

Evaluation épidémiologique du paludisme en zone d'endémie

Rogier C¹, Henry M-C², Trape J-F³

1. *Unité de recherche en biologie et épidémiologie parasitaires, Equipe 7 «Maladies émergentes et moustiques», Unité de recherche sur les maladies infectieuses et tropicales émergentes, URMITE, UMR6236, Institut de recherche biomédicale des armées, Institut de médecine tropicale du Service de santé des armées, Allée du Médecin colonel Jamot, Parc du Pharo, BP60109, 13262 Marseille cedex 07, France.*

2. *Projet FSP REFS/Centre de Recherche Entomologique de Cotonou, 06 BP 2604, Bénin*

3. *Institut de recherche pour le développement/Unité de recherche sur les maladies infectieuses et tropicales émergentes, URMITE, UMR6236, BP1386, Dakar, Sénégal.*

Med Trop 2009; **69** : 123-142

RÉSUMÉ • La lutte contre le paludisme a visé pendant plusieurs décennies à contrôler son impact sur la santé des populations vivant en zones d'endémie. L'utilisation de combinaisons thérapeutiques à base de dérivés de l'artémisinine, les traitements préventifs intermittents chez les enfants et les femmes enceintes, l'utilisation généralisée de moyens de protection antivectorielle comme les moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action et les pulvérisations intradomiciliaires d'insecticide rémanent ont prouvé leur efficacité. Leur déploiement dans certaines zones d'endémie a abouti à une telle réduction du poids du paludisme que l'objectif d'éradication, encore tabou il y a quelques années revient sur le devant de la scène. Quelle que soit la méthode de lutte, son efficacité chez l'homme doit être évaluée et surveillée précisément. L'impact épidémiologique sur le paludisme est l'objectif principal des mesures de contrôle. Son évaluation concerne les aspects parasitologiques et cliniques du paludisme humain. Cet article présente une revue des méthodes d'évaluation épidémiologique du paludisme.

MOTS-CLÉS • Paludisme. Epidémiologie. Diagnostic. Infection. Morbidité. Mortalité.

EPIDEMIOLOGIC EVALUATION OF MALARIA IN ENDEMIC AREAS

ABSTRACT • For decades malarial control has been implemented to control the impact of the disease on the health of populations living in endemic zones. The use of artemisinin combination therapy, intermittent preventive treatment for children and pregnant women, vector-control methods such as long-lasting insecticide-impregnated mosquito nets and indoor remanent insecticide spraying has proven to be effective. These practices have led to such an extensive reduction of the malaria burden in some endemic areas that the objective of eradication that was unimaginable a few years ago is now back to the forefront. Regardless of the method chosen, careful evaluation and surveillance of its effectiveness in man is necessary. Achieving epidemiologic impact is the main goal of malaria control methods. The main measures for evaluation involve parasitological and clinical aspects of human malaria. The purpose of this article is to review methods used for epidemiologic evaluation of malaria burden.

KEY WORDS • Malaria. Epidemiology. Diagnosis. Infection. Morbidity. Mortality.

La lutte contre le paludisme a visé pendant plusieurs décennies à contrôler son impact sur la santé des populations vivant dans les zones d'endémie. L'utilisation de combinaisons thérapeutiques à base de dérivés de l'artémisinine (ACT), les traitements préventifs intermittents chez les enfants et les femmes enceintes, l'utilisation généralisée de moyens de protection antivectorielle comme les moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action et les pulvérisations intradomiciliaires d'insecticide rémanent ont prouvé leur efficacité. Leur déploiement dans certaines zones d'endémie a abouti à une telle réduction du poids du paludisme que l'objectif d'éradication, encore tabou il y a quelques années, revient sur le devant de la scène. Si la technologie et les moyens de lutte contre le paludisme ont connu des développements importants, des enseignements du programme d'éradication mené au milieu du vingtième siècle ont peut-être été oubliés. Quelle que soit la méthode de lutte, son efficacité chez l'homme doit être évaluée et surveillée de manière précise. Ne serait-ce que pour savoir si elles permettront d'éliminer ou seulement contrôler le paludisme dans les zones où elles seront appliquées systématiquement. L'impact épidémiologique sur le paludisme est l'objectif principal de ces mesures de lutte. Son évaluation concerne les aspects parasitologiques et cliniques du paludisme humain (Tableau I). Le présent article passe en revue les méthodes et concepts utilisés pour évaluer le paludisme chez les humains.

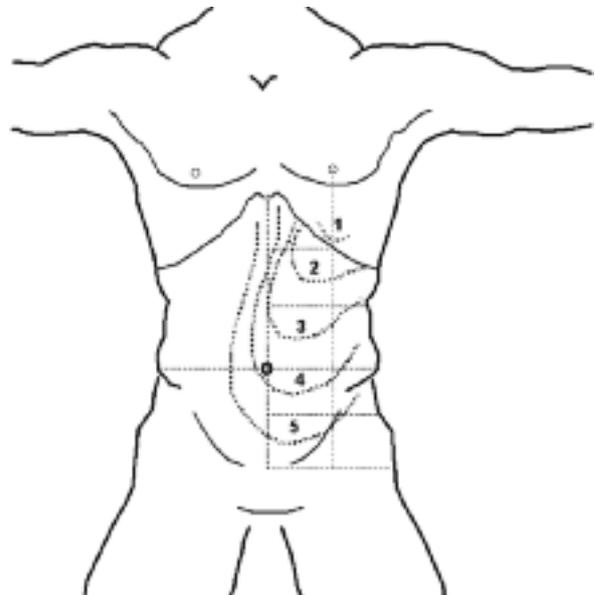


Figure 1. Classification de la taille des rates selon la méthode de Hackett (d'après la Terminologie du paludisme, OMS, 1963).

Droites de références définissant les cinq classes (tirets) et projection à la surface de l'abdomen de splénomégalies atteignant les cinq classes (pointillés). Classe 1 : rate palpable uniquement en inspiration profonde, sous l'hypocondre gauche. Classes 2 à 5 : rate palpable en respiration normale dans les cadrans 2 à 5 délimités par les cinq droites horizontales définies ci-après par la verticale passant par le mamelon gauche, l'horizontale passant par l'intersection de la verticale précédente avec le rebord costal gauche, l'horizontale passant par l'ombilic, l'horizontale passant par la symphyse pubienne et les deux horizontales équidistantes des trois horizontales précédentes.

• Correspondance : christophe.rogier@wanadoo.fr

Indice splénique et indice de Hackett

L'infection plasmodiale s'accompagne généralement d'une augmentation de la taille de la rate. Dans les zones où le paludisme est la principale cause de splénomégalie, la méthode certainement la plus simple et la plus rapide pour évaluer l'importance du paludisme dans une population est la palpation de la rate. L'indice splénique est la proportion d'enfants âgés de 2 à 9 ans porteurs d'une splénomégalie. Le niveau d'endémicité du paludisme a été initialement défini selon cet indice (1) (Tableau II). La taille des splénomégalies peut être classifiée selon la méthode de Hackett (2) (Fig. 1). En pratique, elle repose sur la définition de lignes de référence délimitant des cadrans. La projection à la surface de l'abdomen de la limite inférieure de la rate détectée par la palpation dans les cadrans définis précédemment permet de classer les splénomégalies en cinq niveaux (numérotés de 1 à 5). L'indice de Hackett ou splénomégalie moyenne est la moyenne des classes de splénomégalie (l'absence de splénomégalie étant classée 0) calculée en faisant la somme des produits des nombres d'enfants palpés par les numéros de leur classe de splénomégalie et en la divisant par le nombre d'enfants palpés. L'indice splénique et l'indice de Hackett sont sensibles aux variations du niveau de transmission et à toutes les interventions antipaludiques, y compris médicamenteuses. Ils peuvent être estimés facilement, rapidement et à faible coût. La palpation est généralement réalisée debout, avec l'extrémité des doigts de la main droite, l'examineur étant placé derrière l'enfant debout, légèrement penché en avant avec le pied gauche légèrement surélevé

Tableau 1. Indicateurs utilisables pour l'évaluation épidémiologique du paludisme.

Infection plasmodiale
Indice plasmodique (2-9 ans) & taux de prévalence des infections plasmodiales par espèce plasmodiale et par classe d'âge
Densité parasitaire moyenne (<i>i.e.</i> nombre de plasmodiums rapporté au volume de sang, au nombre d'érythrocytes ou de leucocytes)
Incidence des infections plasmodiales par espèce plasmodiale et par classe d'âge
Multiplécité moyenne des infections (<i>i.e.</i> nombre de populations plasmodiales distinguées par des marqueurs génétiques polymorphes présents dans un même échantillon sanguin)
Taux de prévalence des infections plasmodiales placentaires
Réponse immune
Taux de prévalence de la séropositivité et titres en anticorps dirigés contre des antigènes plasmodiaux par espèce plasmodiale et par classe d'âge
Taux d'incidence des réponses anticorps dirigés contre des antigènes plasmodiaux par espèce plasmodiale et par classe d'âge
Splénomégalie
Indice splénique (<i>i.e.</i> proportion d'enfants âgés de 2 à 9 ans ayant une splénomégalie) et Indice de Hackett (<i>i.e.</i> moyenne des stades de splénomégalie selon la classification de Hackett, estimation de la taille moyenne des rates)
Morbidité
Taux d'incidence des accès palustres simples (<i>i.e.</i> épisodes de fièvre et de manifestations cliniques attribués au paludisme)
Taux d'incidence des accès palustres graves (<i>i.e.</i> manifestations cliniques associées à la létalité et attribués au paludisme)
Proportion de formes graves de paludisme parmi les admissions hospitalières
Taux de prévalence de l'anémie, taux d'hémoglobine moyen et taux d'hématocrite moyen
Taux de prévalence des petits poids de naissance et poids moyen des nouveau-nés
Mortalité
Taux de mortalité toutes causes confondues par classe d'âge (infantile : 0-11 mois, juvénile : 1-4 ans)
Taux de mortalité spécifique attribuée au paludisme par classe d'âge
Taux de létalité (<i>i.e.</i> proportion de cas de paludisme clinique ayant évolué vers un décès)

sur une cale. Pour assurer la reproductibilité des estimations, il est nécessaire de s'assurer de la standardisation de l'examen des enfants. En effet, les variations inter-observateurs peuvent être importantes. Lorsque d'autres causes sont responsables de nombreuses splénomégalies dans la zone (*e.g.* bilharziose), l'indice splénique perd de son intérêt.

Les infections plasmodiales

Sur le plan parasitologique, la manière la plus simple d'évaluer le poids du paludisme est d'estimer la prévalence des infections plasmodiales, c'est à dire le nombre d'individus infectés. On peut aussi estimer l'incidence des infections, c'est à dire le nombre de nouvelles infections par unité de temps. Le résultat de ces évaluations dépend de la sensibilité de la méthode parasitologique utilisée et de la densité parasitaire, *i.e.* nombre de parasites rapporté au volume de sang, au nombre d'hématies ou au nombre de leucocytes. La densité parasitaire moyenne et la multiplécité moyenne des infections, c'est à dire le nombre de populations plasmodiales qui peuvent être distinguées par génotypage dans un échantillon de sang, sont d'autres indicateurs parasitologiques du poids du paludisme.

La prévalence des infections plasmodiales

L'estimation de la prévalence peut reposer sur de nombreuses méthodes de détection des infections plasmodiales (3-5). Des méthodes comme la cytométrie en flux et la spectrométrie de masse ont été récemment appliquées au diagnostic des infections plasmodiales (4) mais elles ne font pas partie de celles utilisées dans les études épidémiologiques (Tableau III).

• Méthodes de détection des plasmodiums utilisables en épidémiologie

- Frottis mince et goutte épaisse

La méthode de référence de détection des infections plasmodiales repose sur la mise en évidence microscopique directe des parasites dans du sang étalé en goutte épaisse ou en frottis mince sur une lame de verre et coloré, généralement au Giemsa (6). La goutte épaisse est réalisée avec 3 à 4 µL de sang, étalé sur une surface ronde, carrée ou rectangulaire d'environ 8-10 mm de diamètre ou de côté. Idéalement, 15 à 20 leucocytes doivent être visibles sur les champs microscopiques (oculaires 5x à 7x, objectif 100x à immersion). Dans ces conditions, l'examen de 200 champs micro-

Tableau II. Classification de l'endémicité selon la monographie de l'OMS sur la terminologie du paludisme et de son éradication (1963).

Endémicité	Indice splénique* (Classification de Kampala, 1950)	Indice plasmodique* (Classification de Yaoundé, 1962)
Hypoendémie	≤ 10% chez les enfants âgés de 2 à 9 ans	Habituellement < 10% chez les enfants âgés de 2 à 9 ans (peut être plus élevé une partie de l'année)
Mésioendémie	11-50% chez les enfants âgés de 2 à 9 ans	Habituellement 10-49% chez les enfants âgés de 2 à 9 ans (peut être plus élevé une partie de l'année)
Hyperendémie	Constamment > 50% chez les enfants âgés de 2 à 9 ans	Constamment > 50% chez les enfants âgés de 2 à 9 ans
Holoendémie	Constamment > 75% chez les enfants âgés de 2 à 9 ans	Constamment > 75% chez les nourrissons âgés de moins de un an

Tableau III. Méthodes de diagnostic des infections plasmodiales.

	Goutte épaisse	Frottis mince	QBC™ Malaria test	Tests rapides HRP2	Tests rapides LDH	PCR
Volume de sang examiné	3-4 µL	1-1,5µL	55-65µL	5-15 µL	5-15 µL	10 à 100µL
Sensibilité biologique pour <i>P. falciparum</i> (95% de chance de détection)	24/µL pour 100 champs 12/µL pour 200 champs 6/µL pour 400 champs	300/µL pour 100 champs 150/µL pour 200 champs	1-5/µL	100 à 300/µL	100 à 300/µL	0,001 à 0,3/µL
Temps de réalisation (en minutes)	30-60	30-60	< 10	5-20	5-20	40-60 (PCR temps réel)
Coût unitaire (en euros)	0,03 à 0,7	0,03 à 0,7	1,5	0,4 à 3	0,4 à 3	env. 15
Diagnostic de <i>P. falciparum</i>	Oui	Oui	Evoqué par le monomorphisme des formes	Oui	Oui	Oui
Diagnostic de <i>P. vivax</i>	Oui	Oui	Non	Non	Oui	Oui
Diagnostic de <i>P. ovale</i> , & <i>P. malariae</i>	Oui	Oui	Non	Non	Oui mais sensibilité médiocre	Oui
Estimation de la densité parasitaire	Oui	Oui	Non	Non	Non	Non
Avantages	Méthode de référence	Morphologie des hématies parasitées conservée		Facilité d'emploi sans besoin d'électricité	Facilité d'emploi sans besoin d'électricité négatation rapide après guérison	
Inconvénients	Dépend de l'expérience technique et d'une source d'électricité	Dépend de l'expérience technique et d'une source d'électricité	Coût initial d'investissements élevé Dépend de l'expérience technique et d'une source d'électricité	Positivité persistant 15j après guérison		Technicité réservée à des centres spécialisés Coût des investissements

scopiques couvre environ 0,4 à 0,6 µL de sang. Un frottis mince est réalisé en étalant environ 1 à 1,5 µL de sang sur une surface de l'ordre de 800 mm². L'examen de 200 champs microscopiques couvre alors environ 0,01 à 0,02 µL de sang, soit 40 fois moins que sur une goutte épaisse. Etant donné qu'environ 50 % des parasites peuvent disparaître au moment de la déshémoglobination et de la coloration, l'examen de 100, 200 et de 400 champs microscopiques d'une goutte épaisse (soit respectivement le comptage d'environ 2000, 4000 et 8000 leucocytes) devrait assurer à 95 % la probabilité de détecter au moins un parasite si la parasitémie est respectivement supérieure à 24, 12 et 6 parasites/µL (Fig. 2). Dans les conditions dégradées de terrain, ce seuil de détection serait souvent de l'ordre de 50 à 100 parasites/µL. L'exactitude du diagnostic et la précision de la densité parasitaire sont inférieures lorsque la parasitémie est plus faible.

Les femmes enceintes et les nouveaux-nés sont des populations à risque de paludisme. Ils font l'objet de mesures prophylactiques visant à limiter les infections plasmodiales des parturientes responsables d'une surmortalité maternelle et de petits poids de naissance associés à une surmortalité infantile. Pour évaluer les infections des placentas par des plasmodiums, on peut utiliser l'apposition placentaire, *i.e.* l'apposition de la face maternelle d'un fragment du placenta sur une lame de verre, ou l'examen histologique du placenta (7). Ces méthodes permettent de détecter les plasmodiums et le pigment malarique résiduel présent dans des macrophages qui témoignent de l'infection actuelle ou ancienne de la mère, avec une plus grande sensibilité que la goutte épaisse réalisée avec du sang capillaire.

La détection microscopique des infections plasmodiales nécessite un personnel technique bien formé, entraîné et supervisé. La lecture des étalements de sang prend du temps, de l'ordre de 15 à 45 minutes pour 100 à 200 champs microscopiques selon l'expérience du lecteur. La qualité du diagnostic microscopique dépend du lecteur et des conditions techniques. Des différences importantes existent entre lecteurs (8). Leur formation, leur entraînement et leur supervision sont donc fondamentaux. L'OMS a publié des

manuels d'enseignement du diagnostic microscopique du paludisme pour l'élève (9) et pour l'enseignant (10) ainsi que des planches d'aide illustrées (11). Il existe à présent un test auto administré en ligne pour l'évaluation des compétences en diagnostic microscopique du paludisme (12) et le Malaria Research and Reference Reagent Resource Centre (MR4, <http://WWW.malaria.mr4.org>) met à disposition des jeux de frottis sanguins et de gouttes épaisses de référence ayant des contenus parasitologiques validés (6). L'assurance qualité dans la microscopie et l'utilisation de standards externes devraient être considérées comme indispensables pour le diagnostic microscopique du paludisme (13, 14), que ce soit en clinique, en épidémiologie ou en recherche.

L'état, le bon entretien et la qualité des optiques des microscopes d'une part et les conditions techniques de réalisation et de

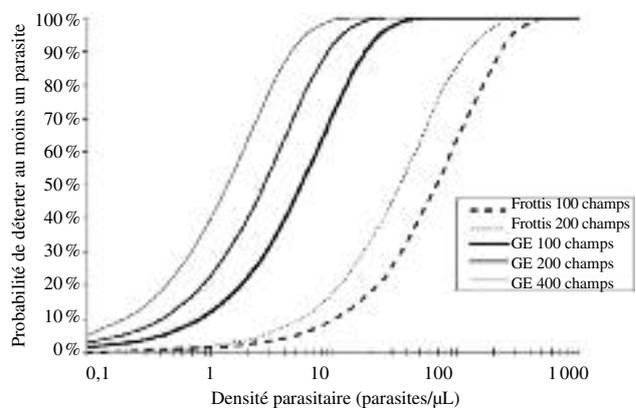


Figure 2. Probabilité de détecter au moins un parasite sur des frottis ou des gouttes épaisses (GE) en fonction du nombre de champs microscopiques examinés et de la densité parasitaire.

Calculs effectués en supposant une distribution de Poisson des parasites sur les lames, une perte de 50% des parasites au moment de la coloration des GE, une probabilité de détection de 100% d'un parasite présent sur un champs microscopique et un volume de sang de 1µL couvert par 400 champs microscopiques.

coloration des frottis sanguins et des gouttes épaisses d'autre part sont cruciaux pour assurer la qualité du diagnostic. Dans le cas contraire, les frottis ou gouttes épaisses peuvent ne plus être lisibles. Parmi les erreurs techniques classiques à éviter, on peut noter la fixation des gouttes épaisses (e.g. avec de l'alcool restant sur le doigt piqué), l'absence de fixation des frottis sanguins avant coloration, les lames sales, l'absence d'ajustement et de contrôle du pH du tampon utilisé pour la coloration (idéal à 7,2 pour la coloration au Giemsa) diminuant les contrastes colorés et gênant l'identification des plasmodiums, l'exposition à la chaleur et à l'humidité favorisant le développement de champignons et de bactéries détruisant les étalements sanguins et les rendant illisibles, l'exposition à la poussière, à des microorganismes (bactéries, champignons) ou des arthropodes (mouches, fourmis) capables de détruire les échantillons et l'utilisation de colorants contenant un précipité, source d'artéfacts et de diagnostic faussement positif. Le diagnostic microscopique des infections plasmodiales nécessite donc à la fois une maintenance rigoureuse des matériels et des procédures suivies de contrôle de qualité et d'assurance qualité. Il ne peut être envisagé sérieusement que dans le cadre d'une solide organisation.

Le frottis sanguin permet un meilleur examen de la morphologie des parasites et des hématies et donc un diagnostic d'espèce plasmodiale plus aisé. Cependant sa sensibilité est beaucoup trop faible pour avoir un intérêt en épidémiologie. Ainsi, la détection microscopique des infections plasmodiales dans les études épidémiologiques ne devrait reposer que sur la goutte épaisse.

- QBC™ Malaria test

Le QBC™ Malaria test repose sur la coloration des parasites (en fait leur ADN) par l'acridine orange, leur concentration dans un tube capillaire par gravimétrie (i.e. centrifugation) et leur détection microscopique en lumière ultraviolette. Il nécessite un matériel spécifique dont le coût initial est élevé. En raison du volume de sang examiné (55 à 65 µL) et de la coloration des plasmodiums, il a la meilleure sensibilité des tests microscopiques, de l'ordre de 1 à 5 hématies parasitées /µL. Le diagnostic positif repose sur une image associant un noyau et un cytoplasme, en situation intra-érythrocytaire, comparable au diagnostic sur frottis mince. Cependant, les caractéristiques morphologiques permettant le diagnostic d'espèce ne sont pas discernables. Ainsi, le diagnostic d'espèce repose sur le monomorphisme des stades jeunes des formes sanguines et leur répartition homogène dans le capillaire en faveur d'une infection par *Plasmodium falciparum*, le polymorphisme des formes parasitaires et leur concentration proche des couches leucocytaires évoquant une autre espèce plasmodiale. Malgré la grande sensibilité de cette méthode, son coût, l'absence d'estimation de la densité parasitaire et de spécificité d'espèce plasmodiale limitent son intérêt en épidémiologie aux recherches des densités parasitaires les plus faibles et au diagnostic des accès palustres chez les individus peu ou non immuns (3).

- Tests rapides par immunocapture d'antigènes plasmodiaux

Ces tests reposent sur la migration d'antigènes de plasmodiums contenus dans le sang périphérique sur une membrane de nitrocellulose et sur leur détection par immuno-capture (i.e. anticorps fixés sur membrane) et immuno-marquage (anticorps marqué par de l'or colloïdal ou du sélénium) (5). Ces tests sont faciles et rapides d'emploi (< 20 minutes), relativement bon marché (de 0,4 à 3 euros par test) et ne nécessitent ni une source d'électricité ni un entraînement poussé des manipulateurs. Ces tests sont moins sensibles que la goutte épaisse avec une sensibilité de l'ordre de plusieurs centaines de parasites par microlitres de sang (< 500 /µL) pour *P. falciparum*, de plusieurs milliers de parasites par microlitres de

sang (< 5 000 /µL) pour *P. vivax* et une sensibilité encore moindre pour *P. ovale* et *P. malariae* (6) (Tableau III). La qualité de ces tests peut varier d'un lot à l'autre et peut être altérée par des températures ou des humidités extrêmes. La plupart des tests sont à conserver entre 4 et 30°C, à < 70 % d'humidité. La plupart des tests utilisés ne détectent que *P. falciparum* mais il existe de nombreux tests qui détectent les autres espèces plasmodiales, selon les antigènes cibles. En pratique, les tests commercialisés combinent souvent la détection de plusieurs antigènes, en fonction des conditions épidémiologiques où ils doivent être employés (consulter <http://www.wpro.who.int/sites/rdt/>) (6). Ces antigènes sont généralement les suivants.

1) l'HRP2 (histidin rich protein 2) de *P. falciparum*. Cet antigène est sécrété par les formes asexuées et les jeunes gamétocytes et peut persister dans le sang périphérique plus de 15 jours après la disparition des parasites. Sa détection fait l'objet de faux-positifs en présence de facteur rhumatoïde ou de faux-négatifs à cause de mutations du gène *hrp2* ou de présence d'anticorps anti-HRP2.

2) la LDH (lactate déshydrogénase). Selon les tests, la LDH de *P. falciparum*, la LDH de *P. vivax* ou les LDH des quatre principales espèces de plasmodium infectant les humains peuvent être détectés. La sensibilité des tests détectant la LDH de *P. falciparum* est généralement meilleure que celle des tests détectant la LDH de *P. vivax*. La sensibilité de la détection de *P. ovale* et de *P. malariae* est médiocre. Cet antigène est aussi sécrété par les formes asexuées et les gamétocytes mais il disparaît plus rapidement du sang que l'HRP2.

3) L'aldolase. Des anticorps capables de reconnaître les aldolases de tous les plasmodiums humains peuvent être utilisés. La sensibilité de détection de ces antigènes est cependant encore moindre que celle des tests détectant l'HRP2 et la LDH.

L'avantage essentiel de ces tests est leur rapidité et facilité d'emploi, ne nécessitant pas une formation et un entraînement important. Leur défaut majeur est leur manque de sensibilité et l'absence d'estimation de la densité parasitaire (Tableau III). Le manque de sensibilité de ces tests est acceptable pour le diagnostic de la morbidité palustre dans les zones d'endémie où les accès palustres s'accompagnent habituellement de densités parasitaires élevées. Il limite cependant leur intérêt pour les études épidémiologiques menées dans les populations asymptomatiques et dans les populations où les densités parasitaires sont basses (5).

- Tests moléculaires

Des techniques de biologie moléculaire sont utilisées depuis plus de 20 ans pour diagnostiquer la présence de *P. falciparum* dans des échantillons sanguins (15) et pour caractériser les populations parasitaires ainsi détectées. La plupart font appel à un stade ou à un autre à la PCR, réaction de polymérisation en chaîne, qui permet d'amplifier un fragment d'ADN compris entre deux courtes séquences nucléotidiques servant d'amorces. Ces techniques n'ont cessé d'évoluer (4) et de se perfectionner, gagnant en sensibilité (e.g. par PCR nichée ou semi nichée), en spécificité, en rapidité (e.g. PCR en temps réel), en sûreté et en simplicité d'emploi (e.g. par multiplexage) et en capacité d'évaluation quantitative ou semi quantitative des densités parasitaires (e.g. PCR en temps réel (16)). Les séquences ADN amplifiées et servant à porter un diagnostic d'espèce plasmodiale sont nombreuses (e.g. gènes codant les ARN ribosomiaux ou des protéines comme le cytochrome b) (4, 15-19). La sensibilité et la spécificité de certaines de ces techniques sont proches de 100 % avec parfois des seuils de détection extrêmement bas, de l'ordre de 0,001 parasite par µL. Ces techniques ne sont pas

encore reconnues comme méthodes de référence car leurs performances et leur fiabilité dépendent de la variabilité génétique des séquences d'ADN plasmodial ciblées (20). Par ailleurs, elles nécessitent des équipements sophistiqués et coûteux, un personnel spécialisé et ont des coûts unitaires bien plus élevés que la microscopie (Tableau III). Leur adaptation au haut débit est cependant possible et leur coût peut être diminué. Ces méthodes sont les seules à permettre, en épidémiologie, de distinguer les populations plasmodiales présentes simultanément dans un même isolat et d'analyser leur diversité génétique et leur dynamique intra-hôte, à l'échelle d'une communauté humaine (*e.g.* un village), d'un continent ou de la terre (21-31). Pour cela, le génotypage concerne des gènes polymorphes codant des antigènes comme *msp1*, *msp2* et *glurp* (24, 26-31) ou des loci microsatellites supposés être sélectivement neutres (21-23, 25). Les premiers servent d'ailleurs à distinguer les recrudescences des nouvelles infections dans les essais d'efficacité des médicaments antipaludiques (30, 32-34).

• *Intérêt et limites de la prévalence des infections plasmodiales*

La prévalence des infections plasmodiales est sensible à de nombreux facteurs. Elle augmente avec le niveau d'exposition à la transmission des plasmodiums, le niveau de résistance des plasmodiums et pendant la grossesse ou le post-partum (35) et diminue avec l'augmentation du niveau d'immunité et l'utilisation d'antipaludiques efficaces. La prévalence plasmodiale et le niveau d'exposition à la transmission des plasmodiums sont étroitement liés (36, 37). Ce dernier est déterminé par l'agressivité des anophèles vis à vis des humains (*i.e.* le nombre de piqûres d'anophèles), le taux d'infection plasmodiale des anophèles et le niveau d'exposition des humains aux piqûres d'anophèles qui dépend lui-même de leur surface corporelle exposée aux piqûres (*i.e.* de l'âge et du port de vêtements ou de tissus couvrants), de leur attractivité individuelle (qui peut dépendre du métabolisme humain ou de la flore bactérienne cutanée), de leur comportement défensif ou protecteur (*e.g.* utilisation de moustiquaires, de répulsifs ou d'insecticides) et de leur lieu de résidence plus ou moins étanche aux anophèles pendant les heures d'agressivité de ces moustiques.

A la suite de l'émergence de résistances et sous une pression médicamenteuse, la prévalence parasitaire, *i.e.* du réservoir humain de parasites, augmente en l'espace de quelques semaines à quelques mois. Cela entraîne une augmentation de l'indice sporozoïtique, *i.e.* de la proportion d'anophèles infectés capables de transmettre des sporozoïtes aux humains, et de la transmission (38). Inversement, l'utilisation des combinaisons thérapeutiques à base de dérivés de l'artémisinine qui sont rapidement efficaces a permis dans de nombreuses zones d'endémie de réduire de façon très importante le réservoir plasmodial humain et, secondairement, la transmission du paludisme.

Un certain niveau d'immunité anti-plasmodium pourrait être acquis très précocement. Les données de malariothérapie (l'infection volontaire de malades par une espèce plasmodiale humaine) suggèrent qu'un certain niveau d'immunité clinique et parasitologique est acquis dès les premières infections et permet de diminuer la durée de patence des infections plasmodiales (39, 40).

L'indice plasmodique est le taux de prévalence plasmodiale calculé chez les enfants âgés de 2 à 9 ans (1). Il permet de classer les zones endémiques selon le niveau d'endémicité (Tableau II). La classification d'une zone en holoendémicité a cependant été définie sur l'estimation du taux de prévalence chez les seuls nourrissons, âgés de moins de un an (1). Il est habituellement estimé par

des études transversales ou longitudinales en population, indépendamment du statut clinique des enfants.

Lorsque le taux de prévalence est élevé, l'indice plasmodique perd son pouvoir discriminant et ne rend plus compte des variations de niveau de transmission (*e.g.* au delà d'une centaine de piqûres d'anophèles infectés par personne et par an, une augmentation de la transmission ne se traduit plus par une augmentation de la prévalence parasitaire) (37). Dans les conditions d'endémicité très élevée, le taux de prévalence parasitaire perd donc de son intérêt par rapport à la densité parasitaire moyenne ou à la multiplicité des infections (*cf.* infra).

Inversement, lorsque le niveau de transmission est bas (*e.g.* inférieur à quelques piqûres d'anophèles infectés par personne et par an), le taux de prévalence, les densités parasitaires et l'immunité antiplasmodiale sont généralement bas. Il est alors laborieux d'estimer le taux de prévalence parasitaire (*i.e.* à cause des densités parasitaires basses) et de mettre en évidence les infections plasmodiales dans une petite proportion de la population humaine. Dans ces contextes, les variations spatiales et temporelles des estimations des prévalences plasmodiales peuvent être importantes et les infections mixtes, *i.e.* à plusieurs espèces plasmodiales, sont souvent sous-estimées. L'utilisation de tests rapides permettrait de s'affranchir des contraintes de la microscopie mais leur faible sensibilité limite leur intérêt. Il peut alors être intéressant d'estimer la proportion des individus infectés par une méthode indirecte comme la sérologie (*cf.* infra).

Lorsque l'immunité est inexistante ou quasi-inexistante, la quasi-totalité ou une forte proportion des infections plasmodiales se traduit par des manifestations cliniques. Si le taux de recours aux structures sanitaires est élevé, le taux de prévalence et d'incidence des infections plasmodiales peut alors être estimé (en fait sous-estimé) en rapportant le nombre de cas cliniques avec infection plasmodiale à la population recrutée dans les structures sanitaires. En pratique, cela n'est valide que dans les zones de paludisme épidémique.

Les formes hypnozoïtes de *P. vivax* et *P. ovale*, responsables d'infections latentes *i.e.* non détectables dans le sang, entraînent une sous-estimation systématique des infections par ces plasmodiums dans les enquêtes paludométriques.

L'estimation de la prévalence des infections plasmodiales dépend de la sensibilité de la méthode de détection utilisée. Cette dépendance technique est plus marquée lorsque les densités parasitaires sont basses, *i.e.* dans les zones de plus faible endémie et chez les individus les plus immuns. Les taux de prévalence ne doivent pas être interprétés comme les proportions d'individus réellement infectés mais comme les proportions d'individus ayant une parasitémie patente, *i.e.* supérieure au seuil de détection de la méthode de détection utilisée. L'analyse des prévalences plasmodiales est une analyse dichotomisée des densités parasitaires. Toutes les sources de variation de la sensibilité de ces méthodes ont donc un impact direct sur les estimations de prévalence. Il en est ainsi de la qualité de la confection et de la coloration des étalements sanguins, de la compétence et de l'expérience des microscopistes, des lots de tests rapides et de la qualité des réactifs (*e.g.* amorces, polymérase, tampons) utilisés pour les PCR.

La multiplicité des infections

La distinction des populations plasmodiales par un polymorphisme de séquence ADN, de taille des fragments ADN amplifiés (*i.e.* du nombre de répétitions en tandem de motifs nucléoti-

diques) ou de restriction permet d'estimer le nombre de populations présentes simultanément dans un même isolat. Ce nombre, appelé la multiplicité de l'infection, est estimé par le nombre maximal d'allèles distincts identifiés sur un panel de plusieurs loci génotypés sur un même isolat (e.g. par génotypage des loci *msp1*, *msp2* et *glurp*). Il s'agit le plus souvent d'une sous-estimation car les polymorphismes étudiés ne peuvent pas rendre compte du polymorphisme de séquence à l'échelle du génome entier. L'estimation de la multiplicité dépend de la méthode utilisée, du nombre de loci génotypés, du polymorphisme étudié et de la diversité génétique plasmodiale. Les infections complexes, i.e. avec une multiplicité des infections supérieure à un, sont les plus fréquentes. Il n'y a guère que dans les zones de très faible endémie ou en période épidémique que la multiplicité moyenne est basse, inférieure à deux (29). La multiplicité des infections augmente avec l'exposition à la transmission et diminue avec l'acquisition d'une immunité antiplasmodiale ou l'utilisation d'antipaludiques (21, 23, 24, 26, 27, 31, 41-47). Elle peut être utilisée pour l'évaluation de l'endémicité du paludisme (23).

La densité parasitaire

L'estimation de la densité parasitaire, c'est-à-dire la quantité de parasites dans le sang, a une importance épidémiologique et clinique. Plusieurs méthodes ont été proposées pour effectuer cette estimation. Il s'agit de compter le nombre de plasmodiums par espèce et en distinguant les formes asexuées et les formes sexuées (gamétocytes) et de le rapporter au i) volume de sang examiné, ii) au nombre de champs microscopiques examinés (au moins 100, de préférence 200 ou 400), iii) au nombre de leucocytes présents sur les champs microscopiques examinés ou iv) au nombre des érythrocytes présents sur les champs microscopiques examinés des frottis minces. Les règles d'arrêt de lecture peuvent être fixes (i.e. selon un nombre prédéterminé de champs microscopiques ou de leucocytes) ou variables (i.e. lire X champs microscopiques puis, en l'absence de parasite détecté, en lire Y autres). Les règles d'arrêt variable introduisent des biais d'estimation des parasitémies et des densités parasitaires des infections mixtes, i.e. sous-estimation en cas de présence simultanée de plusieurs espèces plasmodiales. Une règle pratique et fiable peut consister à examiner l'étalement de sang jusqu'à avoir dénombré soit 500 parasites, soit 2000 leucocytes, quel que soit le dénombrement atteint en premier. Une règle d'arrêt de l'examen microscopique après un temps prédéterminé de lecture (e.g. 20 minutes) ne permet pas d'assurer l'examen d'un volume fixe de sang, introduit un facteur supplémentaire d'hétérogénéité entre lecteurs et ne devrait donc pas être utilisée. Le volume de sang examiné est rarement estimé et directement pris en compte. On considère généralement une leucocytémie standard, e.g. de 8000 leucocytes/ μ L, pour calculer la densité parasitaire. Une perte différentielle des parasites par rapport aux leucocytes au cours de la déshémoglobination et de la coloration des gouttes épaisses pourrait fausser ce mode d'estimation de la densité parasitaire; cependant elle n'a pas toujours été mise en évidence. Utiliser la proportion de champs microscopiques positifs, i.e. avec au moins un parasite, est une méthode simple qui n'est cependant pas très discriminante dès que les densités parasitaires sont élevées.

Les densités parasitaires peuvent être analysées par classes, de préférence avec une progression géométrique des parasitémies d'ordre 2 (i.e. en 10 classes : <100, 101-200, 201-400, 401-800, 801-1600, 1600-3200, ... jusqu'à 25 600/ μ L et plus (1)) ou d'or-

dre 10 (i.e. en 5 classes : <50, 50-499, 500-4999, 5000-49999 & > 50000/ μ L (48)). Elles peuvent aussi être analysées par leur moyenne. On utilise généralement la moyenne géométrique en calculant la moyenne arithmétique des logarithmes des densités parasitaires. Ces moyennes peuvent être calculées sur les seuls individus ayant une parasitémie positive. L'analyse parasitologique est alors effectuée en deux phases : l'analyse de la prévalence parasitaire puis l'analyse de la densité parasitaire chez les seuls positifs. On peut aussi estimer la moyenne géométrique des densités parasitaires en incluant les parasitémies nulles. Pour cela, on utilise la transformation $\log(x + 1)$ à la place de la transformation $\log(x)$ de la densité parasitaire x . Plus la prévalence parasitaire est basse, moins l'analyse de la densité parasitaire moyenne transformée ainsi est informative par rapport à l'analyse de la prévalence parasitaire et moins elle rend compte de la densité parasitaire (i.e. chez les positifs). Quelle que soit la transformation, il est rare que la distribution des densités parasitaires soit gaussienne.

La densité parasitaire dépend de l'espèce plasmodiale (en moyenne les parasitémies les plus élevées s'observent avec *P. falciparum* et les moins élevées avec *P. malariae*) et est sensible à de nombreux facteurs. Elle augmente avec le niveau de transmission, le niveau de résistance des plasmodiums et pendant la grossesse ou le post-partum (35) et diminue avec l'augmentation du niveau d'immunité, l'utilisation d'antipaludiques efficaces et l'ancienneté de l'infection.

L'incidence des infections plasmodiales

L'incidence des infections plasmodiales, i.e. le nombre de nouvelles infections pendant une période de temps donnée, peut être estimée directement, par exemple en dénombrant les parasitémies patentes, i.e. détectables, chez des patients présentant des symptômes évocateurs de paludisme et recrutés dans les structures sanitaires où ils consultent (détection passive des cas) ou chez eux (détection active des cas). Dans le cadre du programme d'éradication, les nouvelles infections étaient recherchées activement chez les patients et chez les proches des cas de paludisme. Si la population étudiée a une immunité antiplasmodiale, même parcellaire, cette approche aboutit à une sous-estimation de l'incidence des infections. Les nourrissons nés en zone d'endémie sont souvent considérés comme non immuns. Ils peuvent cependant avoir été exposés à des antigènes plasmodiaux ou à des plasmodiums ayant traversé la barrière foeto-placentaire au cours de leur vie foetale (49) ou à la naissance (infection congénitale). L'impact de ces stimulations antigéniques sur l'immunité des nourrissons n'est pas clairement établi mais est probablement faible. En effet, même en zone d'endémie élevée où ces stimulations antigéniques sont supposées être les plus fréquentes et importantes, la quasi-totalité des premières infections plasmodiales des nourrissons s'accompagne de manifestations cliniques (observations personnelles). Ces manifestations cliniques peuvent cependant être peu intenses ou de courte durée au point de passer inaperçues en l'absence d'une recherche active étroite, i.e. quotidienne.

En zone d'endémie, d'autres méthodes sont utilisées. Il peut s'agir de rechercher activement les infections plasmodiales, à intervalles réguliers, chez des individus initialement non infectés comme les nourrissons, en considérant les infections congénitales et l'effet de l'immunité transmise par la mère comme négligeables sur l'occurrence des nouvelles infections plasmodiales. On peut aussi surveiller parasitologiquement le délai de détection d'une parasitémie patente chez des individus traités par

un antipaludique efficace à courte demi-vie (50). Dans ce dernier cas, l'immunité antiplasmodiale acquise retarde la positivation, soit en allongeant les périodes de latence (*i.e.* où les parasitémies sont trop basses pour être détectées) soit en limitant le nombre d'infections plasmodiales (*i.e.* par la destruction des formes pré-érythrocytaires et érythrocytaires des plasmodiums), et entraîne respectivement une sous-estimation de l'incidence réelle des infections plasmodiales et une sous-estimation du taux d'inoculation plasmodiale.

Il est aussi possible de surveiller longitudinalement la patence des infections plasmodiales. Chaque individu suivi est alors classé comme «positif» ou «négatif» à deux temps ou plus. Il s'agit alors d'estimer le taux de positivation (h) mais aussi le taux de négativation (r). Ces estimations font appel à des modèles mathématiques. Le modèle le plus connu est dérivé des modèles catalytiques de Muench (51). A l'issue de deux enquêtes effectuées à un intervalle de temps t , on estime la proportion d'individus devenus positifs à la deuxième enquête parmi ceux qui étaient négatifs à la première enquête ($\alpha=N_{-+}/N_{-}$) et la proportion d'individus devenus négatifs à la deuxième enquête parmi ceux qui étaient positifs à la première enquête ($\beta=N_{+-}/N_{+}$). Les taux h et r sont alors estimés par les formules suivantes : $h = [\alpha/t(\alpha+\beta)] \ln (1/(1-(\alpha+\beta)))$ et $r = [\beta/t(\alpha+\beta)] \ln (1/(1-(\alpha+\beta)))$.

Il est enfin possible d'estimer ces taux à partir des taux de prévalence plasmodiale estimés au cours d'une étude transversale chez des nourrissons (ou des individus initialement négatifs) et analysés en fonction de l'âge (ou de l'ancienneté de l'exposition à la transmission). Pour cela, il est aussi nécessaire de faire appel à des modèles mathématiques.

Pour que les modèles utilisés soient valides, il est nécessaire que leurs hypothèses sous-jacentes soient respectées. Ces hypothèses sont le plus souvent les suivantes : 1) h et r sont constants pendant la période de suivi, sans variation selon l'âge, la saison ou l'espace, 2) les groupes de personnes sont homogènes, sans différence d'immunité ou de traitement, 3) les probabilités de transition (*i.e.* h et r) sont indépendantes des transitions précédentes, 4) l'infection plasmodiale (*i.e.* sa patence) persiste sur l'intervalle de temps t , et 5) la détectabilité des infections est constante dans le temps. Ces conditions sont rarement remplies. Si on considère que les approximations nécessaires pour utiliser ces modèles sont acceptables et constantes dans l'espace ou le temps, ces estimations peuvent cependant être utiles pour comparer différentes situations ou leurs évolutions.

Lorsque le taux d'incidence des infections plasmodiales a pu être estimé chez des jeunes enfants en même temps que le niveau de transmission était estimé par méthodes entomologiques, un écart important a le plus souvent été trouvé. Le ratio des taux d'infections plasmodiales divisés par les taux d'inoculation entomologique variait de 0,07 (lorsque la transmission était faible) à moins de 0,01 (lorsque la transmission était élevée). Cela suggère que moins de 7% à moins de 1% des piqûres d'anophèles infectés aboutiraient à une infection patente. Cet écart est difficilement expliqué par la plus faible exposition des enfants à cause de leur surface corporelle plus petite que celle des adultes capturant les anophèles pour l'estimation entomologique de la transmission. Les explications possibles de cet écart sont : i) une sensibilité insuffisante de la méthode de détection des infections, ii) une proportion inconnue de piqûres «inefficaces» d'anophèles infectés, iii) un niveau d'immunité innée ou acquise plus élevé qu'attendu, iv) l'incidence ignorée de parasitémies latentes *i.e.* à densités parasitaires basses, ou/et v) des guérisons parasitologiques.

L'estimation du taux d'incidence des infections plasmodiales pose donc des problèmes méthodologiques liés à la sensibilité des méthodes de détection parasitaire et des conditions de validité des modèles utilisés. En pratique, elle a rarement été utilisée pour l'évaluation épidémiologique du paludisme ou de l'efficacité de méthodes de lutte.

La réponse immune

La sérologie a un intérêt particulier pour évaluer rétrospectivement l'exposition au paludisme. Les réponses anticorps durent plus longtemps que les infections plasmodiales qui les provoquent. Par ailleurs, dans les situations de faible endémie, la recherche des anticorps antiplasmodiaux est beaucoup plus rapide et moins laborieuse que la recherche des infections plasmodiales. Enfin, en phase d'élimination, lorsque les infections plasmodiales sont exceptionnelles ou inexistantes, ou dans le cadre de la lutte anti-vectorielle, l'analyse des réponses anticorps dirigées contre des antigènes de salive de vecteurs pourrait permettre d'évaluer le contact homme - vecteur, c'est à dire le niveau de risque ou l'efficacité de la lutte.

Méthodes sérologiques

Les méthodes sérologiques de mesure de l'exposition au paludisme reposent sur la recherche d'anticorps dirigés contre des antigènes plasmodiaux. Ces antigènes peuvent être des antigènes natifs présents à la surface ou dans les parasites entiers utilisés en immunofluorescence indirecte (IFI) ou contenus dans des extraits obtenus à partir de parasites en culture et utilisés en ELISA. Ces antigènes peuvent aussi être des protéines recombinantes ou des polypeptides synthétiques. Les antigènes natifs sont généralement des antigènes de stades érythrocytaires asexués, le plus souvent de stades schizontes. Des sporozoïtes entiers ou sous forme d'extraits (52-54) peuvent être utilisés mais leur production nécessite de disposer d'un insectarium, de colonies d'anophèles, d'une souche plasmodiale en culture et de la technique permettant d'infecter le vecteur. Les antigènes synthétiques ou recombinants peuvent être spécifiques des stades pré-érythrocytaires (sporozoïtes et stades hépatiques).

• Immunofluorescence indirecte

Pendant longtemps, la sérologie palustre a reposé sur l'IFI. Il s'agit d'une méthode laborieuse dont le résultat dépend de l'expérience du manipulateur. Elle a l'avantage d'être probablement l'une des méthodes sérologiques les plus sensibles pour mettre en évidence une infection plasmodiale par les stades érythrocytaires (55, 56). Elle se positive généralement dès l'accès de primo-invasion et est le plus souvent positive chez les jeunes enfants vivant en zone d'endémie. Elle est par contre peu spécifique vis à vis des autres espèces de plasmodiums infectant les humains ou les primates non humains pour lesquelles il existe des réactions croisées. Il est ainsi difficile d'attribuer une réponse anticorps détectée en IFI sur des schizontes d'une souche de *P. falciparum* à cette seule espèce plasmodiale. Des individus n'ayant été infectés que par *P. vivax*, *P. ovale* ou *P. malariae* peuvent aussi être positifs *i.e.* à un titre ≥ 20 ou ≥ 40 . La comparaison des titres IFI obtenus sur les quatre espèces plasmodiales humaines ou sur des espèces de plasmodiums de primates proches (à défaut de pouvoir cultiver les plasmodiums humains non-*falciparum*) peuvent permettre de porter un sérodiagnostic plus spécifique, sans certitude cependant. Après une infection, la détection d'une réponse anticorps en IFI peut persister longtemps, plusieurs années à plusieurs dizaines d'années.

• *ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) sur extraits parasitaires*

La technique ELISA peut être utilisée avec des antigènes solubles extraits de schizontes érythrocytaires en culture de *P. falciparum*, avec une plus grande spécificité et apparemment moins de réactions croisées entre espèces plasmodiales. Cette sérologie est cependant moins sensible que l'IFI pour mettre en évidence une infection plasmodiale sanguine (57). Elle se positive généralement plus tardivement après un accès de primo-invasion et reste négative dans une proportion élevée de jeunes enfants vivant en zone d'endémie. En l'absence d'infection continue, la détection de la réponse anticorps en ELISA contre des extraits bruts de schizontes peut disparaître au bout de quelques mois à quelques années. La sensibilité de la méthode est meilleure lorsque l'on utilise comme source d'antigène une souche plasmodiale isolée de la zone d'étude où ont été prélevés les sérums testés, plutôt qu'une souche plasmodiale adaptée depuis longtemps à la culture. L'adaptation à la culture est susceptible de faire perdre certaines spécificités antigéniques de *P. falciparum*.

• *Techniques sérologiques sur antigènes recombinants ou synthétiques*

La technique ELISA et d'autres techniques sérologiques, reposant par exemple sur la technologie Luminex® (détection en cytométrie en flux par des anti-immunoglobulines fluoro-marquées des anticorps reconnaissant des antigènes fixés de façon covalente à des microbilles fluorescentes), peuvent utiliser des antigènes recombinants ou des polypeptides spécifiques d'espèce plasmodiale, de variants d'une même espèce ou/et de stades parasitaires. Il est ainsi possible de faire un sérodiagnostic spécifique d'espèce plasmodiale ou de famille allélique d'un antigène donné. Il est aussi possible de détecter des anticorps dirigés spécifiquement contre des antigènes des stades pré-érythrocytaires ou érythrocytaires des parasites.

Par rapport à l'IFI et à l'ELISA réalisée avec des antigènes natifs, l'ELISA ou les autres méthodes sérologiques réalisées avec des antigènes recombinants ou synthétiques sont généralement moins laborieuses (*i.e.* sans longue étape de microscopie à fluorescence ou de culture et d'extraction d'antigène) et, a priori, plus reproductibles. Elles sont par contre souvent moins sensibles. En effet, une réponse anticorps d'un individu ne concerne généralement pas tous les antigènes figurés et les épitopes (*i.e.* régions de l'antigène reconnues par les anticorps) présents sur les antigènes artificiels peuvent différer de ceux présents sur les antigènes natifs. Il est donc nécessaire d'utiliser une combinaison de plusieurs des versions artificielles de ces antigènes pour «approcher» la réponse anticorps globale contre l'ensemble des antigènes natifs (58). Par ailleurs, la détection de ces anticorps sur des antigènes recombinants ou synthétiques est souvent plus labile que sur les antigènes natifs présents sur les parasites entiers ou dans des extraits. Néanmoins, les réponses anticorps contre des antigènes artificiels ont été associées au niveau d'exposition à la transmission (59) ou à la survenue d'épisodes récents de paludisme clinique. Les titres en anticorps varient avec le niveau d'exposition à la transmission ou avec la durée et l'importance des infections plasmodiales.

• *Echantillons biologiques*

Les échantillons de sang utilisés pour la sérologie peuvent être collectés et conservés sous forme de plasma, de sérum ou de tâches de sang sur papier filtre. Ils doivent être conservés de préférence congelés ($\leq -20^{\circ}\text{C}$) en évitant les décongelations itératives.

Sur papier filtre, il est important de bien sécher les échantillons avant de les stocker, de préférence avec un dessiccateur et congelés ($\leq -20^{\circ}\text{C}$)(60). La conservation à température ambiante n'est assurée que pour de très courtes périodes.

Analyse des données séro-épidémiologiques

Les réponses anticorps contre des antigènes plasmodiaux ou salivaires peuvent être analysés comme la prévalence parasitaire dans des études longitudinales ou transversales. Les mêmes modèles mathématiques devraient être utilisés si les mêmes conditions de validité sont remplies. Il existe cependant des différences importantes liées 1) à la durée de la persistance des réponses anticorps patentes après une infection plasmodiale et 2) à la transmission transplacentaire des immunoglobulines G (IgG) de la mère à l'enfant et de la persistance de ces IgG maternelles chez l'enfant plusieurs mois après la naissance. De ce fait, les études séro-épidémiologiques reposant sur la détection des IgG et visant à apprécier le niveau d'exposition au paludisme ne devraient pas être menées chez les nourrissons (âge < 1 an). Il est par contre possible d'utiliser des taux de prévalence en fonction de l'âge ou de l'ancienneté d'exposition chez des enfants ou des individus plus âgés. En supposant le taux d'incidence des séroconversions h constant et l'absence de séronégativisation ($r=0$) sur le pas de temps t considéré par l'étude, le taux de prévalence à l'âge t (ou après une durée t d'exposition) est égal à $1-e^{-ht}$ d'après un modèle catalytique irréversible de Muench.

Les études longitudinales, *i.e.* avec plusieurs mesures sérologiques par individu, peuvent être analysées soit en considérant la positivité de chaque échantillon et toutes les transitions possibles entre les états «négatifs» et «positifs» pour chaque couple d'échantillons individuels (*i.e.* $- \Rightarrow +$, $+ \Rightarrow -$, $- \Rightarrow -$ et $+ \Rightarrow +$), soit en considérant le titre en anticorps et les variations de ces titres (*i.e.* augmentation, diminution ou stabilité du titre) entre deux échantillons individuels. Dans tous les cas, il est nécessaire de définir des seuils, soit de positivité pour un échantillon isolé, soit d'augmentation ou de diminution significative des titres. Les seuils de positivité sont généralement estimés sur des échantillons de personnes n'ayant jamais été exposées aux plasmodiums ou à leurs vecteurs (*e.g.* par la moyenne plus 3 écart-types des titres normalisés en anticorps des individus non-exposés). Le seuil définissant les augmentations et les diminutions significatives des titres en anticorps peuvent être estimé chez des individus initialement non exposés et restant non exposés pendant une période de temps t (*e.g.* respectivement par la moyenne plus 3 écart-types et par la moyenne moins 3 écart-types de la variation normalisée des titres en anticorps entre le début et la fin de la période t). On fait alors l'hypothèse que les variations relatives des titres en l'absence d'exposition et à niveau d'exposition constant au paludisme et à ses vecteurs sont égales (*i.e.* ratio égal à un ou différence égale à zéro) et de même variance. Cette hypothèse est difficile à vérifier. Il faudrait pour cela étudier les variations des titres en anticorps chez des individus initialement exposés et restant exposés de façon constante au paludisme pendant une même période de temps. Il est cependant difficile, en pratique impossible, de s'assurer que ces individus resteront exposés au paludisme à un niveau constant, *i.e.* sans traitement antipaludique, ce qui pose un problème éthique et sans variation de l'exposition à la transmission ne serait-ce que saisonnière. Le calcul des seuils repose souvent sur une combinaison de la moyenne et de l'écart-type (*e.g.* moyenne plus 3 fois l'écart-type). Cela repose sur l'hypothèse implicite de normalité de la distribution de la variable considérée. Si cette

hypothèse n'est pas vérifiée, il convient de normaliser la distribution en appliquant une transformation (*e.g.* transformation logarithmique pour les distributions «contagieuses» ou agrégées, racine carrée pour les distributions de Poisson ou de dénombrement, arc-sinus de la racine carrée pour les fréquences et pourcentages, ou transformation de Box et Cox dans les situations plus complexes). Le seuil est alors calculé sur la variable transformée, puis il est rétro transformé pour être exprimé dans l'unité de la variable initiale.

En définissant les seuils de positivité par la moyenne plus 2, 3 ou 4 écart-types de la variable chez les individus non exposés (*i.e.* réellement négatifs), on s'attend à trouver des faux positifs (*i.e.* > seuils) chez respectivement 2,275 %, 0,135 % (environ 1/1000) et 0,0032 % (environ 3/100 000) des non exposés, c'est à dire à des spécificités respectivement de 97,725 %, 99,865 %, et 99,997 %.

Interprétation des données sérologiques selon les antigènes utilisés

• Antigènes de stades érythrocytaires

Les titres d'anticorps dirigés contre des antigènes de stades sanguins donnent une indication du niveau de contact, présent ou passé, des individus avec les parasites aux stades sanguins, c'est à dire de l'importance et de la durée de l'infection (61). En absence de chimioprophylaxie, de traitements présomptifs répétés des fièvres par des antipaludiques ou de traitements préventifs intermittents, la prévalence des réponses anticorps chez les jeunes enfants (*i.e.* < 2 ans) donne des indications sur l'intensité récente de la transmission à laquelle ils ont été exposés. La réponse en anticorps contre les antigènes de stades érythrocytaires peut cependant être atténuée ou empêchée par l'utilisation de médicaments antipaludiques efficaces contre les stades sanguins, *e.g.* par une chimioprophylaxie, des traitements présomptifs des fièvres par antipaludiques ou des traitements préventifs intermittents (62).

• Antigènes de stades pré-érythrocytaires

La réponse en anticorps contre les antigènes de stades pré-érythrocytaires révèle l'exposition à des sporozoïtes, *i.e.* des piqûres d'anophèles infectés, ou/et aux stades hépatiques du parasite. Étant donné les difficultés logistiques d'obtention de ces antigènes natifs, la sérologie utilise le plus souvent des antigènes des stades pré-érythrocytaires recombinants ou synthétiques.

Il est généralement considéré que les réponses immunes contre les stades hépatiques des plasmodiums sont essentiellement à médiation cellulaire, faisant peu intervenir les anticorps. Les réponses anticorps contre ces antigènes sont généralement peu importantes et souvent labiles, en particulier chez les individus peu exposés (*e.g.* en zone de paludisme épidémique ou chez les voyageurs). En zone de faible endémie, une diminution de la transmission s'accompagne après 2 à 3 mois d'une diminution du titre d'anticorps anti-plasmodiaux (63). Chez des adultes ayant été exposés à une transmission intense et prolongée les anticorps contre les antigènes natifs de stades pré-érythrocytaires peuvent cependant perdurer plusieurs années (52).

Lorsque les amino-8-quinoléines, *e.g.* la primaquine, sont peu ou pas utilisés en prophylaxie, l'utilisation des médicaments antipaludiques n'altère pas les réponses anticorps contre les antigènes des stades pré-érythrocytaires (58, 62). Ces réponses anticorps peuvent être utilisées comme des marqueurs sérologiques de l'exposition à la transmission des plasmodiums sans être biaisées par l'utilisation de médicaments antipaludiques. L'antigène de stade pré-érythrocytaire le plus fréquemment utilisé pour évaluer l'exposition

à la transmission a été la circum- sporozoïte protéine (CSP), en particulier des polypeptides synthétiques reproduisant en tandem les répétitions NANP de l'épitope B dominant (53, 54, 58, 64-68). Les réponses anticorps contre cet antigène sont corrélées au niveau et à la durée d'exposition à la transmission mais elles ne sont pas nécessairement corrélées aux infections plasmodiales sanguines ou aux réponses anticorps contre des antigènes des stades sanguins. Elles sont labiles et disparaissent rapidement, généralement en moins d'un an, en l'absence d'exposition à la transmission (68). Les réponses anticorps contre la CSP peuvent donc être utilisées pour estimer l'exposition récente à la transmission, que ce soit chez les populations vivant en zone d'endémie (53, 54, 64-68) ou chez les voyageurs exposés brièvement (58).

Pour évaluer l'exposition à la transmission, des combinaisons d'antigènes de stades pré-érythrocytaires (*e.g.* TRAP, SALSA, STARP, GLURP, LSA1, LSA3, SR11.1...), en plus de la CSP, peuvent et devraient être utilisées car la CSP n'est pas l'antigène de stade pré-érythrocytaire le plus souvent reconnu par les anticorps acquis naturellement (52, 58).

Les réponses anticorps contre ces antigènes peuvent être utilisés comme marqueurs épidémiologiques d'exposition à la transmission au niveau des populations. Leur utilisation au niveau individuel peut être plus discutable car des variations importantes de réponses ont été observées entre individus considérés comme étant également exposés à la transmission (64, 69, 70), sans pouvoir exclure qu'en fait il existe des différences interindividuelles importantes d'exposition aux piqûres de moustiques.

• Antigènes de salive ou de glandes salivaires d'anophèles vecteurs

Les méthodes entomologiques ne sont pas conçues pour estimer le niveau individuel d'exposition aux vecteurs de paludisme et elles ne sont pas toujours utilisables, en particulier rétrospectivement chez les voyageurs ou pour évaluer les méthodes de protection individuelle contre les moustiques. La sérologie contre les plasmodiums permet d'estimer le contact homme parasite mais pas directement le contact homme vecteur. Elle est donc soumise aux biais introduits par les mesures de lutte antiplasmodiale.

Plusieurs études ont prouvé que la salive de moustiques était antigénique. Les premières études sur la salive de moustique ont été réalisées sur l'allergie. Ces études ont démontré que les personnes allergiques aux piqûres de moustiques développaient des IgG4 et des IgE dirigées contre des antigènes de salive de moustique (71-76). Récemment, les études ont démontré que des personnes non allergiques séjournant constamment ou au cours d'un voyage en zone d'endémie de paludisme et qui ont été exposées aux piqûres d'anophèles, pouvaient développer des anticorps contre des protéines salivaires d'anophèles (77-81). Les réponses anticorps contre des antigènes de salive d'*Anopheles gambiae* ont été considérées comme un indicateur immunologique du niveau d'exposition aux vecteurs du paludisme et à sa transmission (79). La caractérisation des composés salivaires sécrétés pendant le repas de sang des vecteurs connaît un certain intérêt sur le plan immunologique mais aussi pharmacologique et physiopathologique (82). Plusieurs groupes ont développé des méthodes pour analyser les composants des glandes salivaires (83, 84). Peu nombreux ont été ceux qui ont étudié les composants de la salive de moustiques à cause de la quantité limitée de salive qui peut être obtenue à partir des moustiques (78, 79, 83). Des efforts ont donc été faits pour obtenir des antigènes salivaires recombinants et synthétiques utilisables en sérologie pour évaluer le contact homme vecteur. C'est le cas d'antigènes artificiels dérivés de la protéine salivaire gSG6 d'*An. gambiae* (85).

L'analyse des réponses immunes contre des antigènes de salive d'arthropodes, sous forme native, recombinante ou synthétique pourrait donc être utilisée pour évaluer l'importance de l'exposition aux vecteurs de paludisme et l'efficacité de la lutte antivectorielle, indépendamment de la transmission des plasmodiums.

La morbidité attribuable au paludisme

Plus de 110 ans après la découverte de l'agent du paludisme (A. Laveran en 1880) et de sa transmission par des moustiques (R. Ross en 1898), on pourrait croire que pratiquement tout est connu sur l'épidémiologie du paludisme. Paradoxalement, il n'en est rien. Ce n'est que depuis une trentaine d'années que son étude s'est particulièrement focalisée sur la morbidité. Pendant longtemps, la plupart des études ont porté sur la distribution des infections plasmodiales dans les populations. Cela était justifié à l'époque de l'éradication où le parasite et sa transmission étaient la cible de la lutte. Actuellement c'est la prévention de la morbidité et de la mortalité qui est l'objectif des stratégies de lutte.

Il n'existe pas de signe pathognomonique du paludisme et les signes et symptômes sont de peu d'utilité dans le diagnostic de paludisme clinique (86). Les accès de fièvre, l'anémie, les signes de gravité comme le coma ou les détresses respiratoires ne peuvent être aisément attribués à une infection plasmodiale dans les populations qui sont infectées la plupart du temps. L'attribution de manifestations cliniques au paludisme est problématique dans les populations exposées régulièrement à la transmission des plasmodiums humains. L'acquisition d'une immunité partielle et labile permettant aux personnes régulièrement infectées de supporter des parasitémiés sans présenter de manifestation clinique est donc un obstacle à l'évaluation de la morbidité palustre en zone d'endémie. L'association positive entre la densité parasitaire et le risque de fièvre permet d'estimer la fraction des accès cliniques attribuables au paludisme. Cependant, aucune méthode diagnostique ou d'évaluation de la morbidité n'est parfaite. Cela a des conséquences importantes pour mesurer le poids du paludisme dans les populations et peut être un obstacle pour évaluer et mettre au point les mesures de lutte.

Le problème du diagnostic et de l'évaluation de la morbidité palustre se pose dans au moins trois circonstances : en santé publique pour l'estimation du poids du paludisme dans les structures sanitaires, en recherche clinique pour l'évaluation des traitements et des mesures prophylactiques (médicaments, vaccins, protections anti-vectorielles) et en recherche fondamentale pour l'étude de la physiopathologie et des déterminants immunologiques et génétiques de la sensibilité clinique au paludisme. Le choix des méthodes de diagnostic et de recrutement des cas dépend des objectifs et des approches, pragmatiques ou explicatives, dont la différence radicale reste souvent insoupçonnée ou ignorée.

Les problèmes de l'évaluation de la morbidité attribuable au paludisme se posent à deux niveaux, celui du diagnostic, c'est à dire de l'attribution de manifestations cliniques à une infection plasmodiale, et celui du mode de recrutement des cas, en populations ou dans les structures sanitaires. Les réponses qui peuvent être apportées à ces problèmes dépendent des objectifs de l'évaluation mais aussi de contraintes propres à l'histoire naturelle du paludisme.

Comment attribuer des manifestations cliniques au paludisme ?

Le paludisme peut être dû à cinq espèces plasmodiales capables d'infecter l'homme, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi*. Dans la suite de notre exposé, nous ne parlerons que du paludisme à *P. falciparum* qui est de loin le plus répandu, responsable de la plus grande partie de la morbidité et de la quasi totalité de la mortalité par paludisme (87).

• Des manifestations cliniques multiformes.

Seuls les stades sanguins du parasite sont pathogènes. La manifestation clinique la plus fréquente est l'accès palustre simple qui comprend généralement un syndrome fébrile avec asthénie, céphalées et embarras gastrique. Il est lié à l'éclatement des hématies parasitées et à la libérations de substances pyrogènes. Cette lyse érythrocytaire et, dans une moindre mesure, une dysérythropoïèse peuvent entraîner une anémie parfois mortelle, notamment chez les enfants les plus jeunes. Il existe enfin d'autres formes graves de paludisme dont la physiopathologie est encore mal connue. Elles comprennent principalement le neuropaludisme avec des manifestations neurologiques centrales, de l'obnubilation au coma profond, les convulsions, la détresse respiratoire, l'œdème aigu du poumon, le choc cardio-vasculaire, l'ictère, l'hématurie ou le syndrome hémorragique. Ces formes graves du paludisme sont rares et ne représentent qu'un faible pourcentage, souvent moins de 2%, des formes cliniques. En l'absence de traitement efficace, les accès palustres simples peuvent parfois se compliquer et devenir graves, mais leur évolution habituelle est la guérison. Le paludisme grave ne peut être considéré comme l'évolution «normale» du paludisme simple car il a une nature physiopathologique fondamentalement différente.

Il n'existe pas de signe pathognomonique du paludisme. Il n'existe pas non plus de manifestation clinique du paludisme sans parasitémie. Théoriquement, il est bien sûr possible que les parasites d'un malade soient tous séquestrés dans les capillaires profonds à un moment donné d'une infection à *P. falciparum* particulièrement synchrones et que la parasitémie périphérique apparaisse nulle à ce moment là. Ce cas est cependant très rare et ne peut durer que quelques heures. Il ne peut pas poser de problème si la méthode de détection des parasites dans le sang est suffisamment sensible et si les recherches sont répétées au bout de 12 à 24 heures.

• Le problème du diagnostic des accès palustres simples en zone d'endémie

Le diagnostic des accès palustres n'est réellement problématique que dans les populations qui sont exposées régulièrement à la transmission des plasmodiums humains.

Chez les individus naïfs comme chez ceux qui sont plus ou moins immuns contre le paludisme, l'évolution naturelle la plus fréquente d'une infection plasmodiale non ou mal traitée est la guérison parasitologique. Elle survient après quelques épisodes de fièvre et le portage d'une parasitémie asymptomatique, marqué par des recrudescences, plus ou moins prolongées et pouvant durer plusieurs mois (39).

Chez les individus naïfs ou peu immuns qui vivent en zone non endémique ou de faible endémie (< 1 piqûre infectante par personne par an), les parasitémiés à *P. falciparum* s'accompagnent dans la plupart des cas, mais pas toujours, d'au moins un épisode de fièvre. Au cours de ces accès de fièvre, les densités parasitaires sont parfois faibles mais leur détection par des moyens appropriés permet d'attribuer avec un risque d'erreur minime les manifestations cliniques à l'infection plasmodiale.

Il en va tout autrement en zone de plus forte endémie. Plus la transmission est importante et régulière, plus le taux de prévalence des infections plasmodiales est élevé. Chez les populations vivant dans les zones où la transmission est intense (plusieurs centaines de piqûres infectées par personne par an) et pérenne, le taux d'infections plasmodiales asymptomatiques est parfois supérieur à 90%. La détection de cette infection ne peut alors pas suffire pour attribuer des manifestations cliniques au paludisme. Il a même été estimé qu'à un taux de prévalence supérieur à 20%, la détection des infections plasmodiales (*i.e.* parasitémie > 0) perdait son intérêt pour le diagnostic du paludisme clinique par manque de spécificité (88). Cependant, la prise en compte de la densité parasitaire, à la place de la seule détection de l'infection plasmodiale, peut améliorer la valeur du diagnostic parasitologique.

- La fraction des fièvres attribuable au paludisme

Il existe une association positive entre la densité parasitaire, c'est-à-dire la quantité de parasites détectables dans le sang, et le risque de fièvre. Ainsi, il est possible d'estimer la proportion des épisodes pathologiques attribuables au paludisme sous la forme de la fraction attribuable (FA) ou fraction étiologique. Chez les malades avec une parasitémie, elle peut être calculée à partir de l'estimation du ratio de risque R de survenue de l'épisode clinique à un niveau donné de parasitémie par rapport à l'absence de parasitémie détectable: $FA = (R-1)/R$. Le risque relatif R peut lui-même être estimé par un odds-ratio (rapport de cotes), à partir de données d'études longitudinales ou cas-témoins. Tom Smith a ainsi proposé d'utiliser un modèle de régression logistique décrivant le risque de fièvre (P) comme une fonction continue monotone et croissante de la densité parasitaire (89). Le logit de P s'écrit alors sous la forme: $\log[P/(1-P)] = \alpha + \beta d^r$, où α et β sont des paramètres estimés à partir des observations, d est la densité parasitaire (ou sa transformation logarithmique) et r la valeur de la puissance de d qui permet le meilleur ajustement des données. En pratique, aucune autre fonction continue de la parasitémie ne décrit mieux la relation entre densité parasitaire et risque de fièvre. Les modèles logistiques ajustés sur des données parasito-cliniques provenant de zones d'endémies comparables sont très semblables. Dans des zones d'endémie très élevée du Sénégal, de Tanzanie, de Côte d'Ivoire et de Papouasie Nouvelle Guinée, avec plus de 80% des enfants porteurs de *P. falciparum*, la valeur de l'exposant r est généralement de l'ordre de 0,80 à 0,84 (89-93). Dans des régions où le niveau de transmission et le taux de prévalence parasitaire est plus faible (environ 50%), la valeur de l'exposant r est plus basse, de l'ordre de 0,5 (92). La valeur de r est enfin proche de 0,2 dans des régions où la prévalence parasitaire est inférieure à 25% (92). L'ajustement de ces modèles permet d'obtenir une estimation $R_d = \exp(\beta d^r)$ du risque relatif de fièvre associé à n'importe quelle densité parasitaire d, les observations sans parasite détecté servant de référence. En pratique, il est aussi possible d'estimer directement (*i.e.* sans avoir recours à la

régression logistique) les odds-ratio R_d de fièvre en fonction de différents niveaux de densités parasitaires analysées en classes (*i.e.* plutôt que comme une variable continue) tel que cela est présenté dans le tableau IV.

$FA_d = (R_d - 1)/R_d$: fraction attribuable estimée à partir de l'odds ratio R_d .

La probabilité que l'épisode pathologique d'un individu fébrile ayant une densité parasitaire non nulle d soit dû au paludisme vaut alors $FA_d = (R_d - 1)/R_d$. Le nombre d'accès palustres parmi un nombre N d'épisodes pathologiques peut être calculé en faisant la somme des N estimations de FA_d (dans le tableau IV, la somme des produits D x FA_d calculé par classe de densité parasitaire d).

Contrairement à la table de calcul du tableau IV, le modèle de régression logistique permet d'estimer les R_d , les FA_d et leurs intervalles de confiance en contrôlant des facteurs de confusion et des interactions (94-96). Il est ainsi possible de prendre en compte l'effet de l'âge, de la saison ou du site de recrutement. Un éventuel effet individu peut aussi être contrôlé dans les modèles de régression logistique à effet aléatoire ajustés sur des données longitudinales (97). Chaque individu est alors pris comme son propre témoin et R_d est une estimation du risque relatif individuel de fièvre associée à la parasitémie.

La simplicité et la transportabilité de cette méthode la rendent particulièrement attrayante. Elle a l'avantage d'utiliser l'ensemble de l'information contenue dans les estimations des densités parasitaires. Elle est particulièrement indiquée pour estimer l'incidence des accès palustres pour évaluer l'efficacité d'une intervention en zone d'endémie élevée. Ce fut le cas pour des essais vaccinaux (90) ou de moustiquaires imprégnées d'insecticide (98, 99). Dans ce type d'essai, on peut cependant craindre que les interventions modifient le niveau d'immunité et la relation entre la densité parasitaire et le risque de fièvre (100). Pour estimer l'incidence des accès palustres, la méthode de la fraction attribuable peut alors être appliquée sur l'ensemble des observations (même critère diagnostique pour l'ensemble des individus) ou séparément sur les différents groupes d'intervention (critères diagnostiques adaptés).

Cette méthode permet enfin d'estimer la sensibilité et la spécificité d'un seuil diagnostique de densité parasitaire en utilisant la FA comme critère de référence (89, 101). Il est cependant préférable d'utiliser l'estimation de l'incidence des accès palustres directement obtenue par la somme des fractions attribuables plutôt que celle déduite de l'utilisation des seuils diagnostiques car, par définition, la valeur diagnostique de ces derniers est inférieure à 100%, la FA servant de référence (92).

- Existence d'un seuil pyrogène de parasitémie dépendant de l'âge et de l'endémie

En 1985, Trape a introduit la notion de seuil pyrogène pour le diagnostic des accès palustres (102). Faisant suite à ce travail initial, une étude a porté sur la nature continue ou discontinue de

Tableau IV. Table de calcul des odds ratios de fièvre en fonction de classes de densités parasitaires et des fractions attribuables pour l'attribution des fièvres au paludisme.

	Asymptomatique (témoins)	Fébrile (cas)	Odd ratio (R_d)	Nb de cas attribués au paludisme ($D \times FA_d$)
Parasitémie = 0	A	B	1	0
Parasitémie de la classe d1	C_1	D_1	$R_{d1} = (AD_1)/(C_1B)$	$D_1 \times (R_{d1} - 1)/R_{d1}$
Parasitémie de la classe d2	C_2	D_2	$R_{d2} = (AD_2)/(C_2B)$	$D_2 \times (R_{d2} - 1)/R_{d2}$
Parasitémie de la classe di	C_i	D_i	$R_{di} = (AD_i)/(C_iB)$	$D_i \times (R_{di} - 1)/R_{di}$
Parasitémie de la classe dn	C_n	D_n	$R_{dn} = (AD_n)/(C_nB)$	$D_n \times (R_{dn} - 1)/R_{dn}$
Total		N		$\sum [D(R_d - 1)/R_d]$

la relation entre la parasitémie et le risque de fièvre (91). Les données parasitologiques et cliniques recueillies au cours de quatre mois d'un suivi quotidien de la population de Dielmo (Sénégal) ont permis de modéliser le risque individuel d'hyperthermie en fonction de la densité parasitaire de *P. falciparum* et de l'âge par régression logistique à effet aléatoire. Le genre, le type d'hémoglobine (AA ou AS), le niveau de transmission ou la prise d'antipaludiques étaient contrôlés. L'analyse a montré que le risque de fièvre augmentait avec la densité parasitaire et, à densité parasitaire égale, augmentait avec l'âge. En d'autres termes, les densités parasitaires associées à une hyperthermie étaient plus basses chez les adultes que chez les enfants. La fonction continue qui permettait le mieux de décrire les données était la fonction puissance 0,82ième de la parasitémie, mais la relation entre densité parasitaire et risque de fièvre n'était pas décrite de façon satisfaisante. Dans les travaux précédents, l'hypothèse de discontinuité de cette relation n'avait pas été testée. L'existence d'un effet seuil de la densité parasitaire sur le risque de fièvre a été démontrée ($p < 10^{-6}$) dans cette nouvelle étude. L'odds ratio d'hyperthermie d'un individu était de 44 (intervalle de confiance à 95%: 13,6-144,8) lorsque sa densité parasitaire dépassait le niveau d'un seuil dépendant de l'âge. En deçà ou au dessus de ce seuil, le risque de fièvre variait peu. Un résultat similaire a été obtenu en définissant la fièvre par l'existence d'un syndrome fébrile sans nécessairement une hyperthermie enregistrée, par une hyperthermie supérieure ou égale à 37,7°C ou supérieure ou égale à 38°C. L'absence d'effet individuel significatif montrait enfin que les différences de niveau du seuil entre individus étaient suffisamment faibles pour permettre son utilisation dans l'ensemble de la population de Dielmo. Parmi les 8 636 observations simultanées de la parasitémie et de l'état clinique faites chez les 247 habitants du village, seulement 0,4% (36/8 636) avaient une densité parasitaire supérieure au seuil tout en étant en période asymptomatique, c'est à dire qu'aucune manifestation clinique évocatrice du paludisme n'avait été enregistrée au cours des 3 jours précédant et suivant la réalisation de l'examen parasitologique. La spécificité de ce seuil était donc supérieure à 99%.

La démonstration de l'existence d'un effet seuil pyrogène de la parasitémie et la détermination du niveau de ce seuil en fonction de l'âge ont permis d'attribuer sans ambiguïté les épisodes pathologiques observés à Dielmo au paludisme. Dans cette population homogène en terme d'exposition à la transmission, un accès palustre est défini par des manifestations cliniques (pas seulement une hyperthermie) associées à une densité parasitaire supérieure au seuil correspondant à l'âge du malade. Cette définition a été utilisée tant pour la recherche clinique que pour l'étude de l'acquisition de l'immunité antipalustre (35, 103-111).

Il est à présent généralement admis que les manifestations cliniques du paludisme surviennent au cours de pics parasitémiques lorsque la densité parasitaire dépasse un seuil pyrogène. Les accès palustres peuvent donc être définis par l'association de manifestations cliniques avec une densité parasitaire significativement supérieure aux densités parasitaires habituellement observées dans la population de la même zone (*i.e.* exposée au même niveau de transmission, avec la même régularité) et du même âge (*i.e.* ayant acquis un niveau d'immunité équivalent). Le seuil diagnostique peut être déterminé par l'étude des densités parasitaires en périodes asymptomatiques et en périodes fébriles, dans le cadre d'études longitudinales ou d'études cas-témoins. Il permet le diagnostic des accès palustres simples avec à la fois une bonne sensibilité et une excellente spécificité.

A titre indicatif, les seuils utilisés pour le diagnostic des accès palustres varient dans la littérature selon le niveau d'endémicité et l'âge des patients, de 100 à plus de 20 000 parasites/ μ L. Des seuils à 1 000, 5 000 et 10 000 parasites/ μ L ont souvent été utilisés (Tableau V, tiré de (92)).

- Intérêts et limites de l'utilisation de la parasitémie pour le diagnostic des accès palustres simples

L'observation occasionnelle de densités parasitaires très élevées en l'absence de symptôme et la variabilité de la parasitémie ont souvent été des arguments contre l'utilisation de la densité parasitaire pour le diagnostic des accès palustres simples (112-114). Des études parasito-cliniques longitudinales quotidiennes d'enfants et d'adultes n'ont pas permis d'associer clairement une parasitémie initialement élevée et la survenue ultérieure d'hyperthermie. L'absence de prise en compte des signes cliniques de fièvre autres que l'hyperthermie (par exemple: sensation de corps chaud, frissons, sueurs), pendant et surtout avant le suivi, limitent la portée de ces études. En effet, la persistance de parasitémies élevées et asymptomatiques pendant des jours et des semaines après un accès palustre pas ou incomplètement traité est connue depuis les expériences de malariathérapie (40) et les observations longitudinales des infections naturelles (109, 115, 116). Le schéma d'étude utilisé et l'absence de prise en compte de cette particularité de l'infection plasmodiale ne permettaient donc pas de conclure correctement à l'association entre densité parasitaire et risque de fièvre.

Il est clair cependant qu'un seuil parasitémique ne peut être utilisé partout. En effet, le niveau d'endémie et le niveau d'immunité anti-palustre acquise par les individus peuvent varier de façon importante sur de petites distances. Ainsi, les personnes venant consulter dans une structure sanitaire peuvent être originaires de sites qui diffèrent par des niveaux de transmission variant d'un facteur 100, de l'hypo- à l'hyper-endémicité. Dans ces conditions, il deviendrait hasardeux d'utiliser un seuil parasitologique adapté pour certains patients mais inadapté pour d'autres, sans avoir la possibilité de choisir avec certitude, face au malade, le « bon critère diagnostique ».

La microscopie ou les tests rapides par immunocapture d'antigènes plasmodiaux sont parfois disponibles dans les structures sanitaires périphériques des zones d'endémie. On peut se demander quelle place ils peuvent avoir pour le diagnostic des accès palustres (88). Les tests rapides ont des qualités, un coût et une facilité d'utilisation sur le terrain ne nécessitant pas une formation longue et difficile comme celle des microscopistes, qui permettent leur intégration dans les procédures de prise en charge des malades de pays en développement (5, 6). Leur capacité de détection des infections plasmodiales (sans l'estimation de la densité parasitaire que permet l'examen microscopique) les rendent particulièrement attractifs pour sélectionner les malades fébriles relevant d'un traitement antipaludique dans les zones de faible endémie, comme la plupart des grandes villes subsahariennes qui rassemblent une proportion croissante des populations africaines, dans des camps de réfugiés ou au cours d'épidémies. Dans les zones de forte endémie (en pratique dès que le taux de prévalence des infections plasmodiales patentes dépasse 20%), ces tests rapides et la microscopie révèlent des infections plasmodiales chez de nombreux habitants malades ou asymptomatiques et ont donc une spécificité insuffisante pour être utiles dans la prise en charge des patients (88). La densité parasitaire, lorsqu'elle est utilisable, permet dans ces cas d'estimer la part des fièvres attribuables au paludisme. Dans les zones de faible endémie, en pratique lorsque le taux de prévalence

des infections plasmodiales patentes est inférieur à 20 %, la simple mise en évidence d'une infection plasmodiale patente (*i.e.* indépendamment de la densité parasitaire) peut être utile pour le diagnostic de paludisme clinique et le choix de l'administration d'un traitement antipaludique.

- Place des algorithmes cliniques pour le diagnostic des accès palustres simples

La prise en compte de signes cliniques et de symptômes autres que l'hyperthermie a été proposée pour surmonter la difficulté du diagnostic du paludisme clinique. Dans une revue,

Tableau V. Niveaux de seuils de parasitémiés à *P. falciparum* pour le diagnostic des accès palustres.

Pays (lieu)	Endémie	Population d'étude	Age	Seuil de densité parasitaire	Réf.
Pakistan (4 villages, Punjab)	Hypoendémie (< 1 PIHan)	Cas : consultant fébrile Témoin : consultant non fébrile	Enfants & adultes	$< 1\ 000/\mu\text{L}$	(144)
Burkina Faso (Bobo-Dioulasso)	Hypo-mésioendémique (0,14 à 4,6 PIHan)	Cas : consultant fébrile (Tr ou To $\geq 38^\circ\text{C}$) Témoin : consultant apyrétique	< 15 ans Adultes	15 000/ μL 500/ μL	(145)
Ghana (Prampam)	Hypo-mésioendémique (8,5 PIHan)	Cas : population fébrile (Ta $\geq 37,5^\circ\text{C}$) (pris comme leurs propres témoins) Témoin : population asymptomatique	< 12 mois 12-23 mois	100/ μL 3 500/ μL	(146)
Bénin (Villages de la côte)	Mésioendémique (IP 41%)	Cas : population et consultant fébrile (Ta $\geq 37,5^\circ\text{C}$) ou histoire de fièvre Témoin : idem précédemment	< 12 mois 12-23 mois	100/ μL 1 700/ μL	
Bénin (Villages de la côte)	Mésioendémique (IP 41%)	Cas : population fébrile (Tr $\geq 38^\circ\text{C}$) Témoin : population asymptomatique	< 3 ans	1 000/ μL	(147)
Gambie (Villages de la zone de Farafenni)	Mésioendémique (IP 26 à 34%)	Saison des pluies: Cas : population fébrile (Ta $\geq 37,5^\circ\text{C}$) Témoin : population asymptomatique	< 7 ans	5 000/ μL (pas proposé comme seuil)	(148)
Papouasie- Nouvelle Guinée (Wosera, 10 villages)	Mésio-hyperendémique (IP 49 à 70%)	Cas : population fébrile (Ta $\geq 37,5^\circ\text{C}$) ou histoire de fièvre; Témoin : population asymptomatique	< 5 ans 5-19 ans ≥ 20 ans	1 000/ μL 10 000/ μL 1 000/ μL	(149)
Côte d'Ivoire (région de Korhogo)	Hyperendémique (130 PIHan, IP $\geq 70\%$ nourrissons)	Cas : population fébrile (Ta $\geq 37,5^\circ\text{C}$) ou histoire de fièvre; Témoin : population asymptomatique	0-4 ans 7-9 ans ≥ 10 ans	2 500/ μL 1 000/ μL 100/ μL	(150, 151)
Bénin (Cotonou & villages)	Hyperendémique (IP $> 80\%$, enfants)	Cas : consultant fébrile Témoin : population asymptomatique	0-12 ans Adultes	3 000/ μL 1 000/ μL	(152)
Sénégal (Magobél)	Hyperendémique (IP 35%, enfants et adultes)	Cas : consultant fébrile (T $\geq 38^\circ\text{C}$) Témoin : consultant apyrétique	Enfants & adultes	10 000/ μL	(153)
Burkina Faso (Milieu rural, Sud-Ouest)	Hyperendémique (IP 47,9%, enfants et adultes)	Cas : consultant fébrile (T $\geq 38^\circ\text{C}$) Témoin : consultant apyrétique	Enfants & adultes	10 000/ μL	(154)
Tanzanie	Hyper-holoendémie (IP $> 90\%$)	Cas : population fébrile (Tr $\geq 37,5^\circ\text{C}$) Témoin : population asymptomatique	< 6 ans	5 000/ μL	(89)
Côte d'Ivoire (région de Danané)	Hyper-holoendémie (> 300 PIHan)	Cas : population fébrile (Ta $\geq 37,5^\circ\text{C}$) ou histoire de fièvre; Témoin : population asymptomatique	0-4 ans 5-9 ans ≥ 10 ans	5 000/ μL 1 000/ μL 500/ μL	Assi S., en préparation
Congo (Linzolo+4 villages)	Hyper-holoendémie (> 300 PIHan)	Cas : consultant et population fébrile SCE (Ta $\geq 38^\circ\text{C}$); Témoin : population	< 15 ans	2 / leucocyte ($\approx 13\ 500/\mu\text{L}$)	(102)
Congo (Mayombe, 3 villages)	Hyper-holoendémie (> 300 PIHan)	Cas : consultant fébrile (Ta $\geq 37,5^\circ\text{C}$) Témoin : population apyrétique	< 5 ans 5-10 ans 10-15 ans > 15 ans	19 900/ μL 7 713/ μL 2 372/ μL 537/ μL	(155)
Sénégal (Dielmo)	Hyper-holoendémique (200 PIHan)	Cas : population fébrile (Ta $\geq 37,5^\circ\text{C}$) Témoin : population asymptomatique (pris comme leurs propres témoins)	< 1 an 1 an 2 ans 5 ans 7 ans 10 ans 15 ans 20 ans 30 ans 60 ans	29 400/ μL 32 400/ μL 23 250/ μL 17 100/ μL 13 760/ μL 10 010/ μL 7 800/ μL 6 370/ μL 4 680/ μL 3 380/ μL	(91)

PIHan: Piqûres infectées par personne par an. Tr: température rectale; Ta: température axillaire; To: température orale. SCE: fièvre sans cause évidente. IP: indice plasmodique chez les asymptomatiques

Chandramohan *et al.* ont évalué l'utilité d'algorithmes cliniques pour sélectionner les malades qui ont réellement besoin des traitements antipaludiques (117). Les auteurs concluent que l'approche syndromique du diagnostic des accès palustres n'est pas assez exacte pour décider de l'administration d'antipaludiques à un malade fébrile. En zone de forte endémie où les méthodes de diagnostic parasitologique ne sont pas disponibles ou utilisables, les risques associés aux retards de traitement dépassent les bénéfices attendus de l'économie de médicaments. Le traitement présomptif des fièvres par antipaludiques reste donc approprié dans ces situations si le diagnostic d'accès palustre par excès n'aboutit pas à ignorer d'autres étiologies curables des fièvres et, notamment, des manifestations respiratoires ou neurologiques. Les auteurs admettent que l'approche syndromique pourrait être utile pour sélectionner les patients en vue de la réalisation de tests microscopiques ou de tests rapides, ou en vue de l'administration de médicaments de deuxième ligne, plus efficaces mais plus coûteux. Les algorithmes cliniques mis au point jusqu'à présent pour le diagnostic des accès palustres sont cependant spécifiques des sites où ils ont été élaborés et nécessitent des études de validation pour être utilisés ailleurs ou en routine (117).

• *L'attribution au paludisme de manifestations cliniques graves, de l'anémie et des petits poids de naissance.*

Les cas graves examinés dans les structures sanitaires ont souvent bénéficié de soins et de traitements antipaludiques avant leur admission. L'étude de la relation entre ces manifestations cliniques graves et la densité parasitaire est gênée par ces traitements. Le diagnostic de paludisme grave est généralement porté sur l'association de signes cliniques ou biologiques de gravité, et de la simple observation d'une parasitémie à *P. falciparum*. L'absence de spécificité des manifestations cliniques (troubles de la conscience, convulsions, détresse respiratoire, œdème aigu du poumon, ictère, hémoglobinurie, syndrome hémorragique, choc) et biologiques (anémie) et la fréquence des infections plasmodiales dans les zones de moyenne ou de forte endémie pose les mêmes problèmes diagnostiques que pour les accès palustres simples, sans que l'utilisation de la densité parasitaire permette de trouver une solution.

L'attribution au paludisme de faibles poids de naissance ou d'une anémie (définie par la concentration sanguine en hémoglobine, le dénombrement des hématies ou le taux d'hématocrite) d'origine le plus souvent multifactorielle est encore plus problématique. En pratique, c'est l'amélioration des indices hématologiques et du poids des nouveaux nés après l'administration de traitements ou de mesures préventives spécifiquement antipaludiques qui permet de montrer leur origine palustre. Il s'agit donc d'attribuer ces signes cliniques ou biologiques au paludisme au niveau de groupes plutôt qu'au niveau d'individus.

Comment évaluer la morbidité attribuable au paludisme ?

Le problème de l'évaluation de la morbidité palustre se pose au moins dans trois contextes : en santé publique pour l'estimation du poids de la prise en charge des cas simples et graves de paludisme dans les structures sanitaires, en recherche clinique pour l'évaluation des traitements et des mesures prophylactiques (médicaments, vaccins, protections anti-vectorielles) et en recherche plus fondamentale pour l'étude de la physiopathologie et des déterminants, par exemple immunologiques et génétiques, de la sensibilité clinique au paludisme.

Il ne semble ni possible, ni adapté d'utiliser la même définition diagnostique de la morbidité palustre ou le même système de recueil de données dans chacun de ces contextes.

• *Santé publique : évaluation du poids du paludisme dans les structures sanitaires*

L'évaluation du poids du paludisme pour les systèmes de soins ne peut s'effectuer que dans les structures sanitaires par un recueil passif de données. En pratique, cela consiste à comptabiliser les consultations et les hospitalisations attribuées au paludisme. Les estimations publiées de la morbidité attribuée au paludisme en Afrique et reprises par l'OMS (87) sont généralement obtenues ainsi, sur des bases purement cliniques, sans validation d'algorithmes diagnostiques précis ni utilisation de données parasitologiques. L'expérience a montré que la valeur de ces données était douteuse et qu'elles ne permettaient pas d'évaluer valablement le poids du paludisme ou l'impact des stratégies nationales de lutte. Ces données servent pourtant de référence au niveau national et international (87). Une évaluation fiable devrait reposer sur un système de collecte de données adapté au contexte épidémiologique et aux moyens disponibles plutôt qu'à une méthodologie indifférenciée, commune à l'ensemble des structures sanitaires d'un pays et indépendante de l'endémicité. Dans les situations économiques et sanitaires actuelles, la proportion des cas de fièvre et de formes graves attribuables au paludisme pourrait être évaluée par des enquêtes ad hoc reposant sur une méthode diagnostique valide, dans un échantillon représentatif des structures sanitaires. Pour cela, des individus non fébriles et des consultants pour des pathologies graves d'étiologie non palustre seraient recrutés parmi les consultants de ces structures sanitaires et serviraient de groupe témoin pour l'analyse des densités parasitaires.

• *Recherche clinique : évaluation de l'efficacité de méthodes prophylactiques*

L'efficacité d'une vaccination antipaludique, d'une chimioprophylaxie, d'un nouveau traitement ou d'une méthode de lutte ou de protection anti-vectorielle sur la morbidité palustre peut être évaluée dans les structures sanitaires par un recrutement passif, ou en population par une recherche active des cas. Les objectifs et les contraintes opérationnelles sont différents.

Lorsque l'évaluation est réalisée dans une structure sanitaire avec un recrutement passif, l'objectif est généralement pragmatique. On cherche à savoir si l'intervention permet de diminuer le nombre de cas vus dans les structures sanitaires et donc, implicitement, la charge de travail du système de santé. L'installation d'une équipe de recherche est généralement facilitée par la structure sanitaire. Les cas simples ou graves de paludisme peuvent s'y concentrer. Le recrutement passif tend cependant à sous-estimer fortement l'incidence réelle car la guérison spontanée et rapide des manifestations cliniques simples est fréquente (108, 111) et les habitudes d'automédication répandues. Certaines manifestations graves comme l'anémie peuvent rester indétectables par les familles tandis que d'autres, comme les convulsions ou les troubles de la conscience, peuvent être interprétées comme ayant une origine mystique ne relevant pas du système de santé officiel. Le recrutement passif des cas dans les structures sanitaires est donc plus ou moins fortement biaisé. L'aire de recrutement est généralement mal définie et peut être très étendue pour les formes graves.

La nécessité d'effectifs suffisants pour assurer la puissance souhaitée est un argument souvent avancé pour faire reposer l'évaluation d'une nouvelle méthode de prévention ou de traitement sur

un recrutement passif des cas dans des structures sanitaires où ils se rassemblent. Il n'est cependant pas évident que cette démarche soit toujours valide. L'augmentation de la taille des échantillons et donc de l'aire de recrutement se fait le plus souvent au détriment de l'homogénéité des populations échantillonnées en termes d'exposition à la transmission, d'acquisition d'une immunité naturelle et donc de critères diagnostiques. Ce dernier point est crucial. La puissance d'une comparaison d'incidence de la morbidité dépend plus de la spécificité du critère diagnostique que de sa sensibilité (118). Il est possible qu'une part importante de la puissance que l'on espère gagner en recrutant plus de cas dans des structures sanitaires très fréquentées soit perdue à cause des erreurs diagnostiques liées à l'hétérogénéité des populations échantillonnées et à l'inadaptation de critères diagnostiques pas assez spécifiques. Évaluer l'endémicité et définir un critère diagnostique pour chacune des populations recrutées entraînerait une surcharge de travail et diminuerait l'intérêt du recrutement dans les structures sanitaires.

Les études en population sont parfois plus difficiles à mettre en œuvre mais elles apportent souvent des informations de meilleure qualité. Il existe plusieurs bonnes raisons d'étudier de petites populations exposées naturellement au paludisme en recherche clinique. En faisant l'hypothèse que l'effet d'un vaccin, d'un médicament ou d'une nouvelle méthode de protection antivectorielle est sensiblement le même quels que soient les individus étudiés, la représentativité de l'échantillon importe moins que son homogénéité. Nous sommes alors dans une approche plus explicative que pragmatique (119). Il s'agit de démontrer l'effet de l'intervention dans des conditions optimales. Plus l'échantillon étudié est homogène, plus la puissance de l'étude est susceptible d'être élevée. La recherche active des cas a aussi plusieurs avantages. Le nombre d'épisodes cliniques détectés est généralement supérieur à celui des épisodes détectés passivement (111). Par ailleurs, la recherche active des cas limite les biais de recrutement. Dès les premières infections plasmodiales, l'acquisition d'un certain niveau d'immunité peut se traduire par la survenue d'accès palustres courts (108), potentiellement auto-résolutifs sans traitement antipaludique spécifique. Ces épisodes cliniques ont moins de chance d'être observés dans les structures sanitaires, par dépistage passif, que les épisodes plus longs. Ils font perdre moins de jours de santé, mais ils pèsent cependant, par leur nombre, sur la santé des populations et sont à l'origine d'auto-traitements onéreux qui favorisent l'émergence de résistances aux antipaludiques (120). Les essais qui ne prennent pas en compte ces formes cliniques peuvent donc fournir une estimation biaisée de l'efficacité de vaccins ou de mesures prophylactiques sur la santé réelle des populations. La surveillance active des personnes participant à l'étude permet enfin de leur assurer une meilleure sécurité contre l'évolution des accès palustres simples et contre les effets indésirables graves ou fugaces des interventions testées.

Le choix du mode de recrutement des cas et de la méthode d'attribution de la morbidité au paludisme dépend donc étroitement de l'approche, pragmatique ou explicative, qui est choisie. Lorsque cette distinction n'est pas explicite, il peut exister une inadéquation entre le schéma d'étude et son objectif réel. De ce point de vue, l'exemple des essais de vaccins antipaludiques est éloquent. Plus d'une cinquantaine de vaccins contre le paludisme sont en développement, encore au stade de validation du concept et de la démonstration d'une efficacité clinique. Aucun modèle animal ne permettant de choisir les meilleurs candidats, il est actuellement admis que seuls des essais chez les humains permettraient de cribler ces vaccins. Paradoxalement, les essais de phase IIb actuellement réalisés font généralement appel à plusieurs centaines voire

à plus d'un millier d'enfants. Cette taille d'échantillon est liée au recrutement passif dans des structures sanitaires qui limitent le taux d'incidence observable et à l'analyse du seul premier accès palustre enregistré pendant le suivi de chaque individu. Ce schéma d'étude limite le nombre d'études qui pourraient être menées à cause de leur taille et de leur coût. Il réduit par conséquent la probabilité de découverte d'un vaccin efficace et allonge le délai de sa mise au point. Ainsi, avec un taux d'incidence d'accès palustres dans le groupe témoin prévu à 0,11 accès par enfant en 6 mois, une puissance de 80 % et une efficacité attendue de 50 %, un essai de phase II publié (121) nécessitait le recrutement de 1 402 enfants. Dans une situation épidémiologique comparable, dans des populations du Sénégal suivies depuis plus de 10 ans (109, 116) avec une détection active des cas par visite quotidienne des maisonnettes et une analyse de l'incidence des accès palustres en régression de Poisson, une cinquantaine d'enfants (0-4 ans) suffiraient pour avoir 90 % de chance de détecter une efficacité de 50 %. Il est vrai que pendant le semestre où la transmission est la plus élevée, le taux moyen d'incidence des accès palustres enregistré dans ce groupe d'âge est de l'ordre de 270 % (2,7 accès par enfant en 6 mois). Cette analyse du nombre total des accès palustres, en régression de Poisson, suppose que l'on admette que plusieurs accès palustres successifs survenant chez un même individu sont indépendants les uns des autres conditionnellement à l'individu. Cette hypothèse est difficilement vérifiée. Elle empêche, dans la plupart des essais cliniques actuels, de considérer le nombre total d'accès palustres comme le critère principal d'évaluation à la place du délai de survenue d'un premier accès (122, 123).

• *Recherche fondamentale : évaluer la morbidité pour comprendre ses déterminants.*

Lorsque il s'agit d'étudier la physiopathologie des accès palustres simples ou graves, ou d'identifier les déterminants immunologiques ou génétiques de la sensibilité clinique au paludisme, l'approche est explicative. Les travaux devraient idéalement être menés en population avec une recherche active des cas. Le critère diagnostique devrait être le plus spécifique possible et reposer sur une analyse précise de la relation entre l'infection plasmodiale et les manifestations cliniques. Cela est réalisable pour l'étude longitudinale de la morbidité palustre simple en population. Cela n'est pas possible pour les formes graves du paludisme. Leur incidence est faible en comparaison de celle des formes simples. Les effectifs suivis devraient donc être importants pour obtenir une puissance suffisante. La recherche active des cas impliquerait cependant de traiter efficacement tous les accès palustres simples diagnostiqués et donc d'empêcher leur évolution vers des formes graves. Cela rend pratiquement impossible l'étude du paludisme grave en population par un dépistage actif et complique la définition de critères de diagnostic spécifiques.

La recherche d'une association entre des facteurs génétiques ou des réponses immunologiques et la sensibilité clinique au paludisme nécessite en pratique d'évaluer la morbidité palustre au niveau individuel. La méthode de la fraction attribuable pour le diagnostic se prête mal à ce type d'étude. Par ailleurs, l'âge peut être un puissant facteur de confusion associé à la fois au niveau de réponse immunologique et à la sensibilité clinique au paludisme. L'âge doit donc être systématiquement contrôlé lorsque l'on veut identifier une réponse immunologique ou un antigène associés à l'immunité clinique antipalustre (103, 105). Pour les études génétiques, la définition des phénotypes de sensibilité clinique au paludisme doit aussi tenir compte de l'âge auquel les individus ont été suivis et du niveau

de transmission auquel ils ont été exposés dans les semaines précédant les observations. Pour cela, on peut par exemple utiliser l'écart entre le nombre d'accès palustres observés chez chaque individu et le nombre d'accès palustres attendus en moyenne chez les individus du même âge à la même période (124).

• *Choix des populations étudiées : le piège des populations dites «à risque»*

Le choix de l'âge des individus étudiés ou des périodes de suivi peut être crucial et doit être effectué avec prudence. Dans l'étude de la relation entre l'exposition à la transmission de *P. falciparum*, l'acquisition d'une immunité et l'incidence des accès palustres, la restriction des échantillons aux enfants de moins de 5 ans aboutirait à conclure que le poids du paludisme augmente des zones de transmission moyenne (de l'ordre de quelques dizaines de piqûres infectées par personne par an) aux zones de transmission élevée (de l'ordre de centaines de piqûres infectées par personne par an). Cependant, lorsque l'on considère l'ensemble de la population, tous âges confondus, l'incidence des accès palustres simples est clairement supérieure dans les zones de transmission moyenne (125). L'immunité naturelle acquise précocement dans les zones de forte transmission n'est obtenue que bien plus tardivement lorsque la transmission est plus faible. Ce résultat fondamental suggère qu'à long terme, la réduction de la transmission d'un niveau élevé à un niveau moyen pourrait avoir un effet néfaste sur l'incidence globale des accès palustres simples, la forme clinique de loin la plus fréquente.

Sur un autre registre, il est souvent admis que l'augmentation de la sensibilité clinique des femmes enceintes au paludisme serait liée à la sélection au niveau du placenta de populations particulières de *P. falciparum* capables d'adhérer à des récepteurs placentaires. Cette augmentation de la sensibilité au paludisme est clairement démontrée par la comparaison de l'incidence des accès palustres chez des femmes enceintes et des femmes non enceintes du même âge. En comparant l'incidence des accès palustres simples chez des femmes avant et pendant leur grossesse ainsi que pendant leur premier trimestre de post-partum et l'année qui a suivi, il a été possible de démontrer que l'augmentation de sensibilité clinique au paludisme persistait trois mois après l'accouchement (35). Ce résultat remet en cause l'hypothèse de la sélection placentaire des parasites responsables des accès palustres des femmes enceintes.

Le choix des schémas d'étude, des méthodes de diagnostic et de recrutement des cas pour l'évaluation de la morbidité palustre en zone d'endémie dépend donc des objectifs, des formes cliniques considérées, de l'histoire naturelle des infections plasmodiales et de leur relation avec la survenue des épisodes pathologiques. Ce choix dépend aussi de l'approche, pragmatique ou explicative, dont les différences radicales restent souvent insoupçonnées ou ignorées. Cette distinction conditionne l'adéquation des études à leurs objectifs et leur puissance. Elle conditionne ainsi la mise au point de nouvelles méthodes de lutte efficaces contre la morbidité attribuable au paludisme en zone d'endémie.

Mortalité

Plus encore que les formes cliniques graves, l'attribution des décès au paludisme pose des problèmes méthodologiques majeurs (126). Il est tout d'abord important de considérer qu'un décès n'est pas nécessairement attribuable à une seule cause. On parle géné-

ralement de mortalité palustre directe lorsque le paludisme est la cause nécessaire et suffisante des décès et de mortalité palustre indirecte lorsque le paludisme est une cause nécessaire mais pas suffisante au décès.

Mortalité palustre directe

L'estimation de la mortalité palustre directe n'est pas aisée. Il est le plus souvent difficile d'attribuer correctement un décès à une cause. Pour cela, il faudrait que les décès surviennent dans une structure sanitaire pourvue des moyens d'investigation permettant ce diagnostic. En zone d'endémie, la proportion des décès survenant dans des structures sanitaires est souvent faible (< 10 %) et très variable selon l'âge des patients, les présentations cliniques, les lieux et les périodes. Il n'est pas évident non plus que les données cliniques et biologiques qui sont enregistrées dans ces structures permettent un diagnostic de cause de décès fiable.

Les autopsies sont effectuées exceptionnellement en zone d'endémie palustre et il n'existe pas de critère standard et reconnu pour effectuer le diagnostic de décès par paludisme. Lorsqu'elles ont été effectuées, les autopsies ont permis de montrer que les causes réelles de décès attribuées cliniquement au paludisme pouvaient être très différentes. Parmi 31 décès attribués au neuropaludisme dans un hôpital, Taylor *et al.* ont montré que 23 % avaient en réalité un tout autre cause (127). Parmi les signes cliniques, seules des rétinoopathies détectables par l'examen du fond d'œil permettaient, en présence d'une parasitémie patente, d'attribuer correctement les manifestations neurologiques centrales au paludisme (128). Il est probable que l'attribution au paludisme des décès liés aux autres formes graves (*i.e.* autres que le neuropaludisme), sur des bases cliniques et biologiques, ait une spécificité encore moins bonne.

Même si l'on pouvait établir sans erreur la cause palustre de décès survenant dans les structures sanitaires, l'estimation des taux de mortalité se heurterait au problème de définition de la population de référence. En effet, l'aire de recrutement des structures sanitaires n'est généralement pas simple à établir. Il est donc difficile d'estimer les dénominateurs nécessaires pour calculer des taux de mortalité à partir de données hospitalières.

La technique des autopsies verbales consiste à tenter d'identifier la ou les causes de décès selon l'âge du patient, l'histoire clinique de la maladie, et le contexte (*e.g.* saison) du décès rapportés par les proches. Depuis plus d'une quinzaine d'années, de nombreuses études ont porté sur sa validité, sa mise au point et ses résultats pour évaluer la mortalité par paludisme dans différentes situations épidémiologiques (129-143). L'autopsie verbale repose sur une procédure et un questionnaire standardisés. Elle fait l'objet d'un article spécifique de P. Chippaux dans ce numéro de la revue avec présentation de questionnaires utilisés au Sénégal par l'IRD. Les résultats de l'autopsie verbale dépendent des items du questionnaire, de l'examineur (*i.e.* de ses compétences médicales et de sa langue par rapport à celle des personnes interrogées), de l'algorithme de diagnostic, de l'âge du patient et de la forme clinique au moment du décès. Par exemple, le décès d'un enfant de 5 ans, en saison des pluies, dans un tableau de coma fébrile durant depuis plusieurs jours est plus facilement attribuable au paludisme qu'une détresse respiratoire chez un jeune enfant qui peut être confondue avec une pneumopathie ou une anémie qui est difficilement décrite par les proches. Comme les autopsies verbales sont généralement menées en population dans le cadre d'études démographiques, il est facile d'évaluer le dénominateur nécessaire au calcul des taux de mortalité attribuée au paludisme par cette méthode.

Mortalité palustre indirecte

Lorsque il a été possible d'estimer la mortalité palustre totale (*i.e.* directe et indirecte) en comparant la mortalité globale avant et après l'élimination du paludisme d'une zone, on s'est généralement rendu compte qu'elle était environ deux fois plus importante que la seule mortalité palustre directe. Pour l'estimer, il faudrait donc considérer les décès qui auraient été évités (*i.e.* en fait seulement retardés) si le paludisme avait été supprimé, toutes autres choses égales par ailleurs. Ce mode d'évaluation pose le problème de la réelle spécificité des interventions ayant permis d'éliminer le paludisme. Il est difficile d'imaginer que l'amélioration de la prise en charge des malades ne puisse concerner que le paludisme. Même la mise en place de mesures de lutte spécifiques contre les vecteurs du paludisme peuvent aiguïser l'intérêt des populations pour leur santé, améliorer leurs connaissances et leurs comportements préventifs et thérapeutiques, par exemple vis-à-vis des programmes de vaccination ou de la nécessité de consulter rapidement en cas de maladie. Ainsi, ni la spécificité des interventions contre le paludisme ni le maintien de «toutes les choses égales par ailleurs» ne peut être assuré.

Il faut enfin considérer le fait qu'il existe des tendances séculaires d'évolution de la mortalité indépendantes d'une cause unique (*e.g.* liées à l'amélioration de l'hygiène et des conditions de vie), que les causes de décès sont en compétition les unes avec les autres, et que les individus mourant à cause d'une pathologie sont aussi ceux qui, «plus fragiles», seraient aussi décédés d'une autre pathologie. Dans ce domaine, les facteurs de confusion et les biais peuvent être nombreux.

L'évaluation de la mortalité palustre, qu'elle soit directe ou indirecte, pose des problèmes difficiles à résoudre. Evaluer des interventions de lutte antipaludique par leur impact sur la mortalité générale n'est pas satisfaisante non plus. En effet, à cause du manque de spécificité du critère d'évaluation par rapport à l'intervention évaluée, les effectifs nécessaires à ce genre d'étude sont généralement extrêmement importants.

Conclusion

Les méthodes d'évaluation du poids du paludisme dans une population et de l'efficacité de mesures de lutte sont nombreuses. Les plus faciles à mettre en œuvre sont probablement celles qui reposent sur l'évaluation des parasitémies ou des réponses immunes antiplasmodiales dans le cadre d'études transversales ou longitudinales. Cependant, comme l'immunité acquise naturellement permet à la plupart des individus vivant en zone d'endémie de supporter des parasitémies en restant asymptomatiques et que l'attribution des décès au paludisme est difficile, les critères les plus pertinents d'évaluation concernent la morbidité et en particulier les accès palustres simples. La prise en compte de la densité parasitaire dans l'attribution des fièvres au paludisme est complexe mais reste le plus souvent réalisable dans des études longitudinales comme dans des études cas-témoins.

Références

1. WHO. Terminology of malaria and of malaria eradication. Geneva: World health organization; 1963.
2. Hackett LW. Spleen measurement in malaria. *J National Malaria* 1944; 3 : 121-3.

3. De Pina JJ, Garnotel E, Hance P, Vedy S, Rogier C, Morillon M. Diagnostic du paludisme d'importation en France. *Med Mal Infect* 2007; 37 : 710-5.
4. Hawkes M, Kain KC. Advances in malaria diagnosis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2007; 5 : 485-95.
5. Murray CK, Gasser RA Jr., Magill AJ, Miller RS. Update on rapid diagnostic testing for malaria. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21 : 97-110.
6. Wongsrichanalai C, Barcus M, Muth S, Sutamihardja A, Wernsdorfer WH. A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapide diagnostic test (RDT). *Am J Trop Med Hyg* 2007; 77 : 119-27.
7. Rogerson SJ, Mkundika P, Kanjala MK. Diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria at delivery: comparison of blood film preparation methods and of blood films with histology. *J Clin Microbiol* 2003; 41 : 1370-4.
8. O'Meara WP, Barcus M, Wongsrichanalai C, Muth S, Maguire JD, Jordan RG, *et al.* Reader technique as a source of variability in determining malaria parasite density by microscopy. *Malar J* 2006; 5 : 118.
9. WHO. Basic malaria microscopy. Part I. Learner's guide. World Health Organization ed, Geneva, 1991.
10. WHO. Basic malaria microscopy. Part II. Tutor's guide. World Health Organization ed, Geneva, 1991.
11. WHO. Bench aids for the diagnosis of malaria infections. World Health Organization ed, Geneva, 1991.
12. Icke G, Davis R, McConnel W. Teaching health workers malaria diagnosis. *PLoS Med* 2005; 2 : e11.
13. Maguire JD, Lederman ER, Barcus MJ, O'Meara WA, Jordan RG, Duong S, *et al.* Production and validation of durable, high quality standardized malaria microscopy slides for teaching, testing and quality assurance during an era of declining diagnostic proficiency. *Malar J* 2006; 5 : 92.
14. WHO. Informal consultation on quality control of malaria microscopy. WHO/HTM/MAL/2006.1117. World Health Organization ed, Geneva, 2006.
15. Franzén L, Westin G, Shabo R, Aslund L, Perlmann H, Persson T, *et al.* Analysis of clinical specimens by hybridisation with probe containing repetitive DNA from *Plasmodium falciparum*. A novel approach to malaria diagnosis. *Lancet* 1984; 1 : 525-8.
16. de Monbrison F, Angei C, Staal A, Kaiser K, Picot S. Simultaneous identification of the four human *Plasmodium* species and quantification of *Plasmodium* DNA load in human blood by real-time polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003; 97 : 387-90.
17. Perandin F, Manca N, Calderaro A, Piccolo G, Galati L, Ricci L, *et al.* Development of a real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis. *J Clin Microbiol* 2004; 42 : 1214-9.
18. Snounou G. Detection and identification of the four malaria parasite species infecting humans by PCR amplification. *Methods Mol Biol* 1996; 50 : 263-91.
19. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, *et al.* High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 61 : 315-20.
20. Calderaro A, Piccolo G, Perandin F, Gorrini C, Peruzzi S, Zuelli C, *et al.* Genetic polymorphisms influence *Plasmodium ovale* PCR detection accuracy. *J Clin Microbiol* 2007; 45 : 1624-7.
21. Anderson TJ, Haubold B, Williams JT, Estrada-Franco JG, Richardson L, Mollinedo R, *et al.* Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol* 2000; 17 : 1467-82.
22. Anderson TJ, Su XZ, Bockarie M, Lagog M, Day KP. Twelve microsatellite markers for characterization of *Plasmodium falciparum* from finger-prick blood samples. *Parasitology* 1999; 119 : 113-25.
23. Bogreau H, Renaud F, Bouchiba H, Durand P, Assi SB, Henry MC, *et al.* Genetic diversity and structure of African *Plasmodium falciparum* populations in urban and rural areas. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 74 : 953-9.
24. Bottius E, Guanzirolli A, Trape JF, Rogier C, Konate L, Druilhe P. Malaria: even more chronic in nature than previously thought; evidence for subpatent parasitaemia detectable by the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 90 : 15-9.
25. Doudier B, Bogreau H, DeVries A, Poncon N, Stauffer WM 3rd, Fontenille D, *et al.* Possible autochthonous malaria from Marseille to Minneapolis. *Emerg Infect Dis* 2007; 13 : 1236-8.
26. Konaté L, Zwetyenga J, Rogier C, Bischoff E, Fontenille D, Tall A, *et al.* Variation of *Plasmodium falciparum* msp1 block 2 and msp2 allele prevalence and of infection complexity in two neighbouring Senegalese villages with different transmission conditions. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93 : 21-8.

27. Ntouni F, Contamin H, Rogier C, Bonnefoy S, Trape JF, Mercereau-Puijalon O. Age-dependent carriage of multiple *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 alleles in asymptomatic malaria infections. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 52: 81-8.
28. Ntouni F, Rogier C, Dieye A, Trape JF, Millet P, Mercereau-Puijalon O. Imbalanced distribution of *Plasmodium falciparum* MSP-1 genotypes related to sickle-cell trait. *Mol Med* 1997; 3: 581-92.
29. Rogier C, Pradines B, Bogreau H, Koeck JL, Kamil MA, Mercereau-Puijalon O. Malaria epidemic and drug resistance, Djibouti. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 317-21.
30. Snounou G, Beck HP. The use of PCR genotyping in the assessment of recrudescence or reinfection after antimalarial drug treatment. *Parasitol Today* 1998; 14: 462-7.
31. Zwetyenga J, Rogier C, Spiegel A, Fontenille D, Trape JF, Mercereau-Puijalon O. A cohort study of *Plasmodium falciparum* diversity during the dry season in Ndiop, a Senegalese village with seasonal, mesoendemic malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93: 375-80.
32. Färnert A, Arez AP, Babiker HA, Beck HP, Benito A, Björkman A, et al. Genotyping of *Plasmodium falciparum* infections by PCR: a comparative multicentre study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95: 225-32.
33. Färnert A, Arez AP, Correia AT, Björkman A, Snounou G, do Rosário V. Sampling and storage of blood and the detection of malaria parasites by polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93: 50-3.
34. WHO. Methods and techniques for clinical trials on antimalarial drug efficacy: genotyping to identify parasite populations. Informal consultation organized by the Medicines for Malaria Venture and cosponsored by the World Health Organization, 29-31 May 2007, Amsterdam, The Netherlands. Geneva: World Health Organization; 2008.
35. Diagne N, Rogier C, Sokhna CS, Tall A, Fontenille D, Roussilhon C, et al. Increased susceptibility to malaria during the early postpartum period. *N Engl J Med* 2000; 343: 598-603.
36. Beier JC, Killeen GF, Githure JI. Short report: entomologic inoculation rates and *Plasmodium falciparum* malaria prevalence in Africa. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61: 109-13.
37. Smith DL, Dushoff J, Snow RW, Hay SI. The entomological inoculation rate and *Plasmodium falciparum* infection in African children. *Nature* 2005; 438: 492-5.
38. Noranate N, Durand R, Tall A, Marrama L, Spiegel A, Sokhna C, et al. Rapid dissemination of *Plasmodium falciparum* drug resistance despite strictly controlled antimalarial use. *PLoS ONE* 2007; 2: e139.
39. Collins WE, Jeffery GM. A retrospective examination of sporozoite- and trophozoite-induced infections with *Plasmodium falciparum*: development of parasitologic and clinical immunity during primary infection. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61: 4-19.
40. Collins WE, Jeffery GM. A retrospective examination of the patterns of recrudescence in patients infected with *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61: 44-8.
41. Felger I, Smith T, Etoh D, Kitua A, Alonso P, Tanner M, et al. Multiple *Plasmodium falciparum* infections in Tanzanian infants. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93: 29-34.
42. Henning L, Schellenberg D, Smith T, Henning D, Alonso P, Tanner M, et al. A prospective study of *Plasmodium falciparum* multiplicity of infection and morbidity in Tanzanian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004; 98: 687-94.
43. Owusu-Agyei S, Smith T, Beck HP, Amenga-Etego L, Felger I. Molecular epidemiology of *Plasmodium falciparum* infections among asymptomatic inhabitants of a holoendemic malarious area in northern Ghana. *Trop Med Int Health* 2002; 7: 421-8.
44. Smith T, Beck HP, Kitua A, Mwankusye S, Felger I, Fraser-Hurt N, et al. Age dependence of the multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections and of other malariological indices in an area of high endemicity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93: 15-20.
45. Smith T, Felger I, Fraser-Hurt N, Beck HP. Effect of insecticide-treated bed nets on the dynamics of multiple *Plasmodium falciparum* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93: 53-7.
46. Smith T, Felger I, Kitua A, Tanner M, Beck HP. Dynamics of multiple *Plasmodium falciparum* infections in infants in a highly endemic area of Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93: 35-9.
47. Smith T, Felger I, Tanner M, Beck HP. Premunition in *Plasmodium falciparum* infection: insights from the epidemiology of multiple infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93: 59-64.
48. Trape JF. Rapid evaluation of malaria parasite density and standardization of thick smear examination for epidemiological investigations. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1985; 79: 181-4.
49. Dent A, Malhotra I, Mungai P, Muchiri E, Crabb BS, Kazura JW, et al. Prenatal malaria immune experience affects acquisition of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 invasion inhibitory antibodies during infancy. *J Immunol* 2006; 177: 7139-45.
50. Sokhna CS, Rogier C, Dieye A, Trape JF. Host factors affecting the delay of reappearance of *Plasmodium falciparum* after radical treatment among a semi-immune population exposed to intense perennial transmission. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 62: 266-70.
51. Bekessy A, Molineaux L, Storey J. Estimation of incidence and recovery rates of *Plasmodium falciparum* parasitaemia from longitudinal data. *Bull World Health Organ* 1976; 54: 685-93.
52. Druilhe P, Pradier O, Marc JP, Miltgen F, Mazier D, Parent G. Levels of antibodies to *Plasmodium falciparum* sporozoite surface antigens reflect malaria transmission rates and are persistent in the absence of reinfection. *Infect Immun* 1986; 53: 393-7.
53. Nardin E, Gwadz RW, Nussenzweig RS. Characterization of sporozoite surface antigens by indirect immunofluorescence: detection of stage- and species-specific antimalarial antibodies. *Bull World Health Organ* 1979; 57: 211-7.
54. Nardin EH, Nussenzweig RS, McGregor IA, Bryan JH. Antibodies to sporozoites: their frequent occurrence in individuals living in an area of hyperendemic malaria. *Science* 1979; 206: 597-9.
55. Collins WE, Warren M, Skinner JC, Fredericks HJ. Studies on the relationship between fluorescent antibody response and ecology of malaria in Malaysia. *Bull World Health Organ* 1968; 39: 451-63.
56. Warren M, Collins WE, Skinner JC, Larin AJ. The seroepidemiology of malaria in Middle America. I. Longitudinal studies on populations in a low incidence area of El Salvador. *Am J Trop Med Hyg* 1975; 24: 740-8.
57. Spencer HC, Collins WE, Skinner JC. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for malaria. II. Comparison with the malaria indirect fluorescent antibody test (IFA). *Am J Trop Med Hyg* 1979; 28: 933-6.
58. Orlandi-Pradines E, Penhoat K, Durand C, Pons C, Bay C, Pradines B, et al. Antibody responses to several malaria pre-erythrocytic antigens as a marker of malaria exposure among travelers. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 74: 979-85.
59. Drakeley CJ, Corran PH, Coleman PG, Tongren JE, McDonald SL, Carneiro I, et al. Estimating medium- and long-term trends in malaria transmission by using serological markers of malaria exposure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 5108-13.
60. Corran PH, Cook J, Lynch C, Leendertse H, Manjurano A, Griffin J, et al. Dried blood spots as a source of anti-malarial antibodies for epidemiological studies. *Malar J* 2008; 7: 195.
61. Bruce-Chwatt LJ, Dodge JS, Draper CC, Topley E, Voller A. Sero-epidemiological studies on population groups previously exposed to malaria. *Lancet* 1972; 1: 512-5.
62. Philpott J, Keystone JS, Reid A, Chulay JD, Wirtz RA, Szarfman A. Effect of malaria chemoprophylaxis on the development of antibodies to *Plasmodium falciparum* in expatriates living in west Africa. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 42: 28-35.
63. Ramasamy R, Nagendran K, Ramasamy MS. Antibodies to epitopes on merozoite and sporozoite surface antigens as serologic markers of malaria transmission: studies at a site in the dry zone of Sri Lanka. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50: 537-47.
64. Del Giudice G, Engers HD, Toungne C, Biro SS, Weiss N, Verdini AS, et al. Antibodies to the repetitive epitope of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein in a rural Tanzanian community: a longitudinal study of 132 children. *Am J Trop Med Hyg* 1987; 36: 203-12.
65. Del Giudice G, Lambert PH, Mendis K, Pessi A, Tanner M. Antibody responses to *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* sporozoites in areas with stable and unstable malaria. *Bull World Health Organ* 1990; 68: 191-6.
66. Esposito F, Lombardi S, Modiano D, Zavala F, Reeme J, Lamizana L, et al. Prevalence and levels of antibodies to the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* in an endemic area and their relationship to resistance against malaria infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988; 82: 827-32.
67. Tapchaisri P, Chomcharn Y, Poonthong C, Asavanich A, Limsuwan S, Maleevan O, et al. Anti-sporozoite antibodies induced by natural infection. *Am J Trop Med Hyg* 1983; 32: 1203-8.
68. Wijesundera MD, Peiris JS, Ariyaratne YG, Verdini AS, Pessi A, Del Giudice G. Antibodies to *Plasmodium falciparum* sporozoites following a malarial outbreak in a non-endemic area of Sri Lanka. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990; 84: 35-9.

69. Quakyi IA, Otoo LN, Pombo D, Sugars LY, Menon A, De Groot AS, *et al.* Differential non-responsiveness in humans of candidate *Plasmodium falciparum* vaccine antigens. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 41 : 125-34.
70. Webster HK, Brown AE, Chuenchitra C, Permpnich B, Pipithkul J. Characterization of antibodies to sporozoites in *Plasmodium falciparum* malaria and correlation with protection. *J Clin Microbiol* 1988; 26 : 923-7.
71. Brummer-Korvenkontio H, Lappalainen P, Reunala T, Palosuo T. Immunization of rabbits with mosquito bites: immunoblot analysis of IgG antimosquito antibodies in rabbit and man. *Int Arch Allergy Immunol* 1990; 93 : 14-18.
72. Brummer-Korvenkontio H, Lappalainen P, Reunala T, Palosuo T. Detection of mosquito saliva-specific IgE and IgG4 antibodies by immunoblotting. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93 : 551-5.
73. Brummer-Korvenkontio H, Palosuo T, Francois G, Reunala T. Characterization of *Aedes communis*, *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi* mosquito saliva antigens by immunoblotting. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 112 : 169-74.
74. Palosuo K, Brummer-Korvenkontio H, Mikkola J, Sahi T, Reunala T. Seasonal increase in human IgE and IgG4 antisaliva antibodies to *Aedes* mosquito bites. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 114 : 367-72.
75. Reunala T, Brummer-Korvenkontio H, Palosuo K, Miyani M, Ruiz-Maldonado R, Löve A, *et al.* Frequent occurrence of IgE and IgG4 antibodies against saliva of *Aedes communis* and *Aedes aegypti* mosquitoes in children. *Int Arch Allergy Immunol* 1994; 104 : 366-71.
76. Reunala T, Brummer-Korvenkontio H, Palosuo T. Are we really allergic to mosquito bites? *Ann Med* 1994; 26 : 301-6.
77. Cornelie S, Remoue F, Doucoure S, Ndiaye T, Sauvage FX, Boulanger D, *et al.* An insight into immunogenic salivary proteins of *Anopheles gambiae* in African children. *Malar J* 2007; 6 : 75.
78. Orlandi-Pradines E, Almeras L, Denis de Senneville L, Barbe S, Remoué F, Villard C, *et al.* Antibody response against saliva antigens of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti* in travellers in tropical Africa. *Microbes Infect* 2007; 9 : 1454-62.
79. Remoue F, Cisse B, Ba F, Sokhna C, Herve JP, Boulanger D, *et al.* Evaluation of the antibody response to *Anopheles* salivary antigens as a potential marker of risk of malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; 100 : 363-70.
80. Remoue F, Cornelie S, NGom A, Boulanger D, Simonon F. Immune responses to arthropod bites during vector-borne diseases. Update in Tropical Immunology ed, 2005, pp 377-400.
81. Waitayakul A, Somsri S, Sattabongkot J, Looareesuwan S, Cui L, Udomsangpetch R. Natural human humoral response to salivary gland proteins of *Anopheles mosquitoes* in Thailand. *Acta Trop* 2006; 98 : 66-73.
82. Ribeiro JM, Francischetti IM. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annu Rev Entomol* 2003; 48 : 73-88.
83. Choumet V, Carmi-Leroy A, Laurent C, Lenormand P, Rousselle JC, Namane A, *et al.* The salivary glands and saliva of *Anopheles gambiae* as an essential step in the *Plasmodium* life cycle: a global proteomic study. *Proteomics* 2007; 7 : 3384-94.
84. Kalume DE, Okulate M, Zhong J, Reddy R, Suresh S, Deshpande N, *et al.* A proteomic analysis of salivary glands of female *Anopheles gambiae* mosquito. *Proteomics* 2005; 5 : 3765-77.
85. Poinsignon A, Cornelie S, Mestres-Simon M, Lanfrancotti A, Rossignol M, Boulanger D, *et al.* Novel peptide marker corresponding to salivary protein gSG6 potentially identifies exposure to *Anopheles* bites. *PLoS ONE* 2008; 3 : e2472.
86. Genton B, Smith T, Baea K, Narara A, al-Yaman F, Beck HP, *et al.* Malaria: how useful are clinical criteria for improving the diagnosis in a highly endemic area? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; 88 : 537-41.
87. WHO. The world malaria report 2008. WHO/HTM/GMP/2008.1. World Health Organization ed, Geneva, 2008.
88. Perneger TV, Szeless T, Rougemont A. Utility of the detection of *Plasmodium* parasites for the diagnosis of malaria in endemic areas. *BMC Infect Dis* 2006; 6 : 81.
89. Smith T, Schellenberg JA, Hayes R. Attributable fraction estimates and case definitions for malaria in endemic areas. *Stat Med* 1994; 13 : 2345-58.
90. Alonso PL, Smith T, Schellenberg JR, Masanja H, Mwankusye S, Urassa H, *et al.* Randomised trial of efficacy of SPf66 vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria in children in southern Tanzania. *Lancet* 1994; 344 : 1175-81.
91. Rogier C, Commenges D, Trape JF. Evidence for an age-dependent pyrogenic threshold of *Plasmodium falciparum* parasitemia in highly endemic populations. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 54 : 613-9.
92. Rogier C, Henry MC, Spiegel A. Diagnostic des accès palustres en zone d'endémie: Bases théoriques et implications pratiques. *Med Trop* 2001; 61 : 27-46.
93. Smith T, Genton B, Baea K, Gibson N, Taime J, Narara A, *et al.* Relationships between *Plasmodium falciparum* infection and morbidity in a highly endemic area. *Parasitology* 1994; 109 : 539-49.
94. Benichou J. Methods of adjustment for estimating the attributable risk in case-control studies: a review. *Stat Med* 1991; 10 : 1753-73.
95. Benichou J, Gail MH. Variance calculations and confidence intervals for estimates of the attributable risk based on logistic models. *Biometrics* 1990; 46 : 991-1003.
96. Bruzzi P, Green SB, Byar DP, Brinton LA, Schairer C. Estimating the population attributable risk for multiple risk factors using case-control data. *Am J Epidemiol* 1985; 122 : 904-14.
97. Stiratelli R, Laird N, Ware JH. Random-effects models for serial observations with binary response. *Biometrics* 1984; 40 : 961-71.
98. Alonso PL, Lindsay SW, Armstrong Schellenberg JR, Keita K, Gomez P, *et al.* A malaria control trial using insecticide-treated bed nets and targeted chemoprophylaxis in a rural area of The Gambia, west Africa. 6. The impact of the interventions on mortality and morbidity from malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993; 87 : 37-44.
99. Alonso PL, Lindsay SW, Armstrong Schellenberg JR, Konteh M, Keita K, Marshall C, *et al.* A malaria control trial using insecticide-treated bed nets and targeted chemoprophylaxis in a rural area of The Gambia, west Africa. 5. Design and implementation of the trial. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993; 87 : 31-6.
100. Smith TA. Measures of clinical malaria in field trials of interventions against *Plasmodium falciparum*. *Malar J* 2007; 6 : 53.
101. Schellenberg JR, Smith T, Alonso PL, Hayes RJ. What is clinical malaria? Finding case definitions for field research in highly endemic areas. *Parasitol Today* 1994; 10 : 439-42.
102. Trape JF, Peelman P, Morault-Peelman B. Criteria for diagnosing clinical malaria among a semi-immune population exposed to intense and perennial transmission. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1985; 79 : 435-42.
103. Aribot G, Rogier C, Sarthou JL, Trape JF, Balde AT, Druilhe P, *et al.* Pattern of immunoglobulin isotype response to *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens in individuals living in a holoendemic area of Senegal (Dielmo, west Africa). *Am J Trop Med Hyg* 1996; 54 : 449-57.
104. Diagne N, Rogier C, Cisse B, Trape JF. Incidence of clinical malaria in pregnant women exposed to intense perennial transmission. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997; 91 : 166-70.
105. Oouvray C, Theisen M, Rogier C, Trape JF, Jepsen S, Druilhe P. Cytophilic immunoglobulin responses to *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein are correlated with protection against clinical malaria in Dielmo, Senegal. *Infect Immun* 2000; 68 : 2617-20.
106. Rogier C, Brau R, Tall A, Cisse B, Trape JF. Reducing the oral quinine-quinidine-cinchonin (Quinimax) treatment of uncomplicated malaria to three days does not increase the recurrence of attacks among children living in a highly endemic area of Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 90 : 175-8.
107. Rogier C, Imbert P, Tall A, Sokhna C, Spiegel A, Trape JF. Epidemiological and clinical aspects of blackwater fever among African children suffering frequent malaria attacks. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003; 97 : 193-7.
108. Rogier C, Ly AB, Tall A, Cissé B, Trape JF. *Plasmodium falciparum* clinical malaria in Dielmo, a holoendemic area in Senegal: no influence of acquired immunity on initial symptomatology and severity of malaria attacks. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60 : 410-20.
109. Rogier C, Tall A, Diagne N, Fontenille D, Spiegel A, Trape JF. *Plasmodium falciparum* clinical malaria: lessons from longitudinal studies in Senegal. *Parassitologia* 1999; 41 : 255-9.
110. Rogier C, Trape JF. Malaria attacks in children exposed to high transmission: who is protected? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993; 87 : 245-6.
111. Trape JF, Rogier C. Efficacy of SPf66 vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria in children. *Lancet* 1995; 345 : 134-5.
112. Bouvier P, Rougemont A, Breslow N, Doumbo O, Delley V, Dicko A, *et al.* Seasonality and malaria in a west African village: does high parasite density predict fever incidence? *Am J Epidemiol* 1997; 145 : 850-7.
113. Delley V, Bouvier P, Breslow N, Doumbo O, Sagara I, Diakite M, *et al.* What does a single determination of malaria parasite density mean? A longitudinal survey in Mali. *Trop Med Int Health* 2000; 5 : 404-12.
114. Rougemont A, Breslow N, Brenner E, Moret AL, Dumbo O, Dolo A, *et al.* Epidemiological basis for clinical diagnosis of childhood malaria in endemic zone in West Africa. *Lancet* 1991; 338 : 1292-5.
115. Earle W, Perez M, Del Rio R, Arzola C. Observations on the course of naturally acquired malaria in Puerto Rico. *Puerto Rico J Public Hlth Trop Med* 1939; 14 : 391-406.

116. Trape JF, Rogier C, Konate L, Diagne N, Bouganali H, Canque B, *et al.* The Dielmo project: a longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 51 : 123-37.
117. Chandramohan D, Jaffar S, Greenwood B. Use of clinical algorithms for diagnosing malaria. *Trop Med Int Health* 2002; 7 : 45-52.
118. Radhakrishna S, Nair NG, Jayabal P. Implications of misdiagnosis in field trials of vaccines. *Indian J Med Res* 1984; 80 : 711-20.
119. Schwartz D, Lellouch J. Explanatory and pragmatic attitudes in therapeutical trials. *J Chronic Dis* 1967; 20 : 637-48.
120. Gardella F, Assi S, Simon F, Bogreau H, Eggelte T, Ba F, *et al.* Antimalarial drug use in general populations of tropical Africa. *Malar J* 2008; 7 : 124.
121. Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, Milman J, *et al.* Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet* 2004; 364 : 1411-20.
122. Moorthy V, Reed Z, Smith PG, WHO Study Group on Measures of Malaria Vaccine Efficacy. Measurement of malaria vaccine efficacy in phase III trials: report of a WHO consultation. *Vaccine* 2007; 25 : 5115-23.
123. Moorthy VS, Reed Z, Smith PG. Clinical trials to estimate the efficacy of preventive interventions against malaria in paediatric populations: a methodological review. *Malar J* 2009; 8 : 23.
124. Sakuntabhai A, Ndiaye R, Casadémont I, Peerapittayamonkol C, Rogier C, Tortevoye P, *et al.* Genetic determination and linkage mapping of *Plasmodium falciparum* malaria related traits in Senegal. *PLoS ONE* 2008; 3 : e2000.
125. Trape JF, Rogier C. Combating malaria morbidity and mortality by reducing transmission. *Parasitol Today* 1996; 12 : 236-40.
126. Molineaux L. Malaria and mortality: some epidemiological considerations. *Ann Trop Med Parasitol* 1997; 91 : 811-25.
127. Taylor TE, Fu WJ, Carr RA, Whitten RO, Mueller JS, Fosiko NG, *et al.* Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts. *Nat Med* 2004; 10 : 143-5.
128. Beare NA, Taylor TE, Harding SP, Lewallen S, Molyneux ME. Malarial retinopathy: a newly established diagnostic sign in severe malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 75 : 790-7.
129. Becher H, Kynast-Wolf G, Sié A, Ndugwa R, Ramroth H, Kouyaté B, *et al.* Patterns of malaria: cause-specific and all-cause mortality in a malaria-endemic area of west Africa. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 78 : 106-13.
130. Deressa W, Fantahun M, Ali A. Malaria-related mortality based on verbal autopsy in an area of low endemicity in a predominantly rural population in Ethiopia. *Malar J* 2007; 6 : 128.
131. Etard JF, Le Hesran JY, Diallo A, Diallo JP, Ndiaye JL, Delaunay V. Childhood mortality and probable causes of death using verbal autopsy in Niakhar, Senegal, 1989-2000. *Int J Epidemiol* 2004; 33 : 1286-92.
132. Fottrell E, Byass P, Ouedraogo TW, Tamini C, Gbangou A, Sombié I, *et al.* Revealing the burden of maternal mortality: a probabilistic model for determining pregnancy-related causes of death from verbal autopsies. *Popul Health Metr* 2007; 5 : 1.
133. Kamugisha ML, Gesase S, Mlwiio TD, Mmbando BP, Segeja MD, Minja DT, *et al.* Malaria specific mortality in lowlands and highlands of Muheza district, north-eastern Tanzania. *Tanzan Health Res Bull* 2007; 9 : 32-7.
134. Korenromp EL, Williams BG, Gouws E, Dye C, Snow RW. Measurement of trends in childhood malaria mortality in Africa: an assessment of progress toward targets based on verbal autopsy. *Lancet Infect Dis* 2003; 3 : 349-58.
135. Mobley CC, Boerma JT, Titus S, Lohrke B, Shangula K, Black RE. Validation study of a verbal autopsy method for causes of childhood mortality in Namibia. *J Trop Pediatr* 1996; 42 : 365-9.
136. Premji Z, Ndayanga P, Shiff C, Minjas J, Lubega P, MacLeod J. Community based studies on childhood mortality in a malaria holoendemic area on the Tanzanian coast. *Acta Trop* 1997; 63 : 101-9.
137. Quigley MA, Armstrong Schellenberg JR, Snow RW. Algorithms for verbal autopsies: a validation study in Kenyan children. *Bull World Health Organ* 1996; 74 : 147-54.
138. Quigley MA, Chandramohan D, Rodrigues LC. Diagnostic accuracy of physician review, expert algorithms and data-derived algorithms in adult verbal autopsies. *Int J Epidemiol* 1999; 28 : 1081-7.
139. Rowe AK. Should verbal autopsy results for malaria be adjusted to improve validity? *Int J Epidemiol* 2005; 34 : 712-3.
140. Setel PW, Whiting DR, Hemed Y, Chandramohan D, Wolfson LJ, Alberti KG, *et al.* Validity of verbal autopsy procedures for determining cause of death in Tanzania. *Trop Med Int Health* 2006; 11 : 681-96.
141. Snow RW, Armstrong JR, Forster D, Winstanley MT, Marsh VM, Newton CR, *et al.* Childhood deaths in Africa: uses and limitations of verbal autopsies. *Lancet* 1992; 340 : 351-5.
142. Todd JE, De Francisco A, O'Dempsey TJ, Greenwood BM. The limitations of verbal autopsy in a malaria-endemic region. *Ann Trop Paediatr* 1994; 14 : 31-6.
143. van Eijk AM, Adazu K, Ofware P, Vulule J, Hamel M, Slutsker L. Causes of deaths using verbal autopsy among adolescents and adults in rural western Kenya. *Trop Med Int Health* 2008; 13 : 1314-24.
144. Prybylski D, Khaliq A, Fox E, Sarwari AR, Strickland GT. Parasite density and malaria morbidity in the Pakistani Punjab. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61 : 791-801.
145. Benasseni R, Gazin P, Carnevale P, Baudon D. Le paludisme urbain à Bobo-Dioulasso (Burkina Faso). III. Etude de la morbidité palustre. *Cah ORSTOM sér ent méd parasitol* 1988; 25 : 165-70.
146. McGuinness D, Koram K, Bennett S, Wagner G, Nkrumah F, Riley E. Clinical case definitions for malaria: clinical malaria associated with very low parasite densities in African infants. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; 92 : 527-31.
147. Velema JP, Alihonou EM, Chippaux JP, van Boxel Y, Gbedji E, Adegbini R. Malaria morbidity and mortality in children under three years of age on the coast of Benin, West Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1991; 85 : 430-5.
148. Greenwood BM, Bradley AK, Greenwood AM, Byass P, Jammeh K, Marsh K, *et al.* Mortality and morbidity from malaria among children in a rural area of The Gambia, West Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 81 : 478-86.
149. Genton B, al-Yaman F, Beck HP, Hii J, Mellor S, Rare L, Ginny M, Smith T, *et al.* The epidemiology of malaria in the Wosera area, East Sepik Province, Papua New Guinea, in preparation for vaccine trials. II. Mortality and morbidity. *Ann Trop Med Parasitol* 1995; 89 : 377-90.
150. Henry MC, Assi SB, Rogier C, Dossou-Yovo J, Chandre F, Guillet P, *et al.* Protective efficacy of lambda-cyhalothrin treated nets in Anopheles gambiae pyrethroid resistance areas of Cote d'Ivoire. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 73 : 859-64.
151. Henry MC, Rogier C, Nzeyimana I, Assi SB, Dossou-Yovo J, Audibert M, *et al.* Inland valley rice production systems and malaria infection and disease in the savannah of Cote d'Ivoire. *Trop Med Int Health* 2003; 8 : 449-58.
152. Chippaux J, Akogbeto M, Massougbojji A, Adjagba J. Mesure de la parasitémie palustre et évaluation du seuil pathogène en région de forte transmission permanente. In « Robert V, Chippaux J, Diomandé L, editors. Le paludisme en Afrique de l'Ouest : études entomologiques et épidémiologiques en zone rizicole et en milieu urbain ». Editions de l'ORSTOM ed, Paris, 1991 ; pp 55-65.
153. Gaye O, Bah IB, Diallo S, Faye O, Baudon D. Une étude de la morbidité palustre en milieu rural et urbain au Sénégal. *Med Trop* 1989; 49 : 59-62.
154. Baudon D, Gazin P, Sanou JM, Ouedraogo L, Ouedraogo I, Guiguemde T *et al.* Morbidité palustre en milieu rural au Burkina faso: étude de 526 cas fébriles. *Med Afr Noire* 1986; 33 : 767-76.
155. Richard A, Lallemand M, Trape JF, Carnevale P, Mouchet J. Le paludisme dans la région forestière de Mayombe, République populaire du Congo. III. Place du paludisme dans la morbidité générale. *Ann Soc Belg Med Trop* 1988; 68 : 317-29.