

Généralités sur le Paludisme

I-1- Historique

Le paludisme est une maladie parasitaire due à des protozoaires du genre *Plasmodium* et sévissait déjà avant l'apparition de l'Homme. Ces très anciens parasites seraient d'origine africaine et auraient co-évolué depuis plusieurs milliers d'années avec les Anthropoïdes africains, puis avec les Hommes. En Egypte, en 1600 avant J.C., sont décrits sur des papyrus l'association frissons-fièvre et splénomégalie, ainsi que les mesures à prendre pour éviter l'entrée dans les maisons de «vapeurs provoquant des fièvres» et la concordance entre les crues du Nil et l'apparition des fièvres intermittentes. Au IV^{ème} siècle avant J.C., Hippocrate a réalisé ses premières descriptions cliniques des fièvres palustres avec la triade classique «frissons-fièvre-sueur» selon des séquences quotidiennes, tierces ou quartes. Au II^{ème} siècle avant J.C., les Grecs et les Romains ont relevé une corrélation étiologique entre les fièvres intermittentes et la proximité des marécages. Le terme italien «mal aria» ou mauvais air traduit bien la liaison faite par les Italiens entre les fièvres et les miasmes véhiculés dans l'air. Le terme francophone du paludisme, introduit par Laveran (1893), traduit la liaison «fièvres-marais» (palud = marais). En 1717, Lancisi suggère que le paludisme est dû à un poison des marais transmis par des moustiques qui inoculent «les mauvaises humeurs dans le sang».

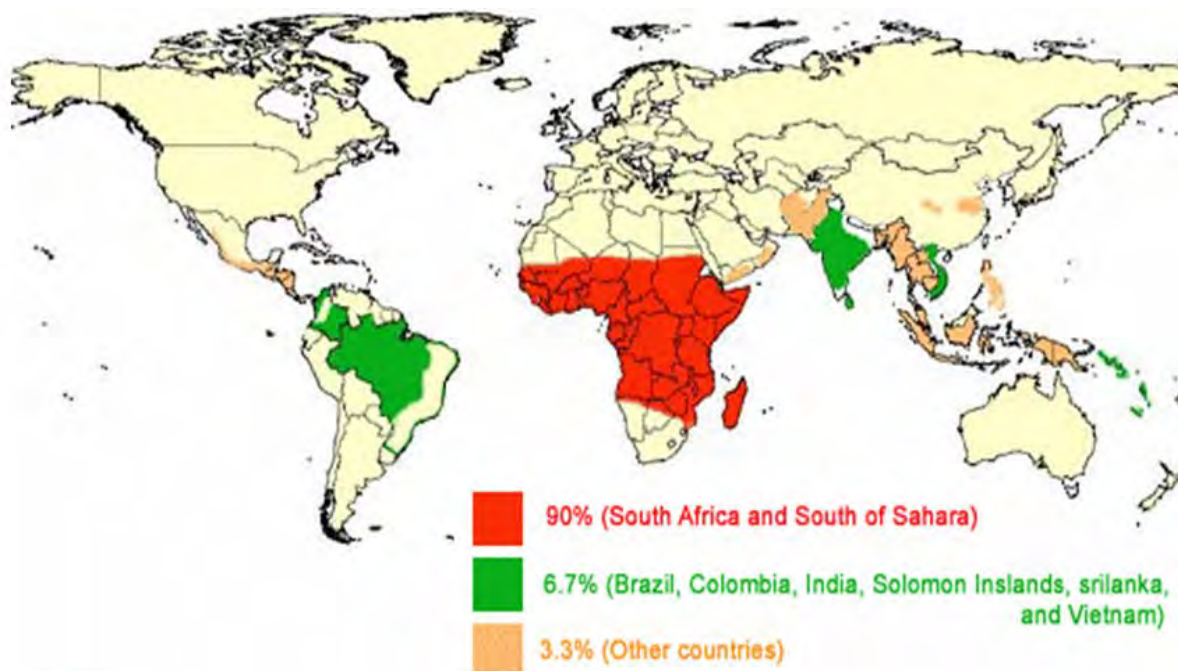
A la fin du XIX^{ème} siècle, le médecin militaire Alphonse Laveran fut le premier à démontrer la nature parasitaire de l'affection en détectant «des éléments pigmentés dans les globules rouges des malades atteints de fièvres palustres, qui se présentent sous forme de croissant, de sphères, de flagelles» et l'appellera *Oscillaria malariae* (1881).

En Italie, les travaux de Golgi (1889), de Grassi et Faletti (1892) sur *P. vivax* et *P. malariae*, et de Welch (1897), Marchiafava, Celli (1885) et de Faletti, Grassi sur *P. falciparum* confirment l'origine parasitaire et l'identité spécifique des parasites. Aux Etats-Unis, Mac Callum (1898) montre l'origine des formes sanguines chez *P. falciparum* avec la formation de microgamètes, puis examine la fécondation donnant un «ookinète». Entre 1895 et 1898, Ross montre que le paludisme pouvait être transmis par les moustiques. En effet, après de nombreuses dissections d'anophèles, il observe que vers le 7 ou 8^{ème} jour, des capsules éclatent libérant de nombreux bâtonnets qui se concentrent dans les glandes salivaires. Il arrive alors à la conclusion que le paludisme est transmis d'une personne malade à un sujet sain par l'espèce appropriée de moustique qui l'inocule en piquant. En même temps, Grassi, Bastianelli et Bignami (1899) décrivent le cycle complet de développement de *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. malaria* chez *An. claviger*.

I-2- Epidémiologie du Paludisme

I-2-1- Importance médicale du paludisme

«Un des rares fléaux de Santé Publique qui ait traversé les siècles sans jamais perdre son activité», le paludisme touche plus de 90 pays (**Fig. 1**), menace près de 2,5 milliards millions de personnes (40% de la population mondiale), cause 300 à 515 millions de cas clinique par an et 1,5 à 2 millions décès par an, en particulier chez les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes. Près de 90 % des cas de décès touchent les pays de l'Afrique subsaharienne, où la maladie fait sérieusement obstacle au développement économique et social. On estime à plus de 12 milliards la perte annuelle de PIB due au paludisme en Afrique où il constitue la principale cause de mortalité chez l'enfant de moins de cinq ans (20%) qui, avec les femmes enceintes, payent alors le plus lourd tribut à cette maladie (OMS, 2003). En effet, chaque année, au moins 23 millions de grossesses sont menacées par le paludisme et plus de 200.000 nouveau-nés souffrent des conséquences de cette maladie sur la grossesse. Il y est responsable de 40% des dépenses de santé publique, de 30-50% des admissions dans les hôpitaux et de pas moins de 50% des consultations externes dans les zones de forte transmission. Tous les cas de paludisme africain se rencontrent presque exclusivement en Afrique sub-saharienne où le complexe *Anopheles gambiae* est le principal vecteur de *Plasmodium falciparum*, l'espèce plasmodiale la plus fréquente et qui induit les formes les plus graves de la pathologie.



Source : www.pon.nic.in/vcrc/globe.html

Fig. 1 : Distribution du paludisme dans le monde.

I- 2-2- Les Protagonistes

I-2-2-1- Les Agents pathogènes

a- Classification

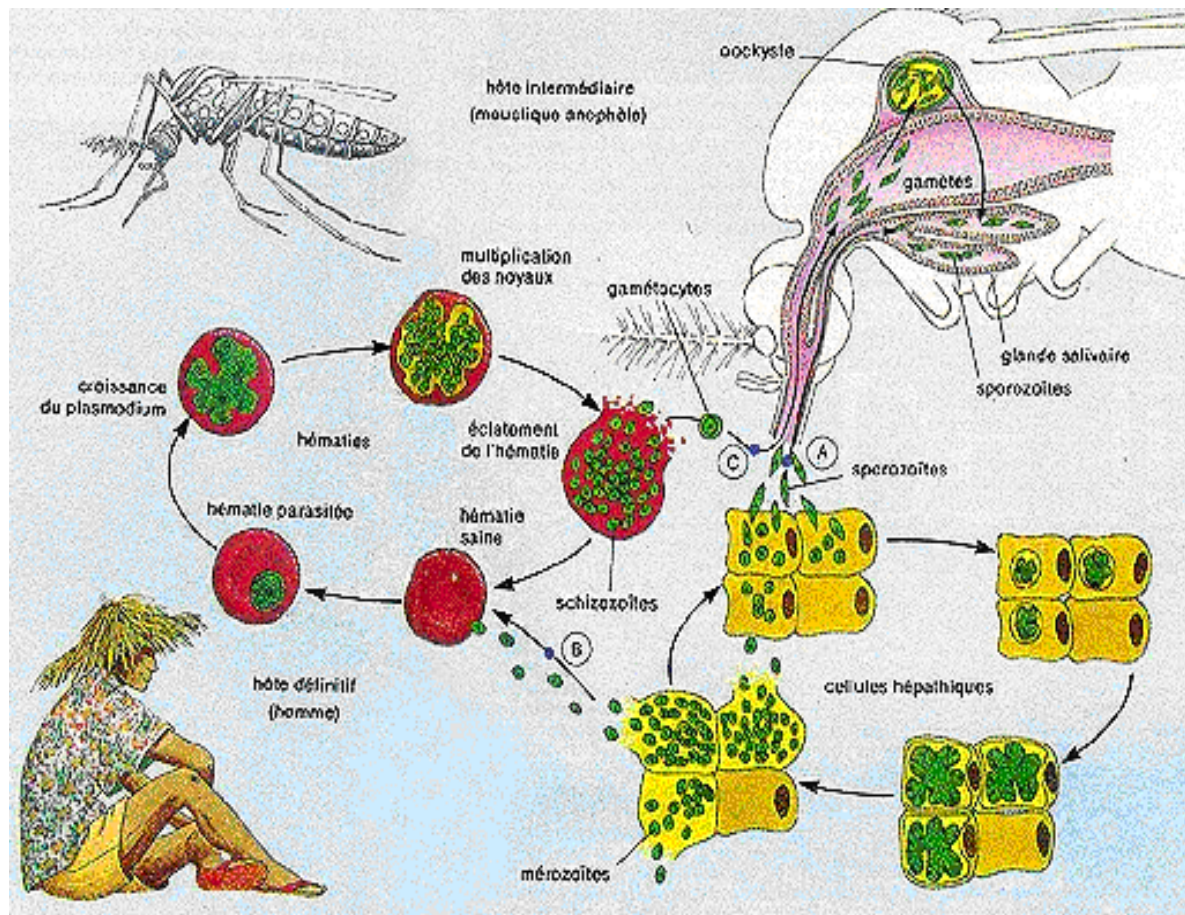
Les agents étiologiques du paludisme sont des parasites protozoaires de l'embranchement des *Apicomplexa* (protozoaires à appareil apical complexe), de la classe des *Sporozoa*, de l'ordre des *Haemosporidia*, de la famille des *Plasmodidae* et appartiennent au genre *Plasmodium*. Sur plus d'une centaine d'espèces du genre *Plasmodium* parasitant batraciens, reptiles, oiseaux ou mammifères, seules 4 peuvent infester l'Homme :

- *P. falciparum* (Welch, 1887) est responsable de la fièvre tierce maligne. Elle est la plus fréquente en Afrique sub-saharienne où 80 à 90% des cas de la maladie lui sont associés. Elle est aussi la plus redoutable car pouvant être à l'origine des formes graves, voire mortelles en l'absence de traitement approprié.
- *P. vivax* (Grassi, 1890) responsable de la fièvre tierce bénigne. Elle est aussi très répandue dans le monde et évolue avec des rechutes à long terme.
- *P. ovale* (Stephens, 1922) est l'agent aussi d'une fièvre tierce bénigne. Elle est très proche de *P. vivax* avec laquelle elle a été très longtemps confondue. Elle évolue à long terme et est donc considérée comme peu pathogène.
- *P. malariae* (Laveran, 1881) est moins fréquente que les 3 précédentes et est responsable d'une fièvre quarte et de trouble rénaux.

Remarque : les 3 premières espèces sont spécifiquement humaines alors que la dernière est commune à l'Homme et aux grands singes africains.

b- cycle de développement de *Plasmodium*

Deux hôtes successifs sont nécessaires à l'accomplissement du cycle des plasmodies (**Fig. 2**) : **homme** où se déroule la multiplication asexuée ou schizogonie et **moustique Culicidae** du genre *Anopheles*, siège de la multiplication sexuée ou sporogonie.



Source : <http://www.ac-orleans-tours.fr/svt/theme3/plasmo.htm>

Fig. 2 : Cycle du développement de *Plasmodium falciparum*.

b-1- Schizogonie chez l'Homme

Au cours de la piqûre, l'anophèle femelle infesté injecte avec sa salive, au niveau de la peau, des sporozoïtes (15/8000) (Rosenberg & Clever, 1990) contenus dans ses glandes salivaires. Ces éléments unicellulaires filiformes, à travers la circulation générale, se répartissent rapidement dans tout l'organisme, pénètrent activement et indifféremment dans différents types cellulaires. Seuls les survivants ayant gagné le foie et franchi une dernière barrière constituée par les cellules de Kupffer pourront poursuivre leur cycle. On estime qu'un anophèle infecté peut injecter dans l'hôte 1 à 1000 sporozoïtes (120 en moyenne) au moment d'une piqûre (Bejon *et al.*, 2005).

b-1-1- la Phase hépatique

Après sa pénétration dans l'hépatocyte, le sporozoïte s'arrondit et se transforme en trophozoïte. Certains trophozoïtes, par multiplication et développement, évoluent immédiatement jusqu'à maturité pour donner des schizontes alors que d'autres restent sous

forme uni-nucléé et sont appelés hypnozoïtes (Jiang *et al.*, 1988). Ces 2 types d'évolution dépendent de l'espèce plasmodiale et expliquent les rechutes observées chez *P. vivax* et *P. ovale* chez lesquels les hypnozoïtes (formes dormantes) ont été soulignés contrairement à *P. falciparum* chez qui les sporozoïtes entrent en évolution immédiate.

A maturité, les schizontes éclatent, libérant des mérozoïtes, nouvelles formes uni-nucléaires qui initieront la phase érythrocytaire en envahissant les globules rouges.

Cette phase constitue la partie cliniquement silencieuse et asymptomatique du cycle. Elle correspond, en effet, à une période d'incubation dont la durée (5 à 15 jours) et la fréquence (périodicité) sont fonction de l'espèce plasmodiale.

b-1-2- la phase érythrocytaire

Le mérozoïte, libéré dans le sang par la rupture de l'hépatocyte, envahissent les globules rouges, selon un processus en plusieurs étapes, s'y déplace par mouvements amiboïdes vers le centre où il se transforme en trophozoïte, siège d'importantes activités métaboliques. Le trophozoïte va ainsi croître en dégradant l'hémoglobine et évoluer en schizonte dans lequel s'accumule l'hémozoïne (pigment malarique, produit de dégradation de l'hémoglobine qui remplit progressivement la vacuole nutritive parasitaire). De nombreuses divisions nucléaires se produisent dans la schizonte aboutissant ainsi à la formation de nouveaux mérozoïtes qui sont libérés lors de l'éclatement du schizonte mature (corps rosacé). Chaque mérozoïte peut alors infester une nouvelle hématie et ainsi recommencer le cycle intra-érythrocytaire. La lyse des hématies parasitées par les schizontes mûrs est responsable des accès fébriles, symptômes cliniques caractéristiques du paludisme. Après plusieurs cycles intra-érythrocytaires, une fraction des mérozoïtes pénètre dans les globules rouges et se différencient en gamétocytes mâles et femelles qui, lorsqu'ils sont ingérés au cours d'un repas sanguin, permettent la poursuite du cycle du parasite chez le moustique (Ghosh *et al.*, 2000).

b-2- Sporogonie chez le moustique femelle

En prenant son repas sanguin sur un sujet infecté par *Plasmodium*, le moustique absorbe les différents stades du parasite (sexués et asexués). Mais seuls les stades sexués (gamétocytes) poursuivront leur développement, les autres étant digérés au niveau de l'estomac de l'insecte. Rapidement, par expulsion des corpuscules chromatinien, le gamétocyte femelle se transforme en macro-gamète, alors que la micro-gamétogénèse mâle ou ex-flagellation est plus lente et donne naissance à 8 microgamètes qui vont rapidement à la rencontre du macro-gamète. La fécondation donne naissance à un ookinète, œuf mobil qui

traverse la paroi stomacale du moustique et migre vers la face externe de l'épithélium intestinal où il s'enkyste pour former l'oocyste mature dans lequel s'individualisent les sporozoïtes. Libérés à la suite de l'éclatement de l'oocyste, ces derniers vont, via l'hémolymph, gagner par prédilection les glandes salivaires de l'insecte pour être inoculé lors d'une piqûre infectante ultérieure.

I-2-2-2- Vecteurs du paludisme en Afrique et quelques éléments de leur bio-écologie

a- Vecteurs en Afrique

On dénombre 422 espèces d'anophèles dans le monde, parmi lesquelles 68 ont été associées à la transmission des quatre espèces de plasmodies humaines. En Afrique, une dizaine d'espèces seulement est concernée : celles du complexe *An. gambiae* et l'espèce *An. funestus* assurent la majeure partie de la transmission en Afrique tropicale, *An. nili* et *An. moucheti* jouant aussi un rôle important dans des régions limitées. Ces espèces sont connues par leur grande capacité vectrice, ce qui explique la forte endémicité palustre en Afrique (OMS, 2006).

Le complexe *An. gambiae s.l. (sensu lato)* présente en Afrique 7 espèces dont *An. gambiae s.s. (sensu stricto)* et *An. arabiensis* sont les plus importantes en terme de distribution géographique et capacité vectorielle. Les femelles piquent généralement à l'intérieur des maisons, on dit qu'elles sont endophages. Mais l'exophagie n'est pas rare, en particulier chez *An. arabiensis*. Ces deux espèces sont nettement anthropophiles (Duchemin *et al.*, 2001), sauf si l'abondance de bétail à proximité (boeufs surtout, mais aussi chèvres et moutons) favorise la zoophilie (Diatta *et al.*, 1998). Le comportement endophilie-exophilie est variable selon la saison, les préférences trophiques, l'habitat, l'anthropophilie etc.

L'espèce *An. funestus* est répandue dans toute l'Afrique subsaharienne. Comme *An. gambiae* et *An. arabiensis*, elle montre une tendance anthropophile, mais un certain opportunisme tend à augmenter la zoophilie lorsqu'il y a abondance de bétail sensible : on parle de déviation trophique. L'endophagie et l'endophilie sont aussi très marquées.

An. nili est très largement répandu dans toute l'Afrique et est localisé aux environs des cours d'eau permanents ou semi-permanents dans lesquels se développent ses larves. Cette espèce pique volontier l'Homme. L'activité de piqûre se manifeste assez rapidement après la tombée de la nuit et présente un pic plus précoce que ceux (entre 0h et 5h) d'*An. gambiae* et d'*An. funestus* mais *An. nili* est nettement plus exophage et exophile que ces deux derniers.

An. moucheti, quant à elle, est limitée au bloc forestier d'Afrique Centrale et aux galeries forestières qui le prolongent au nord et surtout au sud. L'exophilie est souvent très marquée chez cette espèce.

b- Cycle de développement des anophèles

Comme toutes les espèces de moustique, le développement des anophèles est caractérisé par la succession de deux phases (Robert *et al.*, 1998): une première aquatique qui recouvre la vie pré-imaginale, c'est-à-dire l'œuf, les stades larvaires et la nymphe et une seconde aérienne qui concerne l'adulte, ou imago (**Fig. 3**).

- La phase aquatique

Les anophèles femelles pondent sur l'eau des œufs fécondés. Ces derniers, pondus isolément, sont munis de flotteurs et restent en surface durant l'embryogénèse. De chaque œuf éclot une seule larve d'environ 1 mm. Au terme de sa croissance, la larve de quatrième stade effectue une mue particulière, la nymphose. Cette dernière libère une nymphe aquatique mobile, qui ne se nourrit pas. De profonds remaniements de la morphologie s'effectuent au cours du stade nymphal ménageant ainsi les organes typiques du stade larvaire pour laisser la place aux organes caractéristiques de l'adulte (Robert *et al.*, 1998).

- La phase imaginale

De la nymphe émerge un adulte, mâle ou femelle, qui s'envole rapidement. C'est au cours de la phase aérienne, le plus souvent dans un essaim de mâles réunis au crépuscule, que s'effectue l'insémination de la femelle néonate. Les spermatozoïdes sont introduits dans la bourse copulatrice de la femelle, puis ils migrent dans une spermathèque, sorte d'annexe du système sexuel femelle, dans laquelle ils conservent leur pouvoir fécondant pendant plusieurs semaines, jusqu'à la mort de la femelle.

Mâles et femelles se nourrissent de jus sucrés, nectars et autres exsudats végétaux nécessaires au vol et au métabolisme des moustiques. Le mâle est incapable de perforer la peau d'un vertébré. Seule la femelle est hématophage (Clements, 1992) et un repas sanguin n'est pas indispensable à sa survie, mais il l'est à la maturation ovarienne, comprenant habituellement 150 oeufs chez *An. gambiae*. La fécondation s'effectue dans le tractus génital de la femelle, lors de la ponte, des spermatozoïdes étant libérés à partir de la spermathèque.



Source : J. Brunhes et Coll., Les anophèles de la région afro-tropicale, logiciel ORSTOM Ed., 1998

Fig. 3 : Cycle biologique d'un anophèle

c- Le cycle trophogonique des anophèles

Le cycle trophogonique (ou gonotrophique) est la succession des phénomènes physiologiques qui se produisent chez le moustique entre deux repas de sang successifs (Robert, 2002). Trois phases sont distinguées : i) la recherche de l'hôte et sa piqûre par la femelle à jeun, ii) la digestion du sang qui se déroule dans le même temps que la maturation ovarienne et iii) la recherche du lieu de ponte de la femelle gravide.

- La recherche de l'hôte et la piqûre :

La femelle à jeun se met, dans la nuit, à la recherche d'un hôte à piquer. La localisation de ce dernier se fait à plusieurs niveaux. L'identification des facteurs d'attractivité et des mécanismes de localisation et de reconnaissance de l'hôte à piquer sont des domaines de recherche actuellement en plein essor (Besansky *et al.*, 2004; Costantini *et al.*, 1998; Costantini & Diallo, 2001) : à longue distance, interviennent les stimuli olfactifs tels que des kairomones spécifiques d'espèces animales (ou humaine); à moyenne distance, d'autres attractifs interviennent, comme le gaz carbonique émis par la respiration ; et à courte distance, la chaleur de l'hôte, l'humidité corporelle et divers facteurs visuels pourraient jouer un rôle important.

Pour la piqûre proprement dite, la chaleur relative de l'hôte est un facteur primordial. La piqûre d'un anophèle survient pendant la nuit avec un «i ntervalle de piqûre» pouvant se répartir du crépuscule jusqu'à l'aurore. Ce risque est maximal de minuit à 4h du matin. La plupart du temps, la piqûre d'un anophèle est réalisée sur un homme endormi contrairement à celle d'autres espèces de moustiques, tels les *Aedes*, piquant pendant la journée et de nombreuses fois la même personne ou des personnes différentes avant d'avoir ingéré un repas complet. Lors de la piqûre, le sang est ingéré par pompage après canulation directe d'un capillaire sanguin. La salive est éjectée pendant toute la durée de la piqûre, depuis le début de la pénétration des pièces buccales jusqu'à la réplétion complète de l'estomac. La transmission du parasite se fait par la salive, au moment de la piqûre et au cours du repas sanguin.

- La digestion du sang et la maturation ovarienne :

Dès la fin du repas commence la digestion du sang qui dure généralement une quarantaine d'heures. Simultanément, les ovaires se développent. Les femelles pares ont besoin d'un seul repas de sang pour élaborer complètement une ponte. Les femelles nullipares ont parfois besoin de deux repas de sang pour achever le développement ovarien ; on dit alors qu'elles présentent un stade prégravid.

- La recherche du lieu de ponte et la ponte

Dès que la ponte est mature, la femelle se met en quête de gîtes favorables à la ponte (Le Menach *et al.*, 2005). Comme pour la recherche de l'hôte à piquer, des stimuli olfactifs sont perçus à distance par la femelle et lui permettent de les localiser. La ponte a généralement lieu peu après le crépuscule et marque le début d'un nouveau cycle.

La durée du cycle trophogonique est bien connue pour les vecteurs d'Afrique tropicale : elle varie entre deux et trois jours pour les femelles pares, suivant les espèces et les saisons. Pour les nullipares, il est plus long, jusqu'à cinq jours, du fait de la phase prégravid.

I-3- Les moyens de lutte contre le paludisme

La lutte contre le paludisme repose sur 2 aspects majeurs: la lutte contre le parasite et celle contre le vecteur.

I-3-1- Lutte contre le parasite

Cette forme de lutte se base sur la chimiothérapie et la chimioprophylaxie qui sont aujourd'hui les moyens de lutte de choix mais la résistance partielle des parasites aux médicaments antipaludiques tend à se généraliser dans les pays endémiques.

I-3-1-1- Le traitement

Les traitements sont de trois types: 1) un traitement présomptif qui consiste à traiter les accès fébriles, 2) un traitement curatif qui consiste à traiter la crise de paludisme et 3) un traitement radical qui traite les formes cachées du paludisme. A cet effet, diverses molécules anti-paludiques sont utilisées. Il s'agit d'antipaludiques traditionnels (chloroquine, méfloquine, sulfadoxine, pyriméthamine, amodiaquine, certains antibiotiques...) qui sont des molécules de synthèse. Mais actuellement, depuis le développement des résistances de *P. falciparum* à plusieurs de ces molécules (Cosgriff *et al.*, 1985; Deloron *et al.*, 2000; Trape *et al.*, 1998), un nouveau groupe de molécules est de plus en plus utilisé depuis 10 ans: les dérivés de l'artémisinine (Bonnet *et al.*, 2007; Guthmann *et al.*, 2005; Menard *et al.*, 2007) dont les plus connus sont l'artésunate, l'artéméter et le dihydroartémisinine. Ces composés ont une action thérapeutique (baisse de la numération parasitaire et résolution des symptômes) très rapide, efficaces contre le paludisme à *P. falciparum* poly-chimiorésistant, bien tolérés par les malades et réduisent le portage de gamétocytes (et peuvent donc réduire la transmission du paludisme). Aucune résistance du parasite à ces composés n'a été observée à ce jour, bien qu'une certaine décroissance de sensibilité ait été détectée *in vitro* en Chine et au Vietnam (OMS, 2003). Utilisés seuls, les dérivés de l'artémisinine guérissent le paludisme à *P. falciparum* en sept jours mais plusieurs études ont démontré que les dérivés de l'artémisinine combinés à certains médicaments de synthèse donnent des taux élevés de guérison en seulement trois jours avec une adhésion plus élevée au traitement. Selon certaines données, l'utilisation de ces associations pourrait en outre différer sensiblement l'apparition d'une résistance au médicament associé dans les zones de transmission faible à modérée. Une des recommandations de l'OMS est ainsi devenue le traitement par la bithérapie (dérivé Artémisinine-ART*¹ associé à un médicament de longue durée). Il faut noter, cependant, que la bithérapie a été appliquée avec un certain succès en zone endémique mais ne montre toujours pas une efficacité totale.

* ART : médicament très efficace mais de courte durée, c'est pourquoi il est associé à un antipaludique de longue durée

I-3-1-2- La chimioprophylaxie :

C'est un moyen de prévention de la maladie basé sur l'utilisation de molécules chimiques. Tout comme pour le traitement, le produit à utiliser varie suivant les pays et les circonstances et donc l'endémicité de la zone d'où la nécessité de s'informer du corps médical en place (OMS, 2003). Mais d'une manière générale, l'arsenal thérapeutique de la chimiothérapie se limite à la chloroquine, au proguanil, à l'association pyriméthamine-dapsone, à la méfloquine et à la doxycycline (OMS, 2003). En raison de l'accroissement de la pharmacorésistance parasitaire et des effets secondaires propres aux différents produits, il est de plus en plus difficile d'établir des directives chimioprophylactiques rationnelles. Cette méthode préventive se limite aux voyageurs et, dans certains cas, à des groupes particuliers tels que les femmes enceintes. Elle doit toujours s'accompagner d'une protection efficace contre les moustiques.

I-3-1-3- Les stratégies vaccinales

Un vaccin serait un puissant outil préventif et donc de lutte contre le parasite (Tongren *et al.*, 2004). A cet effet, divers types de vaccins ou candidats vaccins ont été développés durant cette dernière décennie. Plus d'une dizaine de candidats vaccins sont actuellement en essais cliniques de phase 1 ou 2 (Malkin *et al.*, 2006). Ils ont tous pour cibles les divers antigènes issus des différents stades du cycle parasitaire (Tongren *et al.*, 2004):

- **vaccins anti-stade exo-érythrocytaire**: ils visent à empêcher le sporozoïte de pénétrer ou de se développer dans les cellules hépatiques. Le vaccin RTS,S/AS02A (GlaxoSmithKline) qui est probablement le candidat le plus avancé et le plus prometteur appartient à ce groupe. En effet, RTS,S/AS02A s'est avéré sûr et immunogénique dans des études précédentes menées chez des adultes (Doherty *et al.*, 1999) et des enfants en Gambie (Bojang *et al.*, 2005). De plus, les études cliniques menées récemment chez 2000 jeunes enfants mozambicains ont révélé que ce candidat vaccin pouvait réduire près de 50 % des cas graves de paludisme et de 35 % l'infection par *Plasmodium* (Macete *et al.*, 2007). Cette protection est associée à une réponse immune protectrice humorale (Ac anti-CSP, CircumSporozoite Protein) et cellulaire (production d'IFN- γ) (Alonso *et al.*, 2005).

- **vaccins anti-stade asexué (antimérozoïtes)**: ils empêchent les mérozoïtes de pénétrer ou de se développer dans les globules rouges. C'est le cas du candidat vaccin MSP/RESA qui a donné de bons résultats en Papouasie (Graves & Gelband, 2006). C'est aussi le cas du vaccin Spf 66 (Graves & Gelband, 2006) développé par l'équipe de Pattayoro (1994) dont les résultats des études cliniques ont été décevants.

- **les vaccins bloquant la transmission**: ils induisent des anticorps bloquant la maturation des stades sexués du parasite chez le moustique.

- **les antigènes variants de surface (AVS)** : ils sont exprimés par les parasites adhérents au placenta (PAP) et sont des candidats prometteurs pour une vaccination spécifique contre le paludisme de la femme enceinte. En effet, l'acquisition lente et progressive de la prémunition est généralement couplée avec la mise en place d'IgG spécifiques à la plupart de nombreux AVS. Ces études ont notamment permis de comprendre la fréquence et le développement du paludisme chez les femmes primipares. En effet, les jeunes femmes vivant dans les zones d'endémie palustre ne possèdent pas d'IgG spécifiques à des AVS exprimés par les parasites adhérents au placenta (AVS-PAP). A la suite de l'exposition aux AVS-PAP, des IgG spécifiques sont rapidement produits, ce qui est cohérent avec la diminution de la susceptibilité du paludisme de la femme enceinte associée avec l'augmentation du nombre des grossesses.

Il convient toutefois de noter qu'aucun de ces types de vaccins n'a pas encore montré des résultats satisfaisants. L'une des difficultés majeures étant rencontrée au niveau des essais cliniques, la plupart des vaccins n'ont pas montré les effets qu'ils avaient en conditions expérimentales sur des modèles animaux. Ces difficultés sont dues à la variation antigénique (au total plus de 5000 antigènes), à la complexité du cycle (4 différents stades de vie), à la diversité des souches *Plasmodium* et à leur faible immunogénicité (l'immunogénicité induite est faible et disparaît rapidement).

I-3-2- La lutte contre le vecteur

La lutte anti-vectorielle vise à empêcher au maximum le contact entre hôte et vecteur afin de réduire ainsi efficacement la transmission du parasite. Elle constitue un élément technique fondamental de la stratégie mondiale de lutte contre le paludisme. En ce sens, elle s'avère être le moyen le plus efficace de prévenir la transmission. Elle peut se faire en deux niveaux en rapport avec les stades de développement du vecteur (Darriet, 1998), à savoir la lutte contre les larves et contre les adultes ou imagos.

I-3-2-1- La lutte contre les larves

Elle requiert une bonne connaissance de la biologie du vecteur (conditions de développement, lieu, période...). Elle peut se faire par assainissement autour des habitations (protection individuelle et familiale) ou par traitement larvicide des eaux de surface

(ecdysoïdes tels que le triflumuron, juvénoïdes, *Bacillus thuringiensis*) (Darriet, 1998) par irrigations intermittentes, lavage, ou lutte biologique (par introduction de prédateurs et parasites de larve du vecteur) qui sont des méthodes communautaires. Les larvicides doivent être sélectives et leur efficacité et rémanence évaluées sur le terrain avant d'être appliquées.

I-3-2-2- La lutte contre les adultes

La lutte contre les moustiques adultes constitue un aspect important dans les programmes de lutte antipaludique. En faisant disparaître par destruction massive ou en limitant les populations anophéliennes à des densités très basses, cette méthode favorise sans doute la diminution du taux d'inoculation du parasite et donc la transmission de la maladie en ce sens que le nombre de piqûres (et donc de piqûres infectantes) sera réduit. Cette lutte anti-adulte se fait généralement par l'utilisation d'insecticides à effet rémanent lors des programmes d'aspersions intra-domiciliaires ou d'imprégnation de moustiquaires, mais aussi par les pulvérisations aériennes ou l'utilisation de répulsifs. Les aspersion intra-domiciliaires et les moustiquaires imprégnées sont des mesures de lutte contre les moustiques adultes applicables à de plus vastes zones géographiques que celles plus spécifiques et plus localisées de la lutte anti-larvaire (OMS, 2006).

- les pulvérisations intra-domiciliaires:

Leur efficacité n'a été montrée que quand elles portent sur un vaste espace. De nombreux types d'insecticides appartenant à 3 grands groupes de composés chimiques (Organochlorés, organophosphorés et carbamates) ont été utilisés pour ces types d'actions depuis longtemps. Mais ils ont tous montré beaucoup de limites dans leur efficacité (Darriet, 1998). En effet certains de composés (Organophosphorés et carbamates) ont montré une trop grande persistance dans les milieux naturels et peuvent entraîner le phénomène de bio-accumulation. D'autres, à l'image du DDT (Organochloré) se sont montrés très toxiques aussi bien pour les invertébrés que pour les vertébrés. Le DDT est le plus connu des insecticides et le premier à être utilisé durant les années 1950. Il a fortement contribué à l'éradication totale du paludisme en Europe, Amérique du Nord, Japon, etc. Mais il a été rapidement abandonné du fait de son effet toxique et donc des énormes dommages causés à l'environnement, à court comme à long terme. Cependant il est actuellement en réutilisation dans plus de 99 pays avec une grande surveillance. Est venue ensuite la découverte des pyréthrinoïdes (vers 1970) de synthèse qui dérivent de pyréthrinoïdes naturelles. L'utilisation de ces composés est encouragée vivement

du fait de leur faible toxicité pour les mammifères et donc sur l'environnement et leur rémanence prolongée.

- Les moustiquaires imprégnées d'insecticide:

Depuis la célèbre expérience de Grassi durant l'été 1900 (Trape, 2000), il est établi que des mesures simples de protection contre les piqûres d'anophèles permettent d'éviter l'infection palustre même en zone d'endémie. Préconisé par tous les traités de médecine tropicale depuis le début du 20^{ème} siècle, l'utilisation de moustiquaires représente non seulement une source individuelle de protection de base contre le paludisme, mais aussi contre d'autres vecteurs arthropodes (*Culex*) et les nuisances qu'ils causent (Hougard *et al.*, 2002). Les moustiquaires imprégnées (de DDT) ont été utilisées pour la première fois durant la 2^{nde} guerre mondiale par les armées allemande, russe et américaine. L'OMS approuve au début des années 1980 l'utilisation des pyréthrianoïdes comme produit d'imprégnation des moustiquaires et la perméthrine en particulier. Divers études ont montré que l'imprégnation des moustiquaires réduit sensiblement la transmission du paludisme (Carnevale *et al.*, 1991; Darriet, 1998; De La Cruz *et al.*, 2006). En effet, l'utilisation des moustiquaires imprégnées dans une communauté entraîne, en plus de la protection individuelle du fait d'une baisse de piqûres reçus individuellement, une mortalité à grande échelle des moustiques dans les régions où les vecteurs sont très anthropophiles. Leur usage généralisé réduit les populations de vecteurs et diminue la durée de vie moyenne des moustiques (Magesa *et al.*, 1991). Il en résulte une diminution du taux d'infestation par les sporozoïtes car peu de moustiques survivent suffisamment longtemps pour que le cycle puisse se dérouler. De plus, les moustiquaires imprégnées empêchent les moustiques de se nourrir, ce qui réduit le potentiel reproducteur des espèces très anthropophiles. Plus d'une vingtaine d'études réalisées sur les moustiquaires imprégnées dans différentes régions du monde rapportent une réduction de 20 à 63% des cas de paludisme et de la mortalité qui lui est associée (Alonso *et al.*, 1991; Snow *et al.*, 1996). Ces résultats sont par la suite confirmés par des études menées au Ghana (Binka *et al.*, 1996) et au Kenya (Nevill *et al.*, 1996) qui ont indiqué qu'au moins 500.000 enfants africains pourraient être sauvés chaque année si la distribution et l'utilisation à grande échelle des moustiquaires imprégnées était efficace. Elles sont de ce fait adoptées comme une importante méthode de lutte contre le paludisme. Mais, le développement des phénomènes de résistance des anophèles aux insecticides d'imprégnations (Chandre *et al.*, 1999) et leur influence supposée négative sur l'immunité anti-paludisme chez l'homme (Muller *et al.*, 2006) ont remis en discussion leur efficacité comme stratégie unique contre le paludisme. A

cet effet, de nouvelles méthodes d'imprégnation visant à réduire ces phénomènes de résistance ont été mises en place. Il s'agit notamment de la bi-imprégnation (Asidi *et al.*, 2005; Hougard *et al.*, 2002) et de l'utilisation d'autres insecticides tels que l'alpha-cyperméthrine (Koffi, 1998) ou la Bifenthrine (Chouaibou *et al.*, 2006).

Les moustiquaires imprégnées, comme les aspersions intra-domiciliaires, peuvent être donc vues comme un moyen de lutte anti-vectorielle à application générale (OMS, 2003).

I-4- Evaluation de la transmission

La transmission du paludisme se fait essentiellement au moment de la piqure par un moustique vecteur. On parle de transmission vectorielle qui est de loin le mode d'infection le plus important. Mais d'autres modes très rares de transmission ont été signalés : ce sont les transmissions par voie sanguine (Frey-Wettstein *et al.*, 2001), par l'utilisation de seringues infectées (Gonzalez Garcia *et al.*, 1986) ou par voie trans-placentaire (Djibo & Cenac, 2000).

I-4-1- Moyens entomologiques

La transmission du paludisme dépend tout d'abord de la présence d'anophèles compétents (bonne capacité vectorielle), de leur taux d'infection par *Plasmodium*, du nombre de piqures reçues et des caractéristiques du contact homme-vecteur. Il existe donc une relation directe entre le degré d'exposition et la transmission de la maladie (Carnevale *et al.*, 1988). Aujourd'hui les moyens d'évaluer l'exposition de l'homme aux différentes espèces d'anophèles sont généralement des méthodes entomologiques (captures des moustiques par pièges lumineux, « appâts humains », imprégnation intra-domiciliaire d'insecticides, moustiquaires pièges). Ces méthodes permettent de déterminer les degrés d'anthropophilie et zoophilie, d'endo- et exophilie, endo- et exophagie.

I-4-1-1- Evaluation de l'exposition aux risques

L'exposition au vecteur infecté est généralement évaluée par la mesure du **taux entomologique d'inoculation par unité de temps (EIR= Entomological Inoculation Rates)**. Il correspond au nombre de piqure infectante que reçoit un Homme pendant 24 heures. Il est obtenu à partir de la formule suivante : $h = ma.s$, dans laquelle ;

ma = nombre quotidien de piqures (nombre moyen de vecteurs piquant un homme en 24 heures). **ma** dépend essentiellement du nombre de gîtes larvaires potentiels, de la productivité en anophèles des gîtes et de l'exposition de l'homme.

s = indice sporozoïtique=SI (pourcentage d'anophèles présentant des sporozoïtes dans leurs glandes salivaires). «s» s'obtient directement par dissection des glandes salivaires pour visualiser la présence de sporozoïtes ou par test ELISA circumsporozoïtique.

Il n'existe pas de classification des zones endémiques à partir de l'EIR mais une relation étroite entre l'intensité de la transmission anophélienne et le taux d'endémicité a été constatée (Killeen *et al.*, 2000):

Hypo-endémicité : $EIR < 10$ piqûres infectantes/homme/an

Méso-endémicité : $10 \leq EIR < 50$ piqûres infectantes/homme/an

Hyper-endémicité : $50 \leq EIR < 100$ piqûres infectantes/homme/an

Holo-endémicité : $EIR \geq 100$ piqûres infectantes/homme/an

I-4-1-2- L'analyse du repas sanguin.

Elle permet de déterminer l'origine du repas sanguin. Elle peut se faire par ELISA directe (Beier, 1998). Cette technique consiste à détecter dans le sang absorbé par les femelles anophèles des anticorps spécifiques d'un certain nombre d'hôtes potentiels (homme, bœuf, mouton, poule, cheval, porc...).

I-4-1-3- Mesure de la densité de la population anophélienne

Pour avoir une idée de la densité anophélienne, les moustiques sont capturés selon différentes méthodes :

- **Captures sur appât humain** : il s'agit de capturer les femelles agressives qui essaient de se nourrir sur les humains. Ceci, permet de déterminer le taux d'agressivité des femelles et de mesurer l'exposition à la piqûre de moustique.

- **Les pièges lumineux** : ils permettent de capturer les moustiques attirés par la lumière. Cette méthode donne une bonne idée de l'abondance des différentes espèces de moustique et représente donc une méthode très utilisée pour évaluer l'exposition à la piqûre de moustique. Mais cette méthode ne permet pas de déterminer certains paramètres tels que l'agressivité, l'endophagie, exophagie des femelles capturées.

I-4-2- Méthodes diagnostiques de l'infection

I-4-2-1- Diagnostic clinique : Evaluation de la morbidité

Elle se fait avec de très grandes difficultés car basé sur l'enregistrement des cas de paludisme à partir des signes cliniques qui ne sont pas forcément spécifiques au paludisme. De plus, le paludisme asymptomatique est fréquent en zone d'endémie. On distingue ainsi :

- **Cas simples** : fièvre, céphalées, vomissements, diarrhées, triade «frissons-chaleur-sueur» (jamais pour la primo-invasion)
- **Accès palustres pernicioeux ou neuropaludisme** : association des symptômes de la crise simple avec des troubles neurologiques, convulsions, coma. Cette complication majeure est due uniquement à *P. falciparum* et s'observe fréquemment avec un ictère et anémie sévère. Ces signes sont évocateurs en zone d'endémie infectée ou après un séjour du patient dans une telle zone.

I-4-2-2- Diagnostic biologique

I-4-2-2-1- Diagnostic biologique non spécifique :

La numération de la formule sanguine montre une cytopénie (anémie, leucopénie, thrombopénie) et peut donner une idée sur la gravité du paludisme. Mais cette méthode n'est pas précise car ces anomalies (anémie, leucopénie, thrombopénie) ne sont pas toujours dues au paludisme. De ce fait ces méthodes imprécises de diagnostic ne sont plus utilisées.

I-4-2-2-2- Diagnostic biologique spécifique :

Il est basé sur des approches parasitologiques, immunologiques et de la biologie moléculaire, utilisant diverses méthodes et techniques.

a- Les techniques microscopiques conventionnelles :

Elles sont basées sur la détection des plasmodiums dans le sang et demeurent la référence diagnostique. Elles nécessitent une méthodologie simple, mais précise et rigoureuse et un long apprentissage. La sensibilité est corrélée au temps d'observation (pour un frottis : lecture d'au moins 100 champs, en pratique 20 minutes).

- Le frottis mince:

Il se fait, soit par prélèvement capillaire au bout du doigt avec confection immédiate du frottis, soit par ponction veineuse avec prélèvement dans un tube contenant un anticoagulant

et réalisation secondaire des lames d'examen. Il permet l'étude morphologique des hématozoaires et le diagnostic différentiel entre les espèces plasmodiales (il reste toujours un défi même pour un lecteur averti). Il peut permettre aussi le calcul de la parasitémie (intensité de l'infection), mais difficilement.

- **La goutte épaisse :**

Examen de référence de l'OMS, elle est largement utilisée pour le diagnostic de routine. Sa sensibilité est 20 à 30 fois plus élevée que celle du frottis mince. C'est une technique de concentration des hématies permettant d'identifier les stades sanguins du parasite (trophozoïtes, mérozoïtes et gamétocytes).

Ces 2 méthodes permettent de déterminer la densité parasitaire qui est estimée par le pourcentage d'hématies parasitées. La goutte épaisse détecte des parasitémies de 3 à 5 parasites/ μ l de sang, le frottis 100 à 200 parasites/ μ l.

Ainsi, elles permettent :

- **L'estimation des charges parasitaires** qui sont calculées par rapport à la leucocytémie moyenne/ μ l de sang. Elles peuvent également être exprimées en nombre moyen de globules rouges parasités sur le frottis sanguins.
- **La détermination de l'Indice Plasmodique (IP)** qui représente la proportion (en %) d'individus porteurs du parasite dans une population donnée et en un moment donné. Elle peut renseigner sur l'endémicité du paludisme dans la zone étudiée.
- **L'Indice Gamétocytaire** qui représente la proportion (en %) de porteurs de gamétocytes d'une population donnée à un moment donné.

b- Les méthodes immunologiques : Sérologie

Elle est basée sur l'immunofluorescence indirecte et l'ELISA. Différentes techniques sont actuellement utilisées :

- **Tests de diagnostic rapide**

Ces tests sérologiques sont actuellement commercialisés sous forme de Kit. Ils sont très rapides et consistent à la détection de différents antigènes plasmodiaux (*P. falciparum* et *P. vivax*), par l'utilisation de bandelettes auto-réactives contenant des anticorps monoclonaux spécifiques à ces antigènes. Cette technique est d'ailleurs utilisée actuellement dans les structures de santé pour confirmer le diagnostic clinique du paludisme.

- Autres tests immunologiques

Plusieurs études immuno-épidémiologiques ont montré que la réponse anticorps (Ac) contre certains antigènes des stades pré-érythrocytaires et érythrocytaires sanguins de *P. falciparum* pourraient représenter une «image» du degré de transmission. Des protéines des stades précoces (CSP, TRAP, LSA1, SALSA...) considérés pour leur activité immunogène et leur relation avec la transmission pourraient être de bons marqueurs d'évaluation de l'intensité de la transmission. En effet, dans les années 1990, il a été suggéré que les réponses IgG contre des antigènes du stade mérozoïte et sporozoïtes pourraient être utilisées comme des marqueurs sérologiques de transmission (Ramasamy *et al.*, 1994; Webster *et al.*, 1992). Ces méthodes permettaient de distinguer une dynamique de transmission en fonction de la saison et de différencier des foyers avec une forte ou faible exposition au paludisme. Mais les limites majeures de ce type de marqueur immunologique, quand il est évalué chez des enfants exposés, étaient liées aux très faible niveau de réponses Ac (très faible titre Ac) et au fort polymorphisme antigénique entre les souches de *Plasmodium* (Ramasamy *et al.*, 1994).

c- Techniques de biologie moléculaire :

Depuis 1985, les techniques d'amplification génique *in vitro* sont en pleine expansion dans le diagnostic et les études épidémiologiques du paludisme. Au départ, fondées sur l'hybridation moléculaire de sondes ciblant des séquences spécifiques d'ADN parasite, ces techniques sont aujourd'hui remplacées par la PCR («Polymerase Chain Reaction»). La PCR permet la détection de parasitemies très faible avec une spécificité de 100 %. La limite de détectabilité de la PCR se situe aux alentours de 0,01 parasites/µl de sang permettant en théorie de détecter un parasite dans l'échantillon analysé soit 100 µl (Druilhe *et al.*, 2001; Hommel & Schrevel, 1998). La PCR est ainsi plus sensible que la microscopie et les techniques de recherche d'antigènes circulants (Filisetti *et al.*, 2002; Rubio *et al.*, 2001). Cependant, c'est une technique demandant du personnel qualifié, des locaux et du matériel appropriés et surtout des moyens financiers importants limitant son essor dans les pays impaludés et en particulier au niveau des structures de santé.

Chez l'homme, les moyens actuels de diagnostic évaluent l'infection et/ou la transmission (parasitémie, réponse immune anti-parasite). En revanche, un diagnostic chez l'homme qui pourrait évaluer efficacement l'exposition aux piqûres de moustiques et ainsi les risques de contracter l'infection palustre n'est pas disponible. Une des meilleures méthodes de mesure de l'exposition au paludisme est la méthode de captures sur appât humain. Il s'agit de capturer les femelles agressives qui essaient de se nourrir sur les humains. C'est la méthode actuelle la

plus précise de mesure individuelle de piqûre de moustiques, mais elle est très limitée dans son application car elle est confrontée à des problèmes éthiques évidents et est très lourde à mettre sur place à grande échelle.

La mise en place d'un outil nouveau de diagnostic évaluant efficacement le degré d'exposition aux piqûres d'anophèles, et ainsi d'évaluer les risques potentiels de paludisme serait alors intéressant pour mieux évaluer l'exposition des populations à la piqûre du vecteur et ainsi au risque de paludisme.

I-5- Relation Homme-Vecteur

I-5-1- Piqûre des moustiques et repas sanguin.

Chez certaines espèces de moustiques, les femelles qui ont besoin d'un apport supplémentaire en protéines pour la maturation des œufs, sont hématophages. La femelle, à jeun, se met, la nuit (*Anopheles* et *Culex*) ou le jour (*Aedes*), à la recherche d'un hôte à piquer. La localisation de ce dernier se fait à plusieurs niveaux. L'identification des facteurs d'attractivité et des mécanismes de localisation et de reconnaissance de l'hôte à piquer sont des domaines de recherche actuellement en plein essor (voir I-2-2-2-c). Une fois qu'un hôte a été identifié, la femelle choisit une zone de peau exposée (où les capillaires sont nombreux et en superficie) et y insère ses pièces buccales. Commence ainsi la piqûre au cours de laquelle il y a transmission des pathogènes du vecteur infecté à l'hôte. Le mécanisme de cette piqûre est relativement simple. La trompe comprend, entre autre un canal salivaire et un canal alimentaire, acéré d'un biseau à l'extrémité. Au repos, les pièces buccales sont protégées dans le labium, une enveloppe souple. Lorsque le moustique se nourrit (pique), le labium se replie sous la trompe qui pénètre et recherche un capillaire sanguin. La salive est injectée à plusieurs reprises durant la pénétration des pièces buccales provoquant ainsi une anesthésie locale et empêchant le sang de se coaguler dans la trompe. Ce repas sanguin apporte à la femelle du moustique anophèle les protéines nécessaires à la maturation de ces œufs et donc indispensable pour l'achèvement de leur cycle gonochorique. Le premier repas sanguin est pris avant ou après l'accouplement, 4-5 jours après l'émergence des adultes, selon les espèces et les conditions écologiques. Mais généralement, les femelles d'anophèles, et en particulier les nullipares, ont besoin d'un second repas sanguin pour la maturation de leurs œufs.

I-5-2- Protéines salivaires d'arthropodes et leurs rôles.

Au cours de la relation homme-vecteur, la salive des arthropodes hématophages est impliquée dans 2 processus : favoriser la prise de repas sanguin de l'insecte (James & Rossignol, 1991) et la transmission du pathogène dans le cas où le vecteur est infecté. Des molécules biochimiques de différentes natures (protéines, acides nucléiques, glucides....) ont été identifiées en solution dans la salive des arthropodes, leur conférant ainsi d'importantes propriétés pharmacologiques (Champagne, 1996). Ces substances affectent essentiellement les systèmes hémostatique, inflammatoire et immunitaire de l'hôte vertébré modifiant ainsi sa physiologie (Ribeiro, 2000; Ribeiro *et al.*, 1994) et permettant aux hématophages de piquer et de favoriser le bon déroulement du repas sanguin. Ces systèmes permettent de contrecarrer la réaction hémostatique et inflammatoire de l'hôte vis-à-vis de la piqûre de l'insecte. Mais, ce changement de la physiologie locale de l'hôte, sous l'effet des protéines, prostaglandines, nucléotides et/ou nucléosides de la salive, risque d'avantager les parasites, bactéries et virus portés par le vecteur arthropode (Belkaid *et al.*, 1998). Par exemple, le spirochète *Borrelia burgdorferi*, agent étiologique de la maladie de Lyme, reste au point d'injection durant toute la durée du repas sanguin de la tique. Cette dernière ayant besoin de plusieurs jours pour sa réplétion (Binnington & Kemp, 1980), l'agent pathogène va ainsi profiter des effets immunosuppresseurs et anti-inflammatoires locaux des éléments salivaires (Gillespie *et al.*, 2000) pour diffuser plus facilement à travers la peau de l'hôte

I-5-2-1- Protéines salivaires et réaction hémostatique

Divers travaux portant sur la salive et les glandes salivaires des arthropodes hématophages ont permis de caractériser et d'identifier une vaste gamme d'éléments salivaires (vasodilateurs, inhibiteurs de vasoconstriction, des inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire, des anticoagulants ou inhibiteurs de la cascade de coagulation...) (**Tableau 1**) par des techniques moléculaires de séparation et d'analyse (identification du DNA, analyse protéomique...). Plus récemment, les techniques de l'analyse du génome ou sialome (analyse du transcriptome de la salive) sont utilisées pour identifier les protéines salivaires sécrétées au moment du repas sanguin (Calvo *et al.*, 2006; Valenzuela, 2002).

Tableau 1 : Protéines majeures d'arthropodes et leurs actions

	Rôle	Espèces	Références
Apyrase 5' nucleotidase	Anti-agrégation plaquettaire	Tous les arthropodes hématophages (sauf <i>Amblyomma americanum</i>)	(Ribeiro <i>et al.</i> , 1985; Roberts <i>et al.</i> , 1999)
Anophèline	anticoagulant		(Francischetti <i>et al.</i> , 1999)
Tachykinines	Vasodilatateur	<i>Aedes aegypti</i> <i>Aedes triseriatus</i>	(Champagne & Ribeiro, 1994; Ribeiro, 1992; Ribeiro <i>et al.</i> , 1994)
Platelet-activating- factor	Anti-agrégation plaquettaire	<i>Culex quinquefasciatus</i>	(Ribeiro & Francischetti, 2001)
PGE2	Vasodilatateur Bloque la RI immédiate	<i>Ixodes dammini</i> <i>Amblyomma americanum</i> <i>Boophilus microplus</i>	(Inokuma <i>et al.</i> , 1994)
Cathécoloxydase/P eroxydase	Vasodilatateur	<i>Anopheles gambiae</i> <i>Anopheles albimanus</i>	(Ribeiro <i>et al.</i> , 1994)
NO binding protein	Anti-agrégation plaquettaire Anti-histaminique	<i>Rhodnius prolixus</i> <i>Cimex lectularis</i>	(Champagne D., 1996)
Carboxypeptidase	Détruit la bradykinine	<i>Ixodes dammini</i>	(Ribeiro & Spielman, 1986)
Maxadilan = (EIF)	Immunosuppresseur Anti-inflammatoire Vasodilatateur	<i>Lutzomia longipalpis</i>	(Lerner & Shoemaker, 1992; Morris <i>et al.</i> , 2001; Soares <i>et al.</i> , 1998)
Novel protein	Anti-coagulant	<i>Simulium vittatum</i>	(Abebe <i>et al.</i> , 1996)
Tse-tse Thrombin Inhibitor	Anti-agrégation plaquettaire Anti-coagulant	<i>Glossina</i>	(Cappello <i>et al.</i> , 1996)
Anti- Facteur Xa	Anti-coagulant	<i>Ixodes</i> , <i>Aedes aegypti</i> , <i>Simulium</i> , <i>Triatoma</i>	(Perez de Leon <i>et al.</i> , 1998; Stark & James, 1996)
Simulidine	Anti-coagulant	<i>Simulium</i>	(Abebe <i>et al.</i> , 1996)
Famille D7	Anti-hémostase Anti-inflammatoire	<i>Aedes</i> , <i>Anopheles</i> et <i>Culex</i>	(Arca <i>et al.</i> , 1999; Valenzuela, 2002)
Hamadarine	vasodilatateur	<i>Anopheles stephensi</i>	(Isawa <i>et al.</i> , 2002)

a- Inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire

L'accumulation de plaquettes sanguines (ou agrégation plaquettaire) est la première ligne de défense des mammifères pour éviter la perte de sang en cas de blessure. En effet, les plaquettes sanguines activées par divers agonisants tels que la thrombine et le collagène vont jouer un rôle majeur dans l'hémostase, la coagulation et la thrombose, phénomènes visant à arrêter le saignement. Mais à travers leur salive, les insectes hématophages limitent ou empêchent, à travers diverses voies, ces mécanismes afin de réussir ainsi leur prise de repas sanguin.

- l'Apyrase :

Molécule de nature protéinique, l'apyrase a été identifiée chez la femelle de toutes les espèces d'arthropodes hématophages (Mathews *et al.*, 1996; Roberts *et al.*, 1999) sauf chez certaines espèces de tiques telles que *Amblyomma americanum*. Elle a été décrite notamment chez les moustiques (Nascimento *et al.*, 2001), les simulies (Cross, 1993), les réduves (Sarkis *et al.*, 1986) et les glossines (Mant & Parker, 1981). Cette protéine hydrolyse les liaisons phosphodi-esters des nucléosides tri- (ATP) et di-phosphates (ADP) en nucléosides mono-phosphates (AMP) et en phosphate organique, qui sont des antagonistes de l'activation des plaquettes (Ribeiro, 1995). Cette protéine a été clairement décrite pour la première fois chez *Aedes aegypti* (Champagne *et al.*, 1995) chez laquelle elle appartient à la grande famille moléculaire des 5'nucléotidases. Cette apyrase a été aussi rencontrée chez les moustiques des genres *Anopheles* (Arca *et al.*, 1999) et *Culex*. Un autre type d'apyrase, présentant des similitudes avec celle des humains et phlébotomes, a été aussi trouvée chez *Cimex lectularius* (Valenzuela *et al.*, 1998). Cette nouvelle molécule se rencontre aussi chez *Phlebotomus papatasi* (Valenzuela *et al.*, 2001) et *Lutzomya longipalpis* (Charlab *et al.*, 1999).

- Autres anti-plaquettaires

C'est le cas de l'**anopheline** de la salive d'*An. albimanus* (Francischetti *et al.*, 1999) et de la **Thrombin inhibitor** (TTI) qui sont des anti-thrombines (Cappello *et al.*, 1996) et qui présentent également une activité visant à inhiber l'agrégation des plaquettes sanguines.

Des **prostaglandines**, similaires à celles rencontrées chez l'homme, assurent l'inhibition de l'activité des plaquettes chez certaines espèces de tiques telles que *Ixodes scapularis* et *Amblyomma americanum* (Ribeiro, 1992).

Des **lipocalines**, pouvant empêchant l'accumulation des plaquettes, ont été découvertes notamment chez les certaines Réduves telles que *Rhodnius prolixus* (Francischetti *et al.*,

2000). Une molécule de même structure (**Pallipidine**) a été aussi découverte chez *Triatoma pallidipennis* (Noeske-Jungblut *et al.*, 1994).

b- Les anti-coagulants

Les insectes hématophages ont développés des stratégies leurs permettant de faire face au processus de coagulation engendré par l'activation de divers facteurs plasmatiques.

- les anti-cascades de coagulation

La cascade de coagulation de sang aboutit à la production de thrombine active, qui transforme le fibrinogène en fibrine qui, à son tour, polymérise et forme avec des plaquettes sanguines un ensemble appelé le «caillot sanguin». En stimulant aussi directement l'agrégation plaquettaire, la thrombine apparaît comme indispensable à la coagulation du sang. Cependant la salive des hématophages renferme des inhibiteurs de thrombine comme l'**anophéline** de la salive d'*An. Albimanus* (Valenzuela *et al.*, 1999) et les inhibiteurs de Facteur Xa comme la **serpine** d'*Ae. aegypti* (Perez de Leon *et al.*, 1998; Stark & James, 1996), chez les *Ixodes spp* et chez *Culex*. Certaines protéines hémostatiques présentent aussi des propriétés immuno-modulatrices sont décrites chez d'autres espèces : c'est le cas de la **simulidine** qui est un inhibiteur de la thrombine (Abebe *et al.*, 1996).

- La Famille D7

De nombreux insectes hématophages possèdent dans leur salive des protéines appartenant à la **grande famille moléculaire D7** (Arca *et al.*, 1999; Valenzuela *et al.*, 2002). Ces protéines qui sont décrites uniquement dans les glandes salivaires des femelles ont été identifiées chez *Ae. Aegypti* (James & Rossignol, 1991), chez *An. dirus* et *An. gambiae* où elles sont codées par 4 gènes (Arca *et al.*, 2002). La fonction de ces protéines reste incertaine. On pense cependant qu'elles seraient impliquées dans le transport de petites molécules hydrophobes intervenant dans la facilitation de la prise de sang et seraient capables de capter des médiateurs de la réponse hémostatique de l'homme (Arca *et al.*, 2002). Une protéine de 16KDa appartenant à une famille proche des protéines D-7 a été décrite chez *An. stephensi* : l'**hamadarine** qui inhibe le système de contact en empêchant l'activation réciproque entre le Facteur XII et la Kallikréine en présence de Zn^{2+} (Isawa *et al.*, 2002).

c- Les Vasodilatateurs

Les vasodilatateurs sont des molécules qui augmentent le flux sanguin et contrent l'effet des vasoconstricteurs endogènes produits par le système hémostatique à la suite de la blessure due à la piquûre. Ils agissent directement ou indirectement sur des cellules musculaires lisses activant ainsi des enzymes intracellulaires comme l'adénylate cyclase et la guanylate cyclase qui sont nécessaires à la formation de l'Adénosine Mono-phosphate cyclique (AMPc) et de la Guanosine Monophosphate cyclique (GMPc). De nombreux vasodilatateurs de diverses natures ont pu être caractérisés chez les insectes piqueurs :

Le **Maxidilian** (MAX) découvert chez *Lutzomyia longipalpalis* (Lerner & Shoemaker, 1992) est un puissant vasodilatateur à action persistante et présente des propriétés immunogéniques impliquées dans l'exacerbation de la pathologie de leishmaniose (Titus & Ribeiro, 1988). Chez *Aedes*, on a 2 **tackikinines** appelées **Sialokinine 1 et 2**. Ces 2 petits peptides miment l'action d'une substance P (autre petit peptide endogène) qui agit directement sur l'endothélium activant la production l'oxyde nitrique par les cellules endothéliales (Champagne & Ribeiro, 1994; Ribeiro *et al.*, 1994) engendrant ainsi une dilatation des vaisseaux sanguins. Ces peptides sont spécifiques aux moustiques de la famille des Culicidae (Ribeiro *et al.*, 1994) et permettent l'activation des macrophages et la présentation des antigènes (activités immuno-modulatrices).

Anopheles albimanus sécrète dans sa salive une **peroxydase de 60-kDa** qui est une enzyme destructrice de la norépinephrine, un très puissant vasoconstricteur de l'hôte humain (Ribeiro & Valenzuela, 1999; Valenzuela *et al.*, 1999). Cette peroxydase serait aussi présente chez *An. gambiae*.

Les **prostaglandines** des tiques du genre *Ixodes* (Ribeiro, 1988), les **nucléotides** et **nucléosides** comme l'AMP et l'adénosine de la salive de *Phlebotomus papatasi* et *P. argentipes* (Ribeiro & Valenzuela, 1999; Valenzuela *et al.*, 1999), sont les exemples de vasodilatateurs non peptidiques.

I-5-2-2- Protéines salivaires et infection

Les composants de la salive, dont certains sont immunogéniques (Billingsley *et al.*, 2006), ont pour rôle majeur de déjouer les mécanismes immunitaires et hémostatiques de l'hôte par diverses manières (Donovan *et al.*, 2007). En particulier, l'infection du vecteur par le pathogène semble provoquer une modification du comportement du vecteur (Donovan *et al.*, 2007), et pourrait ainsi se traduire par une variation de l'expression de certaines de ses

protéines salivaires (Cornelie *et al.*, 2007). Le temps du repas sanguin, celui de la salivation et le nombre de piqûres seraient augmentés chez le vecteur infecté (Ribeiro, 1995). Il a aussi été remarqué que les anophèles infectés par *Plasmodium* réalisent leur repas sanguin tout au long de la nuit, tandis que les non infectés piquent rarement plus d'une fois par nuit (Robert *et al.*, 1998). Tout ceci vise à augmenter l'infection de l'homme par le pathogène. Ce phénomène serait lié à une variation dans l'expression de certaines protéines salivaires, comme décrit chez l'anophèle infecté par *P. falciparum* (Champagne, 1996) permettant ainsi une neutralisation optimale de la réaction locale de l'homme au cours de la piqûre infectante (James & Rossignol, 1991).

I-5-3- Relation immunologique Homme-Vecteur arthropode.

I-5-3-1- Généralités

L'étude de la réponse immune anti-arthropode développée chez l'hôte mammifère constitue un axe important de recherche de l'immunologie à la piqûre d'arthropodes (Remoue *et al.*, 2005). Un ensemble important de travaux a été réalisé dans ce domaine même si la plupart a été surtout appliquée à la recherche de vaccin vétérinaire (Sandeman, 1996) et à l'allergologie chez l'homme (Gillespie *et al.*, 2001; Sandeman, 1996). Dans le domaine de la santé humaine, les axes de recherche de l'immunologie à la piqûre des arthropodes peuvent être classés ainsi (Gillespie *et al.*, 2000):

- l'immunomodulation induite par la piqûre
- les phénomènes allergiques liés à la piqûre des moustiques (*Aedes*, *Culex*)
- les stratégies vaccinales réduisant la population des vecteurs
- l'étude de la réponse immune anti-arthropode en fonction de l'exposition au vecteur

Face à cet état de connaissance, ajouté au développement de l'immunologie et de la biologie moléculaire durant cette dernière décennie, il est devenu clair que l'étude actuelle de la réaction immunitaire de l'homme vis à vis des protéines sécrétées lors de la piqûre d'anophèles pourrait notamment aboutir à une meilleure évaluation de l'exposition au vecteur et de son rôle dans la transmission.

I-5-3-2- Immuno-modulation provoquée par la salive

Les caractéristiques immunologiques de la relation hôte/vecteur sont relativement bien décrites pour certaines maladies. En effet, il a été montré que la salive injectée lors du repas sanguin du vecteur possède des propriétés pharmacologiques intervenant sur la modulation de la réponse immunitaire acquise et innée de l'hôte (Champagne & Ribeiro, 1994; Ribeiro *et al.*, 1994). Les données les plus avancées concernent l'influence de la piqûre du phlébotome, vecteur de la leishmaniose, sur l'immunomodulation locale (Gillespie *et al.*, 2000). Les protéines salivaires peuvent réguler la production de cytokines Th1/Th2 et jouer ainsi un rôle clé dans la protection/susceptibilité à l'infection (Mbow *et al.*, 1998). En effet, la réponse de type Th1 est associée à une immunité protectrice tandis que la réponse type Th2 est associée à l'infection du parasite et à la pathologie de la leishmaniose. Les extraits salivaires de phlébotomes inhibent d'une manière générale la réponse Th1 par activation des lymphocytes T (LT) et induisent une baisse de la production d'interleukine-12 (IL12) et d'interféron- γ (IFN- γ) (Hall & Titus, 1995). Cet effet immunosuppresseur est associé à une augmentation de la production d'IL4 (réponse Th2) qui bloque la destruction des parasites par les macrophages (Titus *et al.*, 1994). Dans un modèle animal, il a été montré que la co-injection de salive de phlébotome, au moment de l'infection par des parasites, inhibe la capacité des macrophages à présenter les antigènes aux LT (Theodos *et al.*, 1991) et à produire du H₂O₂ et du NO, substances ayant une action anti-parasitaire. Il a été aussi montré que le Maxidilan (MAX), petit peptide de 7 kD a, principal vasodilatateur de *Lutzomia longipalpalis*, est capable d'induire le même effet immunomodulateur que les extraits salivaires totaux (Morris *et al.*, 2001; Soares *et al.*, 1998). En effet, l'administration locale de MAX induit des érythèmes cutanés et inhibe la réaction d'hypersensibilité de l'hôte ainsi que l'activation des LT (Qureshi, 1996). Il peut aussi inhiber la production de NO (Gillespie *et al.*, 2000; Hall & Titus, 1995), de H₂O₂ et du Tumor Necrosis Factor- α (TNF α) par les macrophages (Bissonnette *et al.*, 1993) et augmenter la sécrétion de l'IL-10 (Zeidner *et al.*, 1999), du PGE2 et de l'IL6 (Soares *et al.*, 1998). Le MAX diminue alors la réponse Th1 et favorise une réponse Th2, permettant ainsi la survie des *Leishmania* et le développement de la pathologie. La tique *Ixodes scarpulari*, vecteur de la maladie de Lyme, dispose dans sa salive des éléments anti-inflammatoires et immunosuppresseurs lui permettant de faire face aux mécanismes immunitaires innés et spécifiques (Brossard *et al.*, 1982). En effet, il a été montré que les protéines salivaires de cette tique sont capable d'inhiber l'action des neutrophiles de l'hôte (Ribeiro *et al.*, 1990), de réguler négativement des cytokines inflammatoires (IL-1 et

TFN- α) (Gillespie *et al.*, 2000). La salive des simulies, vecteurs de l'onchocercose, renferme un anti-coagulant (Simulidine) qui inhibe la capacité de présenter les antigènes par les cellules immunes en diminuant l'expression des molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de type 2 (Cross, 1993). Il a été récemment montré, chez la souris, que la salive de 2 espèces de Culicidés diffère dans leur activité immuno-modulatrice. Les extraits salivaires d'*Aedes* inhibent la prolifération des LT et la production de cytokines de type Th1 et Th2 alors que cet effet n'a pas été retrouvé chez *Culex quinquefasciatus* (Zeidner *et al.*, 1999). Néanmoins, ces moustiques secrètent des protéines immunomodulatrices si bien que le temps de prise de repas sanguin ne dure que de quelques minutes. Chez ces 2 vecteurs, les vasodilatateurs sialokinine 1 et 2 réguleraient positivement la production d'IL-4 et d'IL-10 de type Th2 (Zeidner *et al.*, 1999), qui modifierait l'activation des macrophages et la présentation des antigènes (Brunelleschi *et al.*, 1990). Plus récemment, le rôle immunomodulateur de la salive des espèces d'*Anopheles* a été rapporté (Owhashi *et al.*, 2001). Ces auteurs ont en effet identifié un facteur présentant une activité attractive pour les neutrophiles mais non pour les éosinophiles, le Neutrophil chemotactic Factor (NCF) qui pourrait être impliqué dans la réaction inflammatoire locale par l'accumulation de neutrophiles au niveau du site de piqûre.

Toutes ces observations laissent croire que le rôle immunosuppresseur des composants salivaires, et d'une manière plus large la régulation de la relation hôte-vecteur, pourrait jouer un rôle non négligeable dans la co-évolution entre l'hôte, le vecteur et le parasite (Randolph & Nuttall, 1994).

I-5-3-3- L'allergie

Les principales études de la relation homme-moustique avaient pour objectif de caractériser les phénomènes allergiques et d'hypersensibilité liés à l'influence de protéines salivaires sécrétées au cours de la piqûre (*Aedes* principalement). Les protéines immunogéniques majeures impliquées dans ces phénomènes ont été caractérisées et sont majoritairement reconnues par les isotypes IgG1, IgE et IgG4 (Brummer-Korvenkontio *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 1995 & 2001). Ces protéines pourraient être ainsi utilisées, sous forme recombinante, en diagnostic (mesure de l'exposition aux piqûres allergisantes) ou en immunothérapie permettant une désensibilisation de l'homme (Brummer-Korvenkontio *et al.*, 1994). La saison et l'âge d'exposition sont des facteurs de variations de la réponse Ac anti-salive et il a été montré que l'apparition d'une réponse IgG4 anti-salive serait un indicateur d'exposition intense aux piqûres d'*Aedes* (Konishi, 1990; Palosuo *et al.*, 1997). Le taux des IgE anti-

protéines salivaires d'*Aedes aegypti* serait aussi un indicateur d'exposition intense à la piqure de ce vecteur (Remoue *et al.*, soumis).

I-5-3-4- Marqueur d'exposition à la piqure du vecteur

L'étude de la réponse immune spécifique aux protéines salivaires pourrait être un marqueur épidémiologique permettant d'évaluer le niveau d'exposition aux piqures des vecteurs et donc aux risques des maladies à transmission vectorielle (Remoue *et al.*, 2006). Chez l'homme, une réponse Ac spécifiques aux protéines salivaires peut être détectée chez les individus exposés aux vecteurs. En effet, il a été montré que les Ac dirigés contre les extraits salivaires de phlébotomes semblent être un marqueur d'exposition aux leishmanioses (Mbow *et al.*, 1998). La réponse IgG spécifique aux extraits salivaires semble être aussi un marqueur d'exposition aux tiques *Ixodes*, vecteurs de *Borrelia burgdorferi*, agent de la maladie de Lyme (Ribeiro *et al.*, 1985). Des isotypes IgG1 et IgG4 spécifiques à la salive de réduves triatomidés, vecteurs de la maladie de Chagas, sont détectés chez des individus exposés (Nascimento *et al.*, 2001). Cette approche est également envisageable pour l'exposition aux glossines (mouche tsé-tsé), vecteur de la Trypanosomiase Humaine Africaine (THA). En effet, des réactions d'hypersensibilités immédiate et retardée ont été observées chez des lapins exposés à la salive de *Glossina morsitans centralis*, (Ellis *et al.*, 1986), mettant en évidence des propriétés immunogéniques pour certaines de ces protéines salivaires. Chez l'homme, notre équipe de recherche a montré que le profile des protéines salivaires immunogéniques de glossines pouvaient être différent en fonction de l'espèce vectrice et du statut trypanique des individus exposés (Poinsignon *et al.*, 2007). Ainsi, l'évaluation de la réponse Ac spécifique à la salive de glossines chez ces individus exposés pourrait s'avérer être un indicateur d'exposition aux piqures de glossines. A cet effet une protéine immunogénique de 54 kDa a été détectée. Cette protéine serait spécifique à l'espèce *Glossina fuscipes fuscipes*, principale espèce vectrice de *Trypanosoma brucei gambiense*. La mise en évidence d'Ac spécifiques à cette protéine pourrait donc être à la base de la recherche d'un marqueur d'exposition spécifique de la piqure de cette espèce. Dans les pays tropicaux, les anticorps IgG et IgE de la salive de *Culex quinquefasciatus* ont été détectés chez des individus vivant dans des régions endémiques pour *Wuchereria bancrofti* (Das *et al.*, 1991). Le taux d'IgG4 et IgE anti-protéines salivaires d'*Aedes aegypti* serait également un indicateur d'exposition intense à la piqure de ce vecteur (Palosuo *et al.*, 1997; Reunala *et al.*, 1994). Contrairement aux données concernant les piqures d'*Aedes* et *Culex* déclenchant pour la plupart des réactions allergiques, peu d'études de la réponse Ac anti-salive ont été décrites chez les anophèles. Des IgE et IgG4

spécifiques sont mises en évidence chez l'homme exposé et reconnaissent différentes protéines salivaires d'anophèles (Brummer-Korvenkontio *et al.*, 1997) en fonction du genre du moustique, *Aedes*, *Culex* ou *Anopheles*. Certaines de ces protéines immunogéniques (faible kD) sont spécifiques de l'espèce de moustique alors que d'autres semblent communes. Enfin, il a été montré récemment dans notre unité IRD que les enfants exposés au paludisme au Sénégal développaient une réponse IgG anti-salive d'*An. gambiae* et que celle-ci était associée positivement au degré d'exposition aux piqûres de ce vecteur qui a été évalué par des méthodes entomologiques classiques (Remoue *et al.*, 2006). De plus, la réponse IgG anti-salive semblait représenter un marqueur prédictif du développement d'une morbidité palustre.

L'utilisation d'un marqueur d'exposition aux piqûres d'arthropodes vecteurs pourrait être bénéfique pour l'épidémiologie des maladies à transmission vectorielle et pour le développement d'immuno-test simple, rapide et quantitatif. Cela pourrait permettre d'identifier les populations à risque de transmission des pathogènes afin de les surveiller en priorité. En plus de l'outil immunologique, un tel marqueur pourrait être utile dans l'évaluation des stratégies anti-vecteurs. Ce dernier point constitue le thème de ce projet de DEA intitulé **«Réponse anticorps anti-salive d'*Anopheles gambiae* : un nouvel outil immunologique pour évaluer l'efficacité des moustiquaires imprégnées dans la lutte anti-vectorielle contre le paludisme?»**. Ce projet a pour objectif général d'évaluer la réponse immune spécifique à la piqûre du vecteur *An. gambiae* et d'appréhender son intérêt d'utilisation dans les stratégies anti-vecteurs, en particulier dans le cas des moustiquaires imprégnées.

Les objectifs spécifiques seront d'évaluer en premier lieu la différence de la réponse Ac dirigée contre les extraits salivaires totaux d'*An. gambiae* entre des individus protégés par des moustiquaires imprégnées d'insecticides (Permanet) versus un groupe contrôle dormant sans moustiquaires (études menées en Angola dans la localité de Lobito en collaboration avec P. Carnevale et la Société Stoltoffshore). L'évolution de la réponse Ac anti-salive sera comparée aux données entomologiques et parasitologiques. Notre objectif sera ainsi d'évaluer si un tel marqueur immunologique pourrait ou non être utilisé comme critère d'efficacité dans cette stratégie de lutte anti-vectorielle qu'est l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides à effet rémanent.