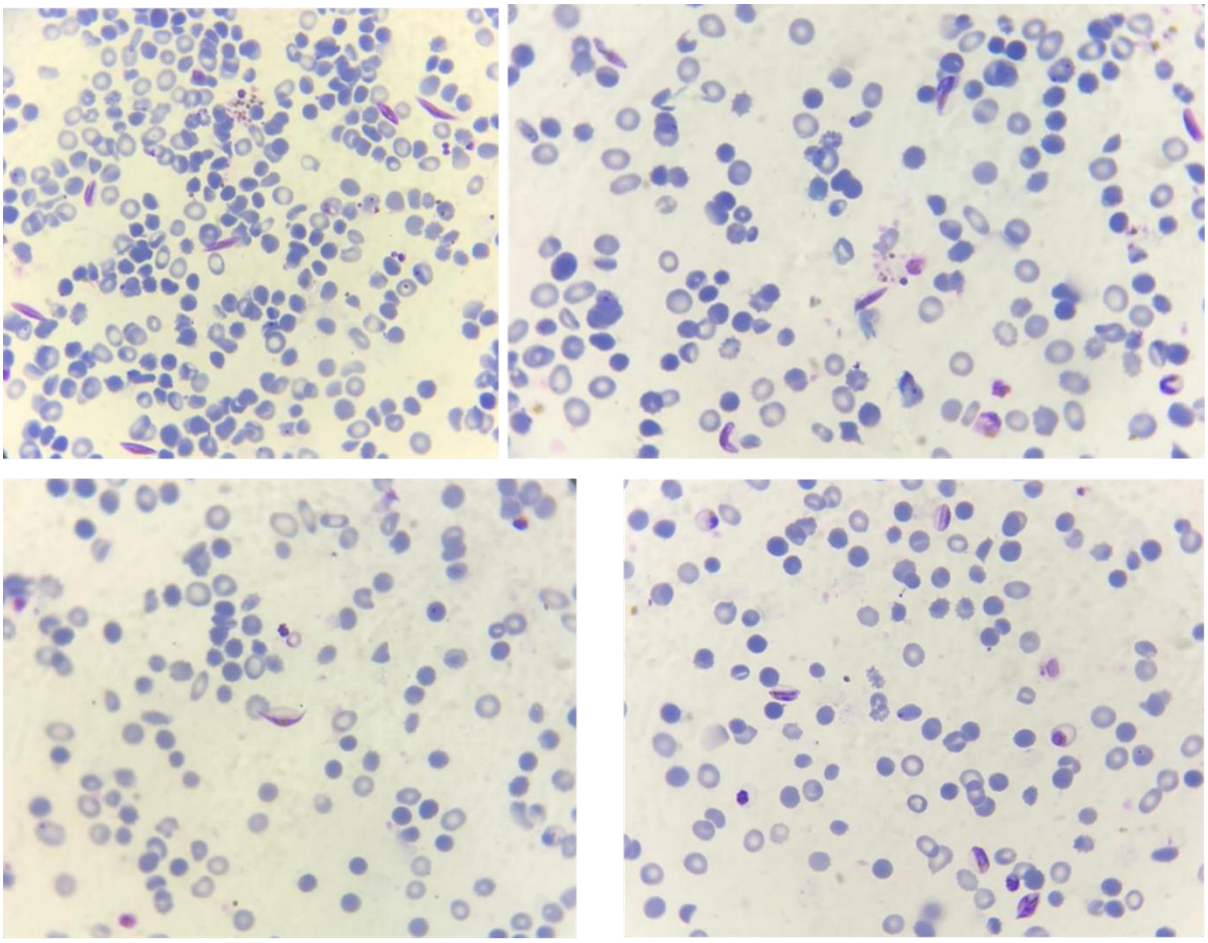


Figure 23 : Illustration d'un frottis de culture montrant différents stades de gamétocyte de *P. falciparum*

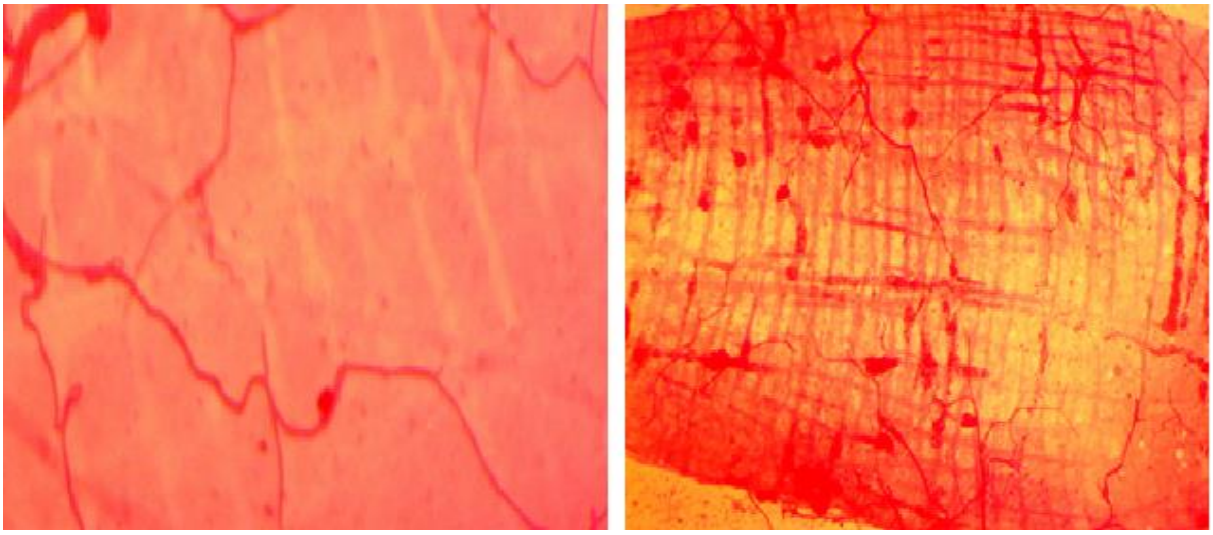


Figure 24 : Illustration d'un estomac de moustique disséqué (sans oocystes)

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence des maitres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer dans l'intérêt de la santé publique ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels ; Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque !

Je le jure.