

LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX

Listes des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Cycle de <i>P. falciparum</i> | 6 |
| Figure 2 : Vue générale de la réponse immunitaire pré-érythrocytaire: intervention des cytokines..... | 10 |
| Figure 3 : Représentation schématisée de CSP et du candidat vaccins : RTS-S..... | 11 |
| Figure 4 : Principales étapes du dosage d'anticorps sériques par ELISA. | 17 |
| Figure 5 : Comparaison des densités parasitaires (en parasites par μ l) suivant l'âge (a) les taux de plaquettes (b) et le taux d'hémoglobine (c). | 20 |
| Figure 6 : Comparaison des niveaux des réponses IgG et IgM anti-CSP et anti-BSA. | 22 |
| Figure 7 : Comparaison de niveaux des réponses IgG et IgM suivant les densités parasitaires chez les enfants (a) et chez les adultes (b)..... | 23 |
| Figure 8 : Comparaison de niveaux des réponses IgG et IgM suivant le taux d'hémoglobine (a) et de plaquettes (b) dans la population d'étude..... | 24 |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau I : Données générales de la population d'étude..... | 19 |
| Tableau II : Prévalences des répondeurs en IgM et IgG anti-CSP..... | 21 |

SIGLES ET ABREVIATIONS

Ac : Anticorps.

ADCI: inhibition cellulaire médiée par les anticorps.

ADN: Acide désoxyribonucléique.

Ag: Antigène.

BSA: Bovine Serum Albumin.

CMH: Complexe Majeur Histocompatibilité.

CSP: Circum Sporozoite Protein.

DDT: Dichlorodiphényltrichloroéthane.

DO: Densité Optique.

EDTA: Ethylène Diamine Tétracétate.

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay.

Fc: Fragment de fixation de l'Ac à la cellule effectrice.

GPI: Glycosyl Phosphatidyl Inositol.

GRp : Globules Rouges parasités.

HLA: Human Leucocyte Antigen.

HPD : Hôpital Principal de Dakar.

ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule-1.

Ig: Immunoglobuline.

IFN γ : Interféron γ .

IL: Interleukine.

IPD: Institut Pasteur de Dakar.

KAHRP: knob-Associated Hisrich Protein.

kDa: kilodalton.

NK: Natural Killer.

NO: Monoxyde d'Azote.

OMS: Organisation Mondiale de la Santé.

PBS: Phosphate Buffer Saline.

Pf : *Plasmodium falciparum*.

PfEMP: *P. falciparum* Erythrocyte Membrane Protein.

PNN : Polynucléaires Neutrophiles.

PS : Paludisme simple.

rtDO: ratio de DO.

SHI: serum hyper-immun.

Th: cellule T helper.

TNF α : Tumor Necrosis Factor α (facteur de nécrose tumorale).

VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule-1.

Table des matières

| | |
|---|----|
| INTRODUCTION | 1 |
| 1ère Partie : RAPPELS SUR LE PALUDISME | 2 |
| I Définition et Historique | 2 |
| II. Epidémiologie du paludisme | 3 |
| II-1 répartition géographique et impact du paludisme dans le Monde | 3 |
| II-2 Aspects particuliers du paludisme en milieu urbain en Afrique. | 3 |
| III. Hôtes et biologie de parasite | 4 |
| III-1 Agent pathogène | 4 |
| III-2 Vecteurs | 4 |
| III-3 Cycle biologique de Plasmodium falciparum. | 5 |
| III.3.1. Cycle chez l'homme. | 5 |
| III.3.2. Cycle chez l'anophèle femelle. | 6 |
| IV. Physiopathologie de l'infection à Plasmodium falciparum. | 7 |
| IV.1 Accès palustre simple. | 7 |
| IV.2 Accès palustres sévères : cas du neuropaludisme. | 7 |
| V - Immunité anti palustre | 8 |
| V-1 Notion de prémunition. | 8 |
| V-2 Immunité à médiation cellulaire. | 8 |
| V-3 Immunité humorale | 9 |
| V-3-1 Les anticorps..... | 9 |
| V-3-2- Les cytokines | 10 |
| VI- Les Antigènes des stades pré-érythrocytaires (exemple de la CSP) et candidats vaccins RTS, S .. | 11 |
| VI-1 protéine circumsporozoite. | 11 |
| VI-2 Candidats vaccins. | 11 |
| 2ème Partie : TRAVAIL PERSONNEL..... | 13 |
| I. MATERIEL ET METHODES | 13 |
| I-1- Site et population d'étude. | 13 |
| I-2- Matériels | 14 |
| I-2-1 Matériel de laboratoire..... | 14 |
| I-2-2- Les tampons et réactifs chimiques. | 14 |
| I-2-3 Matériel biologiques :..... | 15 |
| I-2-3-1 Sérums témoins systématiques :..... | 15 |
| I-2-3-2 L'antigène étudié: | 16 |

| | |
|--|----|
| I-3~ Méthodologie..... | 16 |
| I-3-1- La technique ELISA :..... | 16 |
| I-3-2. Analyses statistiques des résultats | 18 |
| II-RESULTATS | 19 |
| II-1.Caractéristiques de la population d'études | 19 |
| II-1-1Données générales de la population d'étude. | 19 |
| II-1-2. Comparaison des densités parasitaires (en parasites par μ l) suivant l'âge, les taux de plaquettes et le taux d'hémoglobine..... | 20 |
| II-2- Analyses des réponses anticorps contre la protéine CSP..... | 21 |
| II-2-1- Prévalences des répondeurs contre la CSP. | 21 |
| II-2-2- Niveaux de réponses en Ac contre la CSP et BSA : variations suivant l'âge des patients. | 22 |
| II-2-3- Variations des niveaux de réponses Ac suivant les données hémato-parasitologiques. | 23 |
| II-2-3-1 Comparaison suivant la parasitémie. | 23 |
| II-2-3-2 Comparaison suivant le taux d'hémoglobine et de plaquettes..... | 24 |
| III-DISCUSSION | 25 |
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 27 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 28 |

INTRODUCTION

Le paludisme est dû à des parasites du genre *Plasmodium*. Il est transmis par la piqûre d'un moustique femelle du genre *Anophèles*. En Afrique subsaharienne, bien que les programmes de lutte antipaludique aient permis une diminution substantielle de sa prévalence, l'infection palustre continue d'être à l'origine d'une morbidité et d'une mortalité élevées surtout chez les enfants [1, 2]. Parmi les cinq espèces plasmodiales pouvant infecter l'homme, *P. falciparum* est la plus redoutable ; elle est responsable de la majorité des décès liés au paludisme, globalement estimés à 627.000 à 1,2 millions par an selon l'OMS [3].

En raison de la complexité du cycle parasitaire, de la variation antigénique et d'une connaissance incomplète des mécanismes immunitaires assurant la protection de l'hôte contre la maladie, la maîtrise de l'infection palustre reste difficile. En outre, l'émergence et la diffusion de la résistance du parasite aux antipaludiques posent un sérieux problème. Ces échecs prophylactiques ou thérapeutiques expliquent la ré-émergence du paludisme dans des zones où il était éliminé. Cette situation est accompagnée d'une augmentation de la transmission, de la morbidité et de la mortalité. Le développement d'un vaccin anti palustre est le moyen qui permettrait le contrôle adéquat de l'infection voire même son éradication. Cependant, les recherches en vaccinologie antipalustre se heurtent à plusieurs obstacles dont ceux imputables à la variabilité épidémiologique du paludisme notamment de son niveau d'endémicité. Les essais cliniques menés dans plusieurs zones d'endémicité variable diffèrent en termes d'immunogénicité et d'efficacité d'une part en raison des multiples souches plasmodiales et d'autre part du fait de la relation étroite entre la réponse immunitaire de l'hôte et la prévalence de la maladie dans la zone d'étude. La majorité des travaux relatifs à l'immunité anti- palustre ont été faits en milieu rural hyperendémique et ne permettent pas une extrapolation parfaite dans des zones urbaines où le degré d'immunité est très variable mais surtout faible et la prévalence des accès mortels est de plus en plus accrue malgré l'existence d'une transmission faible et instable [4]. Les populations des grandes villes ont rarement fait l'objet d'investigations en vaccinologie, c'est dans ce contexte que nous avons choisi d'explorer l'immunité dans le paludisme urbain non aggravé par une évaluation des niveaux de réponse en IgG et IgM dirigées contre la protéine des formes hépatiques de *P. falciparum* appelée CSP. Notre principal objectif est de rechercher d'éventuelles variations des réponses Ac anti-CSP suivant l'âge des patients. Secondairement, ces taux d'Ac seront analysés suivant les données hémato-parasitologiques des patients.

1ère Partie : RAPPELS SUR LE PALUDISME

I Définition et Historique

Le paludisme ou appartient au genre *Plasmodium* et cinq espèces **malaria est transmis par la piqûre infectante du moustique femelle du genre Anophèles. Le parasite responsable** sont reconnues comme pouvant infecter l'homme: *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi* et *P. falciparum* [5]. La dernière espèce est la plus fréquente en Afrique subsaharienne et elle entraîne des manifestations graves de l'infection dont le neuropaludisme.

Le paludisme est une maladie très ancienne. Des écrits égyptiens datant de plus 3000 avant JC, rapportent des descriptions de la maladie avec des cas. Cette certitude est issue de la découverte de plasmodies dans des momies [6]. A la même époque, des cas d'accès palustres ont été décrits en Chine. Il faudra cependant attendre l'année 1630 pour voir apparaître le premier traitement à base d'écorce de Quinquina découverte par Don Francisco Lopez. Deux siècles seront ensuite nécessaires pour que les pharmaciens J. Pelletier et J. B. Caventou parviennent à isoler le principe actif: la quinine. A partir de cette époque, les recherches s'accélérent et l'agent pathogène fut découvert par Alphonse Laveran en 1880.

En 1897, les moustiques *Anophèles* ont été reconnus comme étant les vecteurs de la maladie et en 1922, quatre espèces plasmodiales infectant l'homme ont été décrites. En 1976, W. Trager et J.B. Jensen mettent au point la culture *in vitro* de *P. falciparum* [7].

A propos du traitement et la chimio -prévention du paludisme, c'est en 1944 que les deux antipaludiques de synthèse la chloroquine et l'amodiaquine ont fait leur apparition sur le marché. Ils seront fortement utilisés. Cependant, en 1960, les premières souches de *P. falciparum* résistantes à la chloroquine ont été découvertes en Asie et en Amérique du Sud. Cette chimiorésistance apparaît de manière concomitante avec les résistances des anophèles à la dichlorodiphényl-trichloréthane ou DDT, utilisée depuis 1948. L'apparition sur le marché des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine a apporté un regain d'espoir dans le cadre de la chimiothérapie antipaludique. Actuellement, un volet important dans la lutte antipaludique est l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides. Elles permettent de réduire le taux d'inoculation, donc l'incidence des fièvres, et diminuent ainsi la mortalité et la morbidité[8].

II. Epidémiologie du paludisme

II-1 répartition géographique et impact du paludisme dans le Monde

La répartition du paludisme dans le monde dépend principalement de celle du vecteur, mais aussi de la compétence vectorielle. Le développement des cinq espèces plasmodiales inféodées à l'homme est possible partout où il y a des vecteurs compétents et où les conditions climatiques permettent l'accomplissement de leur cycle sporogonique [9]. Des facteurs génétiques parasitaires et surtout humaines influent également dans la distribution des espèces plasmodiales. C'est ainsi que les populations mélando-africaines sont naturellement réfractaires à des espèces comme *P. vivax*, car dépourvus de l'antigène tissulaire Duffy.

C'est en Afrique intertropicale que la situation de l'infection est la plus préoccupante et la plus difficile à préciser. Trois cent millions de sujets sont annuellement infectés à travers le monde, 120 millions de cas cliniques seraient observés chaque année. En dehors de l'Afrique, 70% des cas mondiaux sont observés dans six pays : l'Inde, le Brésil, l'Afghanistan, le Viêt-Nam, la Colombie, les îles Salomon [10] La mortalité essentiellement due à *P. falciparum* est sous-estimée. Elle concernerait 1 à 2 millions de personnes chaque année, dont une grande majorité en Afrique. Un élément est commun à toutes les régions du monde: les formes graves et compliquées à *P. falciparum* sont de plus en plus fréquentes, parallèlement à l'augmentation des chimiorésistances, à l'apparition de formes cliniques déroutantes et au retard diagnostique et thérapeutique qui en résulte. [11] .

II-2 Aspects particuliers du paludisme en milieu urbain en Afrique.

En Afrique sub-saharienne, les zones urbaines regroupent environ 41% de la population globale et l'essor considérable de l'urbanisation occasionne d'importants bouleversements écologiques et sociologiques à l'origine de modifications dans l'épidémiologie du paludisme, avec des formes particulières qui tiennent à la fois à des conditions naturelles spécifiques et à des modifications des modes de vie [12]. Tous les paramètres essentiels tant entomologiques que parasitologiques, immunologiques, cliniques et thérapeutiques sont potentiellement modifiés par ces bouleversements qui accompagnent l'explosion urbaine [13].

La croissance urbaine se révèle hautement défavorable aux *Anophèles* qui constituent les principaux vecteurs du paludisme en Afrique au profit d'autres espèces de moustiques non vecteurs, notamment *Culex quinquefasciatus* considérée comme un véritable marqueur de l'urbanisation [14]. Des études menées dans les districts sanitaires de la ville de Dakar [15] [16] ont montré que *C. quinquefasciatus* est l'espèce prédominante avec près de 90% du total des collectes. Une situation comparable est notée dans plusieurs villes africaines. Mais dans

chaque centre urbain, en fonction de la nature des terres conquises et des activités qui s'y déroulent, on note des variations de la population vectorielle [13]. Cette diminution de la densité vectorielle entraînant (i) une baisse des taux d'inoculation par personne et par an (ii) une réduction des taux d'impaludation dans les centres urbains et (iii) une lenteur ou une absence d'acquisition d'une prémunition [14, 17].

Sur le plan clinique, la diminution de la transmission semble aboutir à une réduction de la pathologie palustre. Il convient toutefois de préciser qu'en zone urbaine les cas de paludisme sévère sont plus fréquents par rapport aux individus vivant en zone rurale hyper-endémique. Selon certains auteurs, ce constat serait lié à une immunité anti-palustre défectueuse chez les malades concernés.

Du point de vue thérapeutique, l'accessibilité aux soins et aux médicaments antipaludiques en milieu urbain contrairement aux zones rurales encore très mal desservies en structures sanitaires a comme conséquence le développement rapide de résistance du parasite aux antipaludiques souvent utilisés de manière anarchique en ville [18, 19].

III. Hôtes et biologie de parasite

III-1 Agent pathogène

Les protozoaires Plasmodium appartiennent à l'embranchement des Sporozoaires et à l'ordre des Hemosporididae. Il existe plus de 140 espèces de Plasmodium, pouvant infecter diverses espèces animales. Seules cinq sont retrouvées chez l'homme: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi* [20]. Elles diffèrent par des critères biologiques, cliniques, mais aussi par leur répartition géographique et par leur capacité à la résistance aux antipaludiques. *P. falciparum* est la plus répandue à travers le monde, elle développe des résistances aux antipaludiques et est responsable des formes cliniques potentiellement mortelles.

III-2 Vecteurs

C'est un moustique culicidé du genre *Anophèles* qui transmet le parasite au moment de son repas sanguin [21]. Seule la femelle est hématophage, elle pique surtout à partir du coucher du soleil avec un maximum d'activité entre 23h et 6h ; [22].

La nature des sols, le régime des pluies, la température et l'altitude, la végétation naturelle ou l'agriculture, rendent les collections d'eau plus ou moins propices au développement des espèces d'*Anophèles* [23]. Le développement et la longévité des vecteurs

dépendent de la température avec un optimum compris entre 20 et 30°C pour une durée de vie de l'ordre de 30 jours.

Sur les 400 espèces d'*Anophèles* répertoriées, seule une soixantaine sont des vecteurs du paludisme et une vingtaine, à elles seules, sont à l'origine de la plupart des cas. Les plus fréquemment rencontrées en Afrique sont : *Anopheles arabiensis*, *An. funestus* et *An. gambiae* [24].

III-3 Cycle biologique de *Plasmodium falciparum*.

Les *Plasmodium* sont des parasites intracellulaires obligatoires des vertébrés. Leur cycle biologique est un processus complexe nécessitant l'interaction entre l'hôte vertébré (homme) hébergeant la multiplication asexuée du parasite, le moustique vecteur chez lequel se déroule la reproduction sexuée [25].

III.3.1. Cycle chez l'homme.

Encore appelée schizogonie, le cycle parasitaire chez l'homme passe par deux stades invasifs successifs, le stade sporozoïte et mérozoïte, qui infectent respectivement les hépatocytes et les érythrocytes.

Les sporozoïtes, transmis à l'homme avec la piqure du moustique, passent dans la circulation sanguine avant de se rendre au niveau du foie [26]. Les sporozoïtes pénètrent activement dans les hépatocytes, par invagination de la membrane plasmique formant ainsi une vacuole parasitophore. Cette pénétration est aussi possible par effraction membranaire sans formation de vacuole [27]. Au sein de la vacuole, les sporozoïtes se différencient en schizontes hépatiques, qui au bout de 7 jours, libèrent des milliers de mérozoïtes dans la circulation sanguine.

Ces mérozoïtes vont infecter les globules rouges, avec formation d'une vacuole parasitophore à l'origine d'une phase de multiplication. Les mérozoïtes se différencient en trophozoïtes puis en schizontes qui arrivés à maturité renferment plusieurs mérozoïtes. Les globules rouges infectés éclatent et libèrent des nouveaux mérozoïtes qui vont entrer dans d'autres hématies. Certains mérozoïtes se différencient par la suite en gamétocytes ne pouvant continuer leur développement que chez le moustique.

III.3.2. Cycle chez l'anophèle femelle.

Lors d'un repas sanguin chez un individu infecté, l'anophèle femelle ingère les différentes formes du parasite. Seuls les gamétocytes mâles et femelles poursuivront leur développement dans le tube digestif du moustique.

Parvenus dans l'estomac du moustique, ils se transforment en gamètes mâles et femelles. De la fécondation d'un gamète femelle par un gamète mâle résulte un œuf mobile appelé zygote ou ookinète qui, environ 24 heures après sa formation, traverse la matrice péritrophique du moustique, avant de se différencier en oocyste. Cette phase brève s'achève par une division méiotique suivie de plusieurs mitoses et aboutissant à la différenciation des sporozoïtes au bout de 10 jours. A la suite de l'éclatement de l'oocyste 5000 à 10000 sporozoïtes seront libérés et vont gagner préférentiellement les glandes salivaires de l'anophèle d'où ils pourront être injectés avec la salive lors d'un autre repas sanguin chez l'homme.

Chez le moustique, l'ensemble de ce cycle dure 9 à 10 jours pour *Plasmodium falciparum* à une température extérieure de 28°C [28].

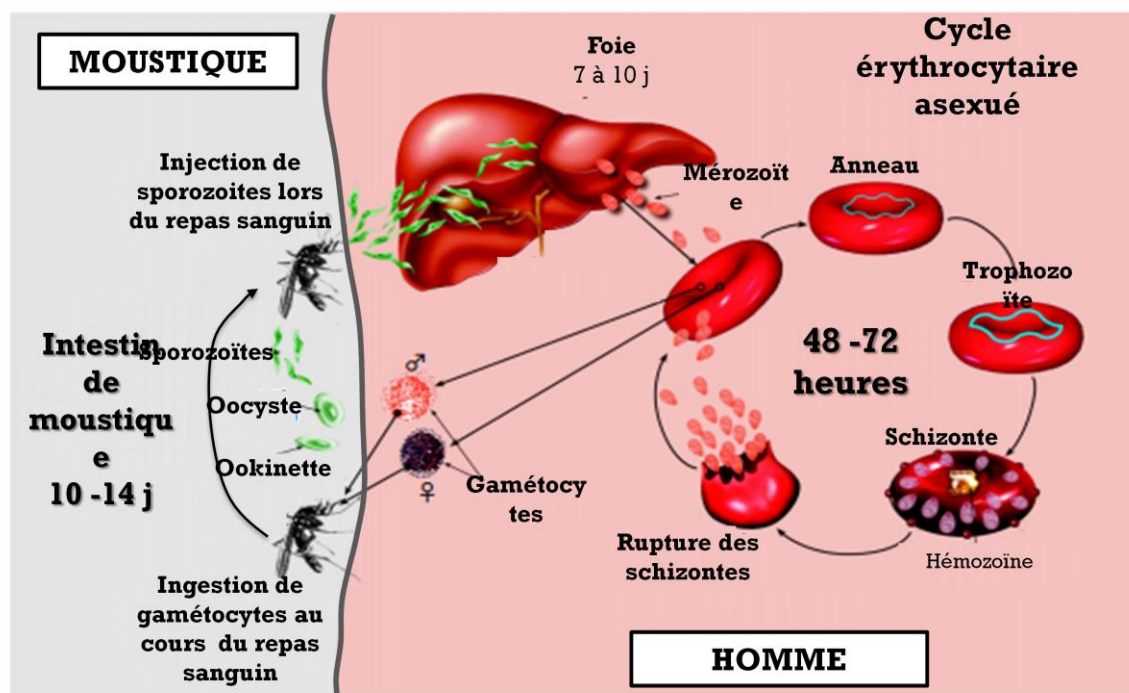


Figure 1: cycle de *Plasmodium.falciparum*

Figure 1 : Cycle de *P. falciparum*.

IV. Physiopathologie de l'infection à *Plasmodium falciparum*.

IV.1 Accès palustre simple.

La forme classique de l'accès palustre simple comprend des paroxysmes fébriles précédés de frissons et suivis de sueurs ; qui se répètent toutes les 48h dans le cas d'une infestation par *P. falciparum*. Ces phases sont séparées de périodes quasi asymptomatiques. L'accès palustre peut s'accompagner d'asthénie, d'algies multiples, de céphalées et de vomissements, parfois même de diarrhée.

La fièvre palustre résulte de l'éclatement des hématies parasitées, libérant les débris de parasites qui poussent les macrophages et les lymphocytes à produire des cytokines inflammatoires telles que le TNF α et IL6 [29]. Des injections expérimentales de TNF α ont montré qu'outre la fièvre, la plupart des autres symptômes de l'accès palustre (céphalées, vomissements, lassitude, nausées, anémie...) pourraient être causés directement par cette cytokine [30]. L'anémie pourrait en outre résulter d'une hémolyse des hématies infectées. Une hépatomégalie et une splénomégalie peuvent survenir suite à une hyperactivité du système phagocytes mononuclés chargés de débarrasser l'organisme aussi bien des pigments malariques que des débris érythrocytaires.

IV.2 Accès palustres sévères : cas du neuropaludisme.

Le paludisme cérébral ou neuropaludisme est la principale complication du paludisme à *P. falciparum*. C'est la forme la plus étudiée et sa physiopathologie très complexe, n'est pas entièrement élucidée. Des constats comme l'absence de relation évidente entre la densité parasitaire et le risque d'atteinte cérébrale, n'admettent pas encore d'explication complètement satisfaisante, bien que des auteurs comme Dondorp trouvent une forte corrélation entre la sévérité de la maladie et la biomasse de parasites séquestrés au niveau cérébral. Cliniquement, le paludisme cérébral se manifeste par une insuffisance neurologique comme le coma, les convulsions, obnubilations.

Plusieurs théories probablement complémentaires, sont incriminées dans la survenue de ces formes cliniques. En effet, l'une particularité de l'infection par l'espèce *P. falciparum* est la séquestration d'hématies parasitées dans les organes profonds de l'hôte. Il s'agit d'une adhérence, des GRp aux cellules endothéliales des microvaisseaux d'organes vitaux tels que le cerveau, le placenta, les poumons, les reins, le cœur et le foie ; on parle de cytoadhérence [31]. Deux autres formes d'adhérence sont décrites pour *P. falciparum*: (i) le « rosetting » entre les GRp et les hématies non infectées [32] et (ii) l'agglutination des GRp aux plaquettes

via la molécule CD36 plaquettaire [33]. Toutes ces formes d'adhérence des GRp ont lieu par l'intermédiaire des protubérances exprimées par ces hématies à leur surface. Ces knobs membranaires expriment des protéines parasitaires (KAHRP) qui interagissent avec celles de la cellule hôte (ICAM .VCAM) [33].

Ces différents processus physiopathologiques seraient à la cause d'une diminution de l'oxygénation des tissus vitaux donc et des manifestations cliniques observées au cours du paludisme grave. Au cours du paludisme, cette ischémie tissulaire s'observe également au niveau de la rétine [34] considérée du point de vue vasculaire comme étant le reflet de la circulation cérébrale [35]. C'est à ce titre, que la rétinopathie palustre a été identifiée comme un important signe clinique diagnostic et de pronostique de neuropaludisme [36, 37].

V - Immunité anti palustre

V-1 Notion de prémunition.

Dans les régions où la transmission palustre est intense, on observe un état d'immunité protectrice non stérilisante caractérisée par une parasitémie faible et l'absence de signes cliniques du paludisme. Cet état dit de prémunition a été défini en 1924 par Sergent[38]. Il s'acquiert lentement et dépend d'une pression constante du parasite sur le système immunitaire [39]. En effet, il résulte de l'exposition répétée au parasite et augmente avec l'âge des sujets [40]. En cas de diminution de l'exposition, la prémunition baisse avec l'âge et pourrait même disparaître [41].

Peu de choses sont connues sur les mécanismes effecteurs de cette protection immune chez l'homme, et ceci notamment parce qu'il est difficile de définir des critères épidémiologiques, cliniques ou parasitologiques simples permettant de caractériser cet état de prémunition et de définir clairement quels sont les individus "protégés" [42]. Outre les facteurs immunologiques de résistance au paludisme, s'ajoutent des facteurs génétiques qui confèrent une protection contre le paludisme grave.

V-2 Immunité à médiation cellulaire.

L'immunité cellulaire joue un rôle primordial dans la lutte contre le paludisme. Dans cette partie, nous allons mettre l'accent sur l'immunité dirigée contre les stades pré-érythrocytaires. Elle est induite à la fois par les sporozoïtes et par les stades hépatiques. Dans les deux cas, la cible est l'hépatocyte infecté, capable d'apprêter et de présenter des antigènes plasmodiaux aux différentes cellules effectrices, les lymphocytes TCD4⁺ et TCD8⁺ principalement . La protection induite est en grande partie le fait de cytokines comme IFN- γ ,

IL-12 IL-1, IL-6, et TNF- α . L'inhibition et/ou la destruction du parasite serait aussi la conséquence de mécanismes effecteurs dépendants de substances telles que les dérivés nitriques ou oxygénés, les protéines de la phase aigue de l'inflammation.

Toutefois, les PNN, les monocytes macrophages et les cellules NK joueraient un rôle prépondérant dans l'immunité observée au cours des infections palustres précoces dans le stade hépatique. Une étude récente a montré que les cellules NK provenant du foie sont capables de détruire les cellules hépatiques parasitées par des sporozoïtes, alors qu'elles sont inaptes à détruire les globules rouges parasités par des trophozoïtes [43]. Les cellules NK sont aussi de puissantes productrices de cytokines telles que l'IFN- γ et cette capacité conduit à l'activation des macrophages [44]. Moins impliquées que les lymphocytes T $\alpha\beta$, les cellules $\gamma\delta$ contribuent également à la protection contre les stades pré-érythrocytaires. Dans des études portant sur l'analyse de la réponse cellulaire T induite, la présence de cellules T cytotoxiques spécifiques d'épitopes de CSP a été associée à la protection contre les réinfections[45].

V-3 Immunité humorale

V-3-1 Les anticorps

Le rôle des Ac dans le contrôle de l'infection et de la maladie a été démontré [46]. En effet, les Ac peuvent bloquer l'invasion des hépatocytes. Ce sont principalement ceux des sous classes IgG₁ et IgG₃. Ils sont spécifiques et peuvent se fixer sur leurs récepteurs Fc présents à la surface des neutrophiles ou monocytes-macrophages et entraîner la lyse des sporozoïtes par ADCI [46]. Les IgG₂ et IgG₄ seraient non protecteurs [47]. Les Ac peuvent aussi se fixer sur des sporozoïtes de *P. falciparum* puis activer le complément par la voie classique.

Chez les populations des régions où le paludisme est endémique, l'infection palustre induit de fortes réponses immunes humores, impliquant une production à prédominance d'IgM et d'IgG. Seuls 5% des Ac sont spécifiques et réagissent avec une grande variété d'antigènes parasitaires, ce qui explique une activation polyclonale de la lignée lymphocytaire B. La formation de complexes immuns entre la CSP et les Ac facilite la phagocytose des sporozoïtes et leur destruction dans les macrophages [46].

Le transfert passif des IgG de donneurs immuns suggérerait l'existence des Ac pouvant conférer une protection contre le paludisme [48]. Ces mécanismes impliquent nécessairement des anticorps cytophiles, c'est-à-dire capables de se lier par leur récepteur Fc au monocyte, de ce fait, il a été observé dans le sérum des sujets protégés, une prévalence d'isotypes

cytophiles, IgG₁ et IgG₃, et chez les sujets non protégés, une prépondérance de classes non cytophiles, IgG₂ et/ou IgM [49].

V-3-2- Les cytokines

L'immunité protectrice anti-palustre repose sur la mise en œuvre par les cellules de mécanismes tels que la production des anticorps, la phagocytose, la cytotoxicité cellulaire et l'inhibition des parasites. Ces activités cellulaires sont notées grâce à la présence des cytokines pouvant aussi endommager des tissus en absence de contrôle et d'équilibre entre la réponse immunitaire Th1 et Th2 [50]. Parmi les nombreux messagers chimiques impliqués dans la réponse immunitaire humorale contre le parasite, les cytokines pro-inflammatoires IL-12, IFN- γ et TNF- α jouent un rôle prépondérant dans la phase hépatique (**Figure 2**).

Le rôle de la balance entre une réponse Th1/Th2 dans la protection contre l'infection est démontré par la susceptibilité accrue au paludisme des femmes enceintes et des immunodéprimés [51]. En effet, après le premier trimestre de la grossesse il y a une commutation de la réponse immune de type Th1 vers une réponse de type Th2. Les cytokines de type Th2 comme l'IL4, l'IL10 et certaines hormones comme la progestérone et la prostaglandine placentaire peuvent inhiber la réponse de type Th1 et favoriser le développement de la réponse de type Th2 [52]. L'orientation de l'immunité vers une réponse à prédominance Th2 prédisposerait la femme enceinte et le fœtus au paludisme car le contrôle de l'infection palustre implique une bonne réponse de type Th1 avec prédominance de l'IL-2, INF- γ , TNF- α [53] [54, 55].

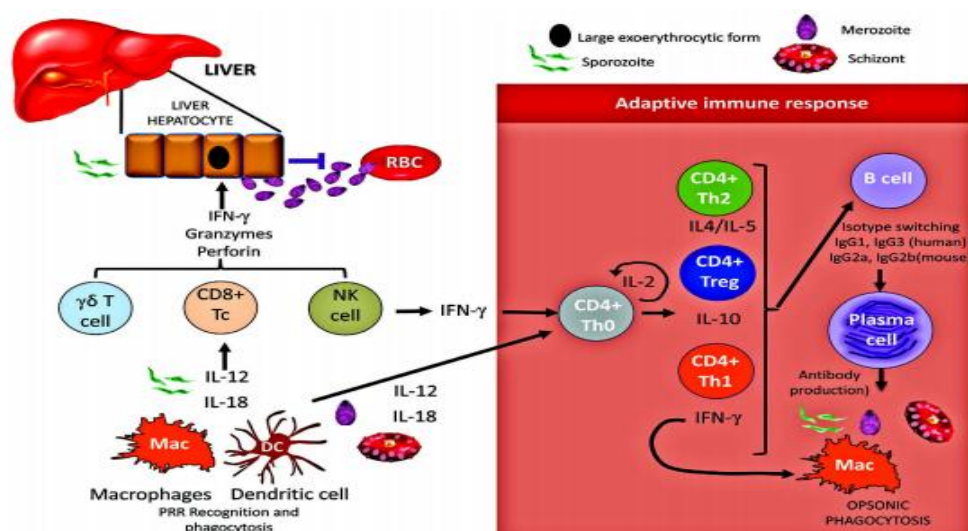


Figure 2: Vue générale de la réponse immunitaire pré-érythrocytaire: intervention des cytokines.

VI- Les Antigènes des stades pré-érythrocytaires (exemple de la CSP) et candidats vaccins RTS, S

VI-1 protéine circumsporozoïte.

La protéine CSP est l'Ag prédominant à la surface des sporozoïtes. Sa région N-terminal se lie à des protéoglycanes de sulfate d'héparine (RI) et sa région centrale renferme une répétition de quatre acides aminés (Asn-Ala-Asn-Pro). On retrouve au niveau de l'extrémité C-terminale un domaine thrombospondine (RII) ancrée à une GPI. C'est la région centrale répétée qui contient l'épitope immunodominant des cellules B. Elle induit la production d'Ac inhibant l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes [56]. La CSP induit aussi une réponse immunitaire de type cellulaire T. Elle comporte trois épitopes de lymphocytes T connus: un épitope des cellules T CD4⁺ très variable en amont du domaine de la thrombospondine [57], un épitope de cellules T CD8⁺ très variable à l'intérieur du domaine de la thrombospondine [58] et un épitope dit "universel" conservé des cellules T CD4⁺ à l'extrémité C-terminal de la protéine [59].

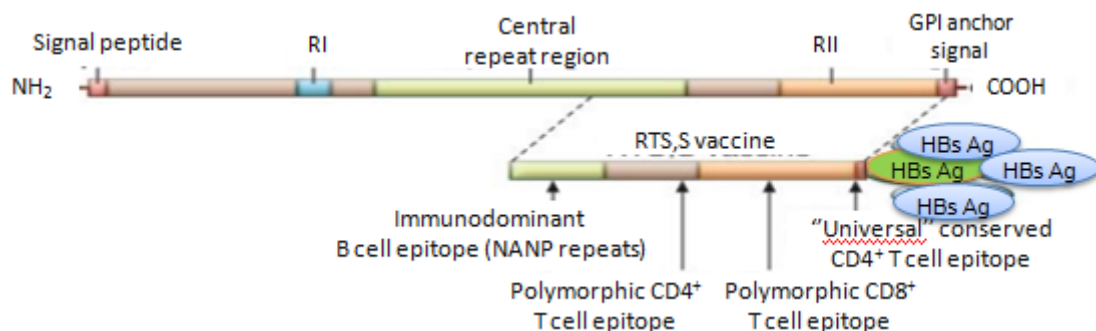


Figure 3 : Représentation schématique de CSP et du candidat vaccins : RTS-S.

Adapté de crompton 2010

VI-2 Candidats vaccins.

Avec les candidats vaccins contre les stades pré-érythrocytaires on essaye de reproduire l'immunité acquise. Les premiers essais vaccinaux ont été faits avec des sporozoïtes irradiés afin de provoquer une réponse anticorps contre la CSP. Parmi les vaccins CSP en cours de développement, celui qui a donné les résultats les plus encourageants dans des essais de phase IIb est le RTS, S/AS02A[60]. Il est en évaluation clinique de phase III[61]. Il est composé de particules protéiques comprenant 19 copies de la portion répétée centrale de la CSP et d'une partie (épitope T) de sa région carboxy-terminale fusionnés à l'antigène S du virus de l'hépatite B, et d'un adjuvant complexe, l'AS02A[62].

Une association entre les réponses immunitaires dirigées contre la CSP et la protection pré-érythrocytaire a été mise en évidence chez l'animal et chez l'homme au cours d'études précoces utilisant des *Plasmodium* dont le cycle de développement est bloqué au stade hépatique [63]. Cette protection est spécifique pour l'espèce *falciparum*, mais nécessite des immunisations répétées. Bien qu'une grande publicité ait été donnée à ce vaccin développé par le Walter Reed Army Institute of Research aux USA et GlaxoSmithKline Biologicals en Belgique, il n'est pas certain qu'il ait une utilité suffisante et assez longue pour justifier son utilisation en santé publique. Chez certains volontaires, cette protection perdure jusqu'à 42 semaines après immunisation [64]. Chez la souris, une immunité stérile a également été obtenue par injection de sporozoïtes irradiés ou génétiquement atténués. Dans ces différents modèles, il a été démontré que la CSP est un antigène immunodominant et protecteur [65]. La protéine CSP contient un domaine répétitif conservé composé de plusieurs motifs (NANP) n constituant un épitope humoral dominant.

2ème Partie : TRAVAIL PERSONNEL

I. MATERIEL ET METHODES

I-1- Site et population d'étude.

Pikine est une ville considérée comme satellite de celle de Dakar ; elle est située à 14°30 de latitude Nord et 17°20 de longitude Ouest. C'est une agglomération proche de la zone des Niayes. Ville sahélo-soudanienne, elle connaît une longue période de saison sèche, allant grossièrement du mois d'octobre au mois de juillet, puis une saison pluvieuse avec des précipitations de l'ordre de 400mm par an. Les amplitudes thermiques annuelles y sont importantes : minima nocturne de 10 à 31°C, maxima diurne de 14 à 39°C. L'humidité relative reste peu élevée.

Les prélèvements étudiés ont été réalisés chez les individus adultes et enfants résidant dans l'agglomération de Pikine entre Septembre 2000 et Janvier 2001. Après avoir révélés atteints de paludisme simple suite à un test ICT positif et selon des critères cliniques pendant les périodes de fortes incidences d'accès palustre sur la base des critères de définition élaborés par l'OMS en 2000 telles que la présence de signes cliniques de gravité ou de tout état susceptible d'interférer sur l'étude tels que la grossesse et un accouchement récent, la prise antérieure d'un traitement antipaludique ou un éventuel séjour hors de la ville datant de moins de trois mois, ont conduit à l'exclusion de certains patients.

Ce recrutement a reposé sur une étroite collaboration entre les chercheurs de l'IPD, les cliniciens et les laboratoires d'analyses médicales de la même structure hospitalière.

Sur l'ensemble des patients colligés, 144 patients ont été sélectionnés pour l'étude. après consentement libre et éclairé .

Pour chaque patient, une prise de sang a été faite sur un tube contenant de l'EDTA et la confection d'une goutte épaisse ou d'un frottis sanguin mince au moment du recrutement a permis la recherche et l'appréciation de la densité parasitaire. Le sang a été ensuite séparé en deux parties dont l'une a servi à l'étude des données hématologiques par NFS tandis que la deuxième fraction centrifugée à 2000 tours/mn pendant 10 mn, a permis d'isoler le plasma stocké à -20°C. Ces plasmas ont été dilués à 1/100 au moment des dosages d'anticorps.

I-2- Matériels

I-2-1 Matériel de laboratoire

- Hotte à flux laminaire vertical..... (Flufrance®, France)
- Plaques Maxisorp (Nunc®Danemark)
- Plaques Immulon..... (Dynatech, Roskilde®Danemark)
- Pipettes: 20, 200, 1000µl.....(Gilson Medical Elec tronics®S.A., France)
- Pipettes Falcon 5ml, 10ml (Becton Dickinson S.A, USA)
- Pipettes multicanaux de 12 à volume ajustable (Costar®Cambribge, USA)
- Bac de dilution..... (Mega®)
- Autoclave (Lequeur®)
- Balance de précision (Navigator®)
- Spectrophotomètre (Biorad®)
- Centrifugeuse (Jouan®GR412)
- Etuves à 37°C (Napco®6001)
- Microscope optique..... (Leica®DMBL)
- Congélateur à -20°C (Goldstar ®)
- Réfrigérateur à -4°C (White-Westinghouse®)
- Tubes avec EDTA (Becton Dickinson S.A, Vacutainer)
- Tubes d'échantillonnage 1,8ml (Nunc®Danemark)
- Tubes coniques Falcon 15 ; 50 ml (BectonDickinson S.A.)

I-2-2- Les tampons et réactifs chimiques.

Tampon de "coating": PBS1X

Dissoudre une pastille de PBS (Sigma®) dans 100ml d'eau distillée.

- Tampon de lavage: PBS+0,01% de Tween 20 pour un litre

H2O distillée.....1000 ml

PBS pastille.....10 pastilles

Tween 20 (Merck®).....1ml.

Tampon de saturation et de dilution des sérums et conjugués:

PBS BSA 1%

Tween 1% de pour un litre

H2O distillée.....100 ml

PBSPastille.....1 pastille

BSA (Sigma®).....1 g

Tween 20.....100 ml

Réactif de révélation:

TMB (3,3',5,5'Tétraméthylbenzidine + H₂O₂)(Eurobio®)

TMB peroxidase substrate et Peroxidase substrate solution B

Les deux solutions A et B sont mélangées extemporanément à volume égale

- solution d'arrêt :

Pour un volume final de 580 ml :

Acide ortho-phosphorique H₃PO₄ (Sigma®).....20 ml

H₂O distillée.....560ml

- Anticorps conjugués:

Anti-human IgG peroxydase conjugate (Cappel®, USA), utilisés à 1/4000

Anti-human IgM peroxydase conjugate (Cappel®, USA), utilisés à 1/5000

I-2-3 Matériel biologiques :

I-2-3-1 Sérums témoins systématiques :

Ce sont des sérums préalablement testés contre l'antigène étudié

❖ **Les sérums contrôles négatifs** sont au nombre de deux :

- Le témoin **NA** ou « Naïf Africain » a été élaboré à partir de sérums d'individus africains, ce sont des sujets vivant à Dakar et n'ayant pas une expérience récente ou ancienne d'accès clinique, connue.
- **SAB** c'est un sérum provenant d'un individu du groupe sanguin AB, il a été préalablement testé contre les antigènes du *Plasmodium* et il s'est révélé négatif.

❖ **Les sérums contrôles positifs** sont également de deux types :

Le témoin **SHI** ou Sérum Hyper-immun, constitués de plasmas prélevés au cours d'enquêtes immuno-épidémiologiques transversales, entreprises chez les populations des villages endémiques de Ndiop et de Dielmo. Ces villages sont situés à environ 280 Km au Sud-Est de Dakar et la transmission palustre y est pérenne avec environ 4,6 à 79 piqûres infectantes par personne et par an respectivement Ndiop et Dielmo. Les individus prélevés ont développé une très forte prémunition [66].

Le témoin positif MH ou Sérum « Marcel Hommel », il s'agit d'IgG extraites d'un très grand pool de sérums recueillis chez des individus Africains prémunis vivant en zone de forte endémicité palustre. Sa concentration en anticorps totaux est estimée à 20 mg/ml et on y retrouve des IgG dirigées contre tous les déterminants de *P. falciparum*.

❖ **Sérums étudiés : prélèvements.**

Cent quarante quatre (144) prélèvements ont été faits entre septembre 2000 et janvier 2001. Des prises de sang sont effectuées, incluant un prélèvement sur tube contenant de l'EDTA et une goutte épaisse ou un frottis destinés à la recherche du parasite dans le sang et à la détermination de la parasitémie. Le sang du tube est séparé en deux parties dont l'une sert à l'étude des données hématologiques tandis que la deuxième est centrifugée à 2000 tours/mn pendant 10mn. Le plasma obtenu est stocké à -20°C sous forme d'aliquots de 500 μ l à 1 ml. Ces plasmas ont été dilués à 1/100 au moment des dosages.

I-2-3-2 L'antigène étudié:

C'est un antigène de stades pré-érythrocytaires asexués du parasite qui est la **CSP**. Cet antigène est associé à la BSA. En effet la CSP est un Ag du stade hépatique. Sa région N-terminale se lie à des protéoglycanes de sulfate d'héparine (RI) et sa région centrale renferme une répétition de quatre acides aminés (Asn-Ala-Asn-Pro). On retrouve au niveau de l'extrémité C-terminal un domaine thrombospondine (RII) ancrée à une GPI.

I-3~ Méthodologie

I-3-1- La technique ELISA :

Le dosage des immunoglobulines dirigées contre les différents antigènes étudiés a été fait par la technique ELISA.

■ Principe:

C'est une technique mettant en jeu deux types de réactions d'une part l'Ag avec l'Ac et de l'autre une enzyme avec son substrat. L'Ag fixé sur un support solide (plaque de 96 puits) est lié de façon non covalente par l'Ac contenu dans le plasma. Cette liaison Ag-Ac est ensuite révélée par un système d'Ac couplé à une enzyme (conjugué) qui en présence de son substrat donne une coloration dont la densité optique est proportionnelle à la concentration d'Ac fixé.

■ Mode opératoire:

La méthode ELISA comporte différentes étapes représentées sur la **Figure 4**. Pour chaque étape, il existe des conditions devant être respectées.

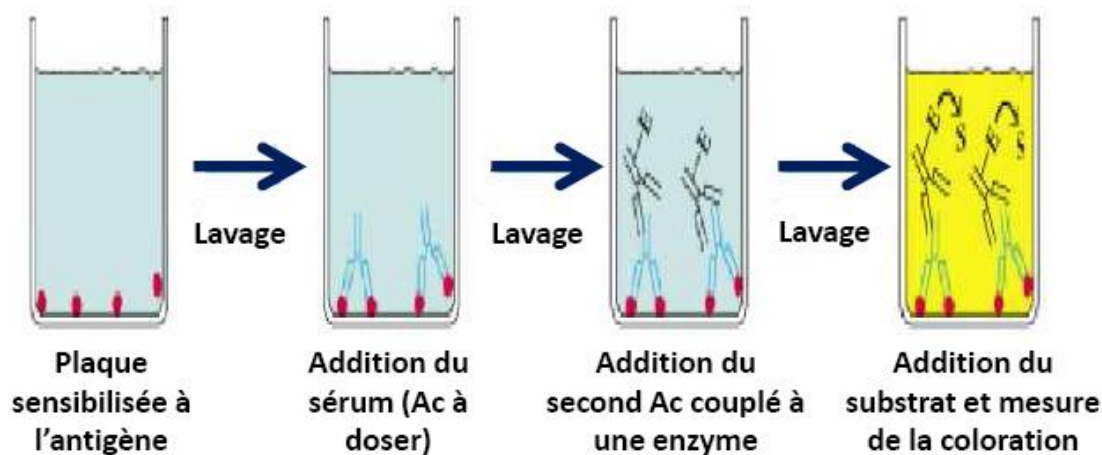


Figure 4 : Principales étapes du dosage d'anticorps sériques par ELISA.

- Etape de Sensibilisation des puits de la plaque avec l'Ag ou « coating »:
Les plaques sont sensibilisées avec 100µl par puits d'Ag préalablement dilués dans du tampon de dilution. Ces plaques sont ensuite incubées à 4°C pendant une nuit. La dilution effectuée varie selon l'Ag et elle est déterminée à la suite d'un test de calibration.
- Etape de saturation des plaques:
 - Laver les plaques 3 fois avec le tampon de lavage et sécher en tapant contre un papier absorbant;
 - Distribuer 130 µl de la solution de blocage dans tous les puits;
 - Incuber pendant 1h, les plaques à 37°C.
- Etape d'addition du sérum:
 - Laver 3 fois les plaques avec le tampon de lavage et sécher;
 - Pendant la période d'incubation du blocage, diluer les sérums témoins positifs et négatifs et les plasmas de volontaires au 1/100 dans le tampon de dilution;
 - Distribuer 100 µl des sérums et plasmas dilués dans les puits conformément au schéma de plaque;
 - Incuber pendant 1h les plaques à 37°C.
- Etape d'addition du conjugué:
 - Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et sécher;

- Distribuer dans les puits 100 µl du conjugué anti-IgG humaine de chèvre diluée à 1/5000 dans le tampon de dilution;
- Incuber pendant 1h la plaque à la température du laboratoire dans une chambre humide en agitation lente.
- Etape de révélation:
 - Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et bien sécher.
 - Distribuer 100 µl de substrat de l'enzyme (TMB) dans chaque puits.
 - Incuber pendant 5 à 10 mn à l'abri de la lumière.
 - Arrêter la réaction en ajoutant 100 µl d'une solution acide ortho-phosphorique H_2SO_4 1M dans chaque puits.
- Etape de lecture au spectrophotomètre et de calcul des ratios de DO:
 - Mesurer les DO des puits à l'aide d'un spectrophotomètre à 450 nm.
 - Calculer des ratios de DO à l'aide de feuilles Excel.

I-3-2. Analyses statistiques des résultats

Les données ont été analysées avec le logiciel STATVIEW[®] version 5.1. Les comparaisons des niveaux de réponses en anticorps entre les différents groupes ont été effectuées grâce aux tests non paramétriques de Mann Withney, de Wilcoxon ou de Kruskall Wallis. La recherche de corrélation a été faite par le test des rangs de Spearman. Une valeur de $P < 0,05$ est considérée comme significative.

II-RESULTATS

II-1.Caractéristiques de la population d'études

II-1-1Données générales de la population d'étude.

Notre cohorte est composée de 144 personnes souffrant d'accès palustre simple. Globalement, l'âge moyen est de 15 ans (4 - 65) avec 59 adultes (Age \geq 15 ans) et 85 des enfants (Age < 15 ans). Le sex-ratio est en faveur des femmes dans les deux groupes.

Tableau I : Données générales de la population d'étude

| Caractéristiques | Adultes | P* | Enfants | Global |
|-----------------------------|-------------------|--------|------------------|------------------|
| Effectifs (N) | 59 | - | 85 | 144 |
| Sexe M/F | 17/42 | - | 43/42 | 60/84 |
| Age moyen (Min - Max) (ans) | 23,4 (15 – 65) | - | 9,3(4 – 14) | 15,1 (4 - 65) |
| Densité parasitaire (%) | 2,2 (0,010 - 14) | ns | 2,1 (0,010 - 17) | 2,1 (0,01 -17) |
| Taux d'hémoglobine (g/dL) | 11,9 (4,6 - 16,6) | < 0,01 | 10,3 (2,5 -15,8) | 10,1 (2,5 -16,6) |
| Taux de plaquettes (G) | 112,4 (18 -238) | ns | 126,7 (28 -355) | 120,8 (18 -355) |

* = test de Mann Withney. ns= non significative

S'agissant des densités parasitaires, elles varient de 0,01 et 17% avec une moyenne globale de 2,1%. Ces parasitémiés ne sont pas significativement variables entre les patients adultes et les enfants.

Seuls les taux d'hémoglobine apparaissent discriminants entre les deux groupes de patients définis suivant l'âge ($P < 0,01$). En effet avec une moyenne globale de 10 g/dl, les taux d'hémoglobine sont plus élevés chez les patients adultes.

Les taux de plaquettes sanguins sont plus élevés chez les adultes que chez les enfants avec une moyenne générale de 121 G/ μ l, mais cette différence observée n'est pas statistiquement significative.

II-1-2. Comparaison des densités parasitaires (en parasites par μl) suivant l'âge, les taux de plaquettes et le taux d'hémoglobine.

Dans une seconde analyse, nous avons recherché les relations entre les paramètres hémato-parasitologiques. Les résultats obtenus sont illustrés au niveau de la **Figure 5**.

Suivant l'âge, l'absence de différences significative des parasitémiées exprimées en parasites par μl (**Figure 5a**) confirme le résultat précédemment décrit au niveau du **Tableau I** avec les densités parasitaires déterminées en pourcentages.

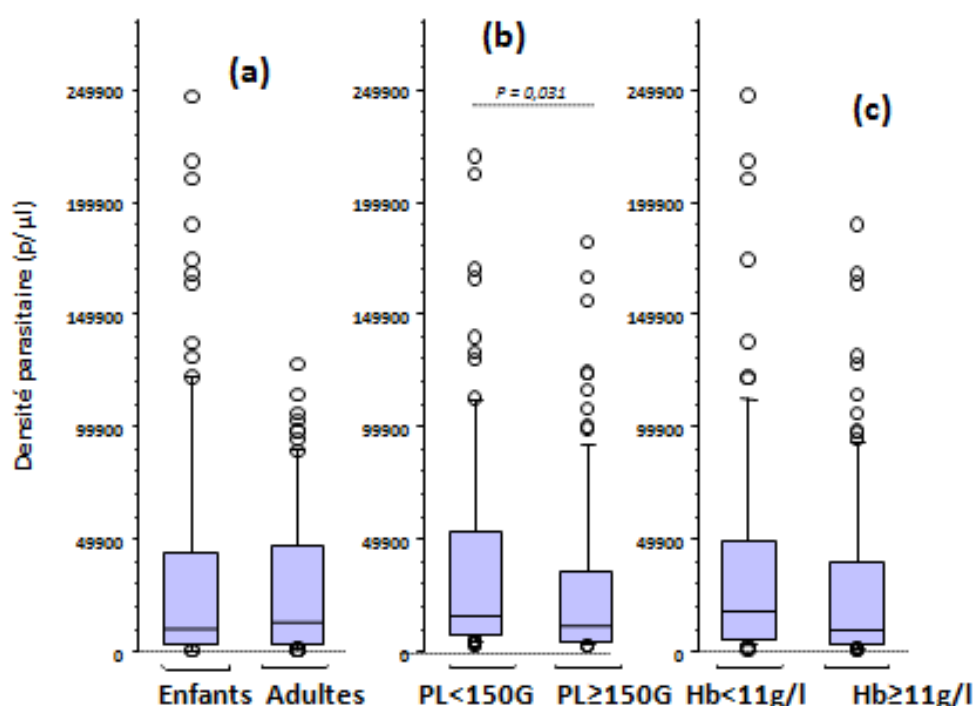


Figure 5 : Comparaison des densités parasitaires (en parasites par μl) suivant l'âge (a) les taux de plaquettes (b) et le taux d'hémoglobine (c).

A la suite d'une séparation des patients suivant les taux de plaquettes sanguins (seuil de 150G), nous avons constaté des densités parasitaires plus élevées chez les patients ayant un taux de plaquette $< 150\text{G}$ (**Figure 5b**) avec une probabilité de ($P = 0,031$). Avec les taux d'hémoglobine séparés à la valeur de 11g/dl, aucune variation des densités parasitaires n'a été observée (**Figure 5c**).

II-2- Analyses des réponses anticorps contre la protéine CSP

II-2-1- Prévalences des répondeurs contre la CSP.

Les répondeurs sont les individus ayant un ratio de DO supérieur ou égal à 2. Sur l'ensemble de la cohorte, nous avons retrouvé des prévalences de répondeurs supérieures à 50% pour les IgG anti-CSP. En effet, un fort pourcentage de réponses positives avoisinant les 95% a été obtenu pour les IgG. Ce taux est significativement plus élevé que celui des répondeurs en IgM (48%) ($P < 0,05$).

Tableau II : Prévalences des répondeurs en IgM et IgG anti-CSP

Prev = prévalence des répondeurs * = nombre de répondeurs ; ** = nombre de patients

| Classes d'âge Caractéristiques | ADULTES | | ENFANTS | | GLOBAL | |
|---------------------------------------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|
| | N*/N** | Prev (%) | N*/N** | Prev (%) | N*/N** | Prev (%) |
| IgM anti-CSP | 31/59 | 52% | 38/85 | 45% | 69/144 | 48% |
| IgG anti-CSP | 58/59 | 98% | 79/85 | 93% | 137/144 | 95% |

testés

Suivant l'âge, les prévalences de répondeurs en IgG et IgM restent plus élevées chez les adultes que chez les enfants, toutefois les différences observées ne sont significatives du point de vue statistique (**Tableau II**).

II-2-2- Niveaux de réponses en Ac contre la CSP et BSA : variations suivant l'âge des patients.

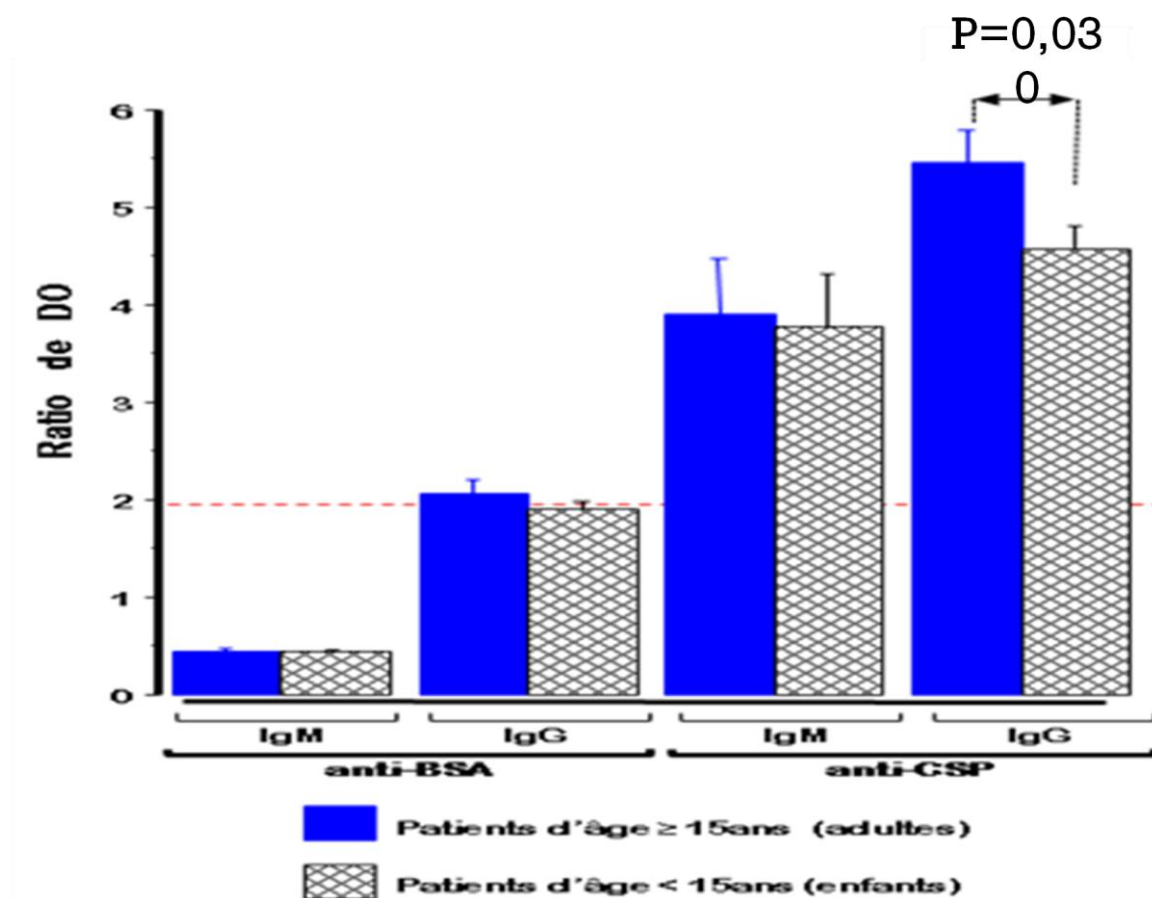


Figure 6 : Comparaison des niveaux des réponses IgG et IgM anti-CSP et anti-BSA.

Les niveaux de réponses en IgM et IgG anti-CSP et anti-BSA sont illustrés sous forme d'histogrammes au niveau de la **Figure 6**. Les réponses anti-BSA sont faibles globalement tandis que celles dirigées contre la protéine parasitaire CSP sont élevées en termes d'amplitudes avec un rtDO moyen supérieur à 3.

Suivant l'âge, on retrouve une différence entre adultes et enfants pour les IgG anti-CSP ($P = 0,03$). En effet, les niveaux de réponse sont plus élevés chez les adultes (âge ≥ 15 ans) que chez les enfants (âge < 15 ans). Cette variation n'est pas notée pour les IgM.

II-2-3- Variations des niveaux de réponses Ac suivant les données hématoparasitologiques.

II-2-3-1 Comparaison suivant la parasitémie.

Pour rechercher les variations des niveaux de réponses Ac suivant la parasitémie, nous avons déterminé dans chaque classe d'âges, deux nouveaux sous-groupes de patients suivant la densité parasitaire à la valeur seuil de 1%.

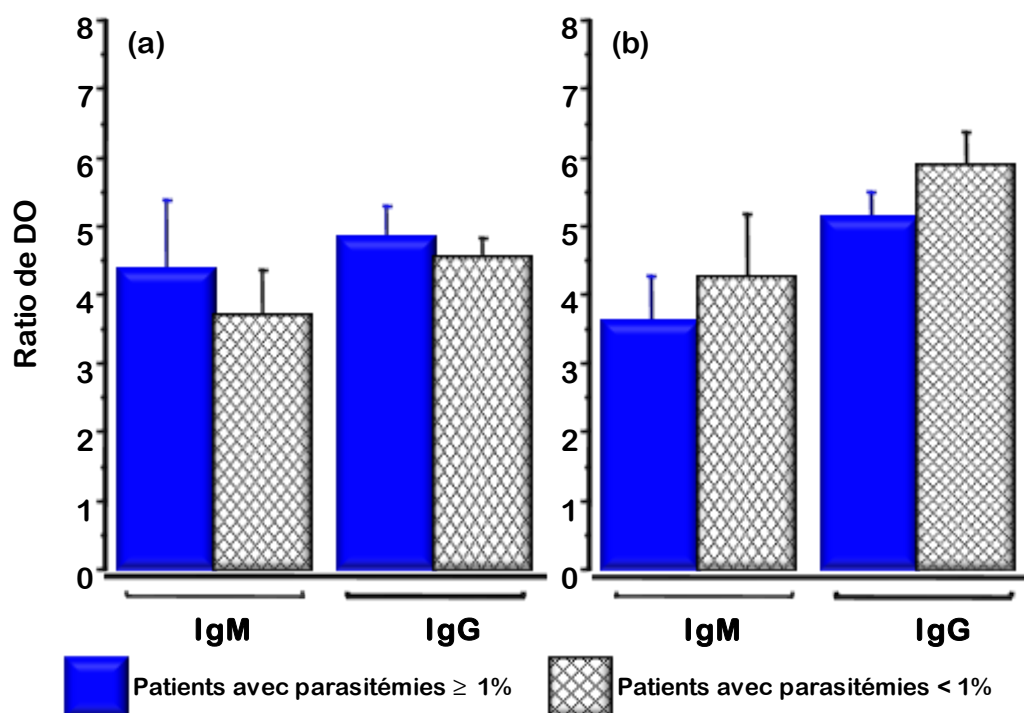


Figure 7 : Comparaison de niveaux des réponses IgG et IgM suivant les densités parasitaires chez les enfants (a) et chez les adultes (b).

Les données obtenues sont représentées sur la **Figure 7** pour les deux classes d'âge antérieurement définies et en fonction des parasitémie $< 1\%$ et $\geq 1\%$. La **figure 7** permet de constater que l'absence entre les deux sous groupes de variation discriminante des taux IgG et IgM anti-CSP. Cependant, nous avons constaté une tendance d'inversion de la réponse. En effet chez les enfants, les niveaux de réponses semblent augmenter suivant avec les parasitémies (**Figure 7a**) alors que chez les adultes les réponses sont faibles chez les personnes ayant une forte parasitémie (**Figure 7b**).

II-2-3-2 Comparaison suivant le taux d'hémoglobine et de plaquettes.

Afin de déceler un éventuel impact des niveaux de réponses en IgG et IgM anti-CSP sur les données hématologiques des patients, nous avons procédé à une analyse des caractéristiques des réponses immunologiques suivant des paramètres tels que, le taux d'hémoglobine et de plaquettes sanguins.

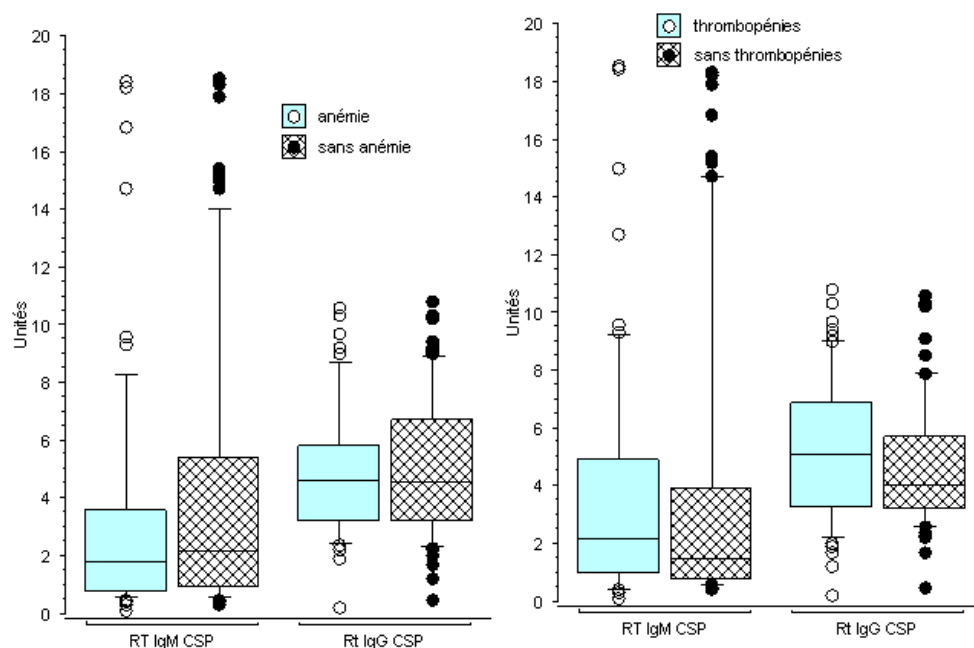


Figure 8 : Comparaison de niveaux des réponses IgG et IgM suivant le taux d'hémoglobine (a) et de plaquettes (b) dans la population d'étude

Avec l'ensemble de population d'étude, sans tenir compte des deux classes d'âge précédemment utilisées, nous avons comparé les niveaux de réponses suivant les taux d'hémoglobine (seuil de 11g/dl) (**Figure 8a**) ou suivant les taux de plaquettes (**Figure 8b**). Que la comparaison soit faite suivant les taux de plaquettes ou suivant l'hémoglobinémie les variations observées n'apparaissent pas statistiquement significatives. Des résultats similaires sont obtenus en tenant compte de l'âge et des données hématologiques. Ainsi les taux d'IgG et d'IgM anti-CSP ne sont pas reliés aux données hématologiques des patients testés dans notre étude.

III-DISCUSSION

Entrant dans le cadre d'investigations menées par l'Unité d'Immunogénétique de l'Institut Pasteur et relatives à l'immunologie du paludisme en milieu urbain, notre étude a pour objectif d'évaluer les réponses en Ac IgM et IgG dirigées contre un antigène du stade hépatique de *Plasmodium falciparum* : la protéine CSP. Ces réponses Ac ont été évaluées suivant l'âge des patients, leurs parasitémies et leurs données hémato parasitologiques en vue de mettre en évidence des facteurs immunologiques caractéristiques du paludisme des grands centres urbains et pouvant servir dans l'élaboration de stratégies vaccinales futures.

Nos patients ont été recrutés au Dispensaire des Sœurs catholiques de Sahm. Il s'agit de malades consultant pour un accès palustre simple non aggravé et confirmé par la détection du parasite sur frottis sanguin, Goutte épaisse ou TDR. Notre discussion portera sur les caractéristiques hémato-parasitologiques discriminantes de la population d'étude et enfin sur les données relatives à l'évaluation des réponses Ac suivant les données hémato-parasitologiques.

■ Caractères hémato-parasitologiques.

En ce qui concerne les données hémato-parasitologiques, nous avons retrouvé des variations significatives des taux d'hémoglobine suivant l'âge. En effet le taux d'hémoglobine est très élevé chez les adultes, ce constat antérieurement rapporté dans d'autres villes africaines comme Brazaville [67] n'est pas toujours imputable à l'infection palustre. Certains auteurs évoquent parmi les causes des parasitoses intestinales et les causes liées à la sous alimentation des jeunes dans les zones de banlieues [68]. Les densités parasitaires sont invariables suivant les âges des patients, il s'agit d'un résultat contraire aux données recueillies dans les zones de forte endémicité palustre telles que les sites de Ndiop et Dielmo, où les parasitémies des patients diminuent avec l'âge [69].

■ Niveaux des réponses anticorps anti-CSP.

Nos résultats ont montré de fortes prévalences des réponses IgG anti-CSP (> 50 %) dans l'ensemble des patients quelle que soit l'âge. Pour toutes les réponses, il n'y pas de variations significatives suivant l'âge. Nos résultats sont conformes à ceux de **John et al** au Kenya [70]. Par contre, nous avons retrouvé des prévalences de répondeurs plus élevées que ceux obtenues par **Dodoo et al** [71]. Nos résultats montrent des niveaux élevés d'Ac anti- CSP

pouvant être en corrélation avec une protection contre une infection *P. falciparum*. Les réponses en IgM sont moins fortes que les IgG, et seuls les taux d'IgG sont discriminants suivant l'âge des patients car leurs amplitudes sont plus fortes chez les patients de plus de 15 ans. Ces résultats confirment une forte réponse dirigée contre la CSP de *P. falciparum*. Les adultes répondent mieux que les enfants. La prédominance des IgG par rapport aux IgM serait liée à la phase de la maladie pendant laquelle a eu lieu le recrutement. En effet, la symptomatologie clinique étant concomitante à la rupture des schizontes sanguins, elle n'est pas observée au cours du stade hépatique, stade de production maximale des IgM anti-CSP. Ces résultats similaires ont été antérieurement rapportés par d'autres auteurs comme John [72].

Suivant la parasitémie, les niveaux de réponses sont élevés chez les enfants ayant une forte parasitémie alors que chez les adultes les réponses sont fortes chez les patients ayant une parasitémie faible. Cette discordance s'explique par le fait que nous avons utilisé un antigène hépatique portant des épitopes T et contre lequel il est plus souhaitable de développer une réponse immunitaire à médiation cellulaire. La recherche d'une relation entre les taux Ac anti-CSP et la densité parasitaire sanguine après sortie du parasite du foie serait plus pertinente si le même antigène CSP était exprimé à la surface des formes sanguins, ce qui n'est pas le cas.

En ce qui concerne les variations de réponses suivant les données hématologiques, le taux élevé d'anticorps chez les patients non anémiés suggère que ces anticorps sont protecteurs même si les variations ne sont pas significatives.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre étude a été faite dans une population souffrant du paludisme non aggravé en zone urbaine. Nous avons étudié les niveaux de réponses Ac dirigées contre la CSP de *P. falciparum*. En effet cet antigène est un candidat vaccin en phase avancée, il est en phase III d'évaluation clinique. Les résultats obtenus ont été analysés en fonction de l'âge, du taux d'hémoglobine, de la parasitémie et du taux de plaquettes.

La CSP de *P. falciparum* est fortement reconnue par le système immunitaire plus particulièrement les IgG. En effet les prévalences des répondeurs ainsi que les réponses Ac sont similaires de celles observées dans des zones endémiques. Toutefois, ce travail nécessite des autres études supplémentaires comme l'exploration de l'immunité cellulaire pour confirmer nos résultats. Une meilleure connaissance de la manière d'explorer les études en zones d'endémie est importante.

.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Murray, C.J., et al., *Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis*. Lancet, 2012. **379**(9814): p. 413-31.
2. Aregawi, M.W., et al., *Reductions in malaria and anaemia case and death burden at hospitals following scale-up of malaria control in Zanzibar, 1999-2008*. Malar J, 2011. **10**: p. 46.
3. OMS, *WORLD MALARIA REPORT 2013*. 2013.
4. Henry, M., et al., *Urban malaria in Dakar, Senegal: chemosusceptibility and genetic diversity of Plasmodium falciparum isolates*. Am J Trop Med Hyg, 2006. **75**(1): p. 146-51.
5. Cox-Singh, J., et al., *Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening*. Clin Infect Dis, 2008. **46**(2): p. 165-71.
6. Miller, R.L., et al., *Diagnosis of Plasmodium falciparum infections in mummies using the rapid manual ParaSight-F test*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1994. **88**(1): p. 31-2.
7. Trager, W. and J.B. Jensen, *Human malaria parasites in continuous culture*. Science, 1976. **193**(4254): p. 673-5.
8. Maxwell, C.A., et al., *Effect of community-wide use of insecticide-treated nets for 3-4 years on malarial morbidity in Tanzania*. Trop Med Int Health, 2002. **7**(12): p. 1003-8.
9. Hay, S.I., et al., *A world malaria map: Plasmodium falciparum endemicity in 2007*. PLoS Med, 2009. **6**(3): p. e1000048.
10. Anonyme, *paludisme dans le monde*. [http : // astrium. Com/maladies :visa09-6. html](http://astrium.Com/maladies:visa09-6.html), 2000.
11. Malvy, *Plasmodies-Malaria. Formes cliniques et diagnostic dans Encyclopédie médico-chirurgicale*. aris, Elsevier, 2000. **8-507-A-20**.
12. Salem G, L.G.F., *Espace urbain et risque anophélien à Pikine (Sénégal)*. cahier santé, 1994. **1**: p. 347-394.
13. Trape, J.F., P. Peelman, and B. Carme, *[The severity of a snake bite. Apropos of 3 case reports in the Congo]*. Ann Soc Belg Med Trop, 1992. **72**(2): p. 155-7.
14. Gazin, P., *Le paludisme en Afrique au Sud du Sahara: comparaison entre milieux urbain et ruraux*. Cahier santé, 1991. **10**: p. 221-9.
15. Diallo, S., et al., *[Malaria in the central health district of Dakar (Senegal). Entomological, parasitological and clinical data]*. Sante, 2000. **10**(3): p. 221-9.
16. Diallo, S., et al., *[Malaria in the southern sanitary district of Dakar (Senegal). 2. Entomologic data]*. Bull Soc Pathol Exot, 1998. **91**(3): p. 259-63.
17. Carme, B., *Indices Plasmodiques et charges parasitaires chez des donneurs de sang à Brazzaville CONGO*. 1993.
18. Gaye, O., et al., *[Malaria morbidity and therapeutic efficacy of antimalarials. Study conducted in the Dakar region]*. Med Trop (Mars), 1993. **53**(4): p. 479-85.
19. Gaye, O., et al., *[Development of chloroquine resistance in an urban area. Results of surveys in Dakar and Pikine]*. Ann Soc Belg Med Trop, 1991. **71**(4): p. 329-30.
20. Singh, B., et al., *A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings*. Lancet, 2004. **363**(9414): p. 1017-24.
21. Malaguarnera, L. and S. Musumeci, *The immune response to Plasmodium falciparum malaria*. Lancet Infect Dis, 2002. **2**(8): p. 472-8.
22. Pages, F., E. Orlandi-Pradines, and V. Corbel, *[Vectors of malaria: biology, diversity, prevention, and individual protection]*. Med Mal Infect, 2007. **37**(3): p. 153-61.
23. Mockenhaupt, F.P., et al., *The contribution of alpha+-thalassaemia to anaemia in a Nigerian population exposed to intense malaria transmission*. Trop Med Int Health, 1999. **4**(4): p. 302-7.

24. Carnevale, P., et al., [*The impact of impregnated mosquito nets on prevalence and morbidity related to malaria in sub-Saharan africa*]. Ann Soc Belg Med Trop, 1991. **71 Suppl 1**: p. 127-50.
25. Perlmann, P. and M. Troye-Blomberg, *Malaria and the immune system in humans*. Chem Immunol, 2002. **80**: p. 229-42.
26. Pradel, G., S. Garapaty, and U. Frevert, *Proteoglycans mediate malaria sporozoite targeting to the liver*. Mol Microbiol, 2002. **45**(3): p. 637-51.
27. Mota, M.M., et al., *Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection*. Science, 2001. **291**(5501): p. 141-4.
28. Ponnudurai, T., et al., *Feeding behaviour and sporozoite ejection by infected Anopheles stephensi*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1991. **85**(2): p. 175-80.
29. Brandts, C.H., et al., *Effect of paracetamol on parasite clearance time in Plasmodium falciparum malaria*. Lancet, 1997. **350**(9079): p. 704-9.
30. Udomsangpetch, R., et al., *Febrile temperatures induce cytoadherence of ring-stage Plasmodium falciparum-infected erythrocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(18): p. 11825-9.
31. Rowe, J.A., et al., *Adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications*. Expert Rev Mol Med, 2009. **11**: p. e16.
32. Horata, N., et al., *Sequence variation of PfEMP1-DBLalpha in association with rosette formation in Plasmodium falciparum isolates causing severe and uncomplicated malaria*. Malar J, 2009. **8**: p. 184.
33. Bridges, D.J., et al., *Rapid activation of endothelial cells enables Plasmodium falciparum adhesion to platelet-decorated von Willebrand factor strings*. Blood, 2010. **115**(7): p. 1472-4.
34. Lochhead, J., et al., *The effects of hypoxia on the ERG in paediatric cerebral malaria*. Eye (Lond), 2010. **24**(2): p. 259-64.
35. Maude, R.J., et al., *The spectrum of retinopathy in adults with Plasmodium falciparum malaria*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2009. **103**(7): p. 665-71.
36. White, V.A., et al., *Retinal pathology of pediatric cerebral malaria in Malawi*. PLoS One, 2009. **4**(1): p. e4317.
37. Goyal, A., S. Goel, and D.C. Gowda, *Plasmodium falciparum: Assessment of parasite-infected red blood cell binding to placental chondroitin proteoglycan and bovine tracheal chondroitin sulfate A*. Exp Parasitol, 2009. **123**(2): p. 105-10.
38. Sergeant, E., Parrot, L., and Donatien, A., *Une question de terminologie: immuniser ou prémunir*. Bull. Soc. Path.Exot, 1935. **17**:30-37.
39. Biswas, S., et al., *Naturally acquired immunity and reduced susceptibility to falciparum malaria in two subpopulations of endemic eastern India*. Scand J Immunol, 2008. **67**(2): p. 177-84.
40. Doolan, D.L., C. Dobano, and J.K. Baird, *Acquired immunity to malaria*. Clin Microbiol Rev, 2009. **22**(1): p. 13-36, Table of Contents.
41. O'Meara, W.P., et al., *Relationship between exposure, clinical malaria, and age in an area of changing transmission intensity*. Am J Trop Med Hyg, 2008. **79**(2): p. 185-91.
42. Baird, J.K. and R.W. Snow, *Acquired immunity in a holoendemic setting of Plasmodium falciparum and p. Vivax malaria*. Am J Trop Med Hyg, 2007. **76**(6): p. 995-6.
43. Roland, J., et al., *NK cell responses to Plasmodium infection and control of intrahepatic parasite development*. J Immunol, 2006. **177**(2): p. 1229-39.
44. Mohan, K., P. Moulin, and M.M. Stevenson, *Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage Plasmodium chabaudi AS infection*. J Immunol, 1997. **159**(10): p. 4990-8.
45. Weetman, A.P., *The immunology of pregnancy*. Thyroid, 1999. **9**(7): p. 643-6.
46. Perlmann, P. and M. Troye-Blomberg, *Malaria blood-stage infection and its control by the immune system*. Folia Biol (Praha), 2000. **46**(6): p. 210-8.

47. Groux, H. and J. Gysin, *Opsonization as an effector mechanism in human protection against asexual blood stages of Plasmodium falciparum: functional role of IgG subclasses*. Res Immunol, 1990. **141**(6): p. 529-42.
48. Orago, A.S. and C.A. Facer, *Cytotoxicity of human natural killer (NK) cell subsets for Plasmodium falciparum erythrocytic schizonts: stimulation by cytokines and inhibition by neomycin*. Clin Exp Immunol, 1991. **86**(1): p. 22-9.
49. Bouharoun-Tayoun, H. and P. Druilhe, *Antibodies in falciparum malaria: what matters most, quantity or quality?* Mem Inst Oswaldo Cruz, 1992. **87 Suppl 3**: p. 229-34.
50. Winkler, S., et al., *Reciprocal regulation of Th1- and Th2-cytokine-producing T cells during clearance of parasitemia in Plasmodium falciparum malaria*. Infect Immun, 1998. **66**(12): p. 6040-4.
51. Day, N.P., et al., *The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria*. J Infect Dis, 1999. **180**(4): p. 1288-97.
52. Hill, A.V., et al., *HLA, malaria and dominant protective associations*. Parasitol Today, 1992. **8**(2): p. 57.
53. Kumaratilake, L.M. and A. Ferrante, *T-cell cytokines in malaria: their role in the regulation of neutrophil- and macrophage-mediated killing of Plasmodium falciparum asexual blood forms*. Res Immunol, 1994. **145**(6): p. 423-9.
54. Nagamine, Y., et al., *Involvement of interleukin-18 in severe Plasmodium falciparum malaria*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2003. **97**(2): p. 236-41.
55. Luty, A.J., et al., *Interferon-gamma responses are associated with resistance to reinfection with Plasmodium falciparum in young African children*. J Infect Dis, 1999. **179**(4): p. 980-8.
56. Plassmeyer, M.L., et al., *Structure of the Plasmodium falciparum circumsporozoite protein, a leading malaria vaccine candidate*. J Biol Chem, 2009. **284**(39): p. 26951-63.
57. Guttinger, M., et al., *Human T cells recognize polymorphic and non-polymorphic regions of the Plasmodium falciparum circumsporozoite protein*. EMBO J, 1988. **7**(8): p. 2555-8.
58. Kumar, R., et al., *Reliability of the fluorescent antibody test in the measurement of malaria in the community*. Indian J Malariol, 1988. **25**(2): p. 73-6.
59. Sinigaglia, F., et al., *Epitopes recognized by human T lymphocytes on malaria circumsporozoite protein*. Eur J Immunol, 1988. **18**(4): p. 633-6.
60. Olotu, A., et al., *Circumsporozoite-specific T cell responses in children vaccinated with RTS,S/AS01E and protection against P falciparum clinical malaria*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e25786.
61. Cohen, J., et al., *[The malaria vaccine candidate RTS,S/AS is in phase III clinical trials]*. Ann Pharm Fr, 2010. **68**(6): p. 370-9.
62. Stoute, J.A., et al., *A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against Plasmodium falciparum malaria*. RTS,S Malaria Vaccine Evaluation Group. N Engl J Med, 1997. **336**(2): p. 86-91.
63. Mueller, A.K., et al., *Genetically modified Plasmodium parasites as a protective experimental malaria vaccine*. Nature, 2005. **433**(7022): p. 164-7.
64. Hoffman, S.L., et al., *Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated Plasmodium falciparum sporozoites*. J Infect Dis, 2002. **185**(8): p. 1155-64.
65. Kumar, K.A., et al., *The circumsporozoite protein is an immunodominant protective antigen in irradiated sporozoites*. Nature, 2006. **444**(7121): p. 937-40.
66. Trape, J.F., 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**(2): p. 123-37.
67. RICHARD, V., *Urbanisation et paludisme-conférence.5e édition du cours international*. Institut Pasteur de Madagascar, 2013.

68. Gause, W.C., J.F. Urban, Jr., and M.J. Stadecker, *The immune response to parasitic helminths: insights from murine models*. Trends Immunol, 2003. **24**(5): p. 269-77.
69. Roger, P.M., et al., *[Elderly patients presenting with fever and respiratory problems in an intensive care unit. Diagnostic, therapeutic and prognostic impact of a systematic infectious disease consultation]*. Presse Med, 2003. **32**(36): p. 1699-704.
70. John, C.C., et al., *Antibodies to the Plasmodium falciparum antigens circumsporozoite protein, thrombospondin-related adhesive protein, and liver-stage antigen 1 vary by ages of subjects and by season in a highland area of Kenya*. Infect Immun, 2003. **71**(8): p. 4320-5.
71. Doodoo, D., et al., *Measuring naturally acquired immune responses to candidate malaria vaccine antigens in Ghanaian adults*. Malar J, 2011. **10**: p. 168.
72. John, C.C., et al., *Correlation of high levels of antibodies to multiple pre-erythrocytic Plasmodium falciparum antigens and protection from infection*. Am J Trop Med Hyg, 2005. **73**(1): p. 222-8.