

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA

FACULTE DES SCIENCES ET DE L'INGENIERIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

Option: Immunologie Approfondie

**Thème : Evaluation de la réponse immunitaire humorale dirigée
contre des antigènes de *Plasmodium falciparum* chez des enfants
de moins de 5ans au Burkina Faso**

Présenté par : OUEDRAOGO Mireille

Membre de jury :

Président : Mr Hemic. A (M.A)

Université 8 Mai 1945-Guelma

Examineur : Mme Zerguine. K (M.A)

Université 8 Mai 1945-Guelma

Encadreur : Dr Bendjeddou. D (M.C)

Université 8 Mai 1945-Guelma

Juin 2010

Dédicaces

A mon père

A vous mon mentor, je dédie ce travail qui n'aurait jamais pu être réalisé sans les multiples sacrifices que vous faite depuis ma tendre enfance jusqu'à ce jour pour me garantir une éducation. Recevez ici mon affection et l'expression de ma gratitude. Que le bon Dieu nous garde plus longtemps ensemble afin que vous puissiez retrouver une ultime fierté dans le fruit de ce travail.

A ma mère

" Si une dent est seule, qu'elle soit blanche". Cette phrase que vous m'avez incessamment répétée durant toute mon enfance alors vous peinez à m'inculquer les règles de la vie, demeure toujours dans mon esprit. Ce travail est le votre, accepter le en guise de reconnaissance à toutes vos peines et vos prières. Puissiez-vous en être fière. Que Dieu vous bénisse !

A mes frères

Gaëtan, Gaël et Germain, cette fraternité et la complicité qu'elle traduit m'apporte toujours du réconfort. En espérant faire votre fierté, frangins, je vous souhaite beaucoup de courage et de succès respectivement dans vos études et vos vies.

A mes cousines, cousins et ami(e)s

Grandir avec vous a forgé ma personne et m'a apporté beaucoup d'enseignements. Que le Seigneur vous assiste dans toutes vos entreprises.

A mes grands parents, tantes et oncles

Vos bénédictions et vos encouragements m'ont beaucoup aidé durant tout ce temps. Soyez surs de ma gratitude et que Dieu vous bénissent.

A toi Carine

Béni soit tu et bénis soit le jour où tu m'a presque emmené de force pour tenter ma chance pour la bourse. Je ne serais peut-être jamais allé en Algérie, si tu n'avais pas été là. Beaucoup de courage pour le reste de tes études, je suis persuadée que tu feras un bon médecin. Merci d'être ma meilleure amie.

A toi Daddy Serge

Tu n'as pas cessé de m'encourager quand je croyais que je n'y arriverais pas." Tu as déjà bu la mer, sois forte, il ne te reste plus qu'un verre d'eau" m'a tu dit. Grâce à toi j'en avale les dernières gouttes. Reçois ici ma profonde gratitude pour ta disponibilité.

A toi Eric (In memoriam)

Grand frère, tu m'as appris à persévérer dans les études. Tu as été disponible en tant que notre répétiteur à tous et j'aurais voulu que tu voies le résultat de tes efforts .Mais hélas, la vie en a décidé autrement. Tu nous manques. Repose en paix !

Je dédie ce mémoire

Remerciements

Nous remercions d'abord le tout puissant pour toutes les grâces que nous recevons tous les jours de notre vie et pour avoir guidé nos pas sur le chemin de la science.

Nous remercions ensuite :

- Dr Bendjeddou Dalila, Maitre de conférences, professeur d'Immunologie et responsable du parcours "Immunologie" à l'Université 08mai 1945 de Guelma, encadreur de ce mémoire. Nous avons eu la chance de bénéficier de vos vastes connaissances et de vos qualités professionnelles depuis notre première année d'études jusqu'à la fin de notre cursus, qui nous serviront d'exemple. Nous vous remercions d'avoir accepté de nous encadrer malgré toutes vos responsabilités. Recevez ici l'expression de notre profonde gratitude.*
- Dr OUEDRAOGO N. Issa, chercheur au Centre National de Recherche et de Formation sur le paludisme (CNRFP), Responsable du laboratoire d'Immuno-Parasitologie. Vous nous avez accepté dans votre laboratoire et proposer de travailler sur cet intéressant thème. Recevez notre gratitude pour votre encadrement durant nos activités pratiques et votre disponibilité.*
- Dr OUEDRAOGO André-Lin, chercheur au Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme (CNRFP), Responsable du laboratoire d'Immunologie. Vous nous avez orienté, suivi et prodiguer de précieux conseils tout au long de notre formation. Nous vous remercions énormément pour votre disponibilité.*
- Dr Bocar KOUYATE, Administrateur Délégué au Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme, pour nous avoir acceptés dans votre institution.*
- Dr Sodiomon B SIRIMA, Chef de Service Recherche, Formation et Communication, au Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme, pour nous avoir acceptés dans votre service ainsi que pour votre disponibilité et vos instructions. Nous vous témoignons notre gratitude pour tout ce que vous avez fais pour nous.*
- Mr Hemici (M.A) qui a bien voulu présider notre jury et à Mme Zerguine (M.A) qui a accepté d'examiner notre travail, recevez notre immense reconnaissance.*

- Aux techniciens du laboratoire d'immunologie du CNRFP, Mr OUEDRAOGO Amathie, Mr TAPSOBA Michel pour notre suivi et formation et Mr TARAMA Casimir pour sa collaboration.
- Aux étudiants stagiaires du laboratoire d'immunologie, Mr SANOÛ Guillaume pour sa disponibilité et son appui, Mme CHERIF Mariama COMBASSERE pour ses conseils et sa collaboration et Mr TIENDREBEOGO Régis. Merci pour votre soutien.
- Dr SANON Souleymane et tous les autres chercheurs du CNRFP sans oublier le personnel pour m'avoir admise dans leur milieu.
- Tous nos professeurs du département de Biologie de l'Université 08 mai 1945 de Guelma pour toutes les connaissances acquises.
- Mes promotionnaires : Sabine, Abraham, Justin, Fety, Kany, pour tous les moments partagés. Que le Seigneur nous guide tous, dans le choix de nos vies futures.
- Mes petites sœurs burkinabè de Guelma: Estelle, Stéphanie et Fatim, dommage que vous soyez arrivés alors que je m'en vais. J'espère seulement avoir été à la hauteur de vos attentes. Merci pour votre disponibilité et votre soutien. Puisses le bon Dieu vous accompagner toujours dans vos études. Du courage !
- A vous aussi Jessica, Safi, Agnès, Kader, Thomas, Harouna, Moctar, Issaka, Issoufou. Merci pour tous les instants partagés. J'espère que ces liens créés se poursuivront au Faso.
- A toi Rima et à ta famille, ainsi qu'à Fouzia. Merci de m'avoir montré que c'est possible d'avoir des sœurs algériennes.
- Merci à vous toutes, mes sœurs de la cellule de prière de Guelma. Avec vous j'ai affermi ma foi. Mes prières vous accompagnent toutes. Courage et succès !
- A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail et dont les noms n'ont pu être cités.

Recevez ici l'expression de nos sentiments de reconnaissance.

LISTE DES ABREVIATIONS

AIA : Afro Immuno Assay

CD : cluster of differenciation (5; 4⁺; 8⁺; 16; 36; 69)

CMA : Centre Médical avec Antenne chirurgicale

CMH : Complexe Majeur D'histocompatibilité (I ; II)

CNRFP : Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme

CSP : Circum Sporozoite Protein

CSPS : Centre de Santé et de Promotion Social

DC : cellules dendritiques

EBA : Erythrocyte Binding Antigen

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique

ELISA : Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay

EMP : Erythrocyte Membrane Protein

EXP : Exported Protein

FC : Fragment Cristallisable

GPI : glycosylphosphatidylinositols

GM-CSF : granulocyte/macrophage-colony stimulating factor

IFN : Interféron (γ)

IL : Interleukine (2 ; 4 ; 5 ; 6 ; 8 ; 10 ; 12 ; 13)

Ig : Immunoglobuline (M ; G : G1, G2, G3, G4)

LPS : lipopolysaccharide

LSA : Liver Stage Antigen

M.G.G : May Grunwald Giemsa

MSP : Merozoite Surface Protein

NK : Natural Killer

NO: Monoxyde d'azote

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell

PDC: Cellules Dendritiques Plasmacytoïdes

Pf: *Plasmodium falciparum*

Pf-E: Erythrocyte infecté par *Plasmodium falciparum*

POS: Procédures Opératoires Standardisées

RAP: Rhoptry-Associated Protein

RDT: Test Diagnostic Rapide

RESA: Ring-Infected Erythrocyte Surface Antigen

SALSA: Sporozoïtes And Liver Stage Antigen

SERA: Serine Repeat Antigen

SSP: Sporozoïtes Surface Protein

STARP: Sporozoïte Threonine and Asparagine Rich Protein

TCR: T - Cell Receptor

TLR: Toll Like Receptor (2; 4; 9)

TMB: Tetra Methyl Benzidine

TNF: Tumor Necrosis Factor (α)

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

FIGURE 1: Technique du frottis sanguin..... 8

FIGURE 2: Technique de la goutte épaisse.....8

FIGURE 3: Cycle de vie de *Plasmodium falciparum*..... 15

FIGURE 4: Différents antigènes énumérés selon le stade de développement de *P.falciparum* 16

FIGURE 5: Site de l'étude..... 24

FIGURE 6 : Pourcentage d'enfants positifs à l'antigène LSA.....31

FIGURE 7 : Pourcentage d'enfants positifs à l'antigène CSP.....32

FIGURE 8 : Pourcentage d'enfants positifs à l'antigène MR48A..... 33

FIGURE 9 : Pourcentage d'enfants positifs à l'antigène LR179A..... 34

FIGURE 10 : Pourcentage d'enfants positifs à l'antigène AS155.4.....34

FIGURE 11 : Pourcentage d'enfants positifs à l'antigène 1574..... 35

FIGURE 12 : Pourcentage d'enfants positifs à l'antigène LR181..... 36

FIGURE 13 : Pourcentage d'enfants positifs à l'antigène MR198..... 36

TABLEAU I: Description des antigènes étudiés..... 26

TABLEAU II : Seuil de positivité en fonction de la densité optique..... 31

Liste des abréviations.....I

Liste des figures et tableaux.....III

SOMMAIRE

INTRODUCTION1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....2

1- Présentation du CNRFP2

2- Historique du paludisme.....4

3- Généralités sur le paludisme.....6

3.1 -Définition.....6

3.2- Epidémiologie.....6

3.3- Diagnostic.....7

3.4- Clinique.....10

3.5- Prophylaxie et traitement.....11

4-*Plasmodium falciparum*.....12

4.1-Cycle de vie du parasite.....13

4.2 -Antigènes du *Plasmodium falciparum*.....15

4.2.1- Antigènes du stade pré-érythrocytaire.....16

4.2.2- Antigènes du stade érythrocytaire.....17

5-Immunité du paludisme.....18

5.1- Immunité innée.....18

5.2- Immunité acquise.....21

5.2.1- Immunité à médiation cellulaire.....21

5.2.2- Immunité humorale.....22

MATERIELS ET METHODES.....	23
1 -Site de l'étude.....	23
2-Population de l'étude.....	23
2.1-Critères d'inclusion.....	24
2.2-Critères d'exclusion.....	25
3-La collecte de données.....	25
4-Matériels utilisés.....	25
5-Détermination du taux d'I _g G par la technique ELISA.....	27
5.1-Principe du test ELISA.....	27
5.2-Contrôle de qualité du test ELISA.....	28
5.3-Validation d'un test ELISA.....	28
6- Analyse de données.....	29
7 -Considération éthique.....	29
RESULTATS ET DISCUSSION.....	30
❖ Pourcentage d'enfants positifs aux antigènes pré-érythrocytaires par tranche d'âge et par saison.....	30
❖ Pourcentage d'enfants positifs aux antigènes érythrocytaires par tranche d'âge et par saison.....	33
❖ Prévalence des anticorps IgG produits contre les antigènes étudiés.....	37
❖ Immunogénicité des antigènes étudiés et protection contre le paludisme.....	37
CONCLUSION.....	39
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	40
Résumé en français.....	i
Résumé en anglais.....	ii
Résumé en arabe.....	iii

INTRODUCTION

Un décès d'enfant sur cinq en Afrique est imputable au paludisme [1].

Le paludisme est une maladie infectieuse due à un parasite unicellulaire du genre *Plasmodium*, transmis par la piqûre d'un moustique (*Anophèle*) et caractérisé par des accès de fièvre récurrente. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, le paludisme tue un enfant toutes les 30 secondes en Afrique et entre 1 à 3 millions de personnes par an dans le monde (OMS, 2008).

Au Burkina Faso, environ 600.000 cas de paludisme sont recensés par an dont 30% surviennent chez les enfants de moins de 5 ans (Drabo *et al.*, 2004). Il existe des structures sous la tutelle du Ministère de la Santé qui participent à la recherche et à la mise en place des stratégies de lutte contre la maladie comme : l'évaluation de la morbidité et de la mortalité dues au paludisme, la recherche et le développement des vaccins et médicaments antipaludiques, l'évaluation du niveau de transmission et la lutte antivectorielle. Parmi ces structures, nous avons le Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme (CNRFP), institution qui nous a accueillis dans le cadre de notre stage pratique dans sa section d'immunologie.

L'étude de la protection vaccinale face au paludisme passe par le développement d'antigènes synthétiques stables et immunogènes. C'est dans ce contexte de recherche de molécules vaccinales anti palustres que la présente étude a été initiée afin de contribuer à l'identification de candidats vaccins contre la maladie.

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer la réponse humorale dirigée contre les antigènes LSA, CSP et MR48A (antigènes de stade pré-érythrocytaires) et MR198, LR181, LR 179A, AS155.4 et 1574 (antigènes de stade érythrocytaires) de *Plasmodium falciparum* chez les enfants de moins de cinq (5) ans vivants dans une zone à transmission saisonnière et stable du Burkina Faso.

Pour atteindre cet objectif, nous étudierons la prévalence des anticorps IgG produits contre le *Plasmodium* à travers les antigènes cités ci-dessus et la corrélation entre la production des IgG et la protection contre le paludisme.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Produced with ScanTOPDF

1-Présentation du Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme (CNRFP)

Le projet de lutte contre le paludisme dans la ville de Ouagadougou a démarré en 1983 avec la collaboration technique et financière de la coopération Italienne. En 1986, le projet évolue vers la création du Centre de Lutte contre le Paludisme (CLP). En 1993, le centre est transformé en Centre National de Lutte contre le Paludisme (CNLP) et rattaché à la Direction Générale de la Santé Publique (DGSP) du Ministère de la Santé. Il avait pour mission de :

- Participer à l'élaboration de stratégies en matière de lutte antipaludique.
- Assurer le diagnostic parasitologique et servir de centre de référence pour le diagnostic parasitologique difficile.
- Surveiller la chimiosensibilité sur toute l'étendue du territoire et améliorer les connaissances sur la pharmacorésistance.
- Participer à l'encadrement des étudiants de l'Université de Ouagadougou et des élèves de l'Ecole Nationale de la Santé Publique.
- Mener la recherche opérationnelle pour appuyer et améliorer la mise en œuvre du programme national de lutte antipaludique.

En 1995 le programme national de lutte contre le paludisme du CNLP est rattaché à la Direction de la médecine préventive. Le CNLP prend alors l'appellation de CNRFP en avril 1998. Ses missions redéfinies étaient :

- La mise en œuvre, la supervision et l'évaluation de nouvelles méthodes de contrôle du paludisme.
- La recherche opérationnelle et fondamentale pour l'identification de nouvelles méthodes de lutte contre le paludisme et l'adaptation des méthodes déjà existantes aux conditions locales.
- La formation sur le paludisme au niveau local et sous régional.

Le laboratoire du CNRFP comprend les sections de recherche en santé publique, d'immuno-parasitologie, de Biologie moléculaire et Entomologie. Il comporte également une section administrative et financière, un service de statistiques épidémiologiques et est doté d'un centre de documentation.

2-Historique du paludisme

La grande particularité de l'histoire du paludisme est la découverte du traitement avant celle de l'agent pathogène mis en cause.

Les étapes historiques :

-Une étape de connaissance clinique de la maladie : Avant **1630**, on distinguait parmi les fièvres, celles des marécages. On rapporte l'existence de fièvres mortelles que l'on pense causées par le paludisme, depuis que l'écriture existe. Les textes védiques datant de 1600 avant J.C, en Inde, et ceux d'Hippocrate, du V^{ème} siècle avant J.C en font mention.

-Une étape thérapeutique : Les indiens de l'Amérique du sud utilisent l'écorce de quinquina pour guérir certaines fièvres. En **1820**, Pelletier et Caventou isolent l'alcaloïde actif du quinquina : la quinine. En **1830**, Maillot utilisera la quinine en Algérie.

-Une étape étiologique : Le **6 Novembre 1880**, Charles-Louis-Alphonse-Laveran, un médecin de l'armée française, a découvert le parasite responsable du paludisme en examinant des échantillons de sang au microscope à Constantine en Algérie. En **1882**, on a émis l'hypothèse de la transmission de la maladie par un moustique. Le **18 décembre 1897**, le *British Medical Journal* signalait que le docteur Ronald Ross avait découvert des kystes paludéens dans les parois de l'estomac d'anophèles ayant piqué un malade atteint de paludisme. En **juillet 1898**, Giovanni Batista Grassi, un scientifique italien, a décrit les transformations du parasite dans le moustique et prouvé que le paludisme observé chez l'homme était transmis par des moustiques du genre *Anophèles*.

1885-1889 : description des différentes étapes du cycle par Golgi.

1890 : description de trois espèces plasmodiales : *malariae*, *vivax* et *falciparum*.

1922 : Stephens isola une quatrième espèce : *Plasmodium ovale*

1937 : description des formes exo-érythrocytaires par RAFFAELE dans la moelle osseuse.

1948 et 1949 : description des formes pré-érythrocytaires dans les cellules hépatiques.

Cent ans après la découverte de Laveran, le cycle du paludisme sera complètement décrit par la découverte de l'hypnozoïte.

-Étape du progrès thérapeutique et résistance : A la deuxième guerre mondiale, découverte :

De la chloroquine, ainsi que d'autres molécules actives sur les plasmodiums. Et D.D.T et autres insecticides modernes.

3- Généralités sur le paludisme

3.1- Définition

Endémie parasitaire majeure, le paludisme est une érythrocytopathie due à un hématozoaire du genre *Plasmodium* transmis par un moustique hématophage, l'anophèle femelle. On pensait à l'origine que cette maladie potentiellement mortelle provenait des zones marécageuses, d'où le nom de paludisme dérivé du mot ancien "palud", marais ou encore malaria (de l'italien mal' aria, "mauvais air").

Au-delà de la façon habituelle, il existe des cas de transmission congénitale du paludisme, par voie transplacentaire ou au cours de la délivrance et rarement des transmissions par transfusion sanguine.

3.2- Epidémiologie

Le paludisme est la parasitose qui cause le plus de mortalité humaine. Les principales espèces plasmodiales qui parasitent l'homme sont au nombre de quatre :

-*Plasmodium vivax* : agent de la malaria tertiaire bénigne, est présent entre les isothermes d'été de 15°C. Actuellement le plus fréquemment rencontré en Algérie.

-*Plasmodium falciparum* : agent de la fièvre tierce maligne, c'est l'espèce la plus redoutable.

-*Plasmodium malariae* : agent de la fièvre quarte, présente des foyers très dispersés, sa distribution géographique mondiale est clairsemée.

-*Plasmodium ovale* : agent de la fièvre tierce douce, est restreint à des foyers isolés en Afrique intertropicale et au nord de Madagascar.

Autrefois, l'extension du paludisme recouvrait sensiblement l'ensemble du globe, à l'exception peut-être des continents arctique et antarctique, du sud de l'Amérique du sud et de quelques îles (Açores, Polynésie, Micronésie, Wallis et Futuna, Hawaï). Mais son éradication, due à l'action de l'homme, a été réussie en Europe, en Amérique du Nord, aux Antilles (sauf Haïti et la République dominicaine), dans une partie de l'Asie (Chine du Nord, Mongolie, Corée, Japon), dans le nord de l'Australie et dans les îles Maldives, Seychelles, Maurice et Réunion. Actuellement, le paludisme est surtout localisé dans les régions intertropicales ; environ 2 milliards d'hommes sont exposés à ses formes virulentes et 2 millions d'enfants meurent chaque année dont 1 million en Afrique (Pierre *et al.*, 1998).

Plusieurs facteurs favorisent la transmission du parasite et de la maladie : l'existence d'une population d'anophèles vecteurs, les particularités de la biologie de ces vecteurs (préférences alimentaires, fréquence des repas, longévité, nature des gîtes de repos et des gîtes larvaires), la présence d'une population d'hommes porteurs du parasite, l'existence d'hommes réceptifs (surtout les enfants et les immigrants en zone endémique), des conditions écologiques convenables (humidité suffisante, présence de gîtes appropriés, température égale ou supérieure à 15°C, altitude inférieure à 2000 m), la résistance des parasites aux drogues.

Dans les zones endémiques de l'Asie du Sud-est, la transmission est forte en milieu rural, mais inexistante en milieu urbain. En Afrique sahélienne et en Afrique du Sud, la transmission est maximale en saison des pluies et absente en saison sèche, alors que dans le reste de l'Afrique Noire, où la température est constamment égale ou supérieure à 20°C, la transmission dure toute l'année, avec toutefois un maximum pendant la saison des pluies.

3.3- Diagnostic

A / Diagnostic direct : Mise en évidence du parasite. Deux techniques peuvent être utilisées :

-Technique du frottis (figure1)

Le prélèvement de sang se fait au moment d'un pic fébrile correspondant à la présence massive de plasmodium dans le sang. Une goutte de sang prélevée au bout du doigt du malade est étalée sur une lame de verre. Le but est de visualiser les plasmodiums, de les compter et de déterminer l'espèce responsable de l'accès palustre. Les parasites sont présents dans les globules rouges, ceux-ci sont plus ou moins déformés selon l'espèce responsable de l'accès palustre.

La lame est colorée avec le colorant de Giemsa et est ensuite examinée au microscope. La lecture de la lame par une personne compétente permet de définir les caractères généraux du parasite, sa forme ainsi que son stade de développement.

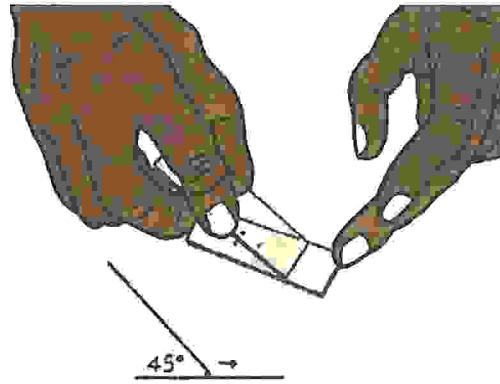
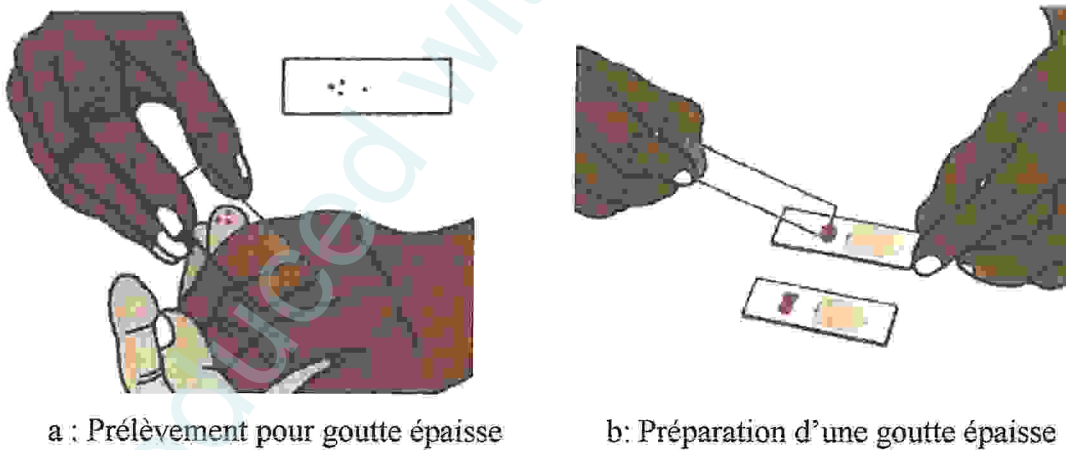


Figure 1 : Technique du frottis sanguine [2]

-Technique de la goutte épaisse (figure 2)

La goutte épaisse détruit les globules rouges et libère les parasites; elle permet donc d'« enrichir » la lame en parasites. La seule visualisation des parasites au microscope confirme le diagnostic de paludisme.



a : Prélèvement pour goutte épaisse

b: Préparation d'une goutte épaisse

Figure 2 : Technique de la goutte épaisse [2]

B / Diagnostic indirect du paludisme

Ce diagnostic se fait par la recherche d'anticorps anti-palustres par des techniques sérologiques. Il faut d'emblée préciser que la sérologie ne remplace en rien l'examen direct des parasites au microscope. Néanmoins, la sérologie est utile et apporte des arguments essentiels en particulier :

-En épidémiologie car elle permet de mesurer :

- La prévalence du paludisme dans une région
- L'intensité de la transmission
- L'efficacité des mesures prophylactiques.

-Dans le dépistage des donneurs de sang dangereux.

Les réactions sérologiques utilisées dans le diagnostic indirect du paludisme peuvent être des techniques quantitatives ou qualitatives.

Les principales techniques quantitatives sont :

a) L'immunofluorescence indirecte : utilise des antigènes hétérologues (plasmodiums d'animaux) : *P.berghei* (souris), *P.cynomolgi* (singe). Ou mieux des antigènes homologues (plasmodiums humains : surtout *P.falciparum*).

b) L'hémagglutination passive

c) Les techniques immuno-enzymatiques comme ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).

Alors que les techniques qualitatives sont essentiellement des techniques de précipitation

a) Immuno- diffusion en gel d'agarose

b) L'immuno- électrodifusion (électrosynérèse) qui présente l'avantage d'une lecture rapide (3heures environ).

c) Electro synérèse couplée à une technique immuno-enzymatique.

3.4- Clinique

Primo invasion : cliniquement, elle est généralement commune aux quatre espèces plasmodiales.

A) La forme typique se retrouve chez le sujet neuf (jamais parasité auparavant non soumis à la chimioprophylaxie et relativement peu infesté).

- Phase d'incubation : correspond à la période qui va de la pénétration des sporozoïtes à l'éclatement du corps bleu. Elle est cliniquement muette.

- Phase d'invasion : caractérisée par une fièvre continue et un cortège de symptômes digestifs (nausées, vomissements) le tout donnant un tableau « d'embarras gastrique fébrile chez un céphalalgique ».

Le diagnostic à ce stade est souvent difficile : on pourra par exemple penser beaucoup plus à une méningite ou à une salmonellose. Mais, au moindre doute, surtout si l'interrogatoire révèle un séjour récent en zone d'endémie, il faudra pratiquer un frottis à la recherche de l'hématozoaire.

B) Formes cliniques de la primo invasion : elles sont nombreuses et trompeuses.

- Formes associées à une salmonellose, amibiase, hépatique, hépatite virale...
- Forme rémittente bilieuse : forme grave de la primo invasion.
- Primo invasion apyrétique
- Paludisme transfusionnel

C) Les accès intermittents : Ils succèdent à une plus ou moins lointaine échéance à la primo invasion. On assiste à la succession de trois stades précédés de prodromes la veille ou l'avant-veille de l'accès, (herpès labial, céphalée, malaise général).

- Stade de frisson : dure environ 1 heure.
- Stade de chaleur : dure environ 3 à 4 heures.
- Stade de sueur : dure environ 2 à 4 heures.

Une fois l'accès passé, le malade ressent une sensation de bien être. Les accès se répètent avec un rythme variable selon l'espèce plasmodiale en cause.

- Type tierce : la fièvre apparaît un jour sur deux. Ce type est observé avec *P.vivax*, *falciparum* et *ovale*.

- Type quarte : la fièvre apparaît un jour sur trois. Ce type est observé avec *P.malariae*. La succession des accès se déroule environ trois semaines puis disparaît jusqu'à l'apparition des rechutes.

3.5- Traitement et prophylaxie

Le traitement est fonction de l'espèce en cause. Il existe plusieurs produits actifs contre les plasmodiums. En fait, quelques uns seulement de ces produits sont utilisés en pratique courante :

- La Quinine
- La Nivaquine
- La Flavoquine

Depuis quelques années, on signale des souches de *Plasmodium falciparum* résistantes aux antipaludiques usuels (Nivaquine, Flavoquine) et à d'autres antipaludiques. Néanmoins aucune résistance n'a été signalée vis-à-vis de la quinine. Ce qui donne un regain à ce produit.

La prophylaxie est à double visée :

-Individuelle :

- a) Au décours d'un accès palustre
- b) Lorsqu'un sujet doit se rendre en zone d'endémie (surtout s'il y'a risque d'infestation par *Plasmodium falciparum*).

-Collective :

Lutte contre le vecteur, dépistage et traitement des malades constituent les bases de la prophylaxie collective.

Dans tous les cas, l'usage de moustiquaire imprégnée à l'insecticide est fortement recommandé.

4. Le Plasmodium falciparum

Le plasmodium est un genre de protozoaire parasite ; la taxonomie de l'espèce *falciparum* se présente comme suit :

<u>Domaine</u>	<i>Eukaryota</i>
<u>Règne</u>	<i>Chromalveolata</i>
<u>Division</u>	<i>Alveolata</i>
<u>Embranchement</u>	<i>Apicomplexa</i>
<u>Classe</u>	<i>Aconoidasida</i>
<u>Ordre</u>	<i>Haemosporida</i>
<u>Famille</u>	<i>Plasmodiidae</i>

C'est le plus dangereux des plasmodiums "celui qui tue". Aussi, il est capital de savoir le reconnaître et d'aviser lorsqu'il est présent, en urgence le clinicien qui a fait la demande d'examen pour l'institution d'un traitement rapide. Ne jamais perdre de vue, car, l'accès dit "simple" est surtout un abus de langage en ce qui concerne *Plasmodium falciparum* car à n'importe quel moment cet accès peut mal tourner et se transformer en accès pernicieux gravissime.

A/ Les hématies parasitées : Les globules rouges sont de taille, de forme et de couleur normale. Ils renferment de façon inconstante des granulations (ou de taches de MAURER) : ce sont des masses de taille et de forme variables, de couleur rouge brun surtout visibles après une coloration basique.

B/ Trophozoïte : Caractérisé par son cytoplasme formant un anneau de petite taille (occupe au maximum le 1/3 de l'hématie) surmonté d'un noyau tantôt simple tantôt dédoublé en haltères et donnant un aspect en "bracelet".

C/ Les hématies sont quelquefois poly-parasitées.

C.1. Schizontes et rosaces : N'existent pas dans le sang périphérique mais dans des organes profonds. Cependant dans quelques cas d'accès pernicieux, on peut les observer dans les frottis. Ce sont généralement des schizontes jeunes ou âgés des corps en rosace contenant 18 à 20 merozoïtes centrés par une grosse masse unique de pigments.

C.2. Gamétocytes : Dans la forme typique il a l'aspect d'une "banane", d'un "croissant" ou d'un "faux".

Il est d'abord intracellulaire, puis extracellulaire lorsque le globule rouge est lysé.

Gamétocyte femelle : au M.G.G

- Cytoplasme bleu

- Noyau condensé au centre, recouvert de pigments.

Gamétocytes males :

- Cytoplasme lilas

- Noyau : il n'y a pas de noyau unique mais des masses chromatiniennes dispersées le long du grand axe du parasite.

- Pigments dispersés à travers le cytoplasme.

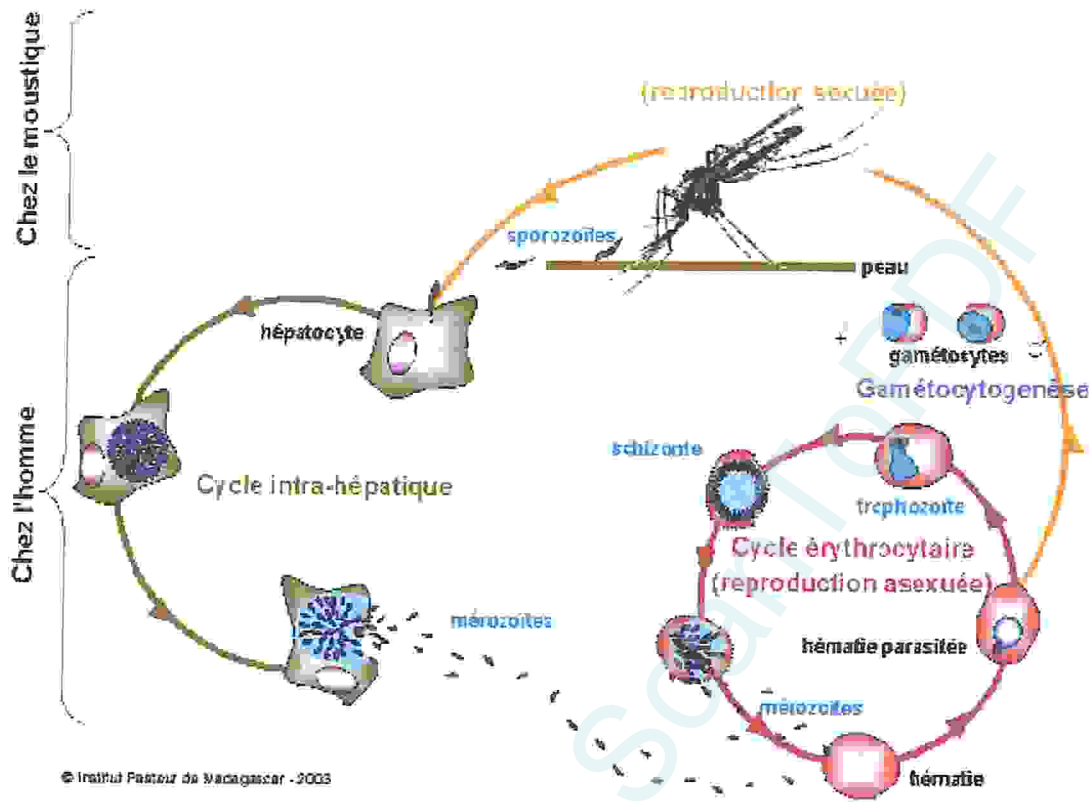
4.1- Cycle de vie du parasite

Le cycle dixène ne comporte pas de passage dans le milieu extérieur ; il passe par un hôte vertébré, et un vecteur, le moustique anophèle.

A/Cycle asexué : cycle schizogonique (figure 3)

La phase pré ou exoérythrocytaire : Plusieurs centaines de sporozoïtes sont inoculés à l'homme avec la salive du moustique femelle lors de la pique ; du sang, ils passent en moins d'une heure dans les cellules du foie, perdent leur complexe apical, deviennent des trophozoïtes qui se nourrissent, grossissent, passent à l'état de schizontes qui subissent une mérogonie dite exoérythrocytaire, donnant environ 40 000 merozoïtes chez *P.falciparum*. Les cellules hépatiques parasitées éclatent, libèrent les merozoïtes dans le sang ; alors que chez *P.falciparum*, il n'y a qu'une seule mérogonie exoérythrocytaire, dans les autres espèces ces merozoïtes libérés peuvent entrer dans d'autres hépatocytes pour y effectuer éventuellement d'autres mérogonies ou y rester à l'état quiescent (hypnozoïtes) pendant plusieurs mois et être à l'origine de rechutes.

La phase érythrocytaire : Les merozoïtes libérés dans le sang par éclatement des hépatocytes pénètrent dans les hématies ; le merozoïte, enfermé dans une vacuole parasitophore, perd son complexe apical, s'arrondit, devient un trophozoïte qui se nourrit aux dépens de l'hémoglobine et du cytoplasme de l'hématie et prend un aspect en anneau, du au développement d'une invagination importante constituant la vacuole nutritive ; puis



© Institut Pasteur de Madagascar - 2003

Figure 3: cycle de vie de *Plasmodium falciparum* [3]

4.2- Antigènes du *Plasmodium falciparum*

Suivant le stade de développement de *P.falciparum*, on énumère une diversité antigénique selon l'étape dans laquelle on s'attendrait à ce qu'ils provoquent une immunoréaction protectrice (figure 4).

5. Immunité du paludisme

L'infection par *Plasmodium*, responsable du paludisme, engendre des réponses immunitaires de l'hôte. Ces réponses immunes sont régulées aussi bien par le système immunitaire non spécifique dit inné, par le système immunitaire spécifique ou acquis, que par des facteurs environnementaux.

Les deux types d'immunité sont complémentaires. L'immunité innée se mobilise dès le début de toute infection en attendant la mise en place de l'immunité acquise qui est opérationnelle dans les dix jours suivant l'infection.

5.1- Immunité innée

L'immunité innée est considérée comme la première ligne de défense de l'organisme ; elle s'active très rapidement sans immunisation ni vaccination préalable. Les mécanismes cellulaires et humoraux de cette défense dite non spécifique, parce que ne dépendant pas de la nature du parasite, ne sont pas très bien connus. De récentes études dans des systèmes non parasitaires ont permis de démontrer qu'une famille de protéines codée par la lignée germinale (les Toll Like Receptors ou TLR) serait importante pour la défense innée de l'hôte (Martinon *et al.*, 2005).

L'infection palustre engendre la production par les lymphocytes B de concentrations plasmatiques très élevées d'immunoglobulines (anticorps) non spécifiques du paludisme (Cohen *et al.*, 1961). Cependant l'importance de l'activation polyclonale B par l'immunité innée sous jacente n'est pas connue à ce jour. Néanmoins, on pense que les cellules BCD5 sont responsables de ce processus. Ce type de cellules qui intervient dans la réponse innée peut sécréter les anticorps IgM dès le premier contact avec l'agent pathogène, sans la nécessité d'une rencontre au préalable.

Les cellules TCD4⁺ de sujets n'ayant eu aucune exposition préalable au paludisme, produisent des cytokines lorsqu'elles sont exposées aux antigènes de *P.falciparum*.

Un autre type cellulaire, la cellule T présentant les antigènes $\gamma\delta$ du TCR est aussi très répandue au cours des phases précoces de l'infection palustre et pourrait contribuer au contrôle inné de la croissance du parasite (Salerno *et al.*, 1998). En appui à cela, les cellules T $\gamma\delta$ mais non les cellules T $\alpha\beta$ de donneurs naïfs pour le paludisme (sujet n'ayant jamais contracté la maladie) inhibent la répllication des parasites *in vitro* (Elloso *et al.*, 1994 ; Troye-Blomberg *et al.*, 1999).

Les antigènes des schizontes stimulent puissamment les cellules T $\gamma\delta$ (Elloso *et al.*, 1996 ; Waterfall *et al.*, 1998). Ces cellules reconnaissent certains antigènes conventionnellement en association avec les molécules du CMH de classe I ou de classe II (Behr *et al.*, 1992 ; Elloso *et al.*, 1996). Toutefois, les cellules T $\gamma\delta$ reconnaissent aussi les antigènes non peptidiques sans nécessité de présentation de ceux-ci par le CMH (Pichyangkul *et al.*, 1997). Les cellules T $\gamma\delta$ activées produisent principalement, mais pas exclusivement, des cytokines pro- inflammatoires, ce qui suggère que la protection par ces cellules contre les parasites mettraient en jeu, à la fois, les fonctions régulatrices et les fonctions cytotoxiques.

Les cellules T $\gamma\delta$ sont, elles aussi, capables de reconnaître des molécules produites par *P.falciparum*. Elles sont notamment activées par des phospho-antigènes de *Pf* (Behr *et al.*, 1996 ; Fournie *et al.*, 1996). Ces cellules, capables de produire de l'IFN γ , sont également cytotoxiques face à des érythrocytes infectés (*Pf*-E), (Stevenson *et al.*, 2004 ; Farouk *et al.*, 2004). Néanmoins, leur activation semble nécessiter, en plus de la reconnaissance directe par le TCR des érythrocytes infectés, des cytokines exogènes, suggérant que les réponses T $\gamma\delta$ pourraient être elles aussi dépendantes de l'activation d'autres types cellulaires, tels que les monocytes et les cellules dendritiques (Stevenson *et al.*, 2004).

Les neutrophiles, les mononucléaires phagocytes et les cellules " tueuses naturelles"(Natural Killer, NK) sembleraient jouer un rôle prépondérant dans l'immunité innée observée au cours des infections palustres précoces.

Les monocytes/macrophages humains sont également activés (production de protéines pro-inflammatoires comme le TNF γ) par des glycosylphosphatidylinositols (GPI) provenant de *Pf*. Les récepteurs impliqués dans cette reconnaissance sont TLR2 et, dans une moindre mesure, TLR4 (Krishnegowda *et al.*, 2005 ; Zhu *et al.*, 2005). Par ailleurs, le récepteur CD36 semble important dans la phagocytose de *Pf*-E par les macrophages.

L'effet du contact avec des *Pf*-E est différent selon les sous populations de cellules dendritiques (DC) considérées. Les DC plasmacytoïdes (PDC) sont activées via leur récepteur TLR9, et produisent de l'IFN α en réponse à des lysats de *Pf*-E (Pichyangkul *et al.*, 2004). Cette activation serait importante pour aider à la production d'IFN- γ par les cellules T $\gamma\delta$ (Pichyangkul *et al.*, 2004). Une autre étude a montré que, *in vitro*, les *Pf*-E étaient également responsables d'une modulation négative de l'activation de DC dérivées de monocytes (Urban *et al.*, 2005). Cette modulation négative, dépendante d'une interaction avec le récepteur CD36, se traduit par une absence d'expression des molécules

du CMH, des molécules d'adhésion et de costimulation, ainsi qu'une absence de production d'IL-12 normalement observée en présence de LPS (lipopolysaccharide). Il reste cependant un grand nombre de questions ouvertes sur le rôle effectif des DC au cours du paludisme (Stevenson *et al.*, 2006).

• **Les cellules NK**

Les cellules NK sont des lymphocytes présents à la fois dans le sang, les organes lymphoïdes et les tissus périphériques (Ferlazzo *et al.*, 2004).

Les cellules NK augmentent particulièrement en nombre et sont capables de détruire *in vitro* les globules rouges parasités par *P.falciparum* (Orago *et al.*, 1991 ; Mavoungou *et al.*, 2003).

Une très récente étude vient de montrer 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 (Roland *et al.*, 2006).

Les cellules NK ont également la capacité de produire un certain nombre de cytokines et de chimiokines en réponse à différents stimulus. Elles sécrètent notamment l'IFN γ , le TNF α , de l'IL-10, de l'IL-13 et du GM-CSF (granulocyte/macrophage-colony stimulating factor), (Cooper *et al.*, 2001). Cette capacité à produire l'IFN γ , qui a conduit à l'activation parasiticide des macrophages, pourrait être de 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 (Mohan *et al.*, 1997).

En testant la production de plusieurs facteurs solubles par des cellules NK purifiées en réponse à des *Pf*-E, Baratin *et al.*, 2005 ont trouvé une sécrétion spécifique d'IL-8 par des cellules NK purifiées du sang périphérique de plusieurs donneurs, ainsi que par la lignée NKL (résultats non publiés). La présence du parasite permet également la surexpression de surface du récepteur CD69. Ces résultats suggèrent que l'interaction observée entre les deux types cellulaires a des conséquences fonctionnelles mesurables. Cependant, les cellules NK purifiées ne produisent pas d'IFN γ en présence de *Pf*-E (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 2003 ; Baratin *et al.*, 2005). Il existe donc dans les PBMC une ou plusieurs autres populations cellulaires capables de donner aux cellules NK des signaux supplémentaires d'activation, nécessaires pour que cette sécrétion ait lieu.

5.2- Immunité acquise

L'immunité acquise, est tout à la fois spécifique des stades de développement du parasite que des espèces parasitaires.

5.2.1- Immunité à médiation cellulaire

Les réponses immunes à médiation cellulaire induites par l'infection par *P.falciparum* peuvent protéger à la fois, contre les stades de développement pré-érythrocytaires et contre les stades érythrocytaires du parasite (Troye-Blomberg *et al.*, 1994).

•Les lymphocytes TCD4⁺ et TCD8⁺

Parmi les sous populations majeures des lymphocytes T, les cellules T CD4⁺ sont essentielles à la protection immune contre les stades asexués sanguins. Pour les cellules TCD8⁺ qui ont d'importantes fonctions effectrices dans l'immunité pré-érythrocytaire (Nardin *et al.*, 1993), et qui contribuent à la protection contre le paludisme sévère (Hills *et al.*, 1991 ; Aidoo *et al.*, 2000), ce rôle est moins clair.

Les CD4⁺ sous l'effet de la stimulation antigénique parasitaire se différencient en deux sous populations lymphocytaires Th1 et Th2 de fonctions distinctes. Ces deux sous populations lymphocytaires produisent chacune des cytokines qui leur sont spécifiques et sont impliquées dans des mécanismes différents.

Les cellules Th1 produisent de l'interleukine 2 (IL2), l'INF γ et de la lymphotoxine. Elles sont les premières à déclencher la réponse immunitaire à médiation cellulaire et l'activation des macrophages.

Les cellules Th2 produisent IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-13. Celles-ci stimulent la croissance des mastocytes et des éosinophiles et la production d'immunoglobulines par les cellules B.

Il a été proposé que les cellules TCD8⁺ puissent réguler l'immunosuppression au cours du paludisme aigu et moduler négativement les réponses inflammatoires (Aidoo *et al.*, 2000). Les lymphocytes T CD8⁺ reconnaissent les molécules antigéniques parasitaires

associées aux molécules de CMH classe I présentes à la surface des hépatocytes. Les lymphocytes T CD8⁺ activées produisent de l'interféron gamma (INF γ) lequel induit la production de monoxyde d'azote (NO) par les hépatocytes et les macrophages conduisant à la lyse des hépatocytes infectés.

La lyse par les cellules TCD8⁺ cytotoxiques, des érythrocytes parasités par *P.falciparum*, n'aurait pas un rôle dans la défense contre les stades sanguins des parasites, du au fait que les érythrocytes n'expriment pas d'antigènes du CMH.

5.2.2 Immunité humorale

Chez les populations des régions où le paludisme est endémique, l'infection palustre induit de fortes réponses immunes humorales, impliquant une production à prédominance d'IgM et d'IgG mais aussi d'autres isotypes d'immunoglobuline, notamment les sous classes d'IgG : IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4.

Chez les sujets protégés, les anticorps cytophiliques des isotypes IgG1 et IgG3 sont prédominants (Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1992 ; Sarthou *et al.*, 1997) alors que chez les individus cliniquement non protégés, ce sont les sous classes non cytophiliques IgG2, IgG4 et IgM qui abondent.

Le transfert passif des IgG de donneurs immuns suggérait déjà il y'a bien longtemps, que les anticorps pouvaient conférer une protection contre le paludisme (Orago *et al.*, 1991).

Les cellules NK sont également impliquées dans l'initiation de la réponse immunitaire adaptative (Zitvogel *et al.*, 2006). De plus, l'expression d'un récepteur du fragment Fc des immunoglobulines (CD16, Fc γ RIIIA) leur confère un répertoire de reconnaissance très large (celui des IgG1 et IgG3 circulantes), et leur permet ainsi d'être également des acteurs à part entière de la réponse immunitaire adaptative.

MATERIELS ET METHODE

Produced with ScanTOPDF

MATERIELS ET METHODE

1. Site de l'étude (figure5)

L'étude est conduite dans le district sanitaire de Saponé dans la province du Bazèga. Cette zone rurale est située à 50km au sud-ouest de Ouagadougou, la capitale du Burkina Faso dans la zone éco-climatique soudano sahélienne.

La transmission du paludisme dans la zone est saisonnière et intense durant la saison des pluies de Juin à Octobre. Le taux d'inoculation entomologique est au dessus d'une piqure infectante/personne/nuit durant cette saison et tend vers zéro durant la saison de faible transmission (saison sèche).

Le *Plasmodium falciparum* est l'espèce la plus rencontrée et compte pour environs 90% des infections dues au paludisme.

2. Population de l'étude

La population de l'étude provient essentiellement de quatres villages appartenant à deux aires de santé, les centres de Santé et Promotion Social (CSPS) de Saponé Marché et de Kounda. Selon le recensement de 2007 de la population, le district de Saponé compte environ 86.735 habitants parmi lesquels les enfants de moins de cinq ans représentent 18,75%.

Pour le CSPS de Saponé Marché, les enfants ont été recrutés dans les villages de Tanghin et Watenga. Pour le CSPS de Kounda, il s'agit d'enfants des villages de Kounda et de Dawelgué. Exactement 420 enfants de moins de cinq (5) ans ont été enrôlés sur la base de certains critères.

2.1- Critères d'inclusion

Seuls les enfants d'âge compris entre 0 et cinq (5) ans ont été enrôlés et ce, sur un consentement écrit/signé obtenu des parents. A cela s'ajoute un accord verbal de résider permanemment dans la zone d'étude pendant au moins trois mois avant l'inclusion et trois mois après l'inclusion de l'enfant dans l'étude.

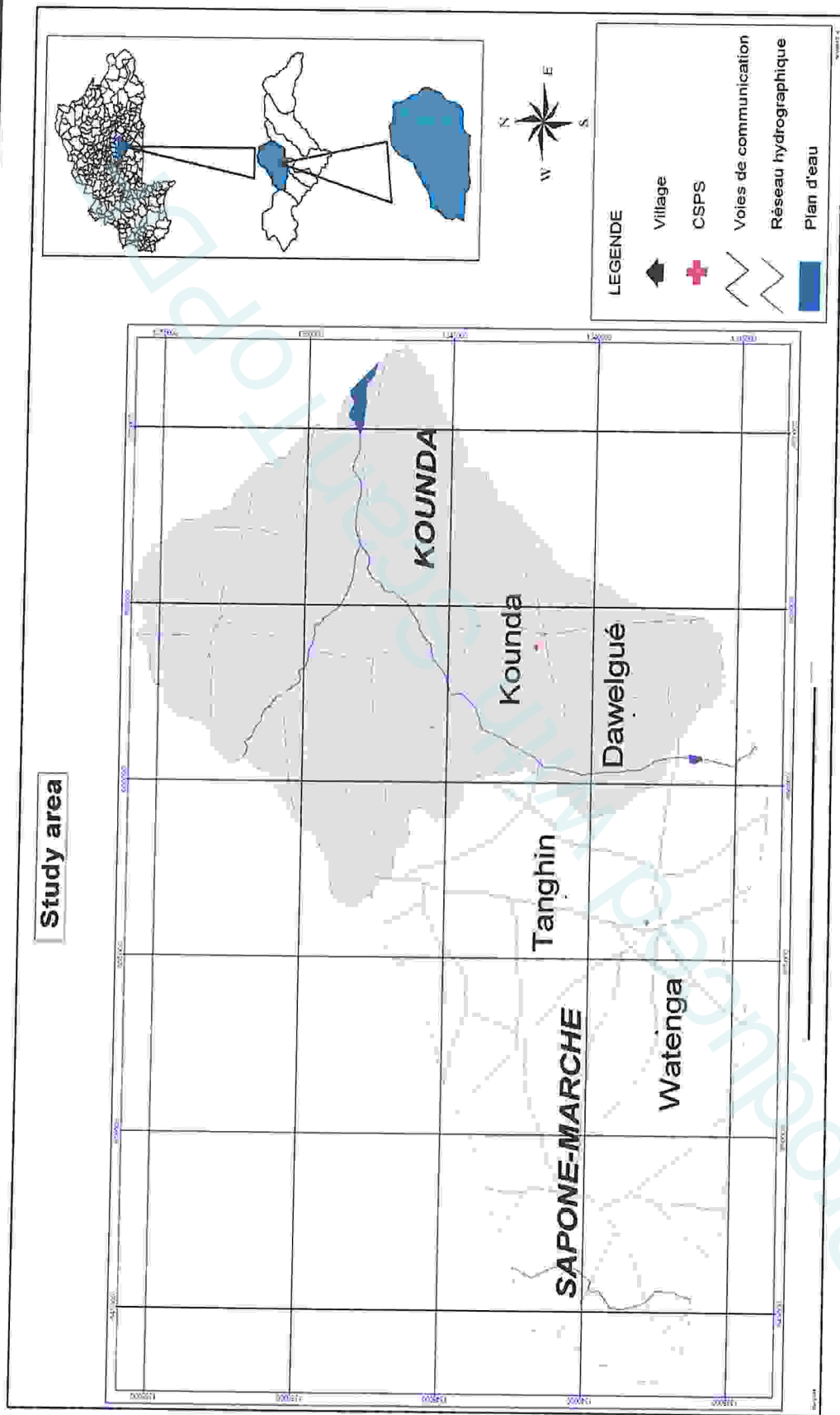


Figure 5 : Site de l'étude (CNRFP)

2.2- Critères d'exclusion

Ont été exclus de l'étude, les enfants présentant :

- Des maladies congénitales majeures ou chroniques (immunologique, cardiovasculaire, hépatique, rénale...) diagnostiquées par un médecin ou un infirmier sur la base de l'examen physique et de l'historique de la santé de l'enfant.

- Une anémie définie par un taux d'hémoglobine strictement inférieure à 6g/dl.

3- La collecte de données

Les enfants qui ont rempli les critères d'inclusion ont subi un examen clinique systématique pour l'évaluation de la morbidité palustre. L'examen clinique a consisté à un examen physique léger et à faire l'historique médical de l'enfant. Un test de diagnostic rapide du paludisme a été fait quand l'enfant était fébrile (température axillaire $T \geq 37,5^{\circ}\text{C}$).

Les malades symptomatiques ont été référés au CSPS le plus proche ou au Centre Médical avec Antenne chirurgicale (CMA) du district sanitaire de Saponé pour recevoir les soins appropriés.

Les données ont été collectées au cours de deux enquêtes transversales. La première en février (saison sèche) correspondant à la saison de faible transmission et la seconde en septembre correspondant au pic de la saison de forte transmission.

Au cours de ces enquêtes, un prélèvement sanguin veineux de 5ml a été réalisé dans un tube contenant de l'EDTA ou de l'héparine comme anticoagulant pour mesurer les paramètres immunologiques. Le sang veineux a été conditionné dans une glacière avec une température entre 15 et 25°C et transporté au laboratoire du CNRFP.

A l'arrivée, le sang a été centrifugé et le plasma séparé du culot sanguin et l'ensemble aliquoté, rangé dans des cryotubes puis des cryoboites et conservé dans un congélateur à -20°C en attendant leur analyse.

4- Matériels utilisés

Divers matériels ont été utilisés pour la collecte de données ainsi que pour le dosage des anticorps Ig G dans le laboratoire d'immunologie du CNRFP.

- Matériel biologique** : plasma obtenu par le prélèvement veineux sous tube EDTA pour la recherche d'anticorps IgG par la technique ELISA et antigènes (Tableau I).

Tableau I : Description des antigènes (Villard et al. 2007, Silayuv et al. 2009, Kolodny et al. 2001, Sedegah et al. 2004, Andrew, 2003)

Antigènes	Séquences (AA)	Localisation	Type de synthèse
LSA	(EQQDLEQLAKEKLLQ) _n	Surface des cellules hépatiques	recombinant
CSP	C-terminal+(NANP ou NVDP) _n +N-terminal	Surface du sporozoïte	recombinant
MIR48A	Fragment CS N-terminal (PfCS65-110)	Surface du sporozoïte	synthétique
MIR198	QFYDYPYSKIKNEKSFIDLNFIKGYSNFIKIKKCVPYDKKKYIFCNKN RLISNVGNKINKESESEQYDSDDNDKLVLNDDDEDEKKQVHI NNK YEALINTINIKNIENIKNDMSINLNINNDNSNQKIKMKNKGGKYDSDVIM	Surface des érythrocytes	synthétique
LR179A	LDENEDNIKMKSKIDDMEKEIKYR GGLLKNSHNLNINEMKYNTLNNNNMNSINK EKMNMKMEQMDMKMEKIDVNMIDQMDVKMEQMDVKMEQMDVKMKRMNE	Surface des érythrocytes	synthétique
LR181	TKLNLKELSEGKNELEKLEKNIKELEETNTNTLENDIKV EKLLKYNNEISSLLKELDILNEKMGKCT KKRNVEEELHSLRKNYNIINEEIEEIT	Surface des érythrocytes	synthétique
AS155.4	KKRNVEEELHSLRKNYNIINEEIEEIT	Surface des érythrocytes	synthétique
1574	GMINMNGDINNIN(GDINNMM) ₄	Surface des érythrocytes	synthétique

A, alanine; C, cystéine; D, acide aspartique; E, acide glutamique; F, phénylalanine; G, glycine; H, histidine; I, isoleucine; K, lysine; L, leucine; M, méthionine; N, asparagine; P, proline; Q, glutamine; R, arginine; S, serine; T, thréonine; V, valine; W, tryptophane; Y, tyrosine

•**Equipements et Logiciel d'acquisition et d'analyses**

- Centrifugeuse pour la séparation du sérum au culot sanguin
- Pipettes 1-20 μ l, 20-100 μ l, 40-200 μ l, 200-1000 μ l
- Pipettes multicanaux
- Chronomètre
- Plate-forme rotative
- Laveurs de plaques
- Lecteur de plaques de type ELx808-BIOTEK
- Ordinateur
- Programme pour le calcul des données

5. Détermination du taux d'IgG par la technique ELISA

Pour le dosage de l'anticorps (IgG) par la technique ELISA, le sérum a été séparé du culot par une centrifugation à 3000 tours / min pendant cinq (5) min.

5.1- Principe du test ELISA

Les tests ELISA ont été réalisés suivant les Procédures Opératoires Standardisées (POS) du réseau Afro Immuno Assay (AIA).

ELISA (Enzyme Linked Immune Sorbent Assay) est une technique immunologique destinée à détecter et/ou doser une protéine dans un liquide biologique.

Au cours de notre travail, nous avons dosé des anticorps IgG contre les antigènes LSA, CSP et MR48A (antigènes de stade pré-érythrocytaires) et MR198, LR181, LR 179A, AS155.4 et 1574 (antigènes de stade érythrocytaires) de *Plasmodium falciparum*.

Chaque test ELISA est réalisable en deux jours :

•**Jour 1** : fixation des antigènes et du standard sur la microplaque (coating)

Le standard est un anticorps de concentration connue (1mg/ml) permettant de tracer la courbe d'étalonnage. Cette courbe est utilisée pour convertir la densité optique en concentration.

Avant la distribution dans les puits, le standard subit une dilution en cascade dans huit (08) tubes différents contenant chacun un volume donné de tampon de coating suivant le protocole.

Incubation toute une nuit à 4°C.

•**Jour 2** : Laver la plaque par intervalle d'une minute à quatre (04) reprises

- Blocage de la plaque : saturation des puits

Laisser sur l'agitateur de plaques pendant 1 heure à la température ambiante

Laver la plaque par intervalle d'une minute à quatre (04) reprises

- Distribution du plasma dilué suivant le protocole.

Incuber 02 heures à la température ambiante sous agitation.

Laver la plaque par intervalle d'une minute à quatre (04) reprises

- Incubation avec le conjugué : IgG de chèvre anti humaines conjuguées à la peroxydase diluées à 1/3000. L'incubation se fait pendant 1 heure à la température

ambiante sous agitation.

- Révélation avec le substrat de l'enzyme couplé (TMB) : 15 minutes à la température

ambiante

- Arrêt de la réaction avec de l'acide : 0,2M H₂SO₄

- Lecture de la plaque sur un lecteur de plaque ELISA : 450 nm

5.2- Contrôle de qualité du test ELISA

Pour s'assurer de la qualité des résultats, le test est réalisé avec :

- Une dilution en série d'un anticorps standard (IgG) de concentration connue qui permet de tracer la courbe d'étalonnage et de déterminer la concentration de l'anticorps à doser. Un test est validé si le score de la courbe est supérieur ou égal à 97%.
- Des témoins positifs et des blancs nécessaires pour la validation et l'interprétation du test. Pour cela leurs valeurs doivent être comprises dans l'intervalle de confiance fixée par la procédure opératoire standardisée.

L'échantillon est testé en duplicata sur la plaque. Ceci nous permet de calculer le coefficient de variation (CV) entre deux puits.

5.3 - Validation d'un test ELISA

Le résultat d'un échantillon est validé si les conditions suivantes sont respectées :

- Le coefficient de variation entre duplicata inférieur ou égal à 15%. Le cas échéant l'échantillon est retenté.
- Les valeurs des duplicata doivent être supérieure à celles des blancs.

Un logiciel conçu pour la validation des tests rejette ou valide les résultats avec une marge de +/- deux écart types.

6-Analyse des données

A partir des données obtenues, un calcul de prévalence a été effectué pour l'analyse :

- Nous avons fait la moyenne de tous les résultats d'échantillons obtenus par antigène ; à laquelle on a additionné trois (03) déviations standards afin de définir le seuil de positivité.

- Tout échantillon présentant une valeur supérieure ou égale au seuil de positivité est désigné comme positif.

- Calcul du pourcentage de positivité par antigène et en fonction de la saison de transmission.

7- Considération éthique

Avant le début de l'étude, un consentement informé a été obtenu auprès des personnes clef leaders d'opinion. Un des investigateurs de l'étude a expliqué aux parents/tuteurs des enfants face à face le protocole de l'étude.

Ces derniers ont donc été informés des objectifs de l'étude, des risques possibles liés à l'étude, de la durée de participation des enfants dans l'étude, de la responsabilité de chaque enfant participant, du nombre de personnes inclus et des procédures de recherche de l'étude.

On leur a précisé que la participation de leur enfant dans l'étude est volontaire et qu'ils sont libres à tout moment de le retirer de l'étude sans aucune pénalité ou perte de bénéfice que devraient gagner l'enfant même s'il n'était pas dans cette étude.

Ni l'investigateur, ni un membre de l'équipe de recherche exercera une pression ou influencera un parent/tuteur d'enfant pour que son enfant participe dans l'étude.

La confidentialité des informations relatives à chaque participant a aussi été prise en compte. Au cas où les données de l'étude seront publiées, les noms des enfants ayant participé à l'étude ne seront pas cités.

Tableau II : Seuil de positivité en fonction de la densité optique

	Antigènes	Moyenne(m) de la densité optique(DO)	Seuil de positivité (m+ 3sd)
Pré-érythrocytaires	LSA	0,075	0,122
	CSP	0,074	0,117
	MR48A	0,049	0,072
Erythrocytaires	LR179A	0,054	0,072
	AS155.4	0,060	0,093
	1574	0,055	0,076
	LR181	0,115	0,213
	MR198	0,062	0,093

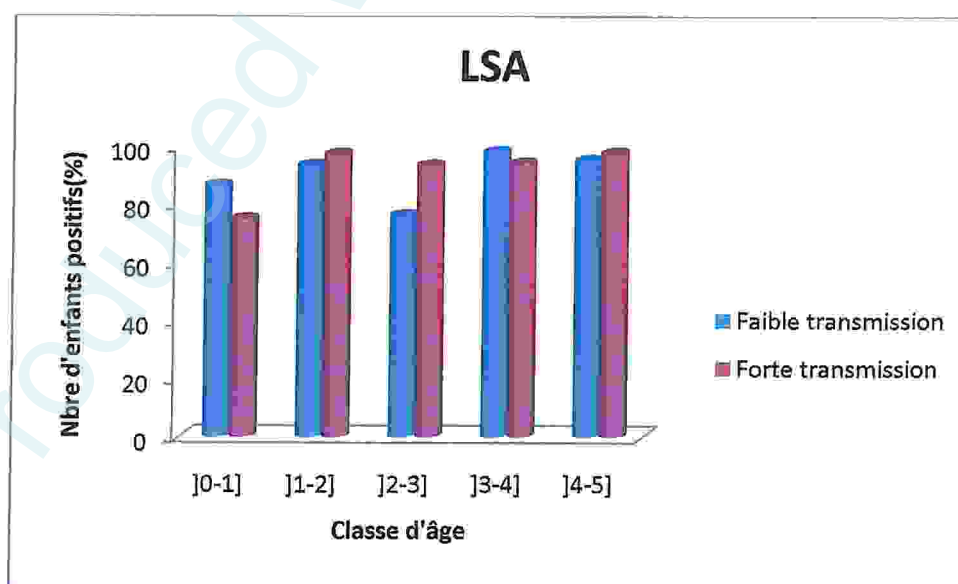


Figure 6 : Pourcentage d'enfants positifs à l'antigène LSA

•Concernant le taux d'IgG dirigés contre CSP (Fig.7), on constate une différence de niveau entre les saisons. En effet, le pourcentage de positivité est assez élevé en saison de faible transmission par rapport à la saison de forte transmission pour les classes d'âge]0-1] ;]1-2] et]2-3].

Dans le groupe de]0-1], le nombre d'enfants positifs est même en dessous de 40% en saison de forte transmission, alors qu'il a atteint son maximum chez les enfants de]2-3] ans en saison de faible transmission.

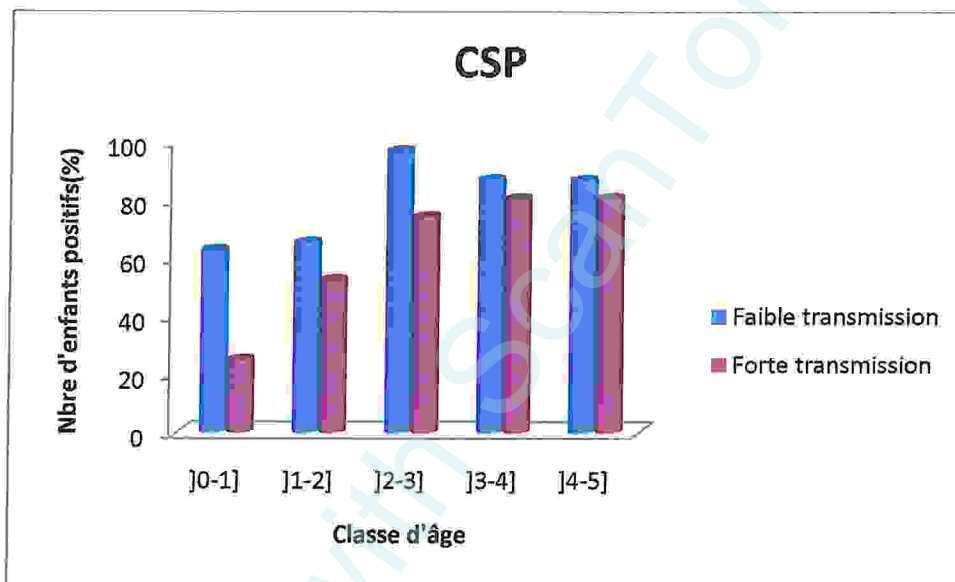


Figure 7 : Pourcentage d'enfants positifs à l'antigène CSP

•Pour l'antigène MR48A (figure 8), nous constatons un pourcentage de positivité sensiblement égal durant les deux saisons pour les classes]1-2] et]4-5].

Par contre, le pourcentage de positivité pour les groupes d'âge de]2-3] et]3-4] est élevé en saison de forte transmission par rapport à la saison de faible transmission. Le contraire est observable dans la classe]0-1] avec un pourcentage qui tend vers 20% en saison de forte transmission.

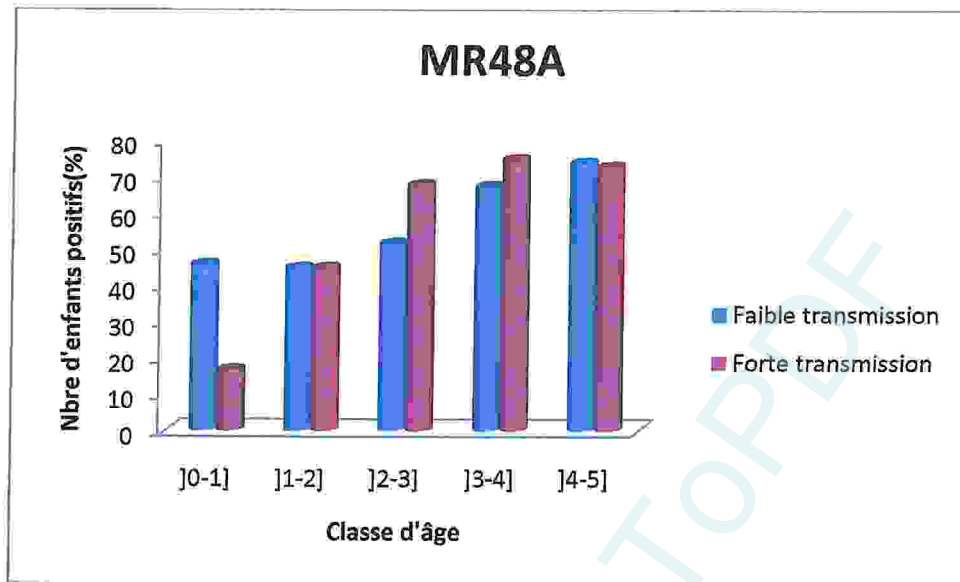


Figure 8 : Pourcentage d'enfants positifs à l'antigène MR48A

L'analyse des figures 6,7 et 8 a montré un pourcentage assez élevé d'enfants positifs aux antigènes de stade pré-érythrocytaire. Ce pourcentage varie en fonction du groupe d'âge auquel appartient les enfants. Il tend à augmenter continuellement dans les groupes d'enfants de 2 à 5ans.

Pourcentage d'enfants positifs aux antigènes érythrocytaires par tranche d'âge et par saison

Les figures 9 ; 10 ; 11 ; 12 ; 13 présentent le pourcentage d'enfants positifs aux antigènes érythrocytaires de *Plasmodium falciparum* par classe d'âge et par saison.

- Pour LR 179A (figure9), le pourcentage d'enfants positifs est doublement élevé en saison de forte transmission par rapport à la saison de faible transmission pour] 0-1]. Il est à peine variable au niveau des classes d'âge] 1-2] et] 2-3]. Cependant, au niveau de]3-4] et] 4-5], le pourcentage est plus élevé en saison de faible transmission qu'en saison de forte transmission.

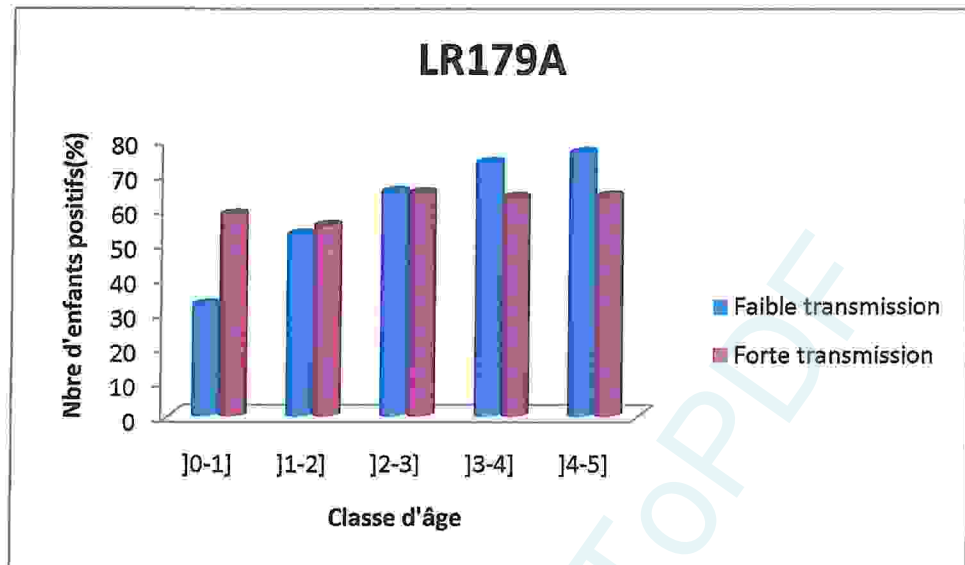


Figure 9 : Pourcentage d'enfants positifs à l'antigène LR179A

• Pour AS155.4 (figure 10), on constate que le nombre d'enfants positifs est carrément inférieur à 30%. Hors mis la classe] 1-2] au niveau de laquelle le pourcentage est égal durant les deux saisons, il est manifestement élevé dans les autres cas pendant la saison de faible transmission à la différence de l'autre saison.

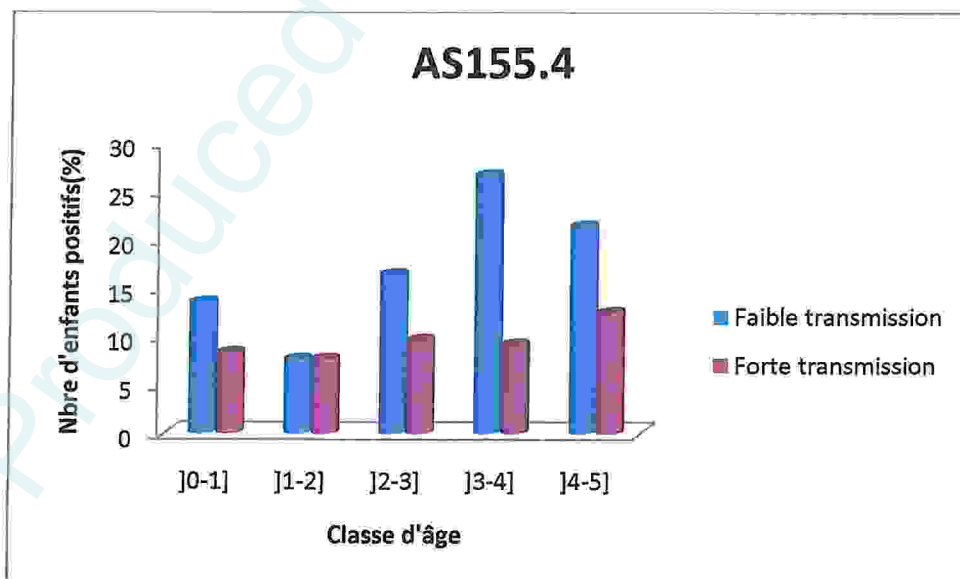


Figure 10 : Pourcentage d'enfants positifs à l'antigène AS155.4

• Le pourcentage d'enfants positifs à l'antigène 1574 (figure 11) est plus élevé en saison de faible transmission qu'en saison de forte transmission dans presque toutes les tranches d'âge à l'exception de] 3-4]. Le nombre d'enfants positifs est inférieur à 50% en saison de forte transmission pour les classes] 0-1] et] 1-2].

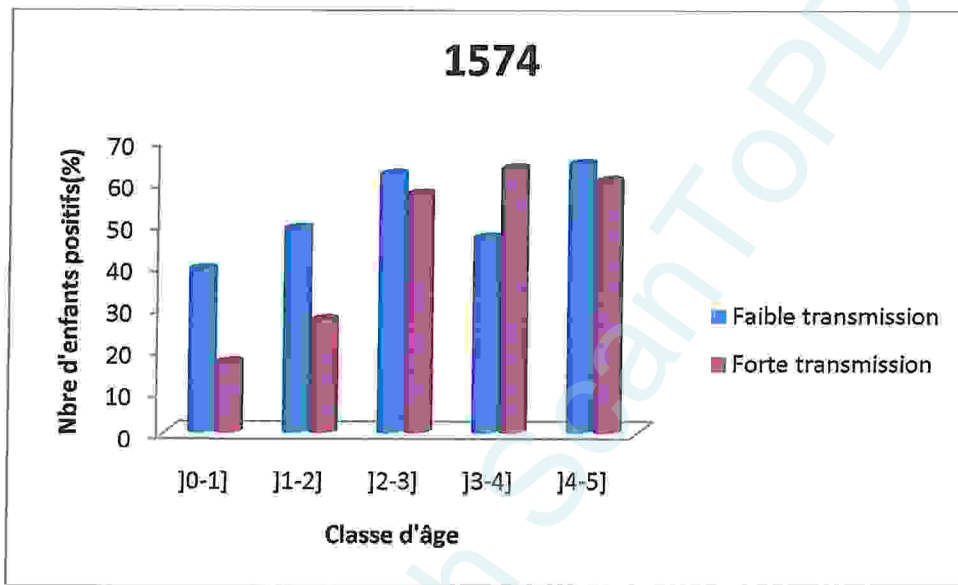


Figure 11 : Pourcentage d'enfants positifs à l'antigène 1574

• En ce qui concerne l'antigène LR181 (figure 12), le pourcentage d'enfants positifs s'avère être très faible en saison de faible transmission et même non considérable en saison de forte transmission au niveau de]0-1]. Le constat demeure quand même dans ce cas que le pourcentage de positivité est très élevé en saison de faible transmission par rapport à l'autre saison pour toutes les classes d'âge.

• Pour MR 198 (figure 13), nous constatons que le pourcentage de positivité est plus élevé en saison de faible transmission qu'en saison de forte transmission et même qu'il semble varier en fonction de l'âge.

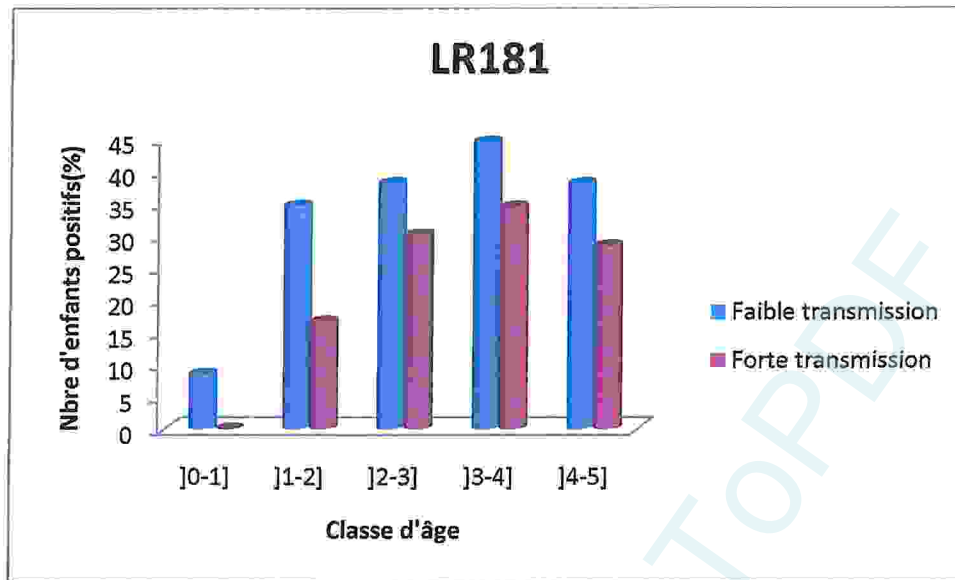


Figure 12 : Pourcentage d'enfants positifs à l'antigène LR181

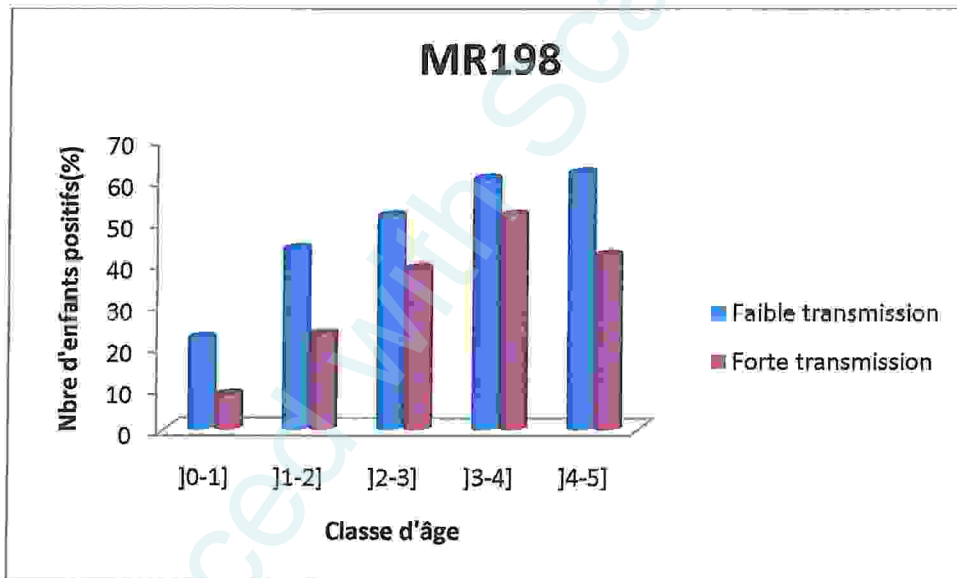


Figure 13 : Pourcentage d'enfants positifs à l'antigène MR198

L'analyse des figures 9 ; 10 ; 11 ; 12 et 13 a montré un faible nombre d'enfants positifs aux antigènes érythrocytaires par rapport au nombre d'enfants positifs aux antigènes pré-érythrocytaires.

Pour la plupart des antigènes érythrocytaires, le pourcentage de positivité est plus élevé en saison de faible transmission qu'en saison de forte transmission. Ce pourcentage varie en fonction des groupes d'âge.

Prévalence des anticorps IgG produits contre les antigènes étudiés

Tous les résultats pris ensemble montrent une variabilité de réponse d'un antigène à l'autre. Malgré le faible taux d'inoculation envisagé durant la saison de faible transmission, nous constatons dans certains cas, un pourcentage de positivité élevé durant cette période par rapport à la saison de forte transmission. Ces résultats sont surtout visibles pour les antigènes AS155.4, LR181, MR198. Pour l'antigène LSA, le pourcentage d'enfants positifs en saison de faible transmission et celui de la forte transmission s'avoisine. Ces observations attestent la stabilité de la transmission saisonnière dans notre zone d'étude.

En ce qui concerne les autres antigènes étudiés, nous constatons des groupes d'âge pour lesquels le pourcentage de positivité est supérieur en saison de faible transmission qu'en saison de forte transmission et inversement. Sachant que le seuil de positivité a été défini en fonction du taux d'anticorps, ces résultats nous font penser que la production d'IgG est fonction de l'âge. Nebié *et al.*, en 2008 au Burkina Faso ont observé que le taux d'anticorps anti mérozoitiques (GLURP et MSP3) évoluait avec l'âge chez les enfants vivant dans les villages de Balonghin et l'ensobentenga.

Immunogénicité des antigènes étudiés et protection contre le paludisme

Nous avons constaté pour certains antigènes un pourcentage de positivité élevé en saison de faible transmission chez les enfants du groupe d'âge] 0-1] par rapport à la saison de forte transmission. Ces résultats sont plus significatifs pour les antigènes CSP, MR48A, AS155.4, 1574, LR181 et MR198. Nous venons à penser que certains enfants avaient déjà des anticorps.

Dans les régions où le paludisme est endémique avec une transmission annuelle stable, les enfants nés de mères semi immunes seraient protégés contre la maladie durant la première moitié de leur première année de vie par les anticorps maternels. Cette immunité des enfants est dite passive, ces derniers ayant « passivement » reçus les anticorps de leurs mères. Cette immunité s'estompe au cours du temps, et on observe chez l'enfant, après le sixième mois de sa vie, une augmentation de la sensibilité au paludisme. Cette période dure jusqu'à environ neuf ans, selon les enfants. Ensuite, se développe progressivement l'acquisition d'une immunité semi protectrice active dite semi immunité (Marsh, 1992).

CONCLUSION

Plusieurs stratégies ont été élaborées pour réduire la morbidité et la mortalité palustres. L'une d'elles est basée sur le développement de vaccins qui passe par l'évaluation des nombreux candidats vaccins synthétisés. Parmi ceux-ci, notre étude a porté sur les antigènes pré-érythrocytaires (LSA, CSP et MR48A) et érythrocytaires (LR179A, AS155.4, 1574, LR181 et MR198) de *Plasmodium falciparum*.

La réponse immunitaire humorale dirigée contre ces antigènes a été évaluée chez 420 enfants de moins de 5ans vivant dans une zone à transmission saisonnière et stable du paludisme au Burkina Faso.

L'analyse des résultats a montré une co-relation entre l'âge et le taux d'IgG produit. Aussi, la réponse immunitaire est fonction de l'antigène.

Les antigènes étudiés, recombinants pour certains et synthétiques pour d'autres ont stimulé efficacement la réponse immunitaire chez les enfants de moins de 5ans avec une variabilité en fonction de l'âge. Par conséquent, la recherche vaccinale constitue une voie d'avenir pour le contrôle du paludisme.

L'immunogénicité des antigènes pré-érythrocytaires et érythrocytaires pourrait servir de repère pour l'inoculation d'un éventuel vaccin élaboré à partir de l'un de ces antigènes, en suggérant la quantité nécessaire à administrer vis-à-vis des seuils de positivité établis. Lors du processus de développement de ces antigènes, la durée de la mémoire immunologique qu'ils stimulent doit être prise en compte de même que la voie d'administration.

Vue la complexité du développement de vaccins anti palustres, il serait intéressant de considérer le rôle du gène responsable de la capacité de la réponse immunitaire, localisé dans une région des gènes du CMH.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Produced by Scantopdf

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aidoo M., Udhayakumar V. (2000): Field studies of cytotoxic T lymphocytes in malaria infections: implications for malaria vaccine development. *Parasitol. Today*.16: 50-56.
- Andrew W.T.R. (2003). Immunity to liver stage malaria. *Immunol. Research* 27 (1): 53-69.
- Beaumont A., Cassier P. (2006) *Biologie Animale. Tome 1 : Des Protozoaires aux Métazoaires épithélioneuriens*. 3^e edition. DUNOD ed, Belgique, 459p.
- Behr C., Dubois P. (1992): Preferential expansion of V γ 9 V δ 2Tcells following stimulation of peripheral blood lymphocytes with extracts of *Plasmodium falciparum*. *Int. Immunol.* 4:361-366.
- Belkaid M., Tabet-Derraz O., Zenaidi N., Hamrioui B. (1992) *Cours de parasitologie. Tome 1: Protozooses*. Office des Publications Universitaires. Alger, 244p.
- Berzins K., Anders RF. (1999): The malaria antigens; In "Wahlgren M, Perlmann P. (eds)." Harwood Academic. London. pp.181 216.
- Bouharoun – Tayoun H., Druilhe P. (1992): *Plasmodium falciparum* malaria: Evidence for an isotype imbalance which may be responsible for delayed acquisition of protective immunity. *Infect. Immun.* 60: 1473-1481.
- Cassier P., Brugerolle G., Combes C., Grain J., Raibaut A. (1998) : *Le parasitisme. Un équilibre dynamique*. Masson ed, Paris, 366p.
- Chen Qj., Schlichtherle M., Whalgren M. (2000) Molecular aspects of severe malaria. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 439-450.
- Cohen S., Mc Gregor IA., Carrington S. (1961) Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature (Lond)* 192:733-737.
- Elloso MM., Van der Heyde HC., Van der Waa JA., Mannig DD., Weidanz WP. (1994) Inhibition of *Plasmodium falciparum* in vitro by human $\gamma\delta$ T T cells. *J. Immunol.* 153: 1187-1194.
- Elloso MM., Van der Heyde HC., Troutt A., Manning DD., Weidanz WP. (1996) Human $\gamma\delta$ T T cell subset- proliferative response to malaria antigen in vitro depends on

- **Roland J., Soulard V., Sellier C., Drapier AM., Di Santo JP., Cazenave PA., Pied S.** (2006) NK cell responses to *Plasmodium* infection and control of intrahepatic parasite development. *J. Immunol.* 177: 1229 – 1239.
- **Sabchaeron A., Burnouf T., Ouattara D., Attanath P., Bouharoun- Tayoun H., Chantavanich P., Foucault C., Chongsuphajaisiddhi T., Druilhe P.** (1991) Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45: 297-308.
- **Salerno A., Dieli F.** (1998) Role of $\gamma\delta$ T lymphocytes in immune responses in humans and mice. *Crit. Rev. Immunol.* 18: 327-357.
- **Sarthou JL., Angel G., Aribot G., Rogier C., Dieye A., Balde AT., Diatta B., Seignot P., Roussilhon C.** (1997) Prognostic value of anti-*Plasmodium falciparum* specific immunoglobulin G3, cytokines, and their soluble receptors in West African patients with severe malaria. *Infect. Immun.* 65: 3271-3276.
- **Sedegah M., Charoenvit Y., Aguiar J., Saeki J., Hedstrom R., Kumar S., Belmonte A., Lanar D.E., Jones T.R., Abot E., Druilhe P., Corradin G., Epstein J.E., Richie T.L., Carucci D.J. and Hoffman S.L.** (2004). Effect on antibody and T-cell responses of mixing five GMP-produced DNA plasmids and administration with plasmid expressing GM-CSF. *Genes and Immunity* 5: 553–561.
- **Silayuv E.B., Ntsama P.M., Offner S., Smith T., Felger I., Tanner M., Alonso P., Nebie I., Romero J.F., Silvie O., Torgler R., Corradin G.** (2009). The N-terminal domain of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein represents a target of protective immunity. *Vaccine* 27: 328–335.
- **Tabet-Derraz O., Belkaid M., Bouchenene Z., Belazzoug S., Chellali A., Hamrioui B., Kellou B.** (1984) *Eléments de parasitologie*. 2^e Edition. Office des Publications Universitaires. Alger, 214p.
- **Troye-Blomberg M., Perlmann P.** (1994): Malaria immunity: An overview with emphasis on T cell function; In “Good MF., Saul AJ. (eds)”. Boca Raton, CRC Press, pp. 1-46.

- **Troye-Blomberg M., Worku S., Tangteerawatana P., Jamshaid R., Söderström K., ElGhazali G., Moretta L., Hammarström ML., Mincheva-Nilsson L.** (1999) Human $\gamma\delta$ T cells that inhibit the in vitro growth of the asexual blood stages of the *Plasmodium falciparum* parasite express cytolytic and proinflammatory molecules. *Scand. J. Immunol.* 50:642-650.
- **Villard V., Agak G.W., Frank G., Jafarshad A., Servis C., Nebie I., Sirima S.B., Felger I., Arevalo-Herrera M., Herrera S., Heitz F., Ba"cker V., Druilhe P., Kajava A. V., Corradin G.**(2007). Rapid Identification of Malaria Vaccine Candidates Based on a-Helical Coiled Coil Protein Motif. *PLoS ONE* 2(7): e645.
- **Waterfall M., Black A., Riley E.** (1998) $\gamma\delta$ + Tcells preferentially respond to live rather than killed malaria parasites. *Infect. Immun.* 66: 2393- 2398.

SITES WEB

[1]- Crawley J, Roll Back Malaria, le paludisme chez les enfants

http://www.rollbackmalaria.org/infosheet6_fr.pdf-Adobe Reader

(Consultation le 22 novembre 2009).

[2]- Sanofi-Aventis. Impact Malaria (2008) ; Microscopie : détection des parasites

<http://www.impact-malaria.com/iml/cx/fr/layout.jsp?s...> (Consultation le 21 avril 2010).

[3]- Institut Pasteur de Madagascar (2003), cycle biologique de *Plasmodium*

<http://www.pasteur.mg/spip.php?article 296> (consultation le 6 avril 2010).

[4]-Amadou H. (2007) : le cycle de *Plasmodium falciparum* : Aspects génétiques et antigéniques.

[http://www.pasteur.mg/atelier-palu/2007/pdf/presentations/hadiza_S2 \[1\].pdf](http://www.pasteur.mg/atelier-palu/2007/pdf/presentations/hadiza_S2 [1].pdf)

(consultation le 8 avril 2010).

[5]- Anonyme (1996) Histoire du paludisme

[http: //archive.idrc.ca/books/reports/ 1996/01-05f.html](http://archive.idrc.ca/books/reports/1996/01-05f.html) (consultation le 26 janvier 2010).

[6]- Anonyme. Paludisme-wikipedia

[http : fr.wikipedia.org/wiki/paludisme](http://fr.wikipedia.org/wiki/paludisme) (consultation le 22 novembre 2009).

[7]- Elie Mavoungou : le paludisme et le système immunitaire humain

[http : afrikibouge.com/publications/ Elie %20 Mavoungou.pdf](http://afrikibouge.com/publications/Elie%20Mavoungou.pdf) (consultation le 22 décembre 2009).

[8]- Rouamba.J. Représentations et pratiques en matière de paludisme chez les personnes en charge des enfants de moins de 5ans en milieu rural de la province du Houet.

[http : www.santetropicale.com/burkina/rstss _palu.pdf](http://www.santetropicale.com/burkina/rstss_paludisme.pdf) (consultation le 22 novembre 2009).