

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Liste des figures

Figure 1 : Cycle de développement de *P. falciparum* chez l'homme et l'anophèle moustique

Figure 2: Structure de LSA₁₋₄₁

Figure 3 : Principales étapes du dosage des anticorps

Figure 4: Comparaison de niveau des réponses IgM et IgG dirigées contre LSA₁₋₄₁ et BSA.

Figure 5 : Corrélations entre les réponses IgM et IgG dirigées contre LSA₁₋₄₁ suivant les Classes d'âge

Figure 6: Variations des niveaux de réponses IgM et IgG anti-LSA₁₋₄₁ suivant les densités parasitaires

Figure 7 Corrélations entre les réponses IgM et IgG dirigées contre LSA₁₋₄₁ suivant le taux d'hémoglobine

Liste des tableaux

Tableau I : Données épidémiologiques et hématoparasitologiques des patients

Tableau II : Interrelations entre les données hématoparasitologiques

Tableau III : Prévalences des répondeurs en IgM et IgG anti-LSA₁₋₄₁

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac : Anticorps

ADCI: Antibody Dependent Cellular Inhibition

Ag : Antigène

BSA (ou **SAB**): Bovine Serum Albumin

CD : Cluster of Differentiation ,

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

DC : Cellule Dendritique

DO : Densité Optique

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

GM-CSF: Granulocyte macrophage- colony stimulating factor

HLA : Human Leucocyte Antigen

HPD : Hôpital Principal de Dakar

IFN : Interféron.

Ig : Immunoglobuline.

IL : Interleukine.

IPD : Institut Pasteur de Dakar

kDa : kilodalton.

LSA-1-41: Liver Stade Antigen-₁₋₄₁

ml : millilitre.

μl : microlitre.

NK : Natural Killer.

NKT : T Natural Killer

NO: Monoxyde d'Azote

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

PBS: Phosphate Buffer Saline.

Pf: *Plasmodium falciparum*.

SHI: Sérum hyper-immun

Th: T-Helper.

TNF: Tumor Necrosis Factor

INTRODUCTION	1
Première partie : CARACTERISTIQUES GENERALES DU PALUDISME	
I-Définition et Historique	2
I-1-Définition.....	2
I-2 Historique.....	2
II -Epidémiologie	3
II-1-Paludisme dans le monde	3
II-2-Paludisme en zone urbain	3
III- Biologie du parasite	3
III-1- Agents pathogènes.....	3
III-2- Vecteur	4
III- 3- Cycle de <i>P. falciparum</i>	5
IV- Pathologie de l'infection palustre.....	6
IV-1-Accès simple.....	6
IV-2-Accès grave.....	6
V- Immunité anti palustre.....	6
V-1- - Immunité Innée	7
V-2- - Immunité Acquise	7
 Deuxième partie: TRAVAUX PERSONNELS	
I - Site d'étude	9
II – Matériel et Méthodes	9
II-1 - Matériel de laboratoire	9
II-2 - Tampons et réactifs	9
II-3- - Matériel biologique	11
II-3-1 - Sérum étudiés.....	11
II-3-2-Sérum Contrôles positif.....	11
II-3-3-Sérum Contrôles négatifs	11
II-3-4-Antigène LSA- ₁₋₄₁	11
II-4- Technique ELISA	13
II-5-.Analyses statistiques des résultats.....	14
III-RESULTATS.....	15
III-1- Caractéristiques de la population d'études.....	15

III-1-1- Données générales de la population d'étude	15
III-1-2-Interrelations entre les données hématoparasitologiques des patients	16
III-2- Evolution des réponses anticorps IgG et IgM dirigées contre LSA₁₋₄₁.....	17
III-2-1-Prévalences des réponses anticorps	17
III-2-2-Evolution des niveaux de réponses en IgM et IgG suivant l'âge des patients ..	17
III-2-2-1-Variations des amplitudes suivant l'âge.....	18
III-2-2-2-Corrélations entre les taux d'IgM et d'IgG dans les deux groupes d'âge.....	19
III-2-2-3-Variations des amplitudes de réponses en IgM et IgG suivant les densités parasitaires.....	20
III-2-2-4- Corrélations entre les réponses en IgM et en IgG suivant le taux d'hémoglobine.....	21
IV-DISCUSSION	23
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	25
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	26

INTRODUCTION

Le paludisme est une maladie parasitaire liée au développement et à la multiplication dans les globules rouges d'un hématozoaire du genre *Plasmodium*. Il est transmis à l'homme par la piqûre d'un moustique femelle du genre *Anophèles* [1].

C'est une endémie parasitaire majeure, qui sévit selon le mode endémo-épidémique. Son incidence dépend de l'écologie du vecteur donc du climat mais également de l'aménagement de l'espace, des migrations des populations et des facteurs économiques [2].

Malgré les efforts entrepris par l'OMS en vue de l'éradication du paludisme, la maladie reste très répandue en Afrique subsaharienne. Dans ces régions, elle revêt des aspects particuliers notamment au niveau des grandes villes où l'exode rural est à l'origine d'une urbanisation grandissante entraînant ainsi d'importantes modifications de l'écologie vectorielle. Le faible niveau de transmission palustre observé dans les grandes villes, explique l'absence d'acquisition de l'immunité protectrice ou prémunition observée en zone rurale hyper-endémique.

En outre, la plupart des études antérieures ont été menées en milieu rural et elles fournissent des données n'étant pas toujours applicables chez les citadins. Les aspects immunologiques du paludisme urbain restent encore mal connus malgré les multiples travaux en cours en Afrique [3, 4].

Cette étude proposée entre dans le cadre d'une investigation dont l'objectif général est d'analyser les caractéristiques immunologiques du paludisme de recrutement urbain dans la ville de Pikine, avec pour objectifs spécifiques (i) de mesurer les taux d'IgM et d'IgG anti-LSA₁₋₄₁, (ii) de déterminer la relation entre les taux d'IgM et d'IgG anti-LSA₁₋₄₁ et la parasitémie et enfin (iii) de rechercher la relation entre le taux d'IgM, d'IgG et les taux d'hémoglobine.

Première partie

CARACTERISTIQUES

GENERALES DUPALUDISME

I – DEFINITION ET HISTORIQUE

I-1-Définition :

Le **paludisme** (du latin *paludis*, « **marais** »), aussi appelé **malaria** (anglo-saxons) de l'italien *mal'aria*, « mauvais air » est une parasitose due à des hématozoaires du genre *Plasmodium*. Elle est transmise par la piqûre d'un moustique du genre *Anophèles*, c'est en effet la maladie infectieuse la plus répandue et la plus meurtrière au monde [5].

Elle est surtout présente dans les régions tropicales d'Afrique, d'Amérique latine et d'Asie où les conditions climatiques et environnementales sont favorables au développement des moustiques vecteurs [6, 7].

I-2-Historique

Le paludisme est une maladie très ancienne. En 3000 avant JC, les Egyptiens en souffraient, cette certitude est issue de la découverte de *plasmodium* dans des momies [8]

Aux environs de 2700 avant JC, des cas d'accès palustres ont été décrits en Chine. Dans la mythologie chinoise, la maladie est représenté sous la forme de démons munis d'un marteau, d'un seau d'eau froide et entretenant un four brûlant, symbolisant les céphalées, les fièvres et les frissons[9]

L'agent pathogène a été découvert à Constantine (Algérie) par **Alphonse Laveran** en 1880 .[10]

En 1922, quatre *Plasmodiums* infectant l'homme étaient décrits: *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax* et *P. ovale*. [2].

La 5^{ème} espèce appelée *Plasmodium knowlesi* proche génétiquement de *Plasmodium vivax*, et, microscopiquement, de *Plasmodium malariae*, n'a été reconnu qu'en 2008 comme infectant l'homme mais elle était rétouvée antérieurement chez le singe.

En 1943 deux anti paludéens de synthèse font leur apparition et seront fréquemment utilisé : la chloroquine et l'amodiaquine [11].

II-EPIDEMOIOLOGIE

II-1-Paludisme dans le monde

En raison des facteurs influençant l'épidémiologie (la distribution des anophèles, sa capacité vectorielle, les caractéristiques biologiques des différentes espèces de *Plasmodium*) la répartition géographique varie d'un continent à l'autre, d'un pays à l'autre, mais aussi d'une région à une autre, d'un village à un autre et même parfois au sein d'un même village. Constituant un frein au développement socio-économique, selon l'OMS en 2012, environ 207 millions de cas de paludisme ont été enregistré, ayant provoqué environ 627 000 décès. Principalement en Afrique et en Asie du Sud-est 3,4 milliards de personnes continuent d'être exposées au risque[12]. Les enfants en bas âge sont les plus touchés [13].

II-2-Paludisme en zone urbain

En milieu urbain, la transmission est plus faible qu'en milieu rural. Cependant, on assiste depuis quelques années à une urbanisation accélérée en Afrique sub-saharienne. Le faible niveau de transmission palustre observé dans les grandes villes explique l'absence de prémunition telle que décrite en zone rurale hyper-endémique.

Ainsi, de par l'accélération de l'urbanisation en Afrique, on peut prévoir pour les prochaines années une diminution des taux de prévalence du paludisme, mais aussi une augmentation relative de la proportion des formes graves de paludisme[14].

III- BIOLOGIE DU PARASITE

III-1-Agents pathogènes.

Le *Plasmodium*, agent du paludisme est un protozoaire appartenant à l'embranchement des Sporozoaires ou Apicomplexa, à la classe des Sporozoasida, à l'ordre des Eucoccidiorida, à la Famille des Plasmodiidae et au Genre *Plasmodium* [15].

Les 5 espèces de *Plasmodium*s pouvant infecté l'homme sont :

Plasmodium falciparum : premier agent causal du paludisme à être découvert. Mais aussi l'espèce la plus répandue dans les régions chaudes et humides, il reste la plus redoutable et la seul véritablement meurtrier [16].

Plasmodium malaria : agent de la fièvre quarte, a une distribution clairsemée et coexiste souvent avec *P. falciparum* sous les tropiques.

Plasmodium ovale : responsable de la fièvre tierce bénigne, très proche de *P.vivax* avec lequel il a été longtemps confondu

Plasmodium vivax : très répandue dans le monde mais moins que *P.falciparum* [17].

Plasmodium knowlesi : affectant originellement les singes, il est responsable de fièvre quarte chez l'homme avec des manifestations relativement graves du fait de son cycle de développement court. Sa ressemblance avec *P. malariae* justifie le fait qu'il ait été longtemps confondu avec ce dernier et sa découverte est assez récente en Asie du Sud-est (Malaisie, Thaïlande, Philippines) [18].

III-2-Vecteur

Le paludisme est transmis par un moustique appartenant à l'ordre des Diptera, à la famille des culicidae et au genre *Anopheles*

Les espèces les plus redoutables sont anthropophiles et leur reproduction nécessite du sang, de l'eau et de la chaleur. Seules les femelles sont hématophages et mènent une activité nocturne [19]. Elles inoculent le parasite *plasmodium* (sporozoïte) par piqûre au cours d'un repas sanguin à une personne saine[20].

III-3-Cycle de *P. falciparum*

La phase de reproduction asexuée encore appelée schizogonie se déroule chez l'homme (hôte intermédiaire) et la phase sexuée ou sporogonie a lieu chez l'anophèle.

III-3-1-Cycle Chez l'anophèle

Le moustique au cours de son repas sanguin ingère chez l'homme du sang contenant des gamétocytes. Le gamétocyte mâle va donner 6 à 8 **gamètes** flagellés qui permettront la fécondation des gamètes femelles pour donner naissance à un œuf appelé **Ookinète**.

Cet œuf, mobile, va traverser la paroi de l'estomac du moustique et s'enkyster à sa partie externe en formant un **Oocyste**. A l'intérieur de l'Oocyste les noyaux vont se diviser et donner après éclatement, des centaines ou des milliers de **Sporozoïtes** qui vont gagner les glandes salivaires du moustique. Ce dernier est alors infestant et peut transmettre le paludisme à un individu réceptif lors d'une piqûre et ce cycle dure 10 -14 jours à 27 ° C[20].

III-3-2-Cycle chez l'Homme

Les **sporozoïtes** inoculés circulent dans le sang pendant une trentaine de minutes avant de se réfugier dans les **hépatocytes** où les parasites se multiplient et se transforment en

corps bleus qui éclatent en libérant de très nombreux **mérozoïtes**. Ceux-ci passent dans le sang.

Dans le sang, chaque **mérozoïte** pénètre dans un globule rouge et devient un **trophozoïte** qui grossit, formant un **schizonte** puis un **corps en rosace**. Celui-ci éclate, libérant des **mérozoïtes** qui infestent de nouvelles hématies. Ils se transforment de nouveau en **trophozoïtes** puis en **corps en rosace** qui éclatent, l'éclatement synchrone des corps en rosace, toutes les 48 ou 72 heures selon l'espèce, correspond à l'accès fébrile.

Après plusieurs cycles endo-érythrocytaires de ce type, certains **trophozoïtes** se transforment en **gamétoцитes femelles et mâles** et qui seront ingérés par l'anophèle femelle[21].

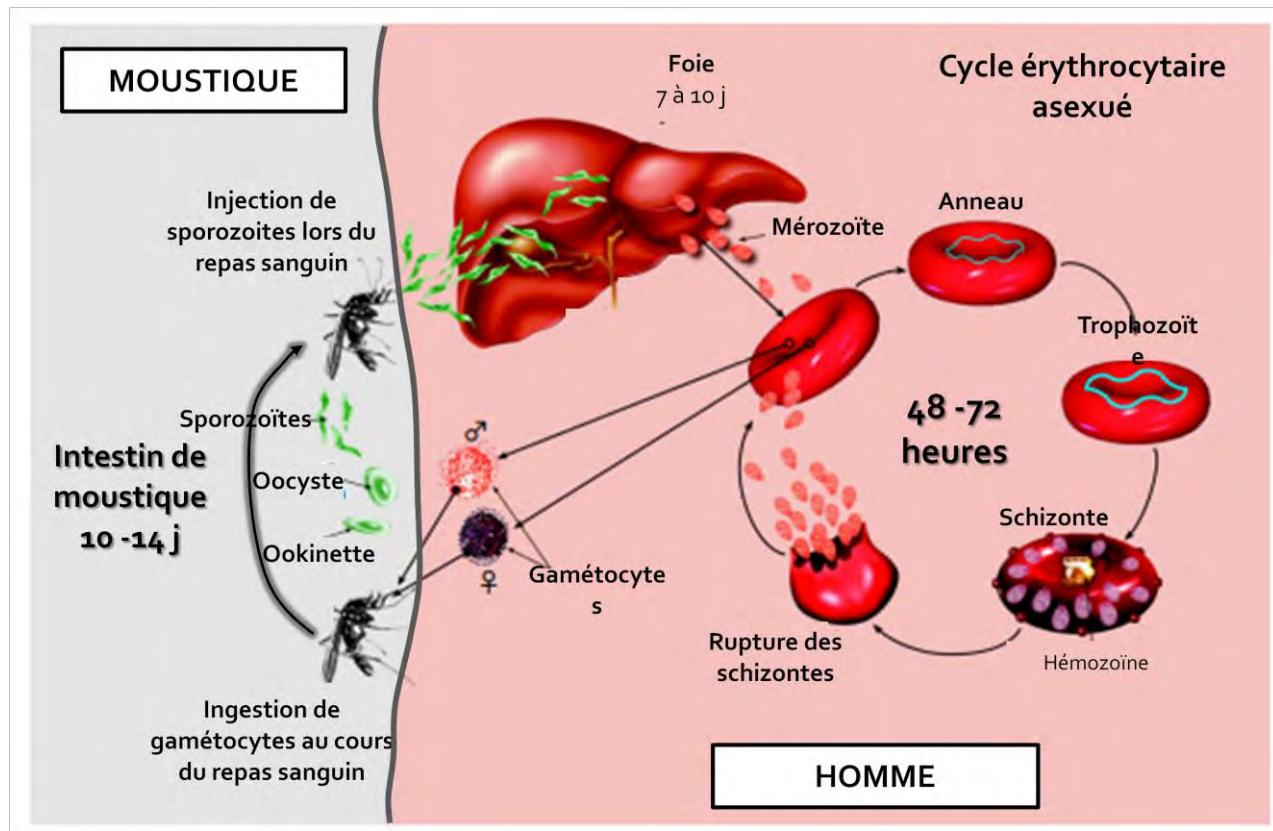


Figure 1: Cycle de développement des schizontes chez l'homme et l'anophèle [21].

IV-PATHOLOGIE DE L'INFECTION PALUSTRE

Les manifestations cliniques du paludisme n'apparaissent qu'au cours de la multiplication asexuée de *plasmodium* à l'intérieur des hématies faisant du paludisme, au sens propre, une érythrocytopathie parasitaire, ce phénomène aboutit à :

- des accès fébriles violents et rythmés;
- une destruction massive d'hématies (directe et indirecte) qui entraîne une anémie hémolytique
- une détérioration de l'état général pouvant aboutir à la cachexie[15].

IV-1-Accès simple

Le tableau clinique des accès de primo –invasion est celui d'un embarras gastrique fébrile associés à des céphalées et myalgies.

Une hépatomégalie est parfois retrouvée, puis va succéder la phase d'état avec périodicité des accès thermiques, ces accès palustres sont caractérisés par la succession de 3 phases à rythme régulier : frissons, chaleur, sueur [2].

IV-2-Accès Grave

Il existe plusieurs formes cliniques dont le neuropaludisme, l'insuffisance rénale, l'insuffisance hépatique, la splénomégalie, l'hépatomégalie, l'hypoglycémie, l'ictère, l'anémie sévère, l'œdème aigu du poumon [2].

V- IMMUNITE ANTI PALUSTRE

L'infection par *Plasmodium*, engendre des réponses immunitaires chez l'hôte, ces réponses sont régulées aussi bien par le système immunitaire innée, que par le système immunitaire acquis,

V-1-Immunité innée

Les cellules Natural killer, les granulocytes, les monocytes-macrophages, les lymphocytes T $\gamma\delta$ jouent un rôle prépondérant dans l'immunité innée observée au cours des infections palustres précoces.

Dans cette immunité, les cellules NK sont de puissantes productrices de cytokines comme l'interféron- (IFN- γ).Cette capacité à produire l'IFN- γ , conduit à l'activité parasiticide des macrophages, et pourrait être d'une grande importance pour l'immunité innée

contre le paludisme. En effet l'IFN- γ augmente la potentialité des cellules NK à détruire les globules parasités de l'hôte [22].

Les granulocytes interviennent dans le contrôle de la parasitemie, soit par une activité phagocytaire directe, soit par une phagocytose médiée par des anticorps, ou par le relargage de médiateurs cytotoxiques, comme les radicaux oxygénés libres et le monoxyde d'azote. Lors de la libération des merozoites, les neutrophiles sont stimulés et altèrent le développement des jeunes anneaux [23].

Les cellules T $\gamma\delta$ sont capables de reconnaître des molécules appartenant à *Plasmodium falciparum*, activées par des antigènes non peptidiques, ces cellules pourraient être aussi dépendantes de l'activation d'autres types cellulaires, comme les monocytes et les cellules dendritiques [24].

Elles sécrètent des cytokines pro-inflammatoire qui peuvent inhiber le développement des formes asexuées du *plasmodium* [25].

Les monocytes /macrophages activés par des glycosylphosphatidylinositols (GPI) provenant de *Plasmodium falciparum* [26] jouent un rôle dans la clairance parasitaire par un mécanisme appelé ADCI (Antibody-Dependant Cellular Inhibition) [27].

Quand aux cytokines un certain nombre est produit au cours du paludisme, dont certaines sont capables d'inhiber le développement du parasite à certains stades du cycle biologique. Ceci comprend les cytokines produites par les lymphocytes T (y compris IFN- γ , TNF, GM-CSF, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 et LT), mais aussi des cytokines produites par d'autres cellules (TNF et IL-1). Ces cytokines peuvent agir directement sur les cellules infectées, comme c'est le cas du TNF, mais dans la plupart des cas, elles agissent indirectement en induisant la production de médiateurs solubles par les macrophages ou les neutrophiles (par exemple, la production de radicaux libres d'oxygène et de monoxyde d'azote); une cascade de réactions aboutissant à la production de NO est probablement responsable de la destruction des hépatocytes infectés. [37].

V-2-Immunité acquise

L'immunité acquise résulte d'un processus lent ; elle est incomplète, non stérilisant, labile et disparaît rapidement. L'immunité ne s'installe qu'à la suite d'infections régulières et répétées.

C'est une immunité que les sujets acquièrent progressivement dans le temps, l'immunité à médiation cellulaire et l'immunité à médiation humorale en sont les 2 principales composantes

V-2-1- Immunité cellulaire

Le développement de la réponse immune ne nécessite ni un grand nombre d'infections ni la présence du parasite qui l'a induite pour se maintenir. L'immunité à médiation cellulaire a un délai d'acquisition relativement court et assure la protection par l'inhibition de la multiplication parasitaire [28].

Certains antigènes plasmodiaux entraînent une production d'anticorps dans le cadre d'une coopération lymphocytaire T/B , impliquant les lymphocytes CD4+. Les mécanismes de cette réponse immune précoce contre les antigènes de *P.falciparum* chez l'homme, sont caractérisés par la prolifération des lymphocytes Th1 (CD4+ et CD8+) et en l'absence d'anticorps [28]. Son induction est accompagnée de la production d'une cytokine de type Th1, l'IFN- γ [28, 29].

L'action de l'IFN- γ et l'activité de l'oxyde nitrique produit par les cellules mononucléées du sang périphérique, jouent un rôle clé dans l'obtention de cette réponse immunitaire [28].

Les lymphocytes T produisent aussi de l'IFN- γ en réponse aux antigènes du stade hépatique LSA[30] .

V-2-2-Immunité humorale

Les lymphocytes B sont considérés comme l'élément clé de cette réponse immunitaire humorale .Il ya au moins quatre argument qui soutiennent le rôle des anticorps dans l'immunité contre le paludisme :

-chez les résidents en zone endémique le paludisme induit des réponses humorales avec la prédominance des IgM et des IgG[31].

-le transfert passif du sérum immun chez un sujet non immun peut prévenir l'infection palustre [32].

-Le passage d'anticorps à travers le placenta qui est une forme de **transfert passif** d'immunité de la mère immune à son enfant; assure une protection effective de l'enfant pendant les premiers six mois [33].

Deuxième partie

TRAVAUX PERSONELS

I-Site d'étude

Les patients recrutés étaient domiciliés à Pikine, dans la banlieue de Dakar. Le paludisme y sévit de façon hypo endémique et saisonnière avec moins d'une 1 piqûre infectante/habitant/an.

Notre étude a porté sur 144 patients (60H/84F) âgés de 4 à 65 ans et recrutés entre Septembre 2000 et Janvier 2001 au niveau du dispensaire des Sœurs Catholiques de Sahm-Guédiawaye.

II-Matériel et Méthodes

II-1-Matériel de laboratoire

- Hotte à flux laminaire verticale..... (Flufrance®, France)
- Plaques Maxisorp(Nunc® Danemark)
- Plaques Immulon-4..... (Dynatech, Roskilde® Danemark)
- Pipettes: 20, 200, 1000ml..... (Gilson Medical Electronics S.A., France)
- Pipettes Falcon 5ml, 10ml(Becton Dickinson S.A, USA)
- Pipettes multicanaux de 12 à volume ajustable.....(Costar® Cambribge, USA)
- Tubes de dilution.....(Mega®)
- Autoclave (Lequeur®)
- Balance de précision(Navigator®)
- Spectrophotomètre (Biorad)
- Etuves à 37°C(Napco® 6001)
- Congélateur à -80°C(REVCO®)
- Réfrigérateur à -4°C (White-Westinghouse®)
- Tubes coniques Falcon 15ml(Becton Dickinson S.A.)
- Tubes coniques Falcon 50ml(Nunc® Danemark)

II-2- Tampons de dosage et réactifs

Pour l'évaluation des niveaux de réponses Ac avec la technique ELISA

Certains tampons et solutions ont été utilisés:

Tampon de “coating” (PBS1X) (GIBCO® United Kingdom):

Tampon de dilution de l'antigène (1 pastille de PBS pour 100ml d'eau distillée),

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

H2O distillée.....	1000 ml
PBS1X.....	10 pastilles
Tween 20 (Labosi®, France).....	1 ml.

Tampon de saturation: PBS BSA 5% Tween 1%

H2O distillée.....	100 ml
PBS 1X.....	1 pastille
BSA (Sigma® Chemical Cie, USA).....	1 g
Tween 20.....	100 ml
Azide de sodium.....	50 mg.

Tampon de dilution des sérum s :

H2O distillée.....	100 ml
PBS1X.....	1 pastille
BSA.....	1 g
Tween 20.....	100 ml
Azide de sodium.....	50 mg

Tampon de dilution des conjugués :

H2O distillée.....	100 ml
PBS 1X.....	1 pastille
BSA.....	1 g
Tween 20.....	100 ml

Réactif de révélation :

Solution de TMB (tetramethylbenzidine) (Gaithersburg, MD 20878 USA)

Solution d'arrêt :

H2SO4 fumant(Prolabo®, France).....	10 ml
H2O distillée.....	90 ml

Conjugués :

Anti-human IgG peroxydase conjugate (Cappel, USA)
Anti-human IgM peroxydase conjugate (Cappel, USA)

II-3-Matériel biologique

II-3-1-Sérum étudiés

Les prélèvements ont été faits de septembre 2000 à janvier 2001. Le sang prélevé a été séparé en deux parties dont l'une a servi 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 formes d'aliquots de 500 µl à 1ml. Ces plasmas ont été dilués à 1/100 lors du dosage.

II-3-2-Sérum contrôles positifs

-SHI : « Sérum hyper-immun » Il s'agit de sérums prélevés au cours des enquêtes immuno-épidémiologiques transversales, entreprises dans la population du village de Dielmo situé à environ 280 Km au Sud-Est de Dakar. Tous les sérums sélectionnés pour la confection de ce premier contrôle positif proviennent d'individus considérés comme de forts répondeurs à la suite de tests d'évaluation mais aussi à la suite d'une calibration avec les différents Ag étudiés.

-MH : Sérum « Marcel Hommel », il s'agit d'un pool de sérums recueillis chez des Africains prémunis vivant dans une zone de forte endémicité palustre.

Sa concentration en anticorps totaux est estimée à 20 mg/ml et on y retrouve essentiellement des IgG dirigées contre *P falciparum*.

II-3-3-Sérum contrôles négatifs

-NA : « Naïf Africain » élaboré à partir de sérums d'individus africains de sexe masculin, qui sont des donneurs de sang à l'HPD. Ce sont des sujets vivant à Dakar et n'ayant pas une expérience récente ou ancienne d'accès clinique, connue.

- SAB : sérum provenant de personnes du groupe AB

II-3-4- Antigène étudié:

LSA-1-41 : Liver Stage Antigen est une protéine de 230 kDa de poids moléculaire, elle possède un grand domaine central de répétition d'acides aminés (jusqu'à 86 répétitions d'une séquence 17 bis) flanqué de domaines non-répétitifs.

Exprimé à la surface de l'hépatocyte infecté, soit directement par le parasite, soit par le mécanisme de processing antigénique et d'expression par l'intermédiaire des molécules CMH de classe I[34],[35]

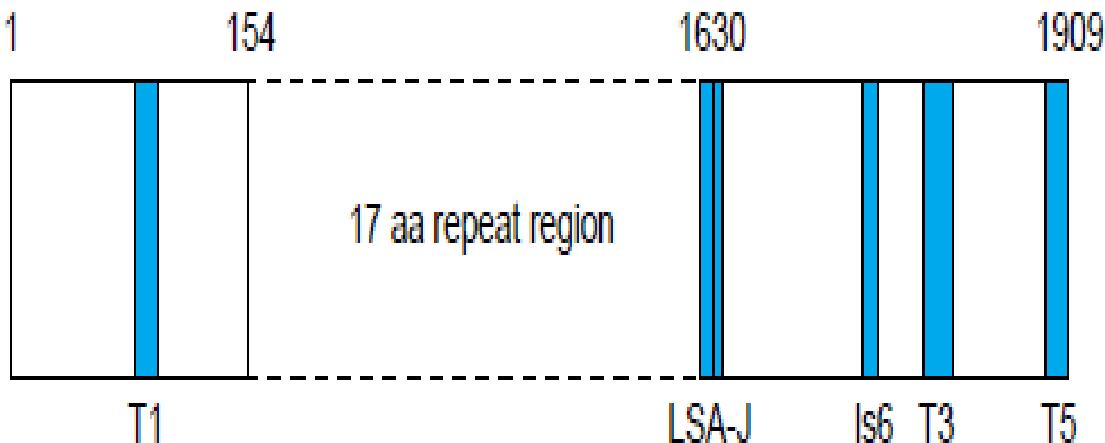


Figure 2:Structure de LSA 1-41

II-4-Technique ELISA:

Le dosage des immunoglobulines dirigées contre les différents antigènes étudiées 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 (plaqué 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. Pour chaque étape, il existe des conditions devant être respectées.

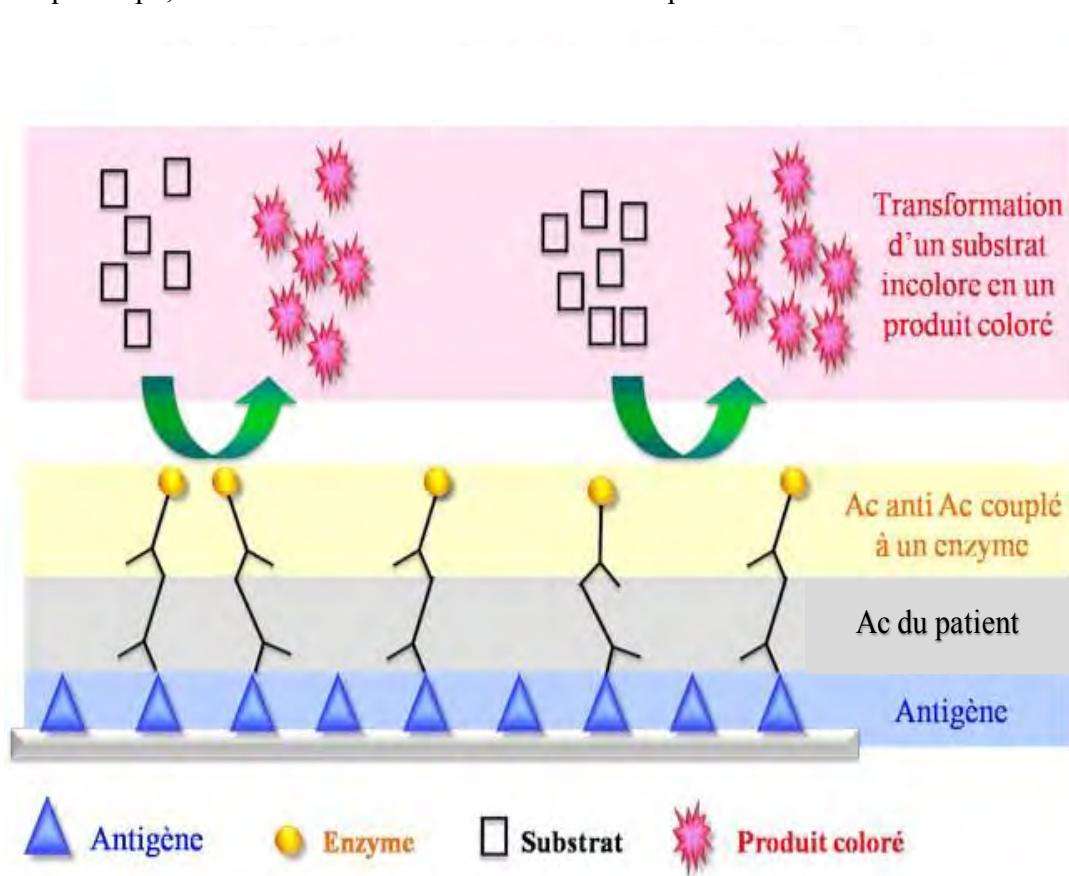


Figure 3: Principales étapes du dosage des anticorps sériques par ELISA.

- 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 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 ;
 - 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 μ l 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 ;
 - Distribuer dans les puits 100 μ l 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.
 - Distribuer 100 μ l 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 μ l 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.

II-5-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.

III-RESULTATS

III-1-Caractéristiques de la population d'étude

III-1-1- Données générales de la population d'étude

Notre cohorte est composée de 144 patients souffrant d'accès palustres simples (non aggravés). Parmi eux 59 sont des adultes (âge ≥ 15 ans) et 85 des enfants âgés de moins de 15 ans. Le **Tableau I** résume les données épidémiologiques et hématoparasitologiques de la population d'étude.

Tableau I: Données épidémiologiques et hématoparasitologiques des patients

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. Prev=prévalence

Le sex-ratio est en faveur des femmes dans les différents groupes de patients. La densité parasitaire moyenne est de 2,1 % et aucune variation statistiquement significative n'est observée entre les adultes et les enfants. Seuls les taux d'hémoglobine globalement compris entre 2,5 et 16,6 apparaissent plus faibles chez les enfants comparés aux adultes. Le taux de plaquettes est plus élevé chez les enfants que chez les adultes, toutefois la différence constatée n'est pas significative du point de vue statistique.

III-1-2-Interrelations entre les données hématoparasitologiques des patients étudiés

Lors d'une évaluation des interrelations entre les données hématoparasitologiques, avec l'ensemble des patients recrutés, nous avons observé une corrélation négative entre les taux d'Hb et les densités parasitaires (**Tableau II**).

Suivant l'âge cette corrélation a été plus significative chez les enfants ($P = 0,023$ et $Rho = - 0,49$).

Tableau II : Interrelations entre les données hématoparasitologiques des patients étudiés

	Hémoglobines	Parasitémie
Parasitémies	$P = 0,025$ $Rho = - 0,41$	
Plaquettes	$P = - 0,359$ $Rho = 0,077$	$P = - 0,218$ $Rho = 0,11$

III-2- Evolution des réponses anticorps IgG et IgM dirigées contre LSA₁₋₄₁

III-2-1-Prévalences des réponses anticorps

Tableau III : Prévalences des répondeurs en IgM et IgG anti-LSA₁₋₄₁

Classes d'âge Caractéristiques	Adultes		Enfants		Global	
	N*/N**	Prev (%)	N*/N**	Prev (%)	N*/N**	Prev (%)
IgM anti-LSA₁₋₄₁	40/59	68%	53/85	62%	93/144	65%
IgG anti-LSA₁₋₄₁	43/59	73%	64/85	75%	107/144	74%

* = nombre de patients répondeurs ; ** = nombre de patients testés. Prev=prévalence

Dans chaque groupe de patients, nous avons déterminé les pourcentages de répondeurs c'est-à-dire de patients montrant des ratios de DO ≥ 2 . Les résultats sont résumés dans le **Tableau III**.

Pour les réponses en IgM anti-LSA₁₋₄₁, globalement 65% des patients sont des répondeurs, ces prévalences des répondeurs en IgM sont de 68% chez les adultes et de 62% chez les enfants.

Concernant les réponses en IgG anti- LSA₁₋₄₁, 74% de l'ensemble des patients sont des répondeurs, il n'y a pas de différences des taux entre les deux classes d'âge.

Quelle que soit la classe d'âge, les prévalences de répondeurs en IgM ou sont plus faibles que celles des IgG anti-LSA₁₋₄₁.

III-2-2-Evolution des niveaux de réponses en IgM et IgG suivant l'âge des patients

III-2-2-1-Variations des amplitudes suivant l'âge

Les réponses contre la BSA, une protéine associée à LSA₁₋₄₁ apparaissent faibles et négatives dans notre étude. La comparaison des moyennes de réponses contre cette BSA, par le test de Mann Whitney, ne décèle aucune variation significative des amplitudes et prévalences de répondeurs suivant l'âge des patients.

Pour déceler ; l'existence de différences de niveaux de réponse Ac anti-LSA₁₋₄₁ entre les adultes et les enfants, nous avons représenté au niveau de la **Figure 3**, les amplitudes de réponses Ac dans les deux groupes de patients. Seules les réponses en IgM sont discriminantes entre les adultes et les enfants étudiés ($P = 0,029$).

Les taux d'IgM sont plus faibles chez les patients âgés de moins de 15 ans.

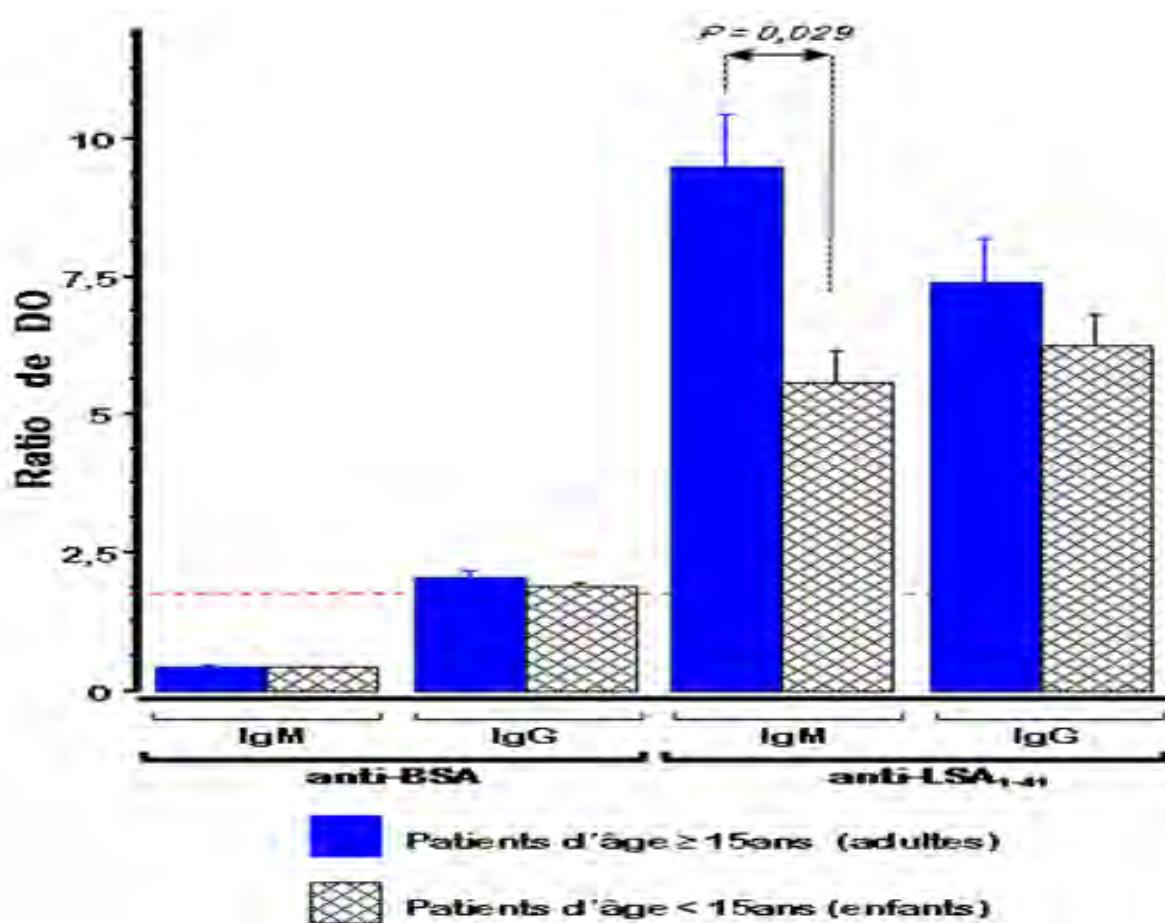


Figure 4:Comparaison des niveaux des réponses IgM et IgG dirigées contre LSA-₁₋₄₁ et BSA.

En outre, la comparaison des niveaux de réponses en IgM anti-LSA-₁₋₄₁ des enfants à ceux des adultes décèle une importante baisse des amplitudes chez les adultes ($P < 0,05$).

III-2-2-2-Corrélations entre les taux d'IgM et d'IgG dans les deux groupes d'âge

Nous avons recherché l'existence de liaisons entre les réponses en IgG et en IgM pour déceler un éventuel synchronisme entre les deux immunoglobulines étudiées. Cette analyse a montré des corrélations positives entre les réponses IgM et IgG chez les adultes ($P < 0,001$, $\text{Rho} = 0,82$) et chez les enfants ($P < 0,001$, $\text{Rho} = 0,78$) (**Figure 4**).

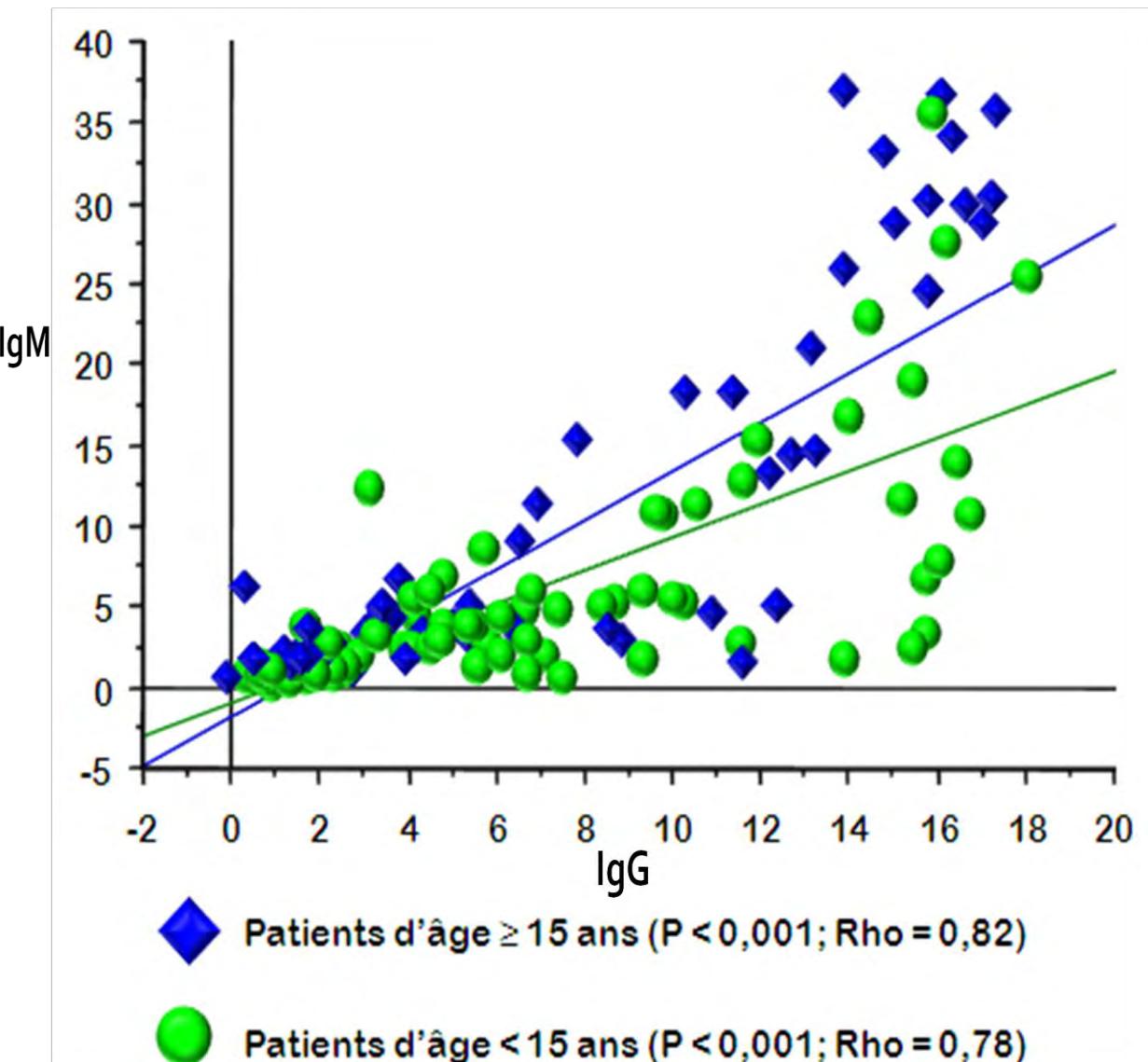
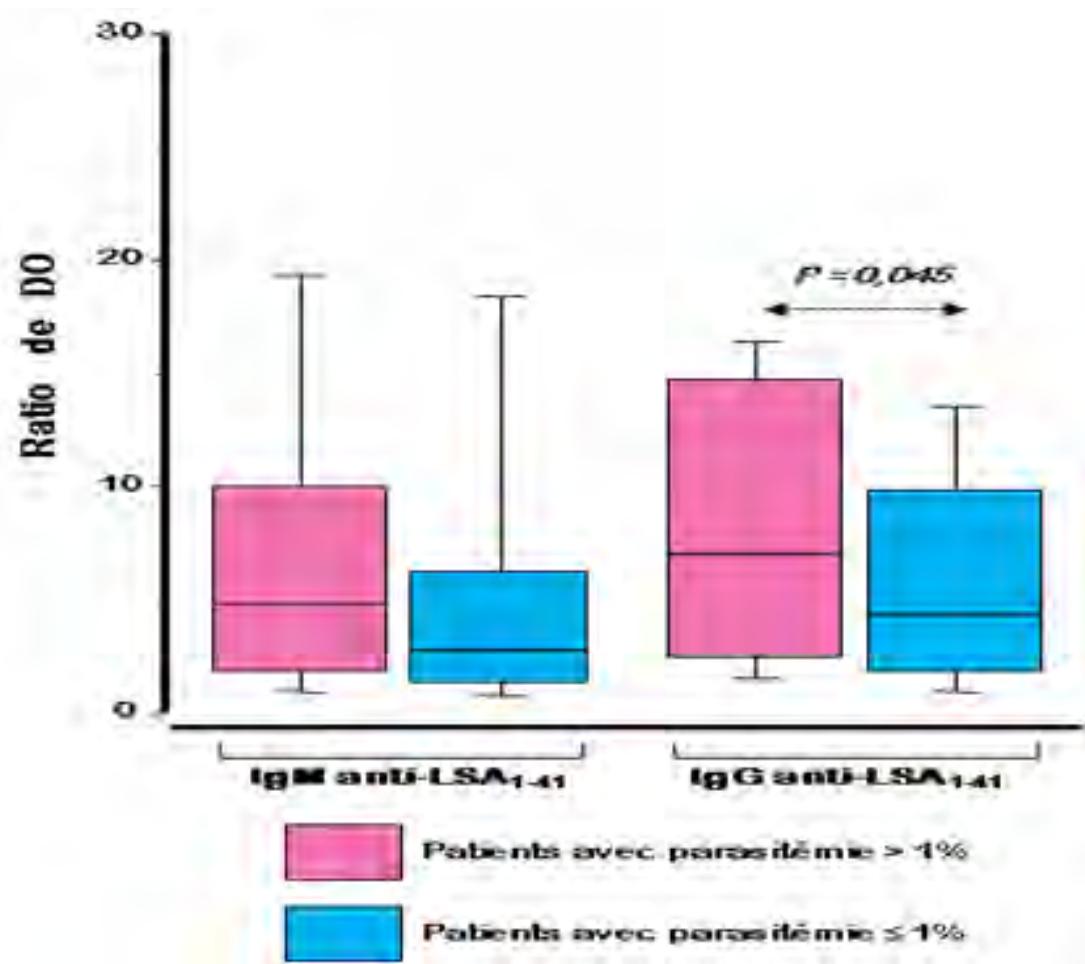


Figure 5 : Corrélations entre les réponses IgM et IgG dirigées contre LSA-₁₋₄₁ dans les 2 classes d'âge

III-2-2-3-Variations des amplitudes de réponses en IgM et IgG suivant les densités parasitaires

En utilisant le seuil de 1% de parasitémie, nous avons séparé notre population d'étude en deux groupes: (i) des patients ayant une parasitémie supérieure à 1% et (ii) des malades montrant une densité parasitaire $\leq 1\%$. Cette nouvelle dichotomisation a permis d'analyser les réponses Ac IgG et IgM anti-LSA₁₋₄₁ et la (Figure 4) montre les résultats obtenus. On y observe l'absence de variations des taux d'IgM entre les deux groupes de patients. Seules les réponses en IgG anti-LSA₁₋₄₁ sont significativement variables entre les patients fortement parasités et ceux ayant des parasitémies faibles ($P = 0,045$).



Figures 6: Variations des niveaux de réponses IgM et IgG anti-LSA₁₋₄₁ suivant les densités parasitaires

III-2-2-4- Corrélations entre les réponses en IgM et en IgG suivant le taux d'hémoglobine

A partir du taux de 11g/dl d'hémoglobinémie, nous avons obtenu deux groupes de patients. Dans ces deux nouveaux groupes, les niveaux de réponses en IgG et IgM anti-LSA₁₋₄₁ semblent plus élevés chez les patients ayant des taux d'hémoglobine inférieurs à 11g/dl, toutefois les variations observées ne sont pas statistiquement significatives.

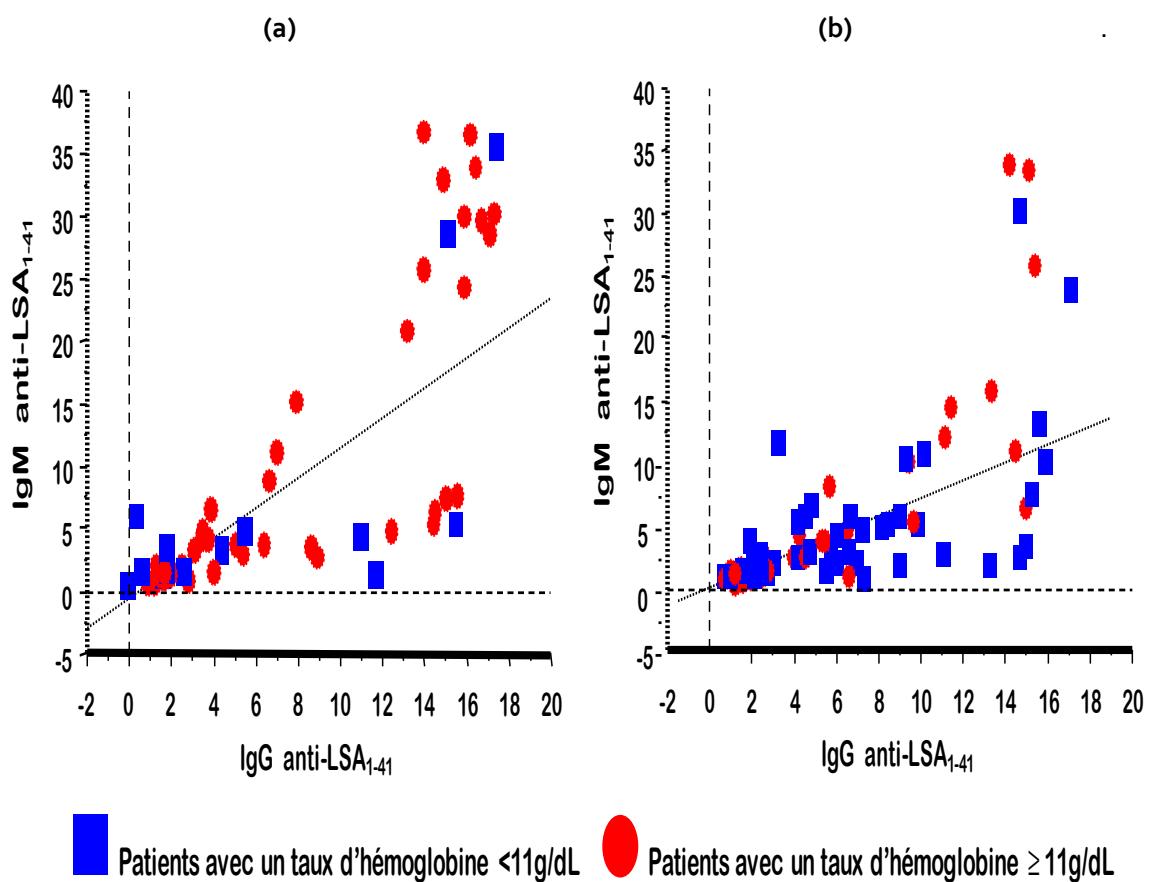


Figure 7 Corrélations entre les réponses IgM et IgG dirigées contre LSA₁₋₄₁ suivant le taux d'hémoglobine chez les adultes (a) et les enfants (b)

Nous avons alors proposé de rechercher les liaisons entre les IgG et les IgM anti-LSA₁₋₄₁ dans les deux classes d'âge en tenant compte des taux d'hémoglobine scindés à la valeur de 11g/dl (Figure 6).

Les analyses ont montré de fortes corrélations entre les taux IgM et d'IgG dans les deux groupes de patients (adultes et enfants) ($P < 0,001$, $\text{Rho} > 0,50$), lorsque les taux d'hémoglobine sont supérieurs à 11g/dl. Pour les patients montrant des taux d'hémoglobine inférieurs à 11 g/dl, une corrélation faible ou une absence totale de liaison est observée (**Figure 6**).

DISCUSSION

L'objectif de ce travail est d'étudier les caractéristiques immunologiques du paludisme simple de recrutement urbain dans la banlieue dakaroise. De façon plus spécifique, nous avons évalué les réponses Ac dirigées contre un antigène du stade hépatique de *P. falciparum*, antigène utilisé comme candidat vaccin : la protéine LSA₁₋₄₁. Ces réponses en IgM et IgG ont été analysées suivant l'âge et suivant les données hémato-parasitologiques des patients. Il s'agit d'individus consultant pour un paludisme simple, c'est dire sans signes de gravité tels que définis par l'OMS. La présence de formes parasitaires sur frottis sanguin ou GE et/ou la positivité d'un test de diagnostic rapide ont été utilisées pour confirmer l'infection par *P. falciparum*. Ont été exclus tous les patients présentant des infections pouvant interférer dans les dosages effectués. La grossesse et les déplacements hors du site au cours des trois derniers mois ont également conduit à l'exclusion de patients.

Nous discuterons deux aspects d'une part les constatations hémato-parasitologiques et d'autre part les caractéristiques des réponses immunes anti-LSA₁₋₄₁ de notre population d'étude.

Pour ce qui est des constatations hémato-parasitologiques, notre étude a montré que le paludisme urbain à Dakar, malgré un faible taux de transmission induit chez les sujets infectés, une charge parasitaire pouvant atteindre des niveaux élevés sans pour autant induire une hospitalisation. Aucune variation statistiquement significative n'est observée entre les adultes et les enfants dans cette étude, mais ce sont les enfants qui présentent une parasitémie plus élevée peut être en raison d'une consultation légèrement plus tardive par rapport au début réel de l'infection,

Le paludisme urbain est aussi générateur d'anémies importantes avec une moyenne en taux d'hémoglobine de 2,5 et 16,6 apparaissent plus faibles chez les enfants comparés aux adultes. Suite à une évaluation des interrelations nous n'avons pas visualisé de relation significative entre anémie et parasitémie. Les thrombopénies sont plus fréquentes chez les adultes toutefois la différence constatée n'est pas significative du point de vue statistique.

Concernant les réponses Ac anti-LSA₁₋₄₁, nous avons retrouvé des prévalences de répondeurs élevées en milieu urbain notamment pour les IgG (74%) et les IgM (65%) chez l'ensemble des individus. Ce résultat est comparable à celui antérieurement décrit par **Dodoo et al.** ayant trouvé des répondeurs jusqu'à 86% en zone urbaine contre 95% en milieu rural[36].

Suivant l'âge les réponses IgM anti-LSA₁₋₄₁ sont plus élevées en termes d'amplitudes chez les enfants, l'explication d'un tel constat reposera sur les délais de consultation qui classiquement sont plus importants chez les jeunes patients ne pouvant résister aux signes cliniques [37]

Suivant les taux de parasitémies, la seule variation des taux d'anticorps notée concerne les IgG avec des niveaux plus bas chez les patients faiblement parasités. Il est important de rappeler cependant que l'antigène testé est retrouvé au niveau du stade hépatique[34] et que cette relation avec les densités parasitaires au niveau sanguin n'est pas très pertinente. En outre, notre présent travail a montré que les niveaux de réponses en IgG et IgM anti-LSA₁₋₄₁ sont plus élevés chez les patients ayant des taux d'hémoglobine inférieurs à 11g/dl mais aussi de fortes corrélations entre les taux IgM et IgG dans les deux groupes de patients avec un taux d'hémoglobine supérieur à 11g/dl. Ces dernières données sont contraires à celles rapportées du kenya par **Moormann et al.** et relatives aux effets des cytokines IFN γ et IL-10 sous la réponse immunitaire anti-LSA₁₋₄₁ [38].

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Menée dans le contexte du paludisme urbain, la présente étude a permis d'évaluer les niveaux de réponses en IgG et IgM dirigées un antigène des stades hépatiques de *P. falciparum* LSA₁₋₄₁. Il s'agit d'un antigène utilisé comme candidat vaccin en phase pré cliniques. Nos résultats ont montré qu'il est fortement reconnu dans le paludisme simple chez les citadins et les analyses suivant l'âge, les taux d'hémoglobine et de la densité parasitaires soulignent des variations auxquelles il convient de tenir compte dans les phases d'essais cliniques et les stratégies vaccinales futures reposant sur cet antigène.

La nécessité d'études complémentaires sur des cohortes plus importantes est cependant à signaler avec notamment l'évaluation des différentes classes d'IgG, l'étude de la fonctionnalité des Ac et l'exploration du phénotype et des réponses cellulaires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Carme, B., [Plasmodium falciparum malaria in urban zones of high endemic regions in black Africa. Potential seriousness and possible preventive measures]. Bull Soc Pathol Exot, 1993. **86**(5 Pt 2): p. 394-8.
2. Malvy, D., *Le Bras M. Plasmodies-Malaria Formes clinique* . in *Encyclopedie médicale et chirurgicale*, E. Paris, Editor. 2000.
3. Breman, J.G. and C.V. Plowe, *A malaria vaccine for control: more progress*. J Infect Dis, 2009. **200**(3): p. 317-20.
4. Greenwood, B.M., et al., *Malaria*. Lancet, 2005. **365**(9469): p. 1487-98.
5. Poinsignon, A., et al., *Novel peptide marker corresponding to salivary protein gSG6 potentially identifies exposure to Anopheles bites*. PLoS One, 2008. **3**(6): p. e2472.
6. Escalante, A.A. and F.J. Ayala, *Phylogeny of the malarial genus Plasmodium, derived from rRNA gene sequences*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(24): p. 11373-7.
7. Singh, N., M.M. Shukla, and A.P. Dash, *Control of malaria in Central India (Madhya Pradesh): hope or hype?* Trans R Soc Trop Med Hyg, 2009. **103**(2): p. 209-10.
8. Miller, J.H. and D.A. Warrell, *Imported falciparum malaria*. BMJ, 1994. **309**(6963): p. 1233-4.
9. Debacker, V., et al., *Heavy metals contamination and body condition of wintering guillemots (Uria aalge) at the Belgian coast from 1993 to 1998*. Environ Res, 2000. **84**(3): p. 310-7.
10. Nosny, P., [Alphonse Laveran and the discovery of the malarial parasite]. Bull Acad Natl Med, 1980. **164**(1): p. 80-7.
11. Desowitz, R.S., *The fate of sporozoites*. Bull World Health Organ, 2000. **78**(12): p. 1445-6.
12. OMS, *world-malaria-report-2013*. mediacentre, 2013.
13. Breman, J.G., *Eradicating malaria*. Sci Prog, 2009. **92**(Pt 1): p. 1-38.
14. 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.
15. Wéry, M., ed. *Protozoologie médicale*. De Boeck Supérieur ed. 1995. 276.
16. Liu, W., et al., *Origin of the human malaria parasite Plasmodium falciparum in gorillas*. Nature, 2010. **467**(7314): p. 420-5.
17. Arevalo-Herrera, M. and S. Herrera, *Plasmodium vivax malaria vaccine development*. Mol Immunol, 2001. **38**(6): p. 443-55.
18. 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.
19. Poinsignon, A., et al., *Human IgG response to a salivary peptide, gSG6-P1, as a new immuno-epidemiological tool for evaluating low-level exposure to Anopheles bites*. Malar J, 2009. **8**: p. 198.
20. Mouchet, J., ed. *Biodiversité du paludisme dans le monde* ed. J.L. Eurotext. 2004. 428.
21. Cooke, B.M., N. Mohandas, and R.L. Coppel, *The malaria-infected red blood cell: structural and functional changes*. Adv Parasitol, 2001. **50**: p. 1-86.
22. 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.
23. Kumaratilake, L.M., A. Ferrante, and C. Rzepczyk, *The role of T lymphocytes in immunity to Plasmodium falciparum. Enhancement of neutrophil-mediated parasite killing by lymphotoxin and IFN-gamma: comparisons with tumor necrosis factor effects*. J Immunol, 1991. **146**(2): p. 762-7.
24. Cooper, E.L., E. Kauschke, and A. Cossarizza, *Annelid humoral immunity: cell lysis in earthworms*. Adv Exp Med Biol, 2001. **484**: p. 169-83.
25. Farouk, S.E., et al., *Gamma delta T cells inhibit in vitro growth of the asexual blood stages of Plasmodium falciparum by a granule exocytosis-dependent cytotoxic pathway that requires granulysin*. Eur J Immunol, 2004. **34**(8): p. 2248-56.

26. Krishnegowda, G., et al., *Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositol of Plasmodium falciparum: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity*. J Biol Chem, 2005. **280**(9): p. 8606-16.
27. Bouharoun-Tayoun, H., et al., *Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of Plasmodium falciparum asexual blood stages*. J Exp Med, 1995. **182**(2): p. 409-18.
28. Pombo, D.J., et al., *Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with Plasmodium falciparum*. Lancet, 2002. **360**(9333): p. 610-7.
29. Good, M.F., *Towards a blood-stage vaccine for malaria: are we following all the leads?* Nat Rev Immunol, 2001. **1**(2): p. 117-25.
30. Schofield, L., et al., *Gamma interferon, CD8+ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites*. Nature, 1987. **330**(6149): p. 664-6.
31. Sergent, E., *[Definition of immunity and premuniton]*. Arch Inst Pasteur Alger, 1950. **28**(4): p. 429-40.
32. Sabchareon, A., et al., *Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria*. Am J Trop Med Hyg, 1991. **45**(3): p. 297-308.
33. impact-malaria, www.impact-malaria.com/cp/en/index.jsp .consulté le 25/11/2013
34. Zhu, J. and M.R. Hollingdale, *Structure of Plasmodium falciparum liver stage antigen-1*. Mol Biochem Parasitol, 1991. **48**(2): p. 223-6.
35. Fidock, D.A., et al., *Plasmodium falciparum liver stage antigen-1 is well conserved and contains potent B and T cell determinants*. J Immunol, 1994. **153**(1): p. 190-204.
36. Dodoo, D., et al., *Antibody levels to multiple malaria vaccine candidate antigens in relation to clinical malaria episodes in children in the Kasena-Nankana district of Northern Ghana*. Malar J, 2011. **10**: p. 108.
37. Rogier, C., et al., *Epidemiological and clinical aspects of blackwater fever among African children suffering frequent malaria attacks*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2003. **97**(2): p. 193-7.
38. Snider, C.J., et al., *Recurrent Plasmodium falciparum malaria infections in Kenyan children diminish T-cell immunity to Epstein Barr virus lytic but not latent antigens*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e31753.