

Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso

Numéro d'ordre :

Institut du Développement Rural
(IDR)

Institut de Recherche en Sciences de la Santé



MEMOIRE

Présenté par :

Nina W. GOUBA

Maître ès Sciences

Pour l'obtention du :

Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA) en
Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques
(BA/MSB)

Thème :

Evolution des marqueurs immunologiques de
l'infection à *Schistosoma mansoni* chez des patients
après traitement au praziquantel à la vallée du Kou

Soutenu le 23 Juillet 2009

Directeur de Mémoire : Pr. Jean Bosco OUEDRAOGO

Devant le jury :

Président : Pr. Georges Anicet OUEDRAOGO

Membres : Pr. Jean Bosco OUEDRAOGO
Dr. Roch DABIRE

Dédicaces

A mon père et à ma mère

Sans vos sacrifices, vos prières et bénédictions, le présent travail n'aurait pas pu être réalisé. Je vous en remercie. Que le Seigneur vous accorde une longue vie afin de bénéficier des fruits de l'arbre que vous avez planté et entretenu.

A mes frères : Alphonse et Odilon

Vous m'avez toujours rassurée de votre soutien fraternel. Puisse Dieu nous garder unis et soudés.

A mon tuteur Sylvain

Vous m'avez hébergée pendant quelques mois durant mes études. Je vous exprime toute ma reconnaissance et ma gratitude pour les conseils et le soutien que vous m'avez apportés. Puisse Dieu vous accorder une longue vie et plein de succès dans votre vie professionnelle.

A mes amis : Léa, Joséphine, Nadinga.

Merci pour vos encouragements et votre soutien spirituel. Que la Grâce de Dieu soit votre partage quotidien.

A ma Tante Cathérine KIENDREBEOGO

Merci pour tes conseils, tes prières et pour le soutien multiforme que tu m'as apporté.

A Jacques KABORE

Je te suis très reconnaissante pour le soutien, les encouragements et l'aide que tu m'as accordés. Que la Grâce de Dieu surabonde dans ta vie.

Remerciements

Ce travail n'aurait pu se concrétiser sans le concours de nombreuses personnes. Aussi, j'ai un réel plaisir à exprimer ma profonde gratitude à tous ceux qui ont, d'une manière ou d'une autre participé à sa réalisation. Mes remerciements vont particulièrement:

Au Professeur Jean Bosco OUEDRAOGO, Directeur Régional de l'Institut de Recherche et de la Santé à Bobo-Dioulasso (IRSS) Directeur et Encadreur de ce mémoire.

Je vous serai toujours reconnaissante pour m'avoir accueillie et guidée dans ce travail malgré vos multiples occupations évidentes. Je vous suis très reconnaissante pour cette initiation à la recherche et pour toutes les connaissances acquises auprès de vous. Vous avez ranimé en moi le goût de la recherche scientifique au travers de votre sens critique et de votre recherche permanente de la perfection. Votre patience, votre douceur, votre rigueur dans le travail m'ont facilité l'assimilation. Je garderai en souvenir permanent vos qualités d'homme scientifique et particulièrement votre dévouement dans la résolution des problèmes de santé au Burkina Faso.

Au Professeur Georges Anicet OUEDRAOGO, Professeur Titulaire à l'Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso, ainsi qu'à tous les enseignants du DEA de Biologie Appliquée. Je vous suis très reconnaissante pour toutes les connaissances que vous m'avez transmises au travers de vos enseignements. Votre constante disponibilité à l'écoute des étudiants m'a toujours marquée.

Aux Docteurs de l'IRSS : Hermann SORGHO, Zekiba TARNAGDA, Issaka ZONGO, Augustin ZEBA. Je vous exprime ma profonde gratitude pour vos conseils et vos encouragements.

Aux étudiants et techniciens à l'IRSS. Je vous remercie pour votre bonne collaboration et l'ambiance amicale qui a régné dans le laboratoire pendant mon séjour.

Au personnel administratif et de soutien à l'IRSS. Je vous remercie pour les appuis multiformes.

Mes parents, mes amis et promotionnaires qui m'ont soutenue dans mes études.

Sommaire

Liste des figures et tableaux	v
Résumé	vi
Abstract.....	vii
Sigles et abréviations.....	viii
1. Introduction.....	1
2. Généralités sur les schistosomes	3
2.1. Classification.....	3
2.2. Cycle biologique des schistosomes.....	3
2.2.1. Les schistosomes adultes	4
2.2.2. L'œuf.....	5
2.2.3. Le miracidium, le sporocyste, les cercaires	5
2.2.4. Le schistosomule.....	6
2.3. Les mollusques hôtes intermédiaires des schistosomes.....	6
2.4. Répartition mondiale des espèces de schistosomes	7
2.5. Répartition géographique des schistosomes au Burkina Faso	9
2.6. Physiopathologie de l'infection et pathologies observées au cours de l'infection par <i>S.mansoni</i>	10
2.6.1. La physiopathologie de l'infection	10
2.6.2. La phase aiguë.....	10
2.6.3. La phase chronique	10
2.7. Le diagnostic	11
2.7.1. Le diagnostic parasitologique	11
2.7.2. Le diagnostic immunologique.....	11
2.7.3. Autres méthodes de diagnostic	12
2.8. La réponse immune dans la schistosomiase.....	12
2.8.1. L'immunité cellulaire.....	12
2.8.2. La réponse immune humorale.....	14
2.9. Lutte contre les schistosomiasis	15
2.9.1. Les différents médicaments	15
2.9.2. Stratégies de lutte contre les Schistosomiasis	15
3. Objectifs de l'étude	16
3.1. Objectif général.....	16
3.2. Objectifs spécifiques	16
4. Matériel et méthodes.....	17
4.1. Type d'étude	17
4.2. Site et population d'étude	17

4.3. Critères d'inclusion et d'exclusion	18
4.3.1. Critères d'inclusion.....	18
4.3.2. Critères d'exclusion	18
4.4. Echantillonnage.....	18
4.5. Procédure de collecte du matériel biologique.....	18
4.5.1. Collecte des échantillons de selles.....	18
4.5.2. Collecte des échantillons de sang	19
4.6. Examen parasitologique.....	19
4.7. Test sérologique.....	21
4.8. Suivi clinique et biologique des patients	25
4.9. Analyse statistique des données.....	26
5. Résultats.....	27
5.1. Caractéristiques de la population d'étude	27
5.2 Intensité de l'infection au cours du suivi	28
5.3 Détection des immunoglobulines avant et après traitement.....	28
5.3.1 Densités optiques moyennes (DO) des immunoglobulines en fonction de l'intensité de l'infection avant traitement	28
5.3.2 Evolution des immunoglobulines après traitement en fonction du temps de suivi	30
5.3.3 DO moyennes des immunoglobulines après traitement en fonction du statut parasitologique.....	31
5.3.4 Analyse de la corrélation entre l'immunoglobuline IgG4 et la charge parasitaire .	33
6. Discussion.....	35
6.1 L'efficacité parasitologique après traitement au praziquantel	35
6.2 Taux des immunoglobulines avant traitement au praziquantel en fonction de l'intensité de l'infection	35
6.3 Evolution des immunoglobulines après traitement au praziquantel en fonction du temps de suivi	36
6.4 Marqueur immunoglobuline associé à l'efficacité du traitement.....	37
6.4.1. DO moyennes des immunoglobulines en fonction du statut parasitologique.....	37
6.4.2 Corrélation entre l'immunoglobuline IgG4 et la charge parasitaire	37
7. Conclusion	38
8. Références.....	39
Annexes	I

Liste des figures et tableaux

Figure 1: Cycle évolutif de <i>S. haematobium</i> , <i>S. mansoni</i> , et <i>S. japonicum</i> , chez l'homme (Ross <i>et al.</i> , 2002).....	4
Figure 2 : Distribution géographique des différentes espèces de schistosomes et des foyers d'endémies de schistosomiase humaine (Gryseels, <i>et al.</i> , 2006).....	8
Figure 3 : Données indicatives des prévalences bilharziennes par région sanitaire au Burkina (Poda <i>et al.</i> , 2004).....	9
Figure 4: Schéma d'un granulome formé autour de l'œuf (Pearce et MacDonal, 2002).....	13
Figure 5 : Schéma du développement de la réponse cellulaire de type Th1 et Th2 au cours de l'infection (Pearce et MacDonald, 2002).....	14
Figure 6: Localisation des deux CSPS de la Vallée du Kou.....	17
Figure 7: Image d'une plaque de microtitration.....	22
Figure 8: Principe général du test ELISA.....	22
Figure 9 : Procédure du test ELISA.....	24
Figure 10: Résultat d'un test ELISA, coloration des puits après arrêt de la réaction.....	24
Figure 11: Evolution de la charge parasitaire en fonction des temps de passages.....	28
Figure 12: Evolution des DO moyennes des immunoglobulines IgM, IgA et IgG après traitement en fonction du temps de suivi.....	30
Figure 13: Evolution des DO moyennes des immunoglobulines IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 après traitement en fonction du temps de suivi.....	31
Figure 14 : Corrélation entre la DO de l'immunoglobuline IgG4 et la charge parasitaire avant traitement.....	34
Tableau I: Caractéristiques principales des cinq espèces de schistosomes infectant l'homme .	8
Tableau II: Schéma d'une plaque ELISA.....	23
Tableau III : Seuil de positivité des immunoglobulines.....	25
Tableau IV: Planning des différentes activités de l'étude.....	26
Tableau V: Caractéristiques de la population d'étude au cours du suivi.....	27
Tableau VI: DO moyennes des immunoglobulines en fonction des classes d'intensité de l'infection avant traitement.....	29
Tableau VII : DO moyennes des immunoglobulines des sujets positifs et négatifs au Kato-Katz au quarante cinquième jour (J ₄₅).....	32
Tableau VIII: DO moyennes des immunoglobulines des sujets positifs et négatifs au Kato-Katz au troisième mois (M ₃).....	33
Tableau IX: DO moyennes des immunoglobulines des sujets positifs et négatifs au Kato-Katz au douzième mois (M ₁₂).....	33

Résumé

Le diagnostic parasitologique de l'infection à *Schistosoma mansoni* par la technique du Kato-Katz manque de sensibilité en zone de faible prévalence ou après traitement. La présente étude a évalué l'évolution des marqueurs immunologiques de l'infection à *Schistosoma mansoni* chez des patients après traitement au praziquantel à la Vallée du Kou.

Sur 980 sujets recrutés, 216 sujets d'âge supérieur ou égal à 6 ans ont été détectés positifs à l'issue des examens parasitologiques des selles par la technique du Kato-Katz. Ils ont été inclus et traités avec du praziquantel à la dose unique de 40 mg/kg de poids corporel, puis suivis de Février 2007 à Mars 2008. Le test ELISA a été utilisé pour la détection des anticorps (IgG, IgM, IgA, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) dirigés contre les antigènes ovulaires du schistosome dans le sérum des patients avant traitement et au cours du suivi.

La prévalence de l'infection a baissé significativement ($p=0,001$) au cours du suivi. Nous avons observé une baisse régulière et significative ($p=0,001$) du taux de l'immunoglobuline IgG4. Par contre nous avons d'abord observé une augmentation significative ($p=0,001$) du taux des immunoglobulines IgG et IgM au quarante cinquième jour, suivi d'une baisse significative ($p=0,0001$) au sixième mois. Au douzième mois du suivi nous avons observé à nouveau une augmentation significative du taux des immunoglobulines IgM ($p=0,03$) et IgG totaux ($p=0,0002$). Nous avons observé une baisse non significative du taux des immunoglobulines IgA et IgG1. Le taux de l'immunoglobuline IgG4 était plus faible chez les sujets négatifs au Kato-Katz au troisième mois ($p=0,004$) et au douzième mois ($p=0,03$) comparé à celui des sujets positifs. Il y'avait une corrélation linéaire positive entre la charge parasitaire et l'immunoglobuline IgG4 avant traitement ($r=0,82$).

L'étude a montré une bonne efficacité parasitologique du praziquantel chez les patients traités. L'immunoglobuline IgG4 est le meilleur marqueur associé à l'efficacité thérapeutique du praziquantel et pourrait être un marqueur de guérison de l'infection à *Schistosoma mansoni*.

Mots clés : Praziquantel, *Schistosoma mansoni*, ELISA, marqueurs, immunoglobulines.

Abstract

The parasitic diagnosis of infection with *Schistosoma mansoni* using the Kato-Katz technique lacks sensitivity in zones with low prevalence of infection or after chemotherapeutic treatment. The objective of this present study was to evaluate the evolution of immunological markers of infection with *Schistosoma mansoni* in patients following treatment with praziquantel in the Kou Valley.

Of 980 subjects recruited, infection with *Schistosoma mansoni* was detected in 216 subjects six years of age or older, through parasitic examination of stools samples using the Kato-Katz method. Those found to be infected were included in the study and received a single dose of praziquantel of 40mg/kg, and followed from February 2007 to March 2008. The ELISA test was used to detect antibodies (IgG, IgM, IgA, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) against the antigens of schistosome eggs in the serum of patients before and after treatment.

The prevalence of infection was significantly reduced ($p=0.001$) during the follow up period. We observed a regular and significant decrease ($p=0.001$) of the level of immunoglobulin IgG4. In contrast, we initially observed a significant increase ($p=0.001$) in the levels of immunoglobulin IgG and IgM after forty-five days, followed by a significant reduction ($p=0.0001$) by the sixth month. After twelve months of follow up, we again observed a significant increase in the levels of immunoglobulin IgM ($p=0.03$) and IgG ($p=0.0002$). We observed a non-significant reduction in the levels of immunoglobulin IgA et IgG1. The level of immunoglobulin IgG4 was lower in subjects testing negative with the Kato-Katz method after three months ($p=0.004$) and after twelve months ($p=0.03$), compared to this of subjects who remained positive. There was a positive linear correlation between parasitic load and immunoglobulin IgG4 level before treatment ($r=0,82$).

The study demonstrated a good efficacy of praziquantel in reducing parasitic infection in treated patients. Immunoglobulin IgG4 is the best marker associated with the therapeutic efficacy of praziquantel in treating *Schistosoma mansoni* and could be a possible cure marker.

Keywords: Praziquantel, *Schistosoma mansoni*, ELISA, markers, immunoglobulins.

Sigles et abréviations

ADN	: Acide désoxyribonucléique
Ag	: Antigène
CAA	: Circulating Anodic Antigen
CCA	: Circulating Cathodic Antigen
CEF6	: Cationic Exchange Egg antigen Fraction 6
CSPS	: Centre de santé et de Promotion Sociale
DO	: Densité Optique
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPG	: Egg Per Gram
Ig	: Immunoglobuline
IgA, IgM	: Immunoglobuline de Classe A, Immunoglobuline de classe M
IgG	: Immunoglobuline de classe G
IgG1, IgG2, IgG3, IgG4	: isotypes 1, 2, 3, 4 de l'immunoglobuline G
IL	: Interleukine
INF γ	: Interféron Gamma
IRSS	: Institut de Recherche en Sciences de la Santé
J ₀ , J ₄₅	: jours de suivi des patients
M ₃ , M ₆ , M ₁₂	: Mois de suivi des patients
NCS	: New-born Calf Serum
OPD	: Ortho-phénylène Diamine
PBS-T	: Phosphate Buffer saline + Tween
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PNLSc	: Programme National de Lutte contre la Schistosomiase
SCI	: Schistosomiasis Control Initiative
SD	: Standard Deviation
SEA	: soluble Egg Antigen
SWAP	: Soluble Worm Antigen Preparation
Th1, Th2	: Lymphocytes T helper 1, 2
TNF α	: Tumor Necrosis factor alpha

1. Introduction

Les bilharzioses ou schistosomiasés sont des affections parasitaires dues à des trématodes du genre *Schistosoma* vivant dans les plexus veineux mésentériques ou vésicaux. Cinq espèces sont pathogènes pour l'homme à savoir: *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mekongi* et *Schistosoma intercalatum*. La pathologie résulte de la réaction inflammatoire provoquée par le dépôt des œufs du parasite dans les tissus de l'hôte définitif (Blanchard, 2004). Les manifestations cliniques sont essentiellement les atteintes hépatiques et l'hypertension portale.

Les schistosomiasés sévissent à l'état endémique dans la plupart des régions tropicales et subtropicales de l'Afrique, de l'Amérique du Sud, de l'Asie, et touchent environ 74 pays du monde (Ross *et al.*, 2002). Elles constituent la deuxième maladie parasitaire après le paludisme (Chitsulo *et al.*, 2000). Selon les statistiques de l'OMS, 200 millions de personnes sont infectées dans le monde, dont 120 millions présentent des symptômes et 20 millions sont atteintes des formes graves et invalidantes (OMS, 1994; Croft *et al.*, 2003). La majorité des cas d'infections, soit 85%, sont répertoriés en Afrique et *Schistosoma mansoni* est responsable de 80% de ces cas (Chitsulo *et al.*, 2000).

Les schistosomiasés sont actuellement en extension dans les pays d'Afrique subsaharienne. Elles sont directement liées au développement agricole et à l'augmentation des réseaux d'irrigation (Fenwick *et al.*, 2006). Au Burkina Faso, les aménagements hydroagricoles et les retenues d'eau naturelles constituent des sites favorisant l'augmentation de la transmission. Face à l'ampleur de la maladie, les pays d'endémie notamment les pays d'Afrique subsaharienne appuyés par l'OMS ont adopté des programmes nationaux de lutte (Hotez *et al.*, 2007). Les stratégies actuelles de lutte sont axées sur le contrôle de la morbidité par la chimiothérapie. Ainsi, le praziquantel est utilisé comme premier médicament de choix dans le traitement de masse des communautés exposées (Garba *et al.*, 2006).

La technique du Kato-Katz est la technique de référence pour le diagnostic parasitologique de l'infection à *S. mansoni* (OMS, 2002). Elle se base sur la mise en évidence des œufs excrétés par le parasite mature dans les selles des patients infectés. Cependant, cette technique manque de sensibilité en cas de baisse de la prévalence et particulièrement en cas de baisse d'excrétion d'œufs suite à un traitement (De Vlas and Gryseels, 1992 ; Pontes *et al.*, 2003). Or, l'utilisation du praziquantel entraîne une baisse d'excrétion des œufs du parasite. Ainsi, après traitement au praziquantel, la technique du Kato-Katz ne permet plus de déceler des cas

d'infections liés à de faibles excrétions d'œufs. Le diagnostic immunologique qui permet la détection des anticorps dirigés contre les œufs du parasite pourrait être un complément à la technique du Kato-Katz.

Notre étude a porté sur l'évolution des marqueurs immunologiques de l'infection à *Schistosoma mansoni* chez des patients après traitement au praziquantel.

2. Généralités sur les schistosomes

2.1. Classification

Les schistosomes sont des métazoaires appartenant à l'embranchement des *Plathelminthes*, à la classe des *Trématodes*, au sous-ordre des *Distomiens* et à la famille des *Schistosomatidae*. Ce sont des vers plats non segmentés, sexués et hématophages. Seize espèces ont été décrites comme étant capables d'infecter les vertébrés en général mais cinq sont pathogènes pour l'homme. Il s'agit de *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. mansoni*, *S. japonicum* et *S. mekongi*.

2.2. Cycle biologique des schistosomes

Les différentes espèces de schistosomes se perpétuent en établissant un cycle dixène (figure 1) comprenant l'infection d'un hôte définitif Vertébré, de spécificité relative, et celle d'un hôte intermédiaire, mollusque d'eau douce très spécifique de l'espèce (Riveau et Dupré, 1999). Le milieu aquatique assure la transmission de ce cycle. L'hôte intermédiaire sert de support à la phase de reproduction asexuée conduisant en quelques semaines (2 à 3 semaines) à la production de milliers de cercaires pour un miracidium ayant infecté le mollusque. Les cercaires constituent la forme larvaire infestante de l'hôte définitif. A la faveur d'un contact de l'eau, elles pénètrent activement par passage percutané. La maturation du parasite et la reproduction sexuée ont lieu chez l'hôte définitif.

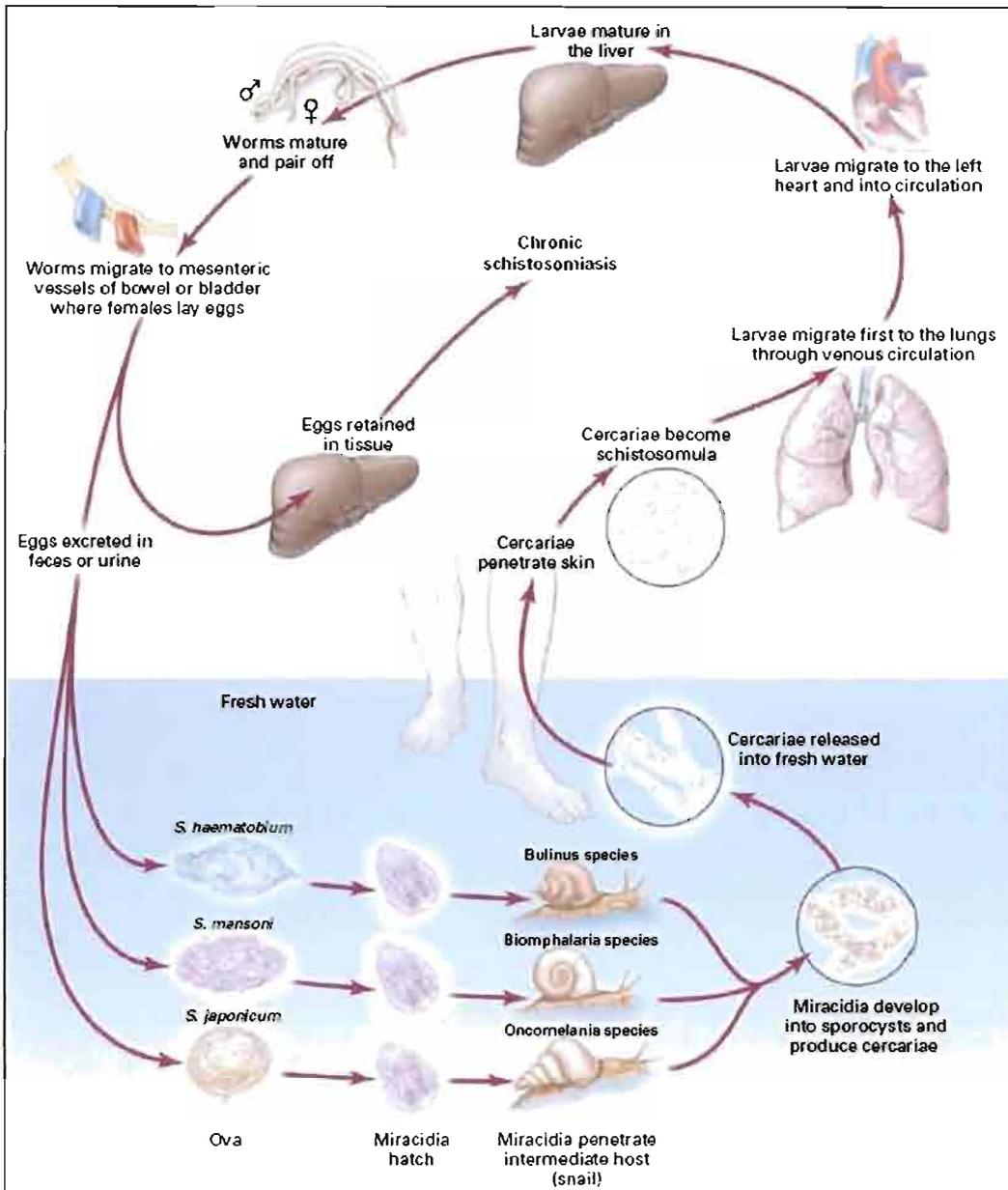


Figure 1: Cycle évolutif de *S. haematobium*, *S. mansoni*, et *S. japonicum*, chez l'homme (Ross *et al.*, 2002).

2.2.1. Les schistosomes adultes

Au stade adulte les schistosomes sont hémato-phages (Zussman *et al.*, 1970). Ils vivent accouplés dans le système circulatoire de l'hôte définitif: veines vésicales pour *S. haematobium* et veines mésentériques pour *S. mansoni*. Cette localisation correspond au lieu de ponte des œufs par la femelle, lieux qui sont respectivement la paroi de la vessie (*S. haematobium*) et celle de l'intestin (*S. mansoni*).

Le mâle de couleur blanchâtre mesure entre 9 et 20 mm de long sur 1 à 2 mm de large contre 12 à 28 mm de long sur 200 µm de large pour la femelle qui est brune. Celle-ci est logée dans le canal gynécophore du mâle. Sur le plan physiologique, la présence du mâle est indispensable (par les substances stimulatrices qu'il sécrète) non seulement pour la maturité physique et sexuelle de la femelle mais aussi au maintien de cet état (Loverde et Chen, 1991 ; Hernandez *et al.*, 2004). La longévité du parasite est estimée à une dizaine d'année, mais des cas de longévité exceptionnellement long de 10 à 20 ans ont été rapportés (Coon, 2005).

2.2.2. L'œuf

A partir de la maturité, la femelle fécondée peut pondre jusqu'à 300 œufs par jour pour la femelle de *S. mansoni* et 3000 à 4000 pour la femelle de *S. haematobium*. Les œufs sont de forme ovoïde, mesurent entre 90 et 200 µm selon les espèces et sont embryonnés (miracidium) à la ponte. Les œufs sont munis d'un éperon dont la position est caractéristique de l'espèce et dont le rôle est de faciliter le passage à travers les tissus après la ponte.

Environ la moitié des œufs s'implante dans le tissu hépatique ou vésical, ce phénomène est à l'origine des manifestations pathologiques. L'autre partie des œufs traverse la paroi intestinale ou vésicale selon l'espèce avant d'atteindre la lumière vésicale ou intestinale. Ils sont aidés par les enzymes lytiques sécrétées par le miracidium, mais aussi par le biais de la réaction inflammatoire déclenchée par le système immunitaire de l'hôte suite à leur présence dans les tissus (Doenhoff *et al.*, 1986). Les œufs qui réussissent ce passage sont excrétés avec les selles ou les urines pour poursuivre leur évolution dans le milieu extérieur : c'est la première forme de dispersion du parasite.

2.2.3. Le miracidium, le sporocyste, les cercaires

Si l'œuf rejeté tombe dans de l'eau dont le pH avoisine la neutralité, de température comprise entre 25 et 30°C, de salinité inférieure à 0,5 g/l et en présence d'un ensoleillement suffisant, il éclot au bout de 8 heures pour *S. haematobium* et 30 heures pour *S. mansoni*. Il libère une forme larvaire, le miracidium, capable d'infecter un gastéropode d'eau douce bien spécifique de l'espèce de schistosome.

Le miracidium est un petit organisme cilié mesurant 300 µm de long sur 100 µm de large. En général, le miracidium nage activement pendant 72 heures au maximum à la recherche du mollusque hôte. Une fois rencontré, il infecte le mollusque au niveau des ses parties tendres (pieds ou antennes). A l'intérieur du mollusque, le miracidium va se multiplier par

sporogonie, donnant successivement naissance aux sporocystes primaires, puis aux sporocystes secondaires (ou sporocystes fils). Cette sporogonie va aboutir au bout de 2 à 3 semaines à la formation de cercaires. A leur maturité, les cercaires sortent du mollusque et nagent activement à la recherche de l'hôte définitif qu'ils doivent rencontrer obligatoirement au bout de 48 heures (N'Goran *et al.*, 1997). La cercaire mesure 125 µm sur 25 µm et constitue la forme infestante du parasite. Elle se déplace dans le milieu aquatique grâce à sa queue bifide mobile (d'où l'appellation "furcocercaire") à la recherche de son hôte définitif.

2.2.4. Le schistosomule

Si la rencontre cercaire-hôte a lieu, la cercaire s'attache à la peau grâce à sa ventouse buccale et déclenche le processus d'invasion. Ce processus est à la fois mécanique (mouvement de sa queue) et chimique (libération de protéases) (Salter *et al.*, 2000), et se termine par une pénétration du corps suivi d'une perte de la queue. La traversée de l'épiderme se fait dans un intervalle d'une trentaine de minutes. Une fois sous la peau, la cercaire se transforme en schistosomule qui va migrer jusqu'à une veinule d'où il gagne les poumons, le cœur puis le foie. Seuls les schistosomules qui atteignent le plexus veineux hépatique pourront mûrir et devenir des schistosomes adultes. Après cela, des couples se forment à ce niveau et il s'en suit une maturation des femelles puis une migration des couples vers le lieu de ponte. Le lieu de ponte varie selon l'espèce et détermine le mode d'excrétion des œufs par l'hôte définitif.

2.3. Les mollusques hôtes intermédiaires des schistosomes

Les hôtes intermédiaires des schistosomes sont des gastéropodes d'eau douce. Les espèces du genre *Bulinus* transmettent *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum*, et celles du genre *Biomphalaria*, *Schistosoma mansoni*; les espèces du genre *Oncomelania* transmettent les Schistosomes du groupe *S. japonicum*, tandis que les gastéropodes du genre *Neotricula* transmettent *S. mekongi*. Ce sont des mollusques hermaphrodites, herbivores et capables d'autofécondation. Ils sont capables d'estivation mais leur durée de vie est environ d'une année. Leur habitat est très varié, allant des collections d'eaux naturelles (lacs, mares, ruisseaux) aux retenues artificielles d'eau telles que les barrages et les canaux d'irrigations.

2.4. Répartition mondiale des espèces de schistosomes

Les différentes espèces pathogènes pour l'homme sévissent à l'état endémique sur les trois continents (figure 2) et déterminent chacune une forme typique de l'affection. Ce sont :

- *Schistosoma haematobium* décrit par Bilharz en 1851 (Coon, 2005) est l'agent de la bilharziose uro-génitale. Son aire de répartition recouvre essentiellement le continent africain, les zones les plus touchées étant la vallée du Nil et la région intertropicale. Cependant, des foyers isolés sont rencontrés au Maghreb, en Inde et au moyen Orient.

Depuis les travaux de Bilharz, quatre autres espèces du genre *Schistosoma* ont été reconnues parasites de l'homme ce sont :

- *Schistosoma japonicum* décrit par Katsurada en 1904 (Coon, 2005) est l'agent de la bilharziose artério-veineuse. Elle est strictement asiatique. Elle sévit : en Chine, à Taïwan, au Japon, en Corée, et aux Philippines.

- *Schistosoma mansoni* décrit par Sambon en 1907 (Coon, 2005) est l'agent de la bilharziose intestinale et parfois hépatosplénique. Elle est la plus répandue dans le monde. Elle est principalement répandue dans la zone intertropicale de l'Amérique latine, aux Antilles et partout en Afrique sauf au Maghreb. Quelques foyers sont retrouvés également au Yémen, en Arabie Saoudite et en Israël.

- *Schistosoma intercalatum* décrit par Fischer en 1934 (Cox, 2002) est responsable de la bilharziose rectale. Strictement africaine, elle est présente en Afrique équatoriale et subéquatoriale. Elle a été signalée ponctuellement au Mali (Drabo, 1990) et au Burkina Faso (Becket R. et Saout J., 1969).

- *Schistosoma mekongi* décrit par Voge en 1968 (Cox, 2002) est l'agent de la bilharziose hépato-mésentérique. Elle n'est retrouvée que dans les quatre pays asiatiques riverains du Mékong à savoir : le Laos, la Thaïlande, le Cambodge et la Malaisie.

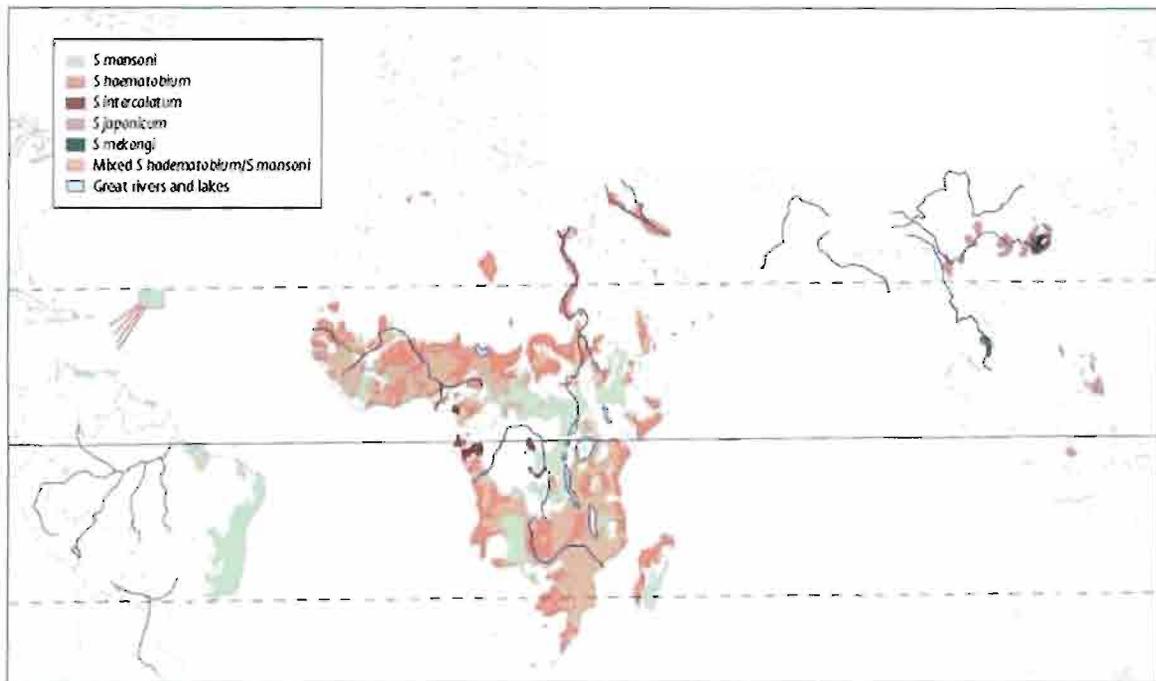


Figure 2 : Distribution géographique des différentes espèces de schistosomes et des foyers d'endémies de schistosomiase humaine (Gryseels, *et al.*, 2006).

Les différentes espèces de schistosomes se distinguent les unes des autres en fonction de caractéristiques telles que la nature du mollusque hôte intermédiaire et la position de l'éperon porté par l'œuf (tableau I).

Tableau I: Caractéristiques principales des cinq espèces de schistosomes infectant l'homme

Schistosomes	Forme de l'œuf	Position de l'éperon	Hôte intermédiaire (genre)	Morbidités majeures
<i>S. haematobium</i>	Ovale	Terminal	<i>Bulinus</i>	Uro-génitale
<i>S. mansoni</i>	Ovale	Latéral	<i>Biomphalaria</i>	Intestinale et hépatosplénique
<i>S. japonicum</i>	Ronde	Latéral (réduit)	<i>Oncomelania</i>	Intestinale et hépatosplénique
<i>S. intercalatum</i>	Ovale	Terminal	<i>Bulinus</i>	Intestinale et rectale
<i>S. mekongi</i>	Ronde	Latéral (réduit)	<i>Neotricula</i>	Artéro-veineuse

2.5. Répartition géographique des schistosomes au Burkina Faso

Les schistosomiasis sont endémiques et figurent parmi les principales affections parasitaires rencontrées au Burkina. Ainsi, elle constitue un problème majeur de santé publique. Elles sont caractérisées par un mode de distribution focale en relation avec le réseau hydrologique du pays (points d'eau naturels et aménagements hydrauliques). Les deux espèces rencontrées sont *Schistosoma haematobium* et *Schistosoma mansoni* (Poda et al., 2004). Les cas de schistosomiasis sont relevés dans tous les districts sanitaires du pays mais celle causée par *Schistosoma mansoni* se rencontre surtout dans les districts du Sud du pays, avec de fortes prévalences dans la partie Sud-Ouest (figure 3).

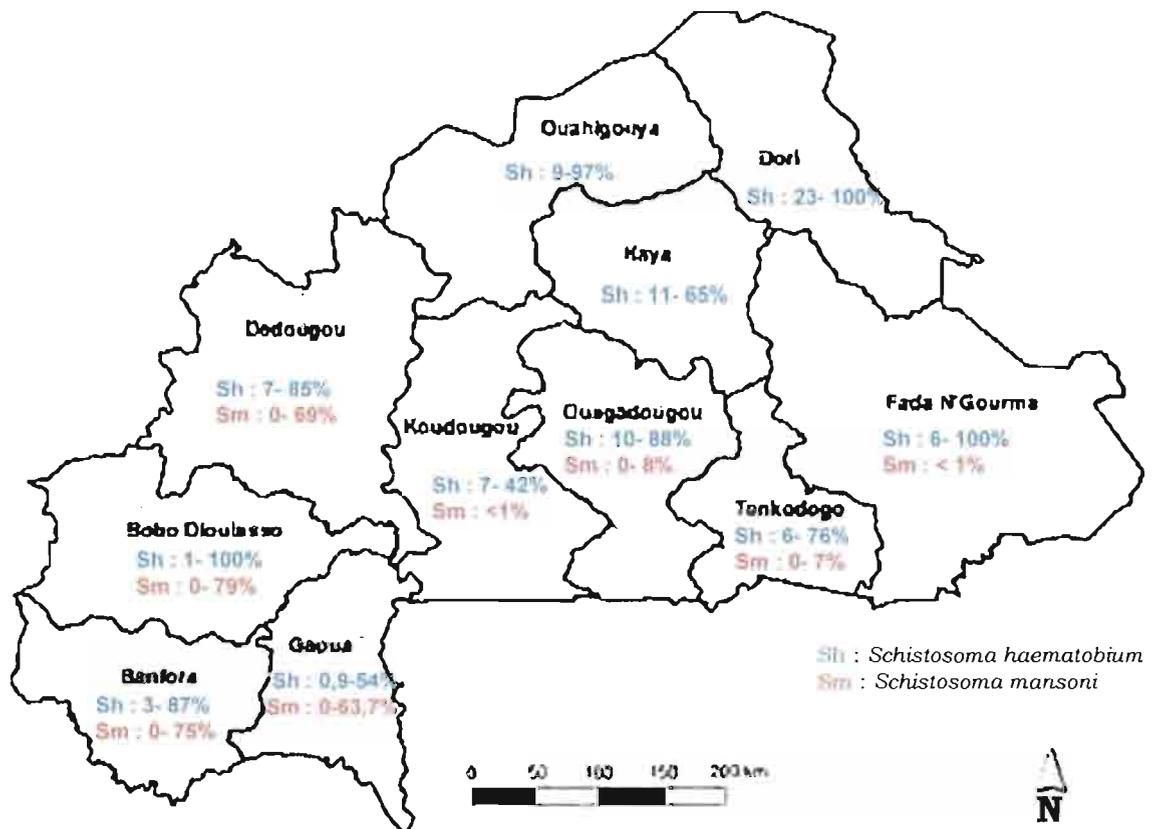


Figure 3 : Données indicatives des prévalences bilharziennes par région sanitaire au Burkina (Poda et al., 2004).

2. 6. Physiopathologie de l'infection et pathologies observées au cours de l'infection par *S.mansoni*.

2.6.1. La physiopathologie de l'infection

Ce sont essentiellement les œufs du parasite qui sont à l'origine des lésions anatomiques et par conséquent des troubles cliniques observés. En effet, les œufs qui traversent les épithéliums des parois vasculaires et des organes creux sous-jacents provoquent ainsi des microsaignements expliquant la présence de stries de sang dans les selles (schistosomiase intestinale). Mais, un certain nombre d'entre eux reste bloqué dans les tissus. Ils sont à l'origine des réactions inflammatoires : le granulome bilharzien ou bilharziome fibroscléreux.

2.6.2. La phase aiguë

La schistosomiase aiguë est une réaction d'hypersensibilité systémique médiée par des complexes immuns dirigés le plus souvent contre le schistosomule en migration dans l'organisme (Gryseels *et al.*, 2006 ; Ross *et al.*, 2007) d'une part, mais aussi contre les œufs déposés dans les tissus de l'hôte d'autre part (Ross. *et al.*, 2002).

Les symptômes surviennent 2 à 9 semaines après l'infection et comportent communément une fièvre, des malaises, des céphalées, des myalgies, une toux non productive, des douleurs thoraciques avec souvent des signes radiologiques évocateurs d'une pneumopathie interstitielle. Des symptômes graves peuvent survenir plus tard : la perte de poids, la diarrhée, les douleurs abdominales et une hépatosplénomégalie. L'ensemble de ces symptômes sont regroupés sous l'appellation de syndrome de KATAYAMA.

2.6.3. La phase chronique

Les principales lésions observées dans la phase clinique sont causées par la présence des œufs. Les œufs retenus dans les tissus sécrètent des antigènes qui induisent une réaction inflammatoire granulomateuse. Le granulome est remplacé progressivement par une fibrose dense. La fibrose conduit à l'obstruction de nombreuses veinules, générant notamment au niveau hépatique une hypertension portale, une hépato-splénomégalie, et la formation de varices œsophagiennes et intestinales pouvant dégénérer en hémorragie mortelle.

2.7. Le diagnostic

2.7.1. Le diagnostic parasitologique

Il repose sur la détection des œufs du parasite dans les selles des sujets infectés en se basant sur la morphologie des œufs. La technique couramment utilisée et recommandée par l'OMS est le Kato-Katz (OMS, 1994). Elle offre de nombreux avantages. Elle est très spécifique, avec une simplicité d'exécution, peu coûteuse et adaptée aux études épidémiologiques. Elle reste la référence pour toutes les autres techniques de diagnostic. Cependant elle manque de sensibilité en zone de faible prévalence de l'infection ou de baisse d'excrétion d'œufs suite à un traitement, d'où la limite de la technique dans le suivi thérapeutique des patients. D'autres méthodes plus sensibles existent mais elles sont coûteuses. Ce sont :

- la méthode de concentration par centrifugation des selles dans une solution de formol et d'éther (Ritchie, 1948 ; Ridley et Hawgood, 1956) ;
- Le test d'éclosion des miracidiums (Werber, 1973). Il consiste à placer l'œuf dans un milieu hypotonique à 30°, il éclot en moins d'une heure pour donner un miracidium. Cette technique a l'avantage de mettre en évidence la viabilité des œufs du parasite;
- La biopsie, elle s'effectue sur la muqueuse intestinale ou vésicale, suivie d'une coloration pour une observation microscopique à la recherche d'œuf. Elle est douloureuse et traumatisante quand elle est mal conduite.

2.7.2. Le diagnostic immunologique

L'immunodiagnostic repose principalement sur la détection des antigènes circulants du parasite ou sur la détection des anticorps de l'hôte en réponse aux antigènes parasitaires.

Les antigènes circulants CAA et CCA proviennent de l'intestin du parasite et sont retrouvés dans le sérum et les urines du patient infecté (Carlier *et al.*, 1975). Ainsi, des anticorps monoclonaux préalablement sensibilisés contre ces antigènes parasitaires sont utilisés dans la détection des antigènes circulants. Une variante de cette méthode existe pour la détection des antigènes circulants: le test d'hémagglutination indirecte (Deelder *et al.*, 1989), le test d'immunofluorescence (De Jonge *et al.*, 1989), l'immuno-test avec des billes magnétiques (Gunderson *et al.*, 1992). La détection des antigènes circulants manque de spécificité (car elle ne distingue pas les antigènes entre les espèces) et de sensibilité en cas de baisse de la prévalence ou de l'intensité de l'infection (Van *et al.*, 1995).

Par contre, la détection des anticorps circulants dans le sérum est une technique très sensible par rapport à la parasitologie et à la détection des antigènes circulants (**Hamilton et al., 1998**). Cette technique utilise des extraits d'antigène des différents stades du parasite (SEA, SWAP, CEF6) pour la détection des anticorps dans le sérum du sujet infecté.

La technique couramment utilisée est le test ELISA avec ses variantes telles le « Western blot », le « Dot blot ». Le principe du test ELISA repose sur l'utilisation d'une immunoglobuline secondaire couplée à une enzyme (le conjugué) pour détecter des anticorps primaires dirigés contre les antigènes du parasite.

Le test ELISA a été retenu pour notre étude afin de déterminer l'évolution des marqueurs immunoglobuliniques anti SEA après traitement.

2.7.3. Autres méthodes de diagnostic

En plus des méthodes ci-dessus, d'autres méthodes de diagnostic existent. On peut citer :

- L'échographie, elle permet d'avoir une image des lésions anatomopathologiques. C'est un outil sans danger, utilisable sur le terrain, fiable et spécifique, notamment en cas de lésions importantes. L'échographie a pour inconvénient de nécessiter des compétences spécialisées ;
- la biologie moléculaire par la PCR. C'est une méthode récente, elle permet une détection de l'ADN du parasite à partir des selles ou du sérum (**Pontes et al., 2002**). C'est une méthode coûteuse qui nécessite également un personnel spécialisé.

2.8. La réponse immune dans la schistosomiase

La souris est particulièrement un modèle de choix pour l'étude des mécanismes cellulaires contrôlant l'infection par les schistosomes. Grâce à ce modèle, il est montré que le profil de la réponse cellulaire est complètement modifié au moment de la ponte des œufs (**Riveau et Dupré, 1999**).

2.8.1. L'immunité cellulaire

Le granulome (figure 4) formé autour des œufs est principalement constitué de monocytes, de macrophages, d'éosinophiles et de fibres de collagènes. Au fur et à mesure que les œufs meurent suite à la réponse immunitaire, le granulome est modulé et remplacé par la formation de plaques fibrotiques.

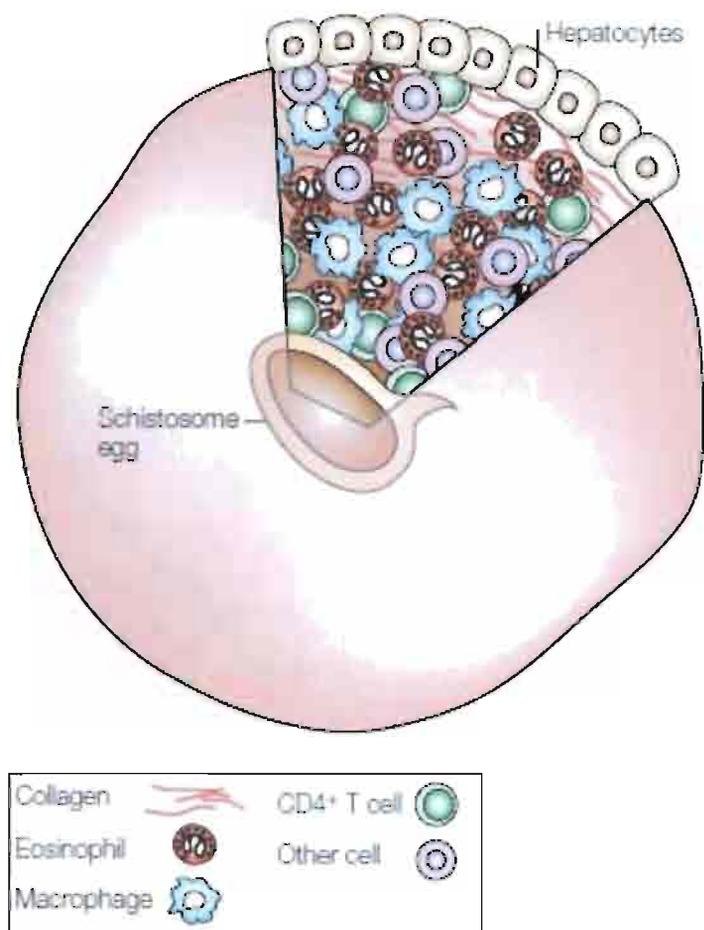


Figure 4: Schéma d'un granulome formé autour de l'œuf (Pearce et MacDonal, 2002).

Au cours de l'infection la réponse immune progresse en trois phases (figure 5). Dans les 3 à 5 premières semaines (première phase), pendant lesquelles l'hôte est exposé à la migration du parasite immature, la réponse cellulaire dominante est de type Th1. Cette réponse caractérisée par une élévation du niveau de cytokines pro inflammatoires, d'interleukines IL -1, IL- 6, IL-12, d'interféron (IFN)-gamma, d'oxyde nitrique (provenant des macrophages et des cellules endothéliales vasculaires) et des TNF-alpha, cette dernière cytokine jouant un rôle clé dans la formation du granulome (Pearce et MacDonald, 2002). Lorsque le parasite devient mature (deuxième phase), s'accouple et commence la ponte des œufs (5 à 6 semaines) la réponse immune change : la composante Th1 décroît considérablement, et cette chute est associée à l'émergence d'une forte réponse cellulaire de type Th2, à laquelle est associée une augmentation du niveau d'interleukines IL-4, IL5, IL-10 et IL-13 (Oswarld *et al.*, 2001). Cette dernière réponse est induite par les antigènes des œufs. Durant la phase chronique (troisième phase) de l'infection la réponse cellulaire de type Th2 est modulée, le granulome

formé autour des œufs diminue de taille par rapport à la phase aigue. La réponse de type Th2 contribue au développement de la fibrose par l'intermédiaire de l'interleukine IL-13 et elle est responsable de la chronicité de l'infection (**Cheever et al., 2000**).

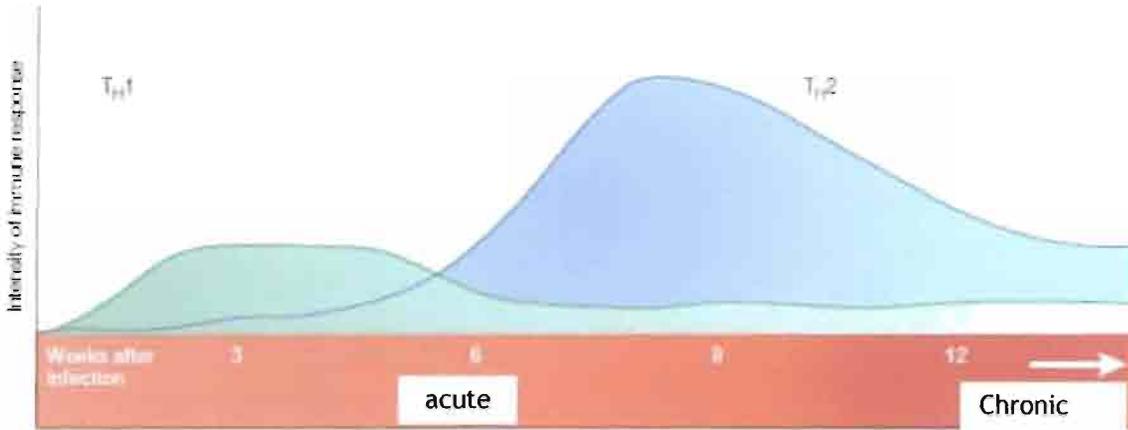


Figure 5 : Schéma du développement de la réponse cellulaire de type Th1 et Th2 au cours de l'infection (**Pearce et MacDonald, 2002**).

2.8.2. La réponse immune humorale

La réponse humorale prédominante observée pendant la phase aigue de l'infection est l'immunoglobuline IgA (**Rabello et al., 1995**). L'immunoglobuline IgA sécrétée au niveau des muqueuses intestinales agit directement contre les œufs du parasite (**Poulain-Godefroy et al., 1996**). Les immunoglobulines IgM et IgG sont observées pendant toutes les phases de l'infection (**Carlos et al., 1997**) de même que les immunoglobulines IgG1, IgG2, IgG3. Ces immunoglobulines agissent donc contre les antigènes du ver et les antigènes des œufs du parasite.

L'immunoglobuline IgG4 est surtout associée à la charge parasitaire (**Abd et al., 2005**). Elle est également impliquée dans la susceptibilité à la réinfection après traitement (**Grogan et al., 1997**). Elle est aussi responsable du changement de la réponse de type Th1 en Th2 (**Pearce et al., 1991**). La réponse de l'immunoglobuline IgG4 absente pendant la phase aigue de l'infection (**Evengard et al., 1990**), est majoritaire pendant la phase chronique de l'infection (**Luciana et al., 2001**).

2.9. Lutte contre les schistosomiasés

2.9.1. Les différents médicaments

Le praziquantel (Biltricide®) recommandé par l'OMS, est le premier médicament de choix contre toutes les schistosomiasés (Cioli et Pica., 2003). Il se présente généralement sous forme de comprimé de 600 mg. La dose indiquée pour le traitement de la schistosomiasé à *S. mansoni* est de 40 mg par kilogramme de poids corporel (OMS, 2002). Il est administré en prise unique et par voie orale. Le praziquantel est une molécule dérivée des pyrazinoisoquinolines. Il augmente la perméabilité membranaire à certains cations mono ou divalents notamment les ions calcium (Ca^{2+}), ce qui induit un afflux des ions Ca^{2+} dans le tégument du schistosome (en une ou deux secondes). Cette action s'accompagne d'une altération des métabolites du ver comprenant une baisse d'incorporation du glucose, du relargage du lactate et des réserves du glycogène et d'ATP. Par la suite, le parasite est détaché des parois des vaisseaux, ce qui rend le parasite vulnérable à l'action du système immunitaire (Clive *et al.*, 1999). Le ver ainsi endommagé meurt. La demi-vie du praziquantel est courte (1 heure à 1 heure 30 minutes) et il n'agit que sur le parasite mature.

Le deuxième médicament est l'oxamniquine (Vansil®). Il est également efficace contre *S. mansoni*. Son rendement est comparable à celui du Praziquantel. Il se présente généralement sous forme de gélules de 250 mg et est administré par voie orale à la dose unique de 15-60 mg par kg de poids corporel.

Quant au métrifonate, il est utilisé dans le traitement de la schistosomiasé urinaire c'est-à-dire contre *S. haematobium*.

2.9.2. Stratégies de lutte contre les Schistosomiasés

Les stratégies mondiales de lutte contre les schistosomiasés reposent principalement sur:

- La chimiothérapie des populations affectées;
- L'éducation pour la santé de la population et la prévention de la contamination des plans d'eau par les matières fécales et les urines;
- Des modifications écologiques : l'assèchement périodique des canaux d'irrigation, la destruction dans les canaux d'irrigation des végétaux dont se nourrissent les mollusques ;
- La prophylaxie individuelle basée sur l'éviction des bains en eaux douces ou saumâtres stagnantes.

La lutte contre la schistosomiase au Burkina était limitée aux traitements des patients consultant dans les centres de santé. Cependant, depuis Mai 2004, le ministère de la santé a lancé un programme national de lutte contre la schistosomiase (PNLSc) en partenariat avec « Schistosomiasis Control Initiative » et soutenu par la fondation « Fondation Bill and Melinda Gate ». L'objectif de ce programme est de contrôler la morbidité par un traitement de masse des communautés exposées à l'infection à l'aide du praziquantel (Garba *et al.*, 2006).

3. Objectifs de l'étude

3.1. Objectif général

Evaluer l'évolution des marqueurs immunologiques chez des patients infectés par *Schistosoma mansoni* après traitement au praziquantel à la Vallée du Kou.

3.2. Objectifs spécifiques

1. Déterminer l'efficacité parasitologique après traitement au praziquantel.
2. Suivre l'évolution des marqueurs immunoglobuliniques après traitement au praziquantel.
3. Identifier le marqueur immunoglobulinique associé à l'efficacité du traitement au praziquantel.

4. Matériel et méthodes

4.1. Type d'étude

Il s'agit d'un suivi longitudinal de patients infectés par *Schistosoma mansoni* résidant à la Vallée du Kou, de février 2007 à mars 2008.

4.2. Site et population d'étude

L'étude s'est déroulée en milieu rural dans la « Vallée du Kou » localité située à 25 Km de Bobo-Dioulasso. C'est une zone aménagée pour la culture du riz. La schistosomiase y est endémique avec une prévalence de l'infection à *Schistosoma mansoni* de 52,7% (Sorgho et al., 2005). Les deux CSPS de la Vallée du Kou ont servi de cadre pour le suivi de nos patients et le Laboratoire de l'IRSS à Bobo-Dioulasso pour le travail de laboratoire. L'étude a porté sur les habitants de la Vallée du Kou des deux sexes d'âge supérieur ou égal à 6 ans.

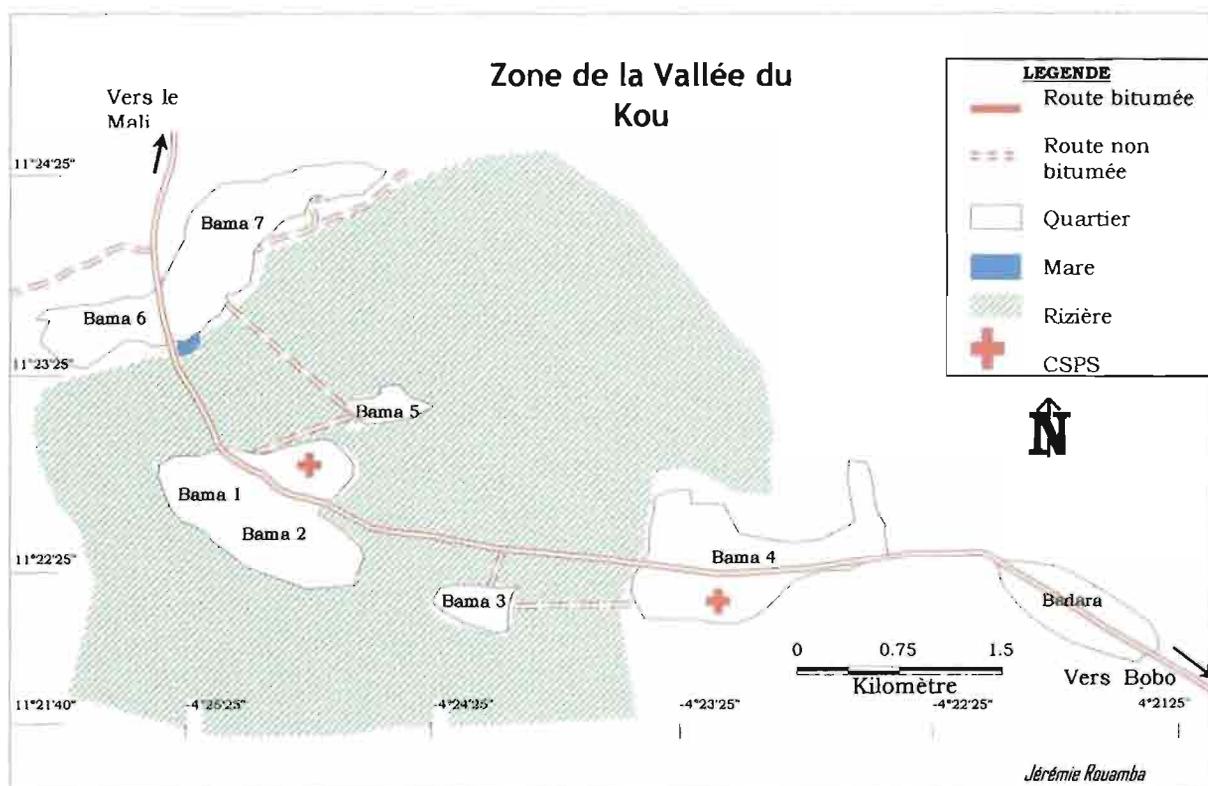


Figure 6: Localisation des deux CSPS de la Vallée du Kou

4.3. Critères d'inclusion et d'exclusion

4.3.1. Critères d'inclusion

Les sujets inclus devaient satisfaire aux critères suivants :

- Avoir au moins 6 ans,
- Etre résident à la Vallée du Kou d'au moins d'une année et consentir à y rester pendant toute la durée de l'étude (12 mois),
- Etre positif à l'examen du Kato-Katz pour la détection de *Schistosoma mansoni*,
- Donner son consentement à participer à l'étude.

4.3.2. Critères d'exclusion

- Les femmes enceintes ou allaitantes,
- Présence d'autres maladies sévères (tuberculose, SIDA etc...).

Le protocole de l'étude a été approuvé par le Comité d'Etique Institutionnel du Centre Muraz.

4.4. Echantillonnage

Un échantillonnage aléatoire sur la base de la prévalence de l'infection à *Schistosoma mansoni* (Sorgho *et al.*, 2005) et de l'effectif de la population, a permis le recrutement de 980 participants. A l'issu des examens parasitologiques 216 patients ont satisfait aux critères d'inclusion. Ces 216 patients ont été inclus pour l'étude. Tous les patients inclus ont été traités avec du praziquantel dès le début de l'étude.

Nos analyses sérologiques ont porté sur 80 patients choisis de façon aléatoire parmi les 216 patients inclus.

4.5. Procédure de collecte du matériel biologique

4.5.1. Collecte des échantillons de selles

Un pot de prélèvement a été remis à chaque participant la veille pour la collecte des selles. Les pots ont été acheminés au laboratoire de l'IRSS (à Bobo-Dioulasso) pour les examens parasitologiques. Les prélèvements ont eu lieu respectivement : avant application du traitement puis au quarante cinquième jour après traitement et aux troisièmes mois, sixième mois et douzième mois après traitement.

4.5.2. Collecte des échantillons de sang

Un volume de 5 ml de sang veineux a été prélevé dans des tubes secs sous vide chez chaque participant. Les échantillons de sang prélevés ont été conservés à 4°C sur « ice-box », puis acheminés au laboratoire. Au laboratoire, après centrifugation du sang à 2000 tours par minute pendant 30 minutes, le sérum est séparé puis aliquoté dans des microtubes stériles et conservé à -20°C jusqu'à utilisation. Les échantillons de sang ont été prélevés avant l'application du traitement et durant les mêmes dates de prélèvement que les échantillons de selles.

4.6. Examen parasitologique

La recherche des œufs de *Schistosoma mansoni* dans les selles a été réalisée par la méthode du Kato-Katz (Katz *et al.*, 1972) ou technique du frottis fécale épais.

➤ Matériel

Il se compose de :

- Lame-porte objet
- Membrane de cellophane
- Cube en verre (servant de moule pour les selles)
- Spatule pour le prélèvement des selles
- Solution de glycérol (voir annexe 1)
- Solution de vert de malachite (voir annexe 1)
- Filtre métallique
- Papier journal

➤ Principe du Kato-Katz

Il est basé sur une coloration des œufs du parasite dans les selles par une solution de glycérol vert de Malachite suivie d'une observation au microscope photonique qui permet d'observer les œufs et de les quantifier dans l'échantillon.

➤ Procédure de l'examen

Une petite quantité de selles est déposée sur du papier journal sur laquelle on applique un filtre métallique pour éliminer les gros débris. On remplit de selles tamisées un calibre déposé sur une lame porte objet à l'aide d'une spatule. Le calibre qui permet de mesurer 41,7mg de matière fécale est retiré et le cube de selles est recouvert avec une membrane de cellophane (4 X 5cm) préalablement trempée dans une solution de glycérol (100 ml glycérol ; 100 ml H₂O ;

1 ml de vert de malachite à 3%) pendant 24 heures. A l'aide d'une seconde lame appliquée perpendiculairement à la première, on étale les selles en couche mince par pression. Les lames sont exposées à la lumière solaire pendant quelques minutes (environ 15 minutes) pour éclaircissement. Ensuite, les lames sont lues au microscope au grossissement 400 (Objectif 40 X oculaire 10). Tous les œufs rencontrés sont comptés. La lecture ayant été faite sur 41,7 mg de matière fécale, le résultat est exprimé en nombre d'œufs par gramme de selle (epg) en multipliant le nombre total d'œufs compté par lame par 24. Deux lames sont préparées pour chaque échantillon, le nombre d'œufs rapportés était la moyenne arithmétique du nombre d'œufs comptés sur les deux lames. Au cas où les lames ne sont pas lues immédiatement après préparation, elles sont rangées dans un coffret sans humidité et à l'obscurité pour éviter un éclaircissement excessif.

L'examen parasitologique des selles a permis de déterminer le nombre de sujets positifs avant le traitement et à chaque date du suivi.

Le taux de prévalence de l'infection (T_p) a été déterminé à partir de la formule suivante :

$$T_p = (N_p \times 100) / \text{Eff}$$

T_p = taux de prévalence

N_p = nombre de sujets positifs

Eff = effectif total de la population examinée et traités

Le taux de négatation après chaque traitement a été déterminé par la formule suivante :

$$T_n = (N_n \times 100) / N_e$$

T_n = taux de négatation

N_n = nombre de sujets négatifs après traitement

N_e = nombre de sujets examinés et traités

L'efficacité parasitologique du praziquantel a été déterminée après chaque traitement. Pour déterminer la charge parasitaire des sujets, le nombre d'œufs par échantillon après chaque observation a été noté. La charge parasitaire moyenne à chaque date de suivi a été ensuite calculée.

Les sujets positifs avant traitement ont été classés en fonction de l'intensité de l'infection (Bergquist *et al.*, 2009) : de 1 à 99 epg (infection légère) ; de 100 à 399 epg (infection modérée) ; ≥ 400 epg (infection forte).

4.7. Test sérologique

Pour suivre l'évolution des marqueurs immunologiques chez les sujets traités, le test sérologique ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) indirect a été réalisé. Le test ELISA a consisté à la détection dans le sérum des patients des anticorps circulants (IgM, IgA, IgG, IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4) dirigés contre les antigènes des œufs de *Schistosoma mansoni* (SEA). Il a été réalisé suivant la méthode décrite par Bahgat *et al.*, (en 2001).

➤ Matériel

Il se compose essentiellement de :

- Sérum des patients ;
- Plaque ELISA de 96 puits en polystyrène de type maxisorp ;
- Antigène SEA fourni par Schistosome Biological Supply Programme, Theodor Bilharz Research Institute, Egypte;
- Sérum de contrôle négatif (cellogmost ® , Dede Behring BA, Germany) ;
- NCS sérum de veau fœtal ;
- Incubateur ;
- Conjugué constitué d'immunoglobulines de chèvre anti humain couplée à la peroxydase (Southern Biotech, USA)
- OPD substrat (OPD, Sigma Fast™, USA)
- H₂SO₄ (4N)
- Spectrophotomètre (µ quant Bio Tek®, USA)

➤ Principe

Le principe du dosage des anticorps repose sur la sensibilisation des puits d'une plaque de 96 puits (figure 7) avec des antigènes solubles extraits du parasite ou des œufs du parasite, de manière à former un immunosorbent. Les anticorps ou immunoglobulines présents dans le sérum à tester se fixent sur les antigènes et forment des complexes qui sont reconnus par un conjugué (anticorps couplé à une enzyme). La révélation est faite à l'aide d'un substrat donnant un produit coloré ; cette coloration est quantifiée sous forme de densité optique(DO) et lue par un spectrophotomètre (figure 8).



Figure 7: Image d'une plaque de microtitration

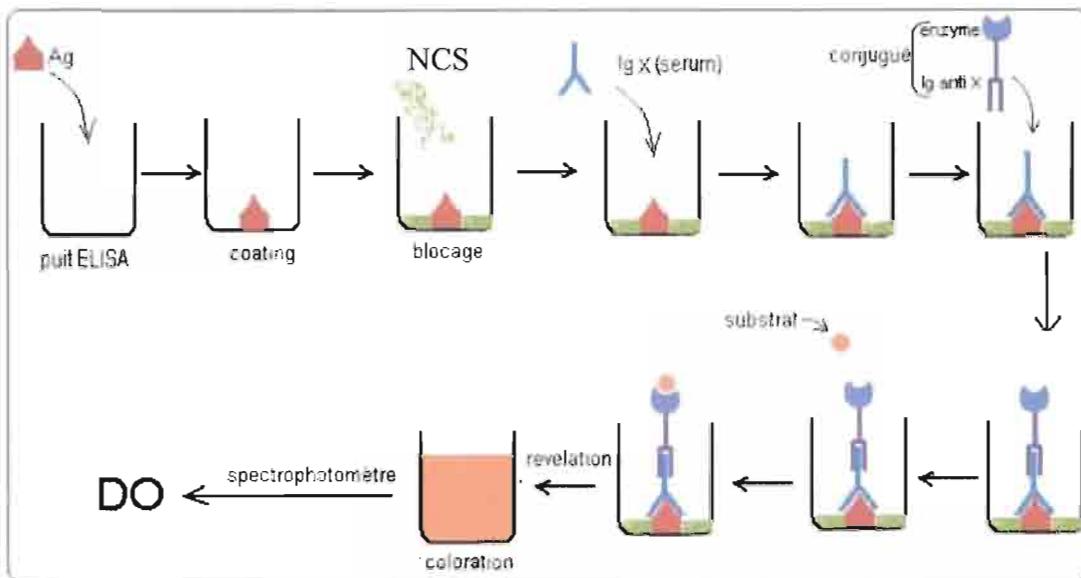


Figure 8: Principe général du test ELISA

Schéma de la plaque pour chaque immunoglobuline

Le schéma de distribution dans la plaque est illustré par le tableau II. Le sérum de contrôle négatif (c), le sérum de vœu foetal (NCS) et le diluant (PBS-T-NCS) sont répartis dans les puits A1, A2, A3, et H10, H11, H12. Les échantillons de sérum sont répartis dans les autres puits.

Tableau II: Schéma d'une plaque ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C	NCS	D	22	30	38	46	54	62	70	77	84
B	1	8	15	23	31	39	47	55	63	71	78	85
C	2	9	16	24	32	40	48	56	64	72	79	86
D	3	10	17	25	33	41	49	57	65	73	80	87
E	4	11	18	26	34	42	50	58	66	74	81	88
F	5	12	19	27	35	43	51	59	67	75	82	89
G	6	13	20	28	36	44	52	60	68	76	83	90
H	7	14	21	29	37	45	53	61	69	C	NCS	D

➤ Procédure de dosage

La mise au point du test a été faite par une série d'essais afin de déterminer la concentration idéale de sérum et d'immunoglobulines anti-humain. Ceci a donc permis une mise au point du test ELISA par titration. Toutes les étapes ci-dessous sont les mêmes pour les différentes immunoglobulines (IgM, IgA, IgG, IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4).

La procédure du dosage est représentée par la figure 9. L'antigène SEA est préalablement dilué dans un tampon carbonate (tampon de coating) à pH 9,6 afin d'obtenir une concentration finale de 1µg/ml. L'antigène dilué est distribué dans les puits des plaques Elisa (figure 8) à raison de 100 µl/puits. Les plaques sont ensuite incubées pendant 3 heures à température ambiante puis conservées toute la nuit à 4°C. Le lendemain matin, les plaques sensibilisées sont lavées trois fois avec 200µl/puits de PBS-T (pH 7,4 ; 0,01M ; PBS 1X contenant 0,05% de tween 20) puis saturées avec 200µl/puits de PBS-T à 5% de NCS. Après une incubation d'une heure à 37°C, les plaques sont à nouveau lavées trois fois avec 200µl/puits de PBS-T. Ensuite, on distribue dans les plaques 100µl/puits de sérum dilué au 1/500 dans du PBS-T-NCS suivi d'une incubation de 2 heures à 37°C. Après lavage des excès d'anticorps non fixés, le second anticorps dilué au 1/1000 dans du PBS-T-NCS est distribué à raison de 100µl/puits. Les plaques sont à nouveau incubées pendant 1 heure à 37°C. Après un dernier lavage, la révélation de la réaction se fait par addition du substrat (mélange d'un comprimé d'Orthophénylène Diamine et de 20 ml d'H₂O distillée) à raison de 100µl/puits suivi d'une incubation de 10 minutes à l'obscurité. Enfin, la réaction est arrêtée avec l'ajout de 30µl de H₂SO₄ (4N)

(figure 10). Les densités optiques sont lues au spectrophotomètre à 490 nm avec un filtre référence de 620 nm.

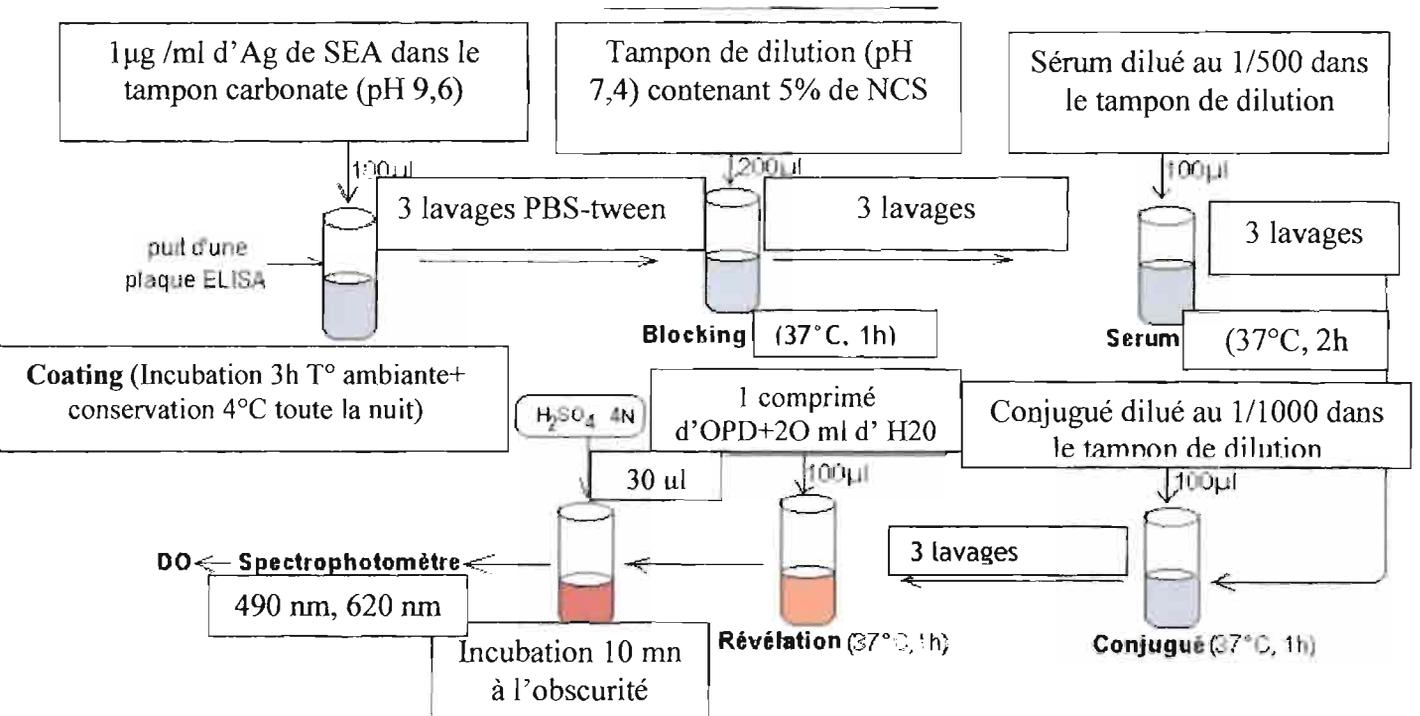


Figure 9 : Procédure du test ELISA



Figure 10: Résultat d'un test ELISA, coloration des puits après arrêt de la réaction.

➤ Critères de validation du test

Le seuil de positivité (cut-off) a été défini pour chaque immunoglobuline comme étant la moyenne géométrique des DO plus 2 déviations standards (DO + 2SD) de l'ensemble des sérums de contrôles négatifs. Tout échantillon présentant une DO supérieure au seuil de positivité est considéré comme positif pour chaque immunoglobuline. Ainsi, les seuils de positivité obtenus sont présentés dans le tableau III.

Tableau III : Seuil de positivité des immunoglobulines

	IgM	IgA	IgG	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Seuil de positivité (DO)	0,25	0,16	0,30	0,17	0,22	0,26	0,28

Le test ELISA a permis de mesurer les densités optiques des différentes immunoglobulines avant et après traitement. La mesure des densités optiques des différentes immunoglobulines à chaque date de contrôle après le traitement a permis de suivre l'évolution de chaque immunoglobuline au cours du suivi.

La comparaison des densités optiques moyennes des différentes immunoglobulines chez les sujets positifs et chez les sujets négatifs au Kato-Katz à partir du quarante cinquième jour après traitement a permis d'identifier le marqueur de guérison.

4.8. Suivi clinique et biologique des patients

Les 216 patients inclus à J₀ ont été traités avec du praziquantel. Ensuite, ils ont été suivis pendant 12 mois (tableau IV) selon le chronogramme suivant : au quarante cinquième jour (J₄₅) après traitement, au troisième mois (M₃), au sixième mois (M₆) et au douzième mois (M₁₂) après traitement.

Le suivi clinique et l'administration du traitement étaient à la charge du médecin de l'équipe de recherche. Le praziquantel a été administré par voie orale à la dose unique de 40 mg par kg de poids corporel (OMS, 2002).

Le suivi biologique a consisté à la collecte des échantillons de selles et de sérums respectivement pour les analyses parasitologiques et sérologiques suivant le chronogramme de suivi. Les résultats des analyses parasitologiques permettaient d'administrer à nouveau la même dose de praziquantel aux patients détectés positifs au cours du suivi.

Tableau IV: Planning des différentes activités de l'étude

Activités réalisées	J ₀	J ₄₅	M ₃	M ₆	M ₁₂
Examen clinique	x	x	x	x	x
Examen parasitologique Kato-Katz	x	x	x	x	x
Sérologie	x	x	x	x	x
Traitement Praziquantel	x	x	x	x	x

4.9. Analyse statistique des données

Les données ont été saisies sur le logiciel Excel 2003 et analysées avec le logiciel Epi info 6.04. Le t-test de Student a été utilisé pour la comparaison des moyennes des charges parasitaires (moyennes arithmétiques) et des densités optiques (moyennes géométriques). Le test du Khi a été utilisé pour la comparaison des taux de prévalence de l'infection. L'outil d'analyse de corrélation du Logiciel Excel 2003 a été utilisé pour déterminer l'association entre la charge parasitaire et le taux de l'immunoglobuline IgG4.

Le seuil de signification des différents tests était de $p < 0,05$.

5. Résultats

5.1. Caractéristiques de la population d'étude

Sur 980 sujets testés, 216 patients ont été détectés positifs à *Schistosoma mansoni* à l'issu des examens parasitologiques des selles. La prévalence de l'infection était donc de 22,04% dans la population. L'inclusion dans l'étude a porté sur les 216 patients positifs. Tous les 216 patients ont été traités avec du praziquantel au premier jour (J₀) et suivis pendant 12 mois. Les sujets détectés positifs au cours du suivi ont été traités avec la même dose de praziquantel. Les caractéristiques des sujets inclus et les prévalences de l'infection au cours du suivi sont présentées dans le tableau ci-dessous (tableau V).

Tableau V: Caractéristiques de la population d'étude au cours du suivi

Caractéristiques de la population	Temps de suivi				
	J ₀	J ₄₅	M ₃	M ₆	M ₁₂
Nombre de sujets examinés	980	201	115	46	157
Nombre de positifs au Kato-Katz	216	27(13,4%)	9(7,8%)	4(8,7%)	18(11,4%)
Age moyen des sujets positifs	23,29±19,42	16,51±10,58	16,66±11,89	10,25±1,5	24,77±17,72
Nombre de femmes positives	118	16	3	4	10
Nombre d'hommes positifs	98	11	6	0	8
Nombre d'enfants positifs de 6-14 ans	114	18	4	4	8
Nombre de sujets positifs >14 ans	102	9	5	0	10

Le suivi parasitologique des 216 patients positifs montre une baisse significative ($\chi^2=224,37$; $p=0,001$) de la prévalence de l'infection au cours du suivi. On observe une chute significative ($p<0,001$) de la prévalence quarante cinq jours après l'administration du premier traitement. Sur 201 sujets examinés au quarante cinquième jour, 27 sujets sont détectés positifs soit un taux de négativation de 86,6%. On observe une baisse non significative ($p>0,05$) de la prévalence entre le quarante cinquième jour et le troisième mois. Cependant, du troisième au douzième mois la prévalence augmente mais de façon non significative ($p>0,05$).

Il n'y a pas de différence significative entre les tranches d'âge des sujets positifs ($p=0,06$) ni entre le sexe des sujets positifs ($p=0,06$) au cours du suivi.

5.2 Intensité de l'infection au cours du suivi

L'évolution de la charge parasitaire au cours du suivi est présentée dans la figure ci-dessous (figure 11). On observe une baisse de la charge parasitaire au quarante cinquième jour suivie d'une évolution en dents de scie entre le quarante cinquième jour et le douzième mois. La baisse de la charge parasitaire observée n'est pas significative.

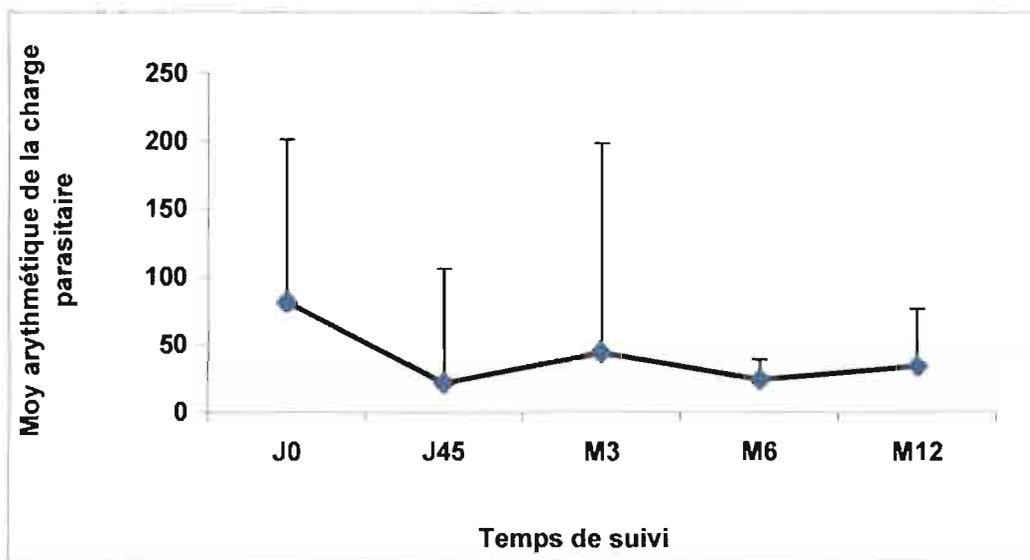


Figure 11: Evolution de la charge parasitaire en fonction des temps de passages.

5.3 Détection des immunoglobulines avant et après traitement

5.3.1 Densités optiques moyennes (DO) des immunoglobulines en fonction de l'intensité de l'infection avant traitement

Les densités optiques moyennes des immunoglobulines de 80 sujets positifs en fonction de l'intensité de l'infection avant traitement sont présentées dans le tableau ci-dessous (tableau VI). On observe entre l'infection légère (1 à 99 epg) et l'infection modérée (100 à 399 epg) une augmentation significative du taux des immunoglobulines IgG ($p=0,008$) et IgG4 ($p=0,02$). Entre l'infection modérée et l'infection forte (≥ 400 epg) on constate une baisse non

significative du taux de l'immunoglobuline IgG et une augmentation non significative du taux de l'immunoglobuline IgG4.

En ce qui concerne les taux des immunoglobulines IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA les augmentations et les baisses observées en fonction des intensités de l'infection ne sont pas significatives.

Tableau VI: DO moyennes des immunoglobulines en fonction des classes d'intensité de l'infection avant traitement

Moyenne géométrique de la DO des immunoglobulines							
classe des epg	IgG	Ig1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	IgM
1-99	1,502 ±0,639	0,340 ±0,583	0,094 ±0,087	0,127 ±0,169	0,621 ±0,799	0,215 ±0,278	1,401 ±0,802
100-399	1,983 ±0,537	0,443 ±0,638	0,099 ±0,090	0,140 ±0,143	1,188 ±0,992	0,233 ±0,290	1,570 ±0,674
≥400	1,332 ±0,429	0,162 ±0,052	0,083 ±0,003	0,118 ±0,013	1,857 ±0,237	0,162 ±0,041	1,095 ±0,505
P	0,025	0,74	0,96	0,95	0,010	0,93	0,62

5.3.2 Evolution des immunoglobulines après traitement en fonction du temps de suivi

La figure 12 ci-dessous montre l'évolution du taux des immunoglobulines IgG, IgM et IgA au cours du suivi. On observe une augmentation significative ($p < 0,001$) du taux des immunoglobulines IgM et IgG entre le premier jour et le quarante cinquième jour après traitement, suivie d'une baisse très significative ($p < 0,0001$) jusqu'au sixième mois de suivi. A partir du sixième mois jusqu'au douzième mois de suivi nous observons à nouveau une augmentation significative ($p < 0,05$) du taux des immunoglobulines IgM et IgG.

Pour l'immunoglobuline IgA on observe une augmentation non significative du taux entre le premier jour et le quarante cinquième jour après traitement, suivie d'une baisse non significative jusqu'au sixième mois. Entre le sixième et le douzième mois le taux de l'immunoglobuline IgA augmente à nouveau mais de façon non significative

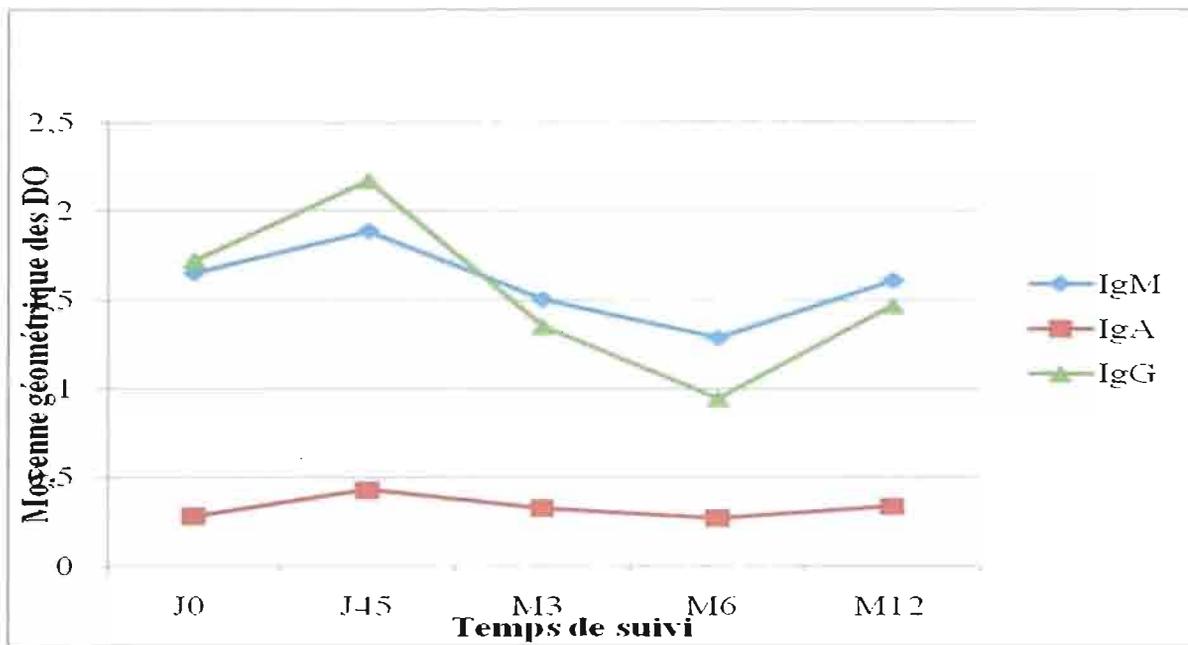


Figure 12: Evolution des DO moyennes des immunoglobulines IgM, IgA et IgG après traitement en fonction du temps de suivi.

La figure 13 ci-dessous montre l'évolution des densités optiques (DO) des immunoglobulines IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 après traitement au cours du suivi. Nous observons une baisse régulière et significative ($p < 0,001$) du taux de l'immunoglobuline IgG4 du premier jour (J_0) de traitement jusqu'au douzième mois (M_{12}) de suivi.

Nous observons successivement une baisse significative ($p=0,008$) du taux de l'immunoglobuline IgG2 entre le premier jour et le quarante cinquième jour après traitement, suivie d'une augmentation très significative ($p<0,0001$) au troisième mois. Nous constatons une baisse non significative du taux de l'immunoglobuline IgG2 entre le troisième et le douzième mois de suivi.

Nous observons une baisse non significative du taux de l'immunoglobuline IgG3 entre le premier jour et le quarante cinquième jour de suivi. Cependant, nous observons une augmentation significative ($p=0,02$) du taux de l'immunoglobuline IgG3 entre le quarante cinquième jour et le douzième mois.

Pour ce qui est du taux de l'immunoglobuline IgG1 nous constatons une baisse non significative entre le premier jour de traitement et le douzième mois de suivi.

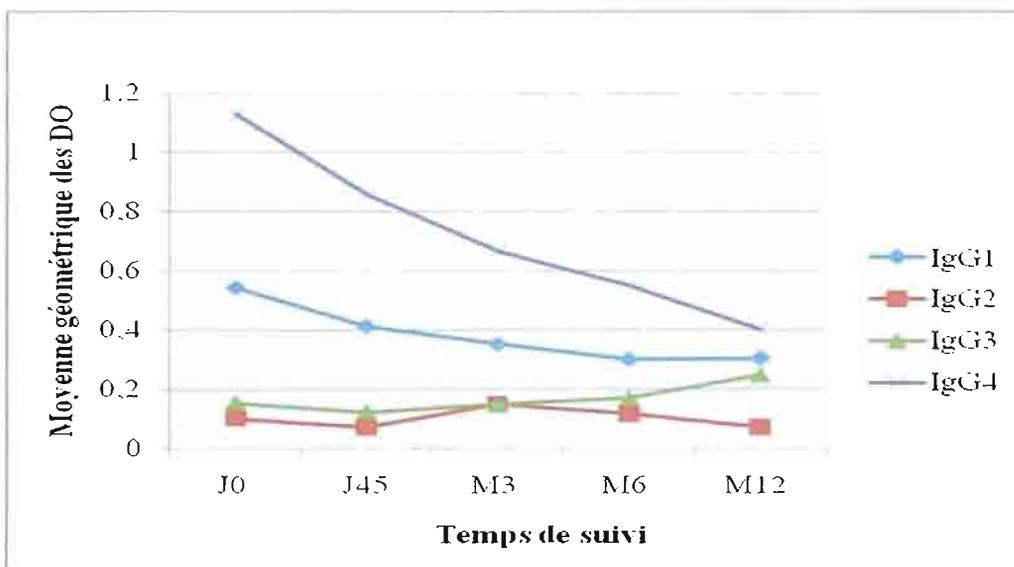


Figure 13: Evolution des DO moyennes des immunoglobulines IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 après traitement en fonction du temps de suivi.

5.3.3 DO moyennes des immunoglobulines après traitement en fonction du statut parasitologique

A partir du quarante cinquième jour après traitement, nous avons déterminé les DO des différentes immunoglobulines en fonction du statut parasitologique de 21 sujets. Ces 21 sujets ont été choisis de façon aléatoire parmi les 80 sujets positifs. Ils ont suivi correctement le

protocole de l'étude pendant les douze mois de suivi. Ces 21 sujets étaient tous négatifs à l'examen du Kato-Katz au sixième mois de suivi.

Le tableau ci-dessous (tableau VII) montre les DO moyennes des immunoglobulines des sujets positifs et négatifs au Kato-Katz parmi ces 21 sujets au quarante cinquième jour de suivi. Les taux des immunoglobulines observés au quarante cinquième jour chez les sujets positifs et chez les sujets négatifs au Kato-Katz ne diffèrent pas significativement.

Tableau VII : DO moyennes des immunoglobulines des sujets positifs et négatifs au Kato-Katz au quarante cinquième jour (J₄₅)

	DO moyenne des Ig des sujets positifs au kato-Katz	DO moyennes des Ig des sujets négatifs au kato-Katz	P
IgG	2,633±0,037	1,753±0,801	0,08
IgG1	0,277±0,172	0,235±0,569	0,37
IgG2	0,074±0,010	0,080±0,011	0,12
IgG3	0,101±0,016	0,109±0,087	0,10
IgG4	1,234±0,307	0,438±0,692	0,26
IgA	0,275±0,086	0,327±0,176	0,49
IgM	2,056±0,440	1,566±0,768	0,19

Le tableau ci-dessous (tableau VIII) montre les taux des immunoglobulines des sujets positifs et négatifs au Kato-Katz au troisième mois de suivi. Le taux de l'immunoglobuline IgG4 observée au troisième mois est significativement plus bas ($p=0,004$) chez les sujets négatifs au Kato-Katz comparé à celui des sujets positifs. Cependant, les taux des immunoglobulines IgG, IgM, IgA, IgG1, IgG2 et IgG3 ne diffèrent pas significativement entre les sujets positifs et négatifs.

Tableau VIII: DO moyennes des immunoglobulines des sujets positifs et négatifs au Kato-Katz au troisième mois (M₃)

	DO moyennes des Ig des sujets positifs au kato-Katz	DO moyennes des Ig des sujets négatifs au kato-Katz	P
IgG	1,267±0,459	0,920±0,427	0,19
IgG1	1,160±0,391	0,227±0,606	0,45
IgG2	0,092±0,015	0,110±0,044	0,24
IgG3	0,130±0,006	0,15±0,173	0,34
IgG4	1,413±0,722	0,440±0,408	0,004
IgA	0,414±0,027	0,360±0,270	0,49
IgM	1,612±0,503	0,982±0,705	0,43

Les DO moyennes des immunoglobulines des sujets positifs et négatifs au Kato-Katz au douzième mois de suivi (M₁₂) sont exposées dans le tableau ci-dessous (tableau IX). Au douzième mois de suivi, le taux de l'immunoglobuline IgG4 est toujours significativement plus bas (p=0,03) chez les sujets négatifs au Kato-Katz comparé à celui des sujets positifs. Par contre, les taux des immunoglobulines IgM, IgA, IgG, IgG1, IgG2, IgG3 ne diffèrent pas significativement entre les sujets et négatifs.

Tableau IX: DO moyennes des immunoglobulines des sujets positifs et négatifs au Kato-Katz au douzième mois (M₁₂)

	DO moyennes des Ig des sujets positifs au Kato-Katz	DO moyennes des Ig des sujets négatifs au Kato-Katz	P
IgG	1,412±0,647	1,099±0,693	0,33
IgG1	0,256±0,173	0,140±0,733	0,48
IgG2	0,065±0,090	0,069±0,015	0,3
IgG3	0,186±0,004	0,193±0,070	0,34
IgG4	0,614±0,540	0,207±0,348	0,03
IgA	0,274±0,013	0,334±0,163	0,18
IgM	1,476±0,675	1,243±0,744	0,43

5.3.4 Analyse de la corrélation entre l'immunoglobuline IgG4 et la charge parasitaire

La figure ci-dessous (figure 14) montre une corrélation linéaire positive entre la charge parasitaire et la DO moyenne de l'immunoglobuline IgG4 des 21 sujets avant traitement. On

constate que l'augmentation de la charge parasitaire est associée à une augmentation du taux de l'immunoglobuline IgG4. On observe une forte corrélation avant le traitement avec $r=0,82$

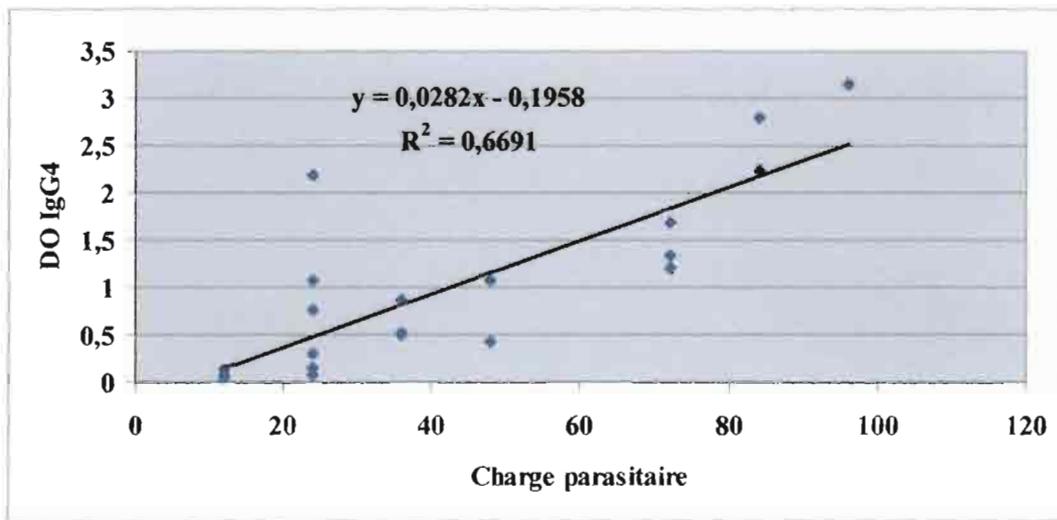


Figure 14 : Corrélation entre la DO de l'immunoglobuline IgG4 et la charge parasitaire avant traitement

6. Discussion

6.1 L'efficacité parasitologique après traitement au praziquantel

Le traitement de nos patients contre la schistosomiase à *S. mansoni* a révélé une bonne efficacité du praziquantel au cours du suivi de nos patients. En effet, la chute significative de la prévalence (13,4%) et la baisse de la charge parasitaire moyenne (de 81,22 à 21,45 epg/g) observées au quarante cinquième jour après traitement pourraient se justifier par l'efficacité parasitologique du praziquantel contre les parasites matures. En outre, nous avons observé un taux de négativation (taux de guérison) de 86,6% au quarante cinquième jour. Nos résultats sont comparables à ceux de **Midzi et al., (2008)** qui ont rapporté des taux de guérison de 85,5% six semaines après traitement au praziquantel de la schistosomiase à *S. haematobium*. La baisse non significative de la prévalence observée entre le quarante cinquième jour après traitement et le troisième mois, et l'augmentation non significative de la prévalence du troisième mois au douzième sont montrées par une évolution en dents de scie de la charge parasitaire. Cette évolution en dents de scie de la charge parasitaire observée entre le quarante cinquième jour et le douzième mois serait due à des cas de réinfections après traitement ou à des formes larvaires du parasite qui ont échappé au traitement. Les formes larvaires peuvent échapper au traitement et arriver à maturité au cours du suivi. En effet, le site de l'étude, étant une zone rizicole et endémique à la schistosomiase à *S. mansoni*, les patients traités peuvent se contaminer quotidiennement au cours de leurs activités dans les rizières et héberger différents stades larvaires du parasite qui arrivent à maturité au cours du suivi et excrètent des œufs. Or, le praziquantel n'est efficace que sur le parasite mature, les formes larvaires peuvent donc échapper au traitement.

6.2 Taux des immunoglobulines avant traitement au praziquantel en fonction de l'intensité de l'infection

Entre l'infection légère et l'infection modérée la réponse des immunoglobulines IgG et IgG4 augmentait significativement avec respectivement $p=0,008$ et $p=0,02$. Mais, quand l'infection était forte (≥ 400 epg) la réponse des immunoglobulines IgG et IgG4 ne variait pas significativement. La réponse de ces immunoglobulines semble être plutôt associée à un niveau d'infection modérée (100 à 399 epg) qu'à un niveau d'infection forte.

Par contre, la réponse des immunoglobulines IgG1, IgG2, IgG3, IgA, IgM à l'infection ne dépend pas de l'intensité de l'infection

6.3 Evolution des immunoglobulines après traitement au praziquantel en fonction du temps de suivi

L'augmentation significative ($p < 0,001$) du taux des immunoglobulines IgG et IgM du premier jour de traitement au quarante cinquième jour du suivi pourrait résulter d'une réaction croisée contre d'autres helminthes ou d'autres parasites chez ces individus (**Hamilton et al., 1998**). Cette augmentation du taux de ces immunoglobulines pourrait être également une réponse contre de nouvelles excrétions d'œufs des parasites qui ont échappé au traitement du premier jour et qui sont arrivés à maturité au quarante cinquième jour de suivi. Par contre, la baisse très significative ($p < 0,0001$) du taux de ces immunoglobulines (IgG et IgM) du quarante cinquième jour au sixième mois pourrait être la preuve d'une bonne réponse au traitement. Nos résultats sont comparables à ceux de **Abd et al., (2005)** qui ont obtenu également une baisse du taux de l'immunoglobuline IgM après 6 mois de traitement au praziquantel.

L'augmentation significative ($p < 0,05$) de la DO des immunoglobulines IgM et IgG du sixième au douzième mois de suivi pourrait être une réponse contre de nouveaux cas d'infection après traitement. En effet, le temps écoulé entre le sixième mois et le douzième mois de suivi (6 mois) est suffisant pour contracter de nouvelles infections surtout pour des sujets vivant en zone endémique.

En ce qui concerne les isotypes de l'immunoglobuline IgG, nous avons observé que la DO de l'immunoglobuline IgG4 a connu une baisse significative ($p < 0,001$) et de façon régulière du premier jour de traitement jusqu'au douzième mois de suivi. Cette baisse du taux de l'immunoglobuline IgG4 pourrait être due à l'effet du traitement. En effet, l'immunoglobuline IgG4 étant un marqueur de chronicité de l'infection à *S. mansoni* (**Luciana et al., 2001**) une telle baisse traduirait une bonne réponse au traitement. Nos résultats sont similaires à ceux de **Luciana et al., 2001** qui ont noté au cours de leur étude une baisse significative du taux de l'immunoglobuline IgG4 après six mois de traitement au praziquantel.

La baisse non significative du taux de l'immunoglobuline IgG1 du premier jour au douzième mois de suivi ne montre pas une réponse spécifique de cette immunoglobuline au traitement. La baisse significative ($p = 0,008$) du taux de l'immunoglobuline IgG2 du premier jour au quarante cinquième jour après traitement serait une bonne réponse au traitement. Par contre, l'augmentation très significative ($p = 0,0001$) du taux de cette immunoglobuline entre le

quarante cinquième jour et le troisième mois pourrait être une forte réponse contre des antigènes ovulaires. De même, l'augmentation significative ($p=0,02$) du taux de l'immunoglobuline IgG3 entre le quarante cinquième jour et le douzième mois de suivi pourrait s'expliquer également par une réponse contre des antigènes des œufs du parasite.

6.4 Marqueur immunoglobuline associé à l'efficacité du traitement

6.4.1. DO moyennes des immunoglobulines en fonction du statut parasitologique

Parmi les différentes immunoglobulines analysées seul le taux de l'immunoglobuline IgG4 était significativement plus bas au troisième mois ($p=0,004$) et au douzième mois ($p=0,03$) chez les sujets négatifs au Kato-Katz. Ainsi, la réponse de l'immunoglobuline IgG4 est plus faible chez les sujets négatifs au Kato-Katz comparée à celle des sujets positifs. Le faible taux de l'immunoglobuline IgG4 chez les sujets négatifs montre que cette immunoglobuline pourrait être le marqueur de guérison de l'infection à *S. mansoni*. Ces résultats confirment ceux de **Vendrame et al., (2001)** qui ont observé une baisse significative du taux de l'immunoglobuline IgG4 après traitement au praziquantel.

Aucune différence significative n'a été observée entre le taux des immunoglobulines IgM, IgG, IgA, IgG1, IgG2, IgG3 des sujets positifs et celui des sujets négatifs au Kato-katz du quarante cinquième jour jusqu'au douzième mois de suivi. Ces marqueurs nous semblent inappropriés pour un suivi thérapeutique.

6.4.2 Corrélation entre l'immunoglobuline IgG4 et la charge parasitaire

L'analyse de nos résultats a montré une forte corrélation linéaire positive ($r=0,82$) avant le traitement entre le taux de l'immunoglobuline IgG4 et la charge parasitaire. La réponse de l'immunoglobuline IgG4 est fortement associée à l'augmentation de la charge parasitaire avant le traitement. Ces résultats corroborent ceux de **Grogan et al., (1996)**; **Abd et al., (2005)** qui ont observé une association de l'immunoglobuline IgG4 avec la charge parasitaire. L'association de l'immunoglobuline IgG4 à la charge parasitaire et son faible taux chez les sujets négatifs au Kato-Katz après traitement montrent que l'immunoglobuline IgG4 est le meilleur marqueur associé à l'efficacité du traitement au praziquantel et pourrait être choisi comme marqueur de guérison de l'infection à *S. mansoni*.

7. Conclusion

La baisse significative ($p < 0,001$) de la prévalence de l'infection au cours du suivi a révélé une bonne efficacité parasitologique du traitement au praziquantel chez nos patients.

Nos résultats ont montré une baisse significative du taux de l'immunoglobuline IgG4 ($p = 0,001$) sous l'effet du traitement. Nous avons noté une corrélation linéaire positive entre la charge parasitaire et la réponse de l'immunoglobuline IgG4 avant traitement. Cette corrélation montre que l'augmentation de la charge parasitaire est associée à une croissance de la réponse de l'immunoglobuline IgG4. De plus nous avons noté parmi les marqueurs (IgG, IgM, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) analysés après traitement que seul le taux de l'immunoglobuline IgG4 était significativement plus bas chez les sujets négatifs au Kato-Katz à partir du troisième mois de suivi jusqu'au douzième mois. L'immunoglobuline IgG4 nous paraît donc être le meilleur marqueur associé à l'efficacité thérapeutique et par conséquent pourrait être un marqueur de guérison de l'infection à *S. mansoni*.

En perspective, nous suggérons pour la suite de l'étude :

- le recrutement de sujets témoins négatifs. L'évolution de l'immunoglobuline IgG4 de ces sujets témoins sera comparée à celle de nos patients sous traitement ;
- une investigation sur le profil de la réponse de l'immunoglobuline IgG4 contre les antigènes du parasite après traitement ;
- l'utilisation de la PCR pour la détection des cas de réinfections au cours du suivi thérapeutique.

8. Références

1. Abd El-Aal AA, El-Arousy MH, El-Gendy AM, Tunkul Ael-K, Ismail SA, El-Badry AA. (2005). Early post-treatment immunoglobulin profile in human schistosomiasis. *J. Egypt Soc Parasitol.*35(1):167-80.
2. Bahgat M., Francklow K., Doenhoff M. J., Li Y. L. , Ramzi R. M. R., Kirsten C. and Ruphel A. (2001). Infection induces antibodies against the cercarial secretions, but not against cercarial elastases of *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum* and *Trichobilharzia ocellata*. *Parasite Immunology* 23: 557-565.
3. Becket R. et Saout J. (1969). La bilharziose intestinale à *Schistosoma intercalatum* en Haute Volta. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 62(13) : 146-150.
4. Bergquist R., Maria V. J. and Utizinger J. (2009). Diagnostic dilemmas in helminthology: what tools to use and when? *Trends in Parasitology* vol.25 N0.4.
5. Blanchard T. J. (2004). Schistosomiasis. *Travel Medicine and infectious Disease* 2: 5-11.
6. Carlier Y., Bout, D., Bina, J.C., Camus, D., Figueiredo, J. F. M. and Capron, A. (1975). Immunological studies in human schistosomiasis. I. Parasitic antigens in urine. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 24: 949-954.
7. Carlos L. P. V., Herminia Y. K., Rita M. D. S., Maria I. P. G. S., Silvia A. G. V. and Eliane T. G. (1997). Efficacy of an Enzyme-Linked Immunosorbent assay in the diagnosis and the serologic distinction between acute and chronic *Schistosoma mansoni* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57(3): 358-362.
8. Cheever, A. W., Hoffmann, K. F. and Wynn, T. A. (2000). Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. *Immunol. Today* 21: 465-466.
9. Chitsulo L., D.Engels, A. Montresor. And Savioli L. (2000). The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Tropica* 7: 41-51.
10. Cioli D. and Pica Mattocci L. (2003). Praziquantel. *Parasitology Research* 90: S3-S9
11. Clive P. Page, Michael J. Curtis, Morley C. Sutter, Brian B. Hoffman, Michael J. Walker. (1999). *Pharmacologie intégrée*. Edition: 2. pp 616. De Boeck Université, 1999.
12. Coon D. R. (2005). Schistosomiasis: Overview of the History, Biology, Clinicopathology, and Laboratory Diagnosis. *Clinical Microbiology Newsletter* vol.27, No.21.
13. Cox.F.E.G. (2002).History of human Parasitology. *Clinical Microbiology Parasitology*. Vol.15 No 4: 595-612.

14. **Croft, S.L, Vivas., L. and Brooker, S.** (2003). Recent advances in research and control of malaria, leishmaniasis, trypanomiasis and schistosomiasis. *East Mediterranean Health Journal* 9: 518-533.
15. **De Jonge, N., Schommer, G., Krijger, F. W., Feldmeier, H., Zwingenberger, K., Steiner, A., Bienzle, U. and Deelder, A. M.** (1989). Presence of circulating anodic antigens in serum of *Schistosoma intercalatum*-infected patients from Gabon. *Acta Tropica* 46: 115-120.
16. **De Vlas, S.J and Gryseels B.** (1992). Underestimation of *Schistosoma mansoni* prevalence. *Parasitol. Today* 8: 274-277.
17. **Deelder, A. M., De Jonge, N., Fillie, Y. E., Kornelis, D., Hlaha, D., Qian, Z. L., Decaluwe, P. and Polderman, A. M.** (1989). Quantitative determination of circulating antigens in human schistosomiasis mansoni using an indirect haemagglutination assay. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 40: 50-54.
18. **Doenhoff M.J., Hassounah O., and Lucas.** (1986). The schistosome egg granuloma: immunopathology in the cause of host protection or parasite survival? *Transaction of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 80: 503-514.
19. **Drabo A.** (1990). Répartition des hôtes intermédiaires au Mali. *Actes conférence International Schisto.-Niger- CERMES/OCCGE*-pp 114-115.
20. **Evengard, B., Hammarstrom, L., Smith, C. I. E. and Linder, E.** (1990). Early antibody response in human schistosomiasis. *Clinical Experimental Immunology* 80: 69-76.
21. **Fenwick, A., Rollinson, D., Southgate.** (2006). Implementation of human schistosomiasis control: challenges and prospects. *Adv. Parasitol.* 61: 567-622.
22. **Garba A., Touré S., Dembelé R., Bosque-Oliva E. and Alan F.** (2006). Implementation of national Schistosomiasis control programmes in West Africa. *Trends and Parasitology* Vol. 22 No. 7.
23. **Grogan, J., L., Kremsner, P., G., Van Dam, G. J., Metzger, W., Mordmulle, B., Deelder, A. M., and Yazdanbaksh, M.** (1996). Anti-Schistosome IgG4 and IgE responses are differentially by chemotherapy in children versus adults. *Journal of Infectious Diseases* 173:1344-1350.
24. **Grogan, J., L., Kremsner, P., G., Van Dam, G. J., Metzger, W., Mordmulle, B., Deelder, A. M., and Yazdanbaksh, M.** (1997). Anti-Schistosome IgG4 and IgE at 2 years after chemotherapy: infected versus uninfected individuals. *Journal of Infectious diseases* 176: 1344-1350.

25. Gryseels B., Polman K., Clerinx J. and Kestens L. (2006). Human schistosomiasis. *Lancet* 368 (9541): 1106-1118.
26. Gunderson, S. G., Haagensen, I., Jonassen, T. O., Figenschau, K. J., De Jonge, N. and Deelder, A. M. (1992). Magnetic bead antigen capture enzyme –linked immunoassay in microtitre trays for rapid detection of schistosomal circulating anodic antigen. *Journal of Immunological Methods* 148: 1-8.
27. Hamilton J. V., M. Klinkert and Doenhoff M. J. (1998). Diagnosis of schistosomiasis: antibody detection, with notes on parasitological and antigen detection methods. *Parasitology* 117: S41-S57.
28. Hernandez D.C., Lim K.C., McKerrow J.H. and Davies S.J. (2004). *Schistosoma mansoni*: sex-specific modulation of parasite growth by host immune signals. *Experimental Parasitology* 106: 58-61
29. Hotez P. J., David. H M., Allan F., Jacob K., Sonia E. S., Jeffrey D. S. And Savioli L. (2007). Control of Neglected Tropical Diseases. *N Engl J Med* 357: 1018-27.
30. Katz N., Chave A. and Pellegrino J. (1972). A simple device for quantitative stool thick smears technique in *Schistosoma mansoni*. *Revista do Instituto de Medecina tropical de Sao Paulo* 14: 397-400.
31. Loverde P.T and Chen L. (1991). Schistosomes female reproductive development. *Parasitology Today* 7 (11): 303-308.
32. Luciana D. G. V., Ana R. and Naftale K.. (2001). Antibody subclass profile and avidity during acute and chronic human *Schistosoma mansoni* infection.
33. Midzi N., Sangweme D., Zinyowera S., Mappingure M. P., Brouwer K. C., Kumar N., Mutapi F., Woelk G., Mduluza T. (2008). Efficacy and side effects of praziquantel treatment against *Schistosoma haematobium* infection among primary school children in Zimbabwe. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medecine and Hygiene* 102: 759-766.
34. N’Goran E., Brémond P., Sellin E., Sellin B. and Theron A. (1997). Intraspecific diversity of *Schistosoma haematobium* in West Africa: chronobiology of cercarial emergence. *Acta Tropica* 66: 35-44.
35. OMS. (1994). The control of schistosomiasis. Report of a WHO Expert Communittee. World Health Organ Tech Rep Ser: 830.
36. OMS. (2002). The control of schistosomiasis. Second report of the WHO Expert committee, World Health Organization Techniacal Report Series N0. 912, WHO, Genova.

37. Oswald IP, Dzois CM, Barlagne R, Fournout S, Johansen MV and Bogh HO. (2001). Cytokine mRNA expression in pigs infected with *Schistosoma japonicum*. *Parasitology* 122: 299-307.
38. Pearce EJ, Caspar P, Grzych JM, Lewis FA and Sher A. (1991). Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *J. Exp. Med.* 173: 159-166.
39. Pearce EJ. and Andrew S. MacDonald. (2002). The immunobiology of schistosomiasis. *Nature Reviews Immunology* vol.2:499-511.
40. Poda J.N., Traoré A. et Sondo B. (2004). L'endémie bilharzienne au Burkina Faso. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 97(1): 47-52.
41. Pontes L. A., Dias-Neto E., Rabello A. (2002). PCR detection of *Schistosoma mansoni* DNA in human fecal and serum samples. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 66: 157-162.
42. Pontes L. A., Maria C. O., Naftale K., Dias-Neto E., and Rabello A.. (2003). Comparison of a polymerase chain reaction and the Kato-katz technique for diagnosing infection with *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68 (6), 652-656.
43. Poulain-Godefroy O., Gaubèrts S., Lafitte S., Capron A., Grzych J. M. (1996). Immunoglobulin A response in murine schistosomiasis: stimulatory role of egg antigens. *Infect. Immun.* 64: 763-768.
44. Rabello, A. L. T., Garcia, M. M. A., Silvia, R. A. P., Rocha, R. S., Chaves, A. and Katz, N. (1995). Humoral immune responses in acute *Schistosomiasis mansoni*: relation to morbidity. *Clinical Infection Disease* 21: 608-615.
45. Ridley D.S. and Hawgood B.C. (1956). The value of formol ether concentration of faecal cysts and ova. *Journal of Clinical Pathology* 9: 74-76.
46. Ritchie I.S. (1948). An ether sedimentation technique routine stool examinations. *Bulletin of the united States Army Medical Department* vol 8 No 326.
47. Riveau G. et Dupré L. (1999). Les Schistosomiasis. *Annales de l'Institut Pasteur / Actualités* 10 (1): 5-26. Elsevier, Paris.
48. Ross A. G.P., Paul B. Bartley, Adrian C. Sleight, G. Richard Olds, Yuesheng Li, Gail M. Williams. and Donald P. McManus. (2002). Schistosomiasis. *N Engl J Med.* Vol. 346, No.16.
49. Ross A.G.P., Vickers D., Olds G.R., Shah S.M. and McManus D.P (2007). Katayama Syndrome. *Lancet Infection Diseases* 7: 218-224.

50. Salter J.P., Lim K.C. Hansell E., Hsieh I., and McKerrow J.H. (2000). Schistosome invasion of human skin and degradation of dermal elastin mediated by a single serine protease. *Journal of Biological Chemistry* 275(49): 38667-38673.
51. Sorgho H., Bahgat M., Poda J.N., Song W., Kirsten C., Doenhoff M.J., Zongo I., Ouédraogo J.B. and Ruppel A. (2005). Serodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infections in an endemic area of Burkina Faso: performance of several immunological tests with different parasite antigens. *Acta Tropica* 93: 169-180.
52. Van L., L., Panday, U.G., De Jonge, N., Krijger, F. W., Oostburg, B. F., Polderman, A. M. and Deelder, A. M. (1995). Immunodiagnostic of schistosomiasis mansoni in a low endemic area in Surinam by determination of the circulating antigens CAA and CCA. *Acta Tropica* 59: 19-29.
53. Vendrame V. C. M. V., Marcia Dias T. C., Célia R. F. Y., Maria C. N., Silvino A. C. and Pedro P.C.. (2001). Evaluation of anti-*Schistosoma mansoni* IgG antibodies in patients with chronic schistosomiasis mansoni before and after specific treatment. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 43: 153-159.
54. Werber M.C. (1973). Miracidial hatching in diagnosis of bilharziasis. *Central African Journal of medicine* 19: 11-17.
55. Zussman R.A., Bauman P. M. and Petruska J. C. (1970). The role of ingested hemoglobin in the nutrition of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Parasitology* 56(1): 75-79.

Annexes

Annexe 1

Procédure de la technique du Kato-Katz

1. Préparation de la solution de glycérol

1. Dissoudre 3 g de vert de malachite dans 100 ml d'H₂O distillée ;
2. Introduire 100 ml de glycérol dans un bécher ;
3. Ajouter 100 ml d'H₂O ;
4. Ajouter 1 ml de la solution de vert malachite à 3%.

2. Préparation des lames de selles

La recherche des œufs de *Schistosoma mansoni* s'est effectuée suivant la méthode de Kato-Katz (Katz *et al.*, 1972).

1. Découper la cellophane en petit morceau d'environ 4x5 cm ;
2. Tremper les morceaux obtenus dans une solution de glycérol (100 ml glycérol ; 100 ml d'H₂O ; 1 ml de vert malachite à 3% ;
3. Laisser tremper pendant au moins 12 heures (24 heures si possible) ;
4. Reporter le numéro de l'échantillon sur une lame porte-objet ;
5. Déposer une petite quantité de selles sur du papier journal ;
6. Appliquer le filtre métallique (ou nylon) sur le morceau de selle pour éliminer les gros débris par tamisage en appuyant avec la spatule ;
7. Déposer le calibre délivrant des cubes de 41,7 mg de selles sur une lame porte-objet ;
8. Remplir de selles tamisées le calibre déposé sur une lame-porte objet à l'aide d'une spatule ;
9. Retirer le calibre ;
10. Recouvrir à l'aide d'une pince le cube de selles avec une membrane de cellophane préalablement trempée dans une solution de glycérol et vert de malachite ;
11. Etaler les selles en couche mince par pression avec une seconde lame. La seconde lame est appliquée perpendiculairement à la première ;
12. Nettoyer si nécessaire l'excès de selles débordant à l'aide de papier hygiénique ;
13. Exposer la lame de selles à la lumière solaire pendant quelques minutes (environ 15 minutes) pour éclaircissement ;
14. Ranger les lames éclaircies dans les boîtes de rangement à l'obscurité pour éviter un éclaircissement extrême qui les rendraient illisibles ;

15. Au cas où les lames ne peuvent pas être lues immédiatement après préparation, elles sont rangées dans un coffret hors d'atteinte de l'humidité et à l'obscurité pour éviter un trop grand éclaircissement ;

16. Etiqueter les boîtes (site d'étude, date et contenu).

3. Lecture des lames de selles

1. Les lames de Kato-Katz ainsi préparées sont lues au microscope au grossissement 400 (objectif 40x oculaire 10) ;
2. Compter tous les œufs de *Schistosoma mansoni* rencontrés ;
3. Enregistrer les résultats dans une fiche adéquate ;
4. La lecture ayant été faite sur 41,7 mg de matière fécale le résultat est exprimé en nombre d'œufs par gramme de selles (egg per gram, « epg ») en multipliant le nombre d'œufs comptés par 24.

Annexe 2

Procédure du test ELISA

Le test ELISA a été suivant la méthode de Bahgat et al., (2001).

Sensibilisation de la plaque (Coating)

- Diluer l'antigène SEA (*Schistosoma* Egg Antigen) dans le tampon de « coating » à pH 9,6 ;
- Introduire 100 µl/puits de plaque de microtitration maxisorp ;
- Incuber à température pendant 3 heures ;
- Garder au réfrigérateur à 4°C toute la nuit ;

Saturation (Blocking)

- Le lendemain matin, laver la plaque trois fois avec du PBS-Tween (pH 7,4 ; 0,01M contenant 0,05% de Tween 20 (PBS-T) ;
- Introduire 200 µl/puits de PBS-T-NCS (PBS-T plus 5% de NCS (sérum de veau fœtal) ;
- Incuber à 37°C pendant 1 heure ;

Test des sérums

- Diluer les sérums à tester au 1 :500 dans du PBS-T-NCS ;
- Introduire 100 µl/puits de sérum dilué ;
- Incuber pendant à 37°C pendant 2 heures ;
- Laver la plaque trois fois avec du PBS-Twee ;

- Diluer le second anticorps qui est un IgG anti-humain au 1 :1000 dans du PBS-T-NCS ;
- Introduire 100 µl/puits de second anticorps dilué dans du PBS-T-NCS ;
- Incuber pendant 1 heure à 37°C ;
- Laver la plaque trois fois avec du PBS-Tween.

Révélation

- Ajouter 100 µl/puits de substrat
- Incuber pendant 10 minutes

Arrêt de la révélation

- Ajouter 20 µl de H₂SO₄ (4 M)

Lecture des densités optiques

- La plaque est lue à 490 nm avec un filtre de référence de 620 nm.

Préparation des solutions tampons pour le test ELISA

Phosphate Buffer Saline (PBS 10X)

Peser:

- Monobasic sodium phosphate: NaH₂PO₄ 3,16 g;
- Dibasic sodium phosphate: Na₂HPO₄ 10,23 g;
- Sodium chloride: NaCl 85,3g ;
- Ajuster le pH à 7,2-7,4 et compléter avec 1 litre d'H₂O distillée.

Tampon de lavage (Washing buffer)

PBS-T 0,05% : 0,5 ml de Tween 20 dans 1 litre de PBS 1X.

Diluant

PBS-T 0,05%-NCS 5% : 5 ml de sérum de veau foetal dans 95 ml de PBS-T 0,05%.

Coating buffer

Il s'agit d'un tampon de Carbonate-Bicarbonate à pH 9,6 :

- 1 M de Sodium bicarbonate (A) : NaHCO₃ 3,4 g dans 100 ml d'H₂O distillée ;
- 1 M Sodium carbonate (B) : Na₂CO₃ 10,6g dans 100 ml d'H₂O distillée;
- Additionner 4,53 ml de (A) + 1,82 ml de (B), ajuster le pH à 9,6 et diluer avec 100 ml d'H₂O distillée.

Solution de peroxydase (OPD)

Dissoudre une tablette de substrat (OPD) dans 20 ml d'H₂O distillée.

Abstract

The parasitic diagnosis of infection with *Schistosoma mansoni* using the Kato-Katz technique lacks sensitivity in zones with low prevalence of infection or after chemotherapeutic treatment. The objective of this present study was to evaluate the evolution of immunological markers of infection with *Schistosoma mansoni* in patients following treatment with praziquantel in the Kou Valley.

Of 980 subjects recruited, infection with *Schistosoma mansoni* was detected in 216 subjects six years of age or older, through parasitic examination of stools samples using the Kato-Katz method. Those found to be infected were included in the study and received a single dose of praziquantel of 40mg/kg, and followed from February 2007 to March 2008. The ELISA test was used to detect antibodies (IgG, IgM, IgA, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) against the antigens of schistosome eggs in the serum of patients before and after treatment.

The prevalence of infection was significantly reduced ($p=0.001$) during the follow up period. We observed a regular and significant decrease ($p=0.001$) of the level of immunoglobulin IgG4. In contrast, we initially observed a significant increase ($p=0.001$) in the levels of immunoglobulin IgG and IgM after forty-five days, followed by a significant reduction ($p=0.0001$) by the sixth month. After twelve months of follow up, we again observed a significant increase in the levels of immunoglobulin IgM ($p=0.03$) and IgG ($p=0.0002$). We observed a non-significant reduction in the levels of immunoglobulin IgA et IgG1. The level of immunoglobulin IgG4 was lower in subjects testing negative with the Kato-Katz method after three months ($p=0.004$) and after twelve months ($p=0.03$), compared to this of subjects who remained positive. There was a positive linear correlation between parasitic load and immunoglobulin IgG4 level before treatment ($r=0,82$).

The study demonstrated a good efficacy of praziquantel in reducing parasitic infection in treated patients. Immunoglobulin IgG4 is the best marker associated with the therapeutic efficacy of praziquantel in treating *Schistosoma mansoni* and could be a possible cure marker.

Keywords: Praziquantel, *Schistosoma mansoni*, ELISA, markers, immunoglobulins.