

T H E S E

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 7 Juillet 1989

PAR Marie-Pierre HAYETTE

T I T R E

ETAT ACTUEL DE LA VACCINATION ANTIPALUSTRE

JURY PRÉSIDENT : Monsieur le Professeur M. ASSICOT

MEMBRE : Mademoiselle le Professeur J. ORFILA

DIRECTEUR : Docteur J. CHANDENIER

THÈSE N°

A Monsieur le Professeur Marcel ASSICOT
Professeur de Biochimie à l'U.E.R. d'Amiens
Biologiste à l'institut Gustave Roussy

Qui me fait l'honneur de présider mon jury.

Je le remercie d'avoir accepté de juger ce travail.

Je lui adresse toute ma gratitude pour avoir guidé mes pas vers
la biologie et pour le soutien constant qui fut le sien tout au
long du concours de l'internat en pharmacie.

A Mademoiselle le Professeur Jeanne ORFILA
Titulaire de la chaire de Bactériologie, Virologie,
Immunologie générale
Biologiste des hôpitaux
Chef du Laboratoire de Bactériologie, Immunologie générale

Qui m'a fait l'honneur de siéger dans mon jury.
Je la remercie d'avoir accepté de juger ce travail.
Quelle soit assurée de ma profonde reconnaissance.

Au Docteur Jacques CHANDENIER
Docteur en Médecine
Assistant de Parasitologie
Responsable du Laboratoire de Parasitologie et
de Mycologie du C.H.U. d'Amiens

Qui m'a fait l'honneur de diriger ma thèse.

Je le remercie du soutien et de la confiance qu'il m'a témoignés
au cours de l'élaboration de ce travail.

Je lui sais gré de ses précieux conseils et lui exprime ma pro-
fonde reconnaissance pour tout le temps qu'il a bien voulu y
consacrer.

Je lui renouvelle toute ma gratitude pour avoir su me transmettre
son goût pour la parasitologie au cours du stage d'internat
effectué sous sa direction.

A mes parents,

à qui je dois tout.
qui n'ont jamais cessé de m'entourer de leur amour
que j'essaierai de ne jamais décevoir

A Marc, mon frère

A tous mes amis,

pour leur fidèle et précieuse amitié.

A Sylviane,

pour sa gentillesse et son dévouement.

A l'ensemble des membres du laboratoire de PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE du
C.H.U. d'AMIENS.

En souvenir de leur chaleureux accueil.

A tous les enseignants d'AMIENS, LILLE et PARIS
qui ont contribué à ma formation

qu'ils trouvent ici le témoignage de ma sincère reconnaissance
et mon profond respect.

SOMMAIRE

ETAT ACTUEL DE LA VACCINATION ANTI-PALUSTRE

	Page
INTRODUCTION	5
I - <u>LE PALUDISME : HISTORIQUE ET ACTUALITE</u>	7
I.1. LE PALUDISME ET LA LUTTE ANTIPALUSTRE A TRAVERS LES AGES	7
I.2. LE PALUDISME EN 1989	12
I.2.1. L'agent pathogène	12
I.2.2. Le cycle plasmodial	12
a. L'étape humaine	12
b. L'étape anophélienne	14
I.2.3. Le vecteur	16
I.2.4. La répartition géographique	17
I.2.5. La clinique	18
I.2.6. Les moyens de lutte	19
I.2.6.1. La lutte antivectorielle	19
I.2.6.2. Les antimalariques	20
I.2.6.2.1. Classification	20
I.2.6.2.2. Les antimalariques disponibles en 1989	20
1. Quinine	20
2. Amino-4-quinoléines	21
3. Amino-8-quinoléines	22
4. Antimétabolites	22
5. Les molécules récentes	24

II - <u>LA VACCINATION ANTIPALUSTRE</u>	27
II.1. RAPPEL SUR LES MECANISMES IMMUNITAIRES INTERVENANT DANS LE PALUDISME	27
II.1.1. La réponse de l'hôte face au parasite	27
II.1.1.1. La résistance naturelle	27
II.1.1.2. La résistance acquise	28
1. Prémunition	28
2. Mécanismes	29
3. Immunité humorale spécifique protectrice	30
- Antisporozoïte	30
- Antistades sanguins	31
4. Immunité cellulaire	32
- Antisporozoïte	32
- Antistades sanguins	35
5. Immunité acquise non spécifique	35
II.1.2. Le parasite face à son hôte : les mécanismes d'échappement	36
II.1.2.1. La localisation intracellulaire	36
II.1.2.2. L'échappement à la reconnaissance	36
1. La diversité antigénique	36
2. Les variations antigéniques au cours du cycle parasitaire	37
3. Les protéines de diversion	37
4. Les variations antigéniques au sein d'un même stade	38
II.1.2.3. Suppression de la réponse immunitaire de l'hôte	38
1. Rôle des antigènes solubles parasitaires	38
2. Les complexes immuns circulants	39
3. L'activation polyclonale	39
II.1.2.4. L'échappement à la réponse de l'hôte	39

II.2. LA VACCINATION	40
II.2.1. Historique	40
II.2.1.1. Les nouvelles approches technologiques	41
1. Production d'anticorps monoclonaux	41
2. Techniques de recombinaison génétique	42
3. Les autres progrès technologiques	42
II.2.1.2. Les nouveaux modèles animaux	43
II.2.1.3. Les cultures cellulaires	44
II.2.2. Les trois axes	45
II.2.2.1. La vaccination anti-sporozoïte	46
1. Les premiers essais sur l'animal	46
2. Les premiers essais sur l'homme	48
3. Structure de la CSP des plasmodies	49
- Identification	49
- Structure	51
- Interprétation	54
4. Obtention de fractions immunogènes	54
5. Trois essais de vaccination sur l'homme	62
- Première tentative (Ballou & coll. 87)	62
- Deuxième tentative (Herrington & coll. 87)	64
- Troisième tentative (Etlinger & coll. 88)	65
6. A la recherche d'épitopes T	67
- Identification d'épitopes T efficaces chez l'homme	68
- Stimulation artificielle des lymphocytes T : quel risque ?	69
7. Conclusion	69

II.2.2.2. La vaccination contre le stade érythrocytaire asexué	70
1. Présentation	70
2. Identification des antigènes protecteurs :	
- Par les anticorps monoclonaux	72
- Par la recherche des protéines du mérozoïte nécessaires à sa pénétration dans l'hématie	73
- Par les sera hyperimmuns de sujets vivant en région endémique	75
- Par les anticorps protecteurs chez un modèle expérimental utilisant les primates	76
3. Vaccination contre les formes érythrocytaires asexuées chez des modèles animaux	76
- Vaccination contre <u>P. yoelii</u> chez la souris	76
- Vaccination contre <u>Plasmamodium-falciparum</u> chez les primates avec des polypeptides purifiés	77
- Vaccination avec des peptides synthétiques ou recombinants.	78
4. Vaccination de l'homme : l'essai de Patarroyo 1988	83
5. Peptides, enzymes et protection	85
6. Conclusion	86
II.2.2.3. La vaccination contres les stades sexués	87
1. Présentation	87
2. le pouvoir immunogène des gamètes : l'immunité bloquant la transmission	88
3. Identification des antigènes cibles par les anticorps monoclonaux :	89
- les antigènes des gamètes	89
- les antigènes du zygote	92
4. Gamètes et variations antigéniques	93
5. Anticorps et immunité bloquant la transmission	94
6. Immunité cellulaire antigamète	95
7. Conclusion	96
III - <u>COMMENTAIRES</u>	97
CONCLUSION	104

INTRODUCTION

Le paludisme représente sans aucun doute, à l'heure actuelle, la maladie infectieuse la plus importante dans le monde, touchant plusieurs centaines de millions de personnes par an, avec, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S.), plus d'un million de décès de jeunes enfants chaque année, pour le seul continent africain.

En France plus de 1 100 cas dont une dizaine de décès ont été déclarés pour la seule année 1988.

Comment ne pas s'interroger, cependant, sur la gravité de cette endémie palustre en 1989, alors que l'on sait que des insecticides et des anti-malariques réputés efficaces ont été synthétisés et largement employés depuis la seconde guerre mondiale ?

A cette question, une seule réponse : la résistance.

- Résistance, d'une part, des vecteurs, les anophèles, au D.D.T.

Apparu dès 1960, ce phénomène a fortement ébranlé l'optimisme des organismes internationaux qui entrevoyaient déjà l'éradication pure et simple de l'affection.

Aucun insecticide n'a à ce jour remplacé, en efficacité, en facilité d'épandage, ni surtout en coût, le D.D.T.

- Résistance, d'autre part, du plus agressif des parasites du paludisme, Plasmodium falciparum, à la chloroquine. Cet antimalarique, qui avait pourtant lui aussi, fait naître les plus grands espoirs après guerre, n'aura pas tenu plus longtemps face à l'affection. En effet, c'est également dès les années 1960, que les premières souches chloroquinorésistantes sont signalées en Asie du Sud-Est et en Amérique du Sud, pour arriver en Afrique en 1975.

Rares, sont aujourd'hui les pays de la zone d'endémie palustre, où nul cas de résistance n'a encore été signalé.

Face à ces deux catastrophes successives, la lutte s'est organisée : on a cherché, et l'on cherche encore actuellement, des produits de remplacement. Les résultats existent mais sont insuffisants.

Ainsi, rapidement, il s'est avéré qu'une autre voie devait venir compléter sinon supplanter l'étude des nouvelles molécules, et tous les efforts se sont alors tournés vers la voie de la vaccination.

Compte-tenu des enjeux, tant sociaux qu'économiques, cette recherche pour la mise au point d'un vaccin anti-palustre a pris à l'heure actuelle une importance considérable : sur tous les continents, des équipes de chercheurs travaillent sur le sujet en utilisant les outils les plus récents, les plus sophistiqués, mais aussi les plus onéreux pour parvenir à des résultats.

Qu'en est-il de ces travaux en 1989 ? Quels sont les axes de recherche retenus ? Quelles méthodes sont utilisées ? Quels résultats ont été obtenus ? Et surtout, quels espoirs sont permis pour demain ?

C'est ce que nous avons voulu savoir à travers une revue de la littérature sur le sujet.

Aussi, la partie la plus importante de notre travail, la seconde, est-elle consacrée à la synthèse des travaux, tant anciens qu'actuels, sur la recherche du vaccin anti-palustre, et ce, après un rappel sur les mécanismes immunitaires intervenant dans l'affection.

Dans la première partie, il nous a semblé intéressant, pour une meilleure compréhension, de resituer le paludisme dans son contexte historique et épidémiologique.

I - LE PALUDISME : HISTORIQUE ET ACTUALITE

I.1. LE PALUDISME ET LA LUTTE ANTI PALUSTRE A TRAVERS LES AGES

Dans sa remarquable historique du paludisme, Golvan (1978) montre bien l'ancienneté de la reconnaissance par les hommes des manifestations de cette maladie parasitaire :

- Faute d'explication, on lui attribue d'abord un caractère surnaturel puisque les sociétés primitives observent ses effets en les rattachant à l'expression d'un châtement divin, et les Egyptiens rendent responsable la déesse SEKHET. Très judicieusement, ces derniers conseillent, pendant la période des pluies, de ne pas s'exposer en plein air après le coucher du soleil.
- Au IV^e siècle avant J.C., HIPPOCRATE décrit les signes cliniques du paludisme dans son premier livre intitulé "Des épidémies", et un siècle plus tard, Diogène de Laërte dépeint pour la première fois une épidémie de paludisme.
- D'autres peuples, Chinois, Indiens, Chaldéens font de nombreuses allusions dans leurs écrits à des infections qui semblent palustres, tandis qu'au XI^e siècle, AVICENNE, médecin iranien, décrit la maladie de façon précise.
- Cependant, au Moyen-Age, toutes les fièvres sont amalgamées et jusqu'en 1630, on classera le paludisme parmi les fièvres intermittentes sous le nom de fièvre des marécages : l'étymologie des deux noms donnés à cette maladie est d'ailleurs très évocatrice puisque palus en latin signifie marais et mala-aria signifie mauvais air en italien.

- 1630, première date importante de la lutte antipalustre puisqu'en Equateur un aristocrate espagnol guérit de sa fièvre après l'absorption d'une décoction d'écorce de quinquina ; ce remède empirique était depuis longtemps utilisé dans le même but par les péruviens. C'est en 1643 que cette potion est introduite à la cour d'Espagne.

- En France, le quinquina fait son apparition sous forme de poudre, appelée "poudre des jésuites" ou "poudre de la comtesse" dont l'amertume est parfois masquée par l'adjonction de vin. En effet, au XVIIIème siècle, le paludisme sévit en Europe et la pharmacopée française s'enrichit du quinquina grâce à Louis XIV qui ne fut pas le dernier à l'utiliser !

- 1820 : seconde date notable où s'illustrent deux pharmaciens PELLETIER et CAVENTOU qui isolent du quinquina l'alcaloïde actif : la quinine. Grâce à son utilisation pendant la campagne d'Algérie, MAILLOT, médecin militaire, guérit les fièvres intermittentes et continues, et découvre les bienfaits de la chimioprophylaxie dont il établira les bases.

- Soixante ans plus tard, Alphonse LAVERAN découvre, à l'hôpital de Constantine, l'agent responsable de ces fièvres : il décrit les éléments parasites et visualise entre lame et lamelle l'exflagellation du gamétocyte mâle. Voici comment il raconte :
 "Le 6 novembre 1880, j'examinaï le sang d'un malade en traitement pour fièvre intermittente à l'hôpital de Constantine, lorsque je constatai, pour la première fois, l'existence de filaments mobiles qui adhéraient aux corps pigmentés et dont la nature animée n'était pas douteuse. J'eus, à ce moment, l'intuition que j'étais en présence des véritables microbes du paludisme et tous les faits, que j'ai observés depuis lors, n'ont fait que confirmer cette impression première". (Repris dans "Laborama" 1987).

- A partir de là, tout s'accélère ainsi que le rapportent Gentilini et Duflo dans leur ouvrage de médecine tropicale (1986) :

- MARCHIAFAVA, CELLI et GOLGI distinguent trois espèces parasites de l'homme : Plasmodium vivax, P. falciparum, P. malariae.

- En 1898, Golgi décrit la multiplication intraérythrocytaire du parasite puis Moss découvre l'existence d'un agent vecteur dont l'appartenance au genre Anopheles sera confirmée par Grassi.
- En 1948, Shortt et Garnham, mettent en évidence des formes exoérythrocytaires à localisation hépatique. Dès lors le cycle est bouclé.
- De son côté, la lutte antimalarique progresse également. Peu avant la seconde guerre mondiale, les premiers antimalariques de synthèse apparaissent grâce aux chimistes allemands, tandis que les premiers essais chimiques s'opèrent entre 1942 et 1943 en Tunisie par DECOURT, DURAND et SCHNEIDER, ainsi que le rapporte CHARMOT (1987). La chloroquine en constitue le chef de file.
- Parallèlement se développe la lutte antivectorielle avec l'utilisation d'insecticides de contact à effet rémanent : le DDT (dichloro diphényl-trichloroéthane) est alors massivement utilisé.
- En 1957, l'organisation mondiale de la santé (O.M.S.) lance un plan d'éradication à l'échelle mondiale, qui, après de rapides succès va s'essouffler : la résistance se développe ! Résistance des vecteurs aux organochlorés dès 1953, suivie, en 1961, par l'apparition des premières souches de P. falciparum chloroquinorésistantes. L'O.M.S. décide en 1968, de réorienter sa politique d'éradication, et cherche désormais les moyens de contenir les effets de la maladie.
- Les années 1970-1972 sont marquées sur le plan thérapeutique, par la synthèse de deux nouvelles molécules actives sur les souches chloroquinorésistantes : la méfloquine et l'halofantrine.
- Néanmoins, devant la longueur et la complexité de la mise au point et des tests nécessaires à l'expérimentation de nouvelles molécules in vivo, il devenait de plus en plus urgent de pouvoir disposer d'outils de laboratoire pour l'expérimentation de nouvelles drogues. L'avènement de techniques d'entretien du parasite in vitro, et la découverte de nouveaux modèles animaux furent à la base des développements actuels de la lutte antimalarique :

- En 1976, TRAGER et JENSEN réalisent la culture des stades sanguins de P. falciparum.
- En 1985, MAZIER reproduit in vitro le développement intrahépatique de P. falciparum.
- L'année 1987 est marquée par une double tentative de vaccination de l'homme contre P. falciparum :
 - . L'expérience de BALLOU utilise un peptide recombinant dérivé du sporozoïte de P. falciparum sur 15 volontaires.
 - . HERRINGTON prend un peptide de synthèse également dérivé du sporozoïte de P. falciparum pour réaliser l'essai sur 35 volontaires.
- L'année 1988 est également marquée par deux essais de vaccination chez l'homme contre P. falciparum.
 - . ETLINGER utilise un peptide à peu près identique à celui utilisé par HERRINGTON en 1987, et le teste sur 11 volontaires.
 - . L'équipe colombienne de PATARROYO fait un essai sur 13 volontaires, en utilisant un mélange de peptides synthétiques dérivés des stades mérozoïtes et sporozoïtes de P. falciparum.

Ainsi, depuis la nuit des temps le paludisme est connu, depuis plus d'un siècle l'agent en est identifié, et depuis près de cinquante ans des produits de lutte actifs sont synthétisés.

La maladie continue pourtant de sévir avec la gravité que l'on sait.

Il semble donc logique que les efforts se multiplient actuellement pour mettre au point l'arme absolue de la lutte contre n'importe quelle pathologie infectieuse : le vaccin.

Avant d'aborder ce sujet, thème principal de notre travail, il nous paraît important de regarder comment se présente l'affection palustre aujourd'hui, en 1989.

I.2 - LE PALUDISME EN 1989

I.2.1. L'agent pathogène

Celui-ci est un protozoaire du genre Plasmodium, dont on distingue quatre espèces parasites de l'homme : P. vivax, P. ovale, P. malariae, P. falciparum.

Ces quatre espèces se caractérisent par une très forte spécificité hôte-parasite : l'homme constitue donc l'unique "réservoir de virus".

Au cours du cycle, l'hématozoaire revêt différentes formes morphologiques correspondant chacune à un stade bien précis (cf figure 1).

I.2.2. Le cycle plasmodial (cf figure 2)

Le cycle nécessite deux hôtes successifs reliés par une piqûre, celle de l'insecte vecteur. On n'évoquera pas les deux autres modes de transmission, congénital et transfusionnel, dont l'incidence épidémiologique reste faible.

a. L'ETAPE HUMAINE

Elle commence après la première piqûre infestante du moustique, qui, en prenant son repas sanguin, libère dans le flux circulatoire de la victime de très nombreux sporozoïtes. Ceux-ci mettent environ 30 minutes pour gagner le foie où ils effectuent leur première schizogonie exoérythrocytaire dans les hépatocytes. Le noyau du parasite subit alors plusieurs divisions et à maturité, chaque noyau s'entoure de cytoplasme pour former un schizonte géant appelé corps bleu. Celui-ci éclate en libérant de très nombreux mérozoïtes qui vont s'emboliser dans les capillaires sinusoidaux et passer dans la circulation. Par ailleurs, selon les espèces, on distingue plusieurs schémas :

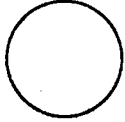
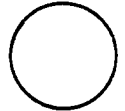
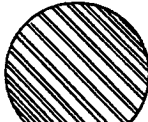

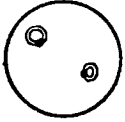
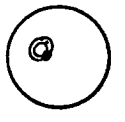



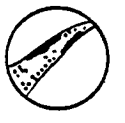


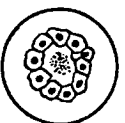
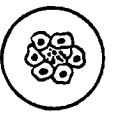
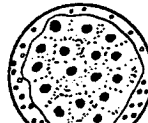



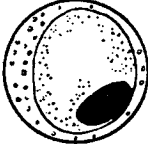
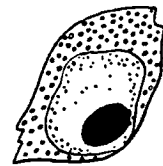
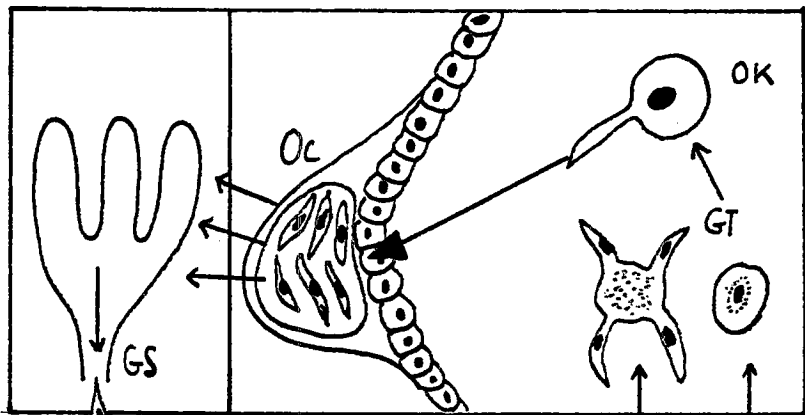
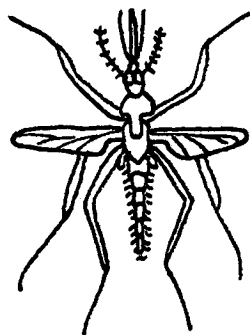
NOM	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>
DIAMÈTRE et affinités tinctoriales de l'hématie parasitée	 normal normochrome	 hématie rétractée normochrome	 grande hématie polychromatophile	 hématie ovalisée, polychromatophile.
TROPHOZOITE ou SCHIZONTE jeune	 bi- ou tri-parasitisme fréquent		 grains de Schüffner	 grains de Schüffner
SCHIZONTE AGÉ	 dans les capillaires viscéraux	 bande équatoriale, pigment gros	 pigment fin	 pigment assez gros
CORPS EN ROSACE	 dans les capillaires viscéraux	 6 à 8 mérozoïtes	 16 mérozoïtes	 8 à 10 mérozoïtes
GAMÉTOCYTE				
RYTHME DES ACCÈS	48 heures TIERCE MALIGNE	72 heures QUARTE BÉNIGNE	48 heures TIERCE BÉNIGNE	48 heures TIERCE BÉNIGNE
COMPLICATION	ACCES pernicieux Bilieuse hémaglob.	exceptionnelle néphrite quintane	exceptionnelle	exceptionnelle
RECHUTES	PAS de RECHUTES	RECHUTES (60 ans)	RECHUTES (5 ans)	RECHUTES (2 ans)

Figure 1 - Principaux caractères des plasmodies humaines (d'après Golvan 1978)

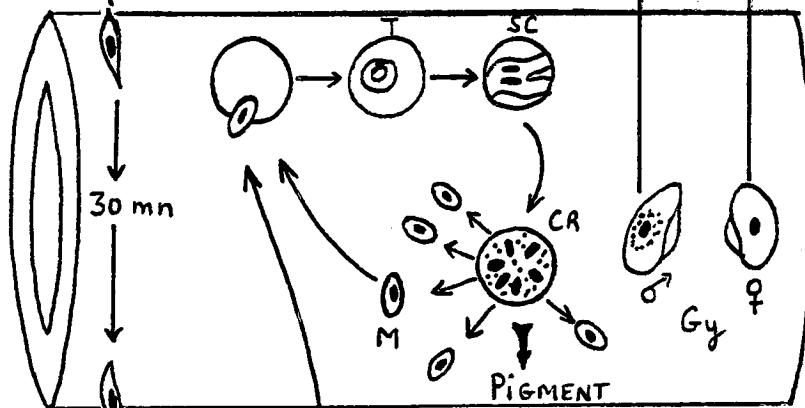
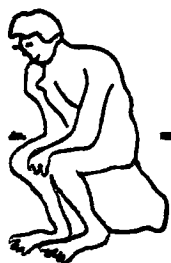
Anophèle



CYCLE
SPORO GONIQUE
OU
CYCLE ANOPHELIEN
SEXUÉ.

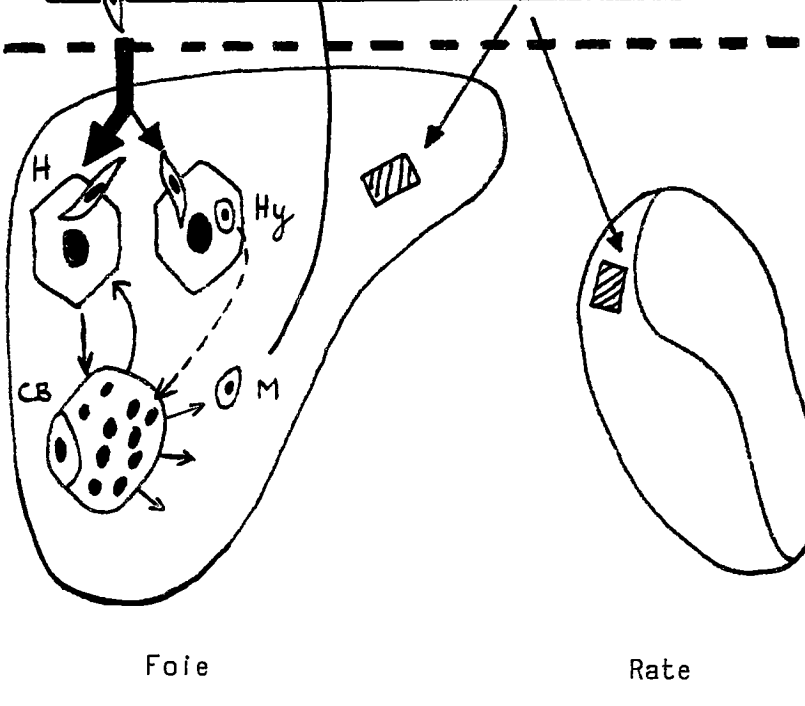
Homme

sang



Cycle
SCHIZOGONIQUE
OU
CYCLE HUMAIN ASEXUÉ

viscères



Foie

Rate

CB=Corps bleu
CR=Corps en rosace
GS=Glandes salivaires
GT=Gamète

Gy=Gamétocyte
H=Hépatocyte
Hy=Hypnozoïte
M=Mérozoïte

Oc=Oocyste
OK=Ookinète
S=Schizonte
T=Trophozoïte

Figure 2 - Cycle du paludisme

- pour P. ovale et P. vivax on décrit :

- . des sporozoïtes à développement immédiat

et

- . des sporozoïtes à développement lent appelés hypnozoïtes, restant à l'état quiescent dans les hépatocytes et à l'origine des rechutes. Ce phénomène serait génétiquement déterminé et variable selon la souche.

- pour P. malariae, les reviviscences s'expliqueraient par un autre mécanisme, à savoir la persistance d'une parasitémie infraclinique susceptible de réaugmenter sous l'effet de phénomènes non encore identifiés. (Gentilini et coll. 1984)

- pour P. falciparum il n'y a pas de rechutes.

Une fois dans le flux sanguin, les mérozoïtes après adhésion à l'hématie y pénètrent pour se transformer en trophozoïtes. Leur cytoplasme grossit, le noyau se divise pour former un schizonte, puis, à maturité, un corps en rosace, dont le centre, occupé par l'amas pigmentaire, est entouré de nombreux mérozoïtes. L'éclatement des corps en rosace, coïncidant avec le pic fébrile, libère les mérozoïtes et le pigment palustre. Selon que les schizogonies sont synchrones ou non, les accès fébriles seront continus ou intermittents. La période apyrétique dure 48 h pour P. ovale, P. vivax, P. falciparum, et 72 h pour P. malariae.

Après un certain nombre de cycles schizogoniques érythrocytaires, une partie des schizontes mûrs évolueront vers les formes sexuées, gamétocyte mâle et femelle, dont la fusion ne s'opérera que chez l'anophèle ; l'homme est devenu "réservoir de virus" : il abrite le protozoaire en lui permettant de se développer et devient potentiellement infectieux.

La schizogonie érythrocytaire de P. falciparum possède la particularité de se situer essentiellement dans les capillaires viscéraux pour créer une anoxie tissulaire. Celle-ci prédomine au niveau de l'encéphale, c'est le neuropaludisme, puis atteint le rein et le foie. Elle s'explique par un triple mécanisme : anémie hémolytique, troubles de la microcirculation et phénomène cytotoxique. La parasitémie élevée conditionne la gravité de l'anémie hémolytique. Kaul (1985) ont démontré le rôle indispensable de structures particulières, "les knobs", dans la survenue des microthromboses. Les knobs sont des protubérances apparaissant en surface des hématies parasitées, les rendant adhérentes aux cellules endothéliales des capillaires avec obstruction progressive de la lumière vasculaire.

Les hématies agglutinées vont se lyser, en libérant une substance phospholipidique qui amorce un processus de coagulation intravasculaire disséminée (C.I.V.D.). Enfin, la libération de substances vasoactives (kinine, sérotonine, histamine) aggravera ces troubles de la microcirculation.

Les phénomènes d'anoxie cytotoxique sont la conséquence de l'inhibition des processus de respiration cellulaire et de phosphorylation oxydative par un poison élaboré par le parasite appelé substance plasmatique de Mac Graith. Des troubles hydroélectrolytiques sont susceptibles d'aggraver le tableau.

b. L'ETAPE ANOPHELIENNE

L'anophèle femelle s'infeste en piquant un homme impaludé et bien que tous les stades parasitaires soient ingérés, seuls les gamétocytes survivent à la digestion. Après l'exflagellation du gamétocyte mâle, celui-ci fusionne avec le gamète femelle pour donner un ookinète mobile, qui traverse la paroi de l'estomac du moustique pour se loger au niveau de la face externe et prendre le nom d'oocyste. Après 5 à 6 jours de maturation se forme un sporocyste dont la rupture libérera plusieurs milliers de sporozoïtes qui vont gagner les glandes salivaires du moustique.

L'étude immunologique des différents stades a révélé que les transformations morphologiques s'accompagnaient de modifications antigéniques.

Grâce à l'analyse biochimique, on a identifié les protéines supportant l'activité antigénique :

- ainsi, les sporozoïtes se caractérisent par leur "Circumsporozoïte protéine" (CSP), qui est une protéine présente à la surface de la membrane du protozoaire. Celle-ci, très antigénique, a vu sa structure précisée dès que l'on a réussi à cloner le gène codant : Hyde et coll 1981, Dame et coll 1984 pour P. falciparum, Osaki et coll 1983 pour P. knowlesi, Arnot et coll 1985 pour P. vivax.
- Les mérozoïtes sont caractérisés par l'expression de protéines de surface spécifiques dont certaines possèdent un caractère antigénique (Cheung 1986). D'autre part, on sait que lors de l'invasion du mérozoïte dans l'hématie, plusieurs protéines sont déposées en surface du globule rouge et sont pour certaines de bons supports antigéniques (Mendis en coll. 1987 et Berzins et coll. 1986).
- Les schizontes libèrent des antigènes solubles qui donnent lieu à la synthèse d'anticorps (Schofield et coll. 1985).
- Les gamétocytes et les ookinètes expriment en surface des antigènes dont certains sont des supports antigéniques (Vermeulen et coll 1985).

Si cette analyse moléculaire doublée de l'étude immunologique sert de base à la recherche d'un vaccin, elle permet également de mieux comprendre la biologie du parasite. En effet, certains mécanismes d'échappement à la réponse immune sont dus à des variations antigéniques. De plus, certains mécanismes de résistance aux antimalariques ont un déterminisme génétique, opérant principalement par mutation chromosomique : la pression médicamenteuse intervenant pour sélectionner les souches résistantes.

1.2.3. Le vecteur

Les caractéristiques biologiques des anophèles vecteurs, parfaitement détaillées par Golvan (1978), conditionnent l'épidémiologie du paludisme.

- le vecteur du paludisme est un Culicidae du genre Anopheles appartenant à la sous-famille des Anophelinae.
- Seules les femelles sont hématophages et participent au cycle parasitaire. Bien que l'ingestion de sang ne soit pas vitale, elle participe à la pérennité de l'espèce en déclenchant les pontes.
La femelle pond à la surface des eaux. Là les oeufs se transforment en larves, puis en nymphes avant d'atteindre le stade adulte : cette évolution dure environ dix jours. Les gîtes de pontes varient, par ailleurs selon les espèces.
- deux facteurs écologiques majeurs influencent la biologie des anophèles : la température et le degré hygrométrique. Ainsi la période d'activité varie selon la zone climatique ce qui explique l'endémie palustre de la zone équatoriale, les flambées épidémiques en zone tropicale et les épidémies saisonnières dans les zones tempérées chaudes.

- La connaissance des gîtes de repos détermine la stratégie de la lutte antivectorielle puisqu'on distingue des variétés exophiles piquant hors des habitations, endophiles piquant dans les habitations et des variétés amphophiles piquant dedans et à l'extérieur. Cependant, il faut savoir que le comportement des anophèles s'est modifié à la suite des traitements insecticides : ainsi l'effet irritant du D.D.T. empêche les moustiques de se poser sur les surfaces enduites par cet organochloré, ce qui favorise l'exophilie.

Les espèces les plus fréquentes en Afrique sont Anopheles funestus et A. gambiae , A. albimanus domine en Amérique du Sud et en Amérique centrale. En Asie, A. minimus sévit sur la Péninsule Indochinoise tandis qu'en Chine c'est plutôt A. sinensis

1.2.4. La répartition géographique

Pour reprendre les termes employés par Gentilini et Duflo (1986), le paludisme touche actuellement la "ceinture de pauvreté du Monde". C'est un problème particulièrement crucial en zone tropicale.

En Europe, le paludisme a été éradiqué. Cependant, les cas importés en France sont en expansion notamment depuis les années 70 (Roué et coll 1987).

En Afrique du Nord, la prévalence est faible et seuls P. vivax et P. malariae sont rencontrés, tandis que dans toute l'Afrique intertropicale coexistent P. falciparum, P. malariae (20 à 15 %) et P. ovale (pour une moindre part). A Madagascar et dans les Comores, P. falciparum est largement dominante. A la réunion, l'endémie paraît éteinte, mais elle s'est rétablie à l'Ile Maurice en 1979.

En Asie, P. falciparum et P. vivax dominent notamment en Asie Mineure, dans la Péninsule indienne, en Birmanie, en Chine, en Thaïlande et au Vietnam.

En Amérique du Nord : pas de paludisme. Par contre, en Amérique du Sud et en Amérique centrale, ainsi qu'à Haïti, il continue de sévir pour rester absent des Antilles françaises.

En Océanie certaines îles sont atteintes (Nouvelle Guinée, Iles Salomon) alors que d'autres sont épargnées (Tahiti, Nouvelle Calédonie, Iles Loyauté).

1.2.5. La clinique

L'affection évolue chronologiquement en trois phases (Gentilini et Duflo 1986) :

L'incubation, toujours silencieuse prend une durée variable selon l'espèce : 7 à 15 jours pour P. falciparum, 15 jours à plusieurs mois pour P. vivax et P. ovale avec possibles rechutes à 2 et 5 ans, trois semaines pour P. malariae avec rechutes allant jusqu'à 10, 20 ans et plus.

La primo-invasion succède sous forme fruste ou patente. Elle associera alors un syndrome grippal, avec fièvre continue, céphalées et syndrome abdominal.

La phase d'état prend plusieurs aspects :

- L'accès palustre simple : parfois précédé de prodromes, il se caractérise par une succession d'accès fébriles survenant à intervalles réguliers : fièvres tierces pour P. vivax, P. ovale, P. falciparum, fièvres quartes pour P. malariae. Chaque accès associe une triade : frissons, chaleur, sueurs. Il en résulte une anémie qui s'aggrave au fil des accès.
- L'accès pernicleux dont la physiopathologie a été évoquée plus haut (cf p. 14) n'est dû qu'à P. falciparum. La forme la plus typique, et souvent fatale, est le neuro-paludisme qui associe fièvre très élevée (40° à 42°), coma, signes neurologiques et autres manifestation à type de splénomégalie, hépatomégalie, anémie (constante), collapsus, et insuffisance rénale fonctionnelle.

Ce tableau constitue à lui seul le risque majeur d'une infection palustre puisqu'il tue, et ce d'autant plus facilement que les sujets sont fragiles, comme les enfants. Or la chimiorésistance qui ne concerne que P. falciparum s'accompagne d'une augmentation relative de cette espèce par rapport aux trois autres moins dangereuses, ainsi que de l'apparition des formes cliniques inhabituelles, plus frustes et difficiles à diagnostiquer ou même à traiter.

Classiquement, il existe aussi des formes neurologiques sans coma, et des formes viscérales.

- Le paludisme viscéral évolutif survient dans les organismes affaiblis par un long séjour tropical et ayant subi des accès répétés, ou chez les enfants non traités ou insuffisamment. Cette forme évolue vers la cachexie, et chez l'enfant, vers un retard staturo-pondéral souvent fatal. La guérison est spectaculaire avec les anti-malariques.
- la fièvre bilieuse hémoglobinurique : syndrome para-paludéen à composante immunitaire survenant chez d'anciens paludéens irrégulièrement traités par la quinine.

I.2.6. Les moyens de lutte

I.2.6.1. La lutte antivectorielle

Ainsi que le rappellent Gentilini et Duflo (1986), ce fut l'axe primordial de la lutte antipaludique menée par l'O.M.S. pendant plus de trente ans en vue de l'éradication du paludisme.

Deux cibles : la destruction des adultes endophiles par application d'insecticides rémanents sur les murs intérieurs des habitations, et l'épandage de larvicides chimiques sur les gîtes de ponte.

Trois groupes chimiques sont utilisés : les organochlorés dont les principaux sont le DDT, l'hexachlorocyclohexane (HCH), et la dieldrine ; les organophosphorés avec le malathion ; enfin les carbamates hétérocycliques avec le Dimetan^R.

Hélas, dès 1953 apparaît la résistance des insectes aux organochlorés, ce qui conduit à leur remplacement par des produits 4 à 10 fois plus chers, posant de graves problèmes économiques aux pays pauvres atteints par l'endémie palustre (Gentilini et coll 1984). En septembre 1984, ces auteurs rapportent que 47 espèces d'anophèles sont résistantes à la dieldrine, 30 au DDT et dieldrine, 10 le sont au DDT, dieldrine et organophosphorés.

Ainsi l'atteste la reprise épidémique du Nicaragua et la recrudescence observée en Turquie depuis 1976 à P. vivax (Gentilini et Duflo 1986).

I.2.6.2. Les antimalariques

I.2.6.2.1. Classification (cf figure 3)

On distingue :

Les schizontocides tissulaires actifs sur les formes tissulaires primaires et secondaires (hypnozoïtes)

Les schizontocides sanguins (cf tableau n° I)

Les gamétocytocides

Les sporontocides actifs sur la fécondation des gamètes

I.2.6.2.2. Les antimalariques disponibles en 1989

Charmot (1987) dresse une revue précise des molécules actuellement disponibles, ainsi :

1. La Quinine (Quinine^R, Quinimax^R, Quiniforme^R)

- Alcaloïde du quinquina, principalement extraite de Cinchona ladgeriana espèce la plus riche en quinine base.
- Schizontocide sanguin d'action rapide, inactif sur les formes tissulaires.
- Gamétocytocide sur les formes immatures de P. vivax et P. ovale
- Sa pharmacologie rendant son utilisation délicate, son emploi est réservé au traitement de l'accès pernicieux, de l'accès simple avec vomissements et dans les chloroquinorésistances.

Elle présente l'énorme avantage de ne pas entraîner de résistance, et les cas de résistances de souches de P. falciparum signalées en Thaïlande dans les camps de réfugiés cambodgiens constitueraient plutôt des diminutions de sensibilité à la quinine que des résistances vraies (Gentilini et Duflo 1986).

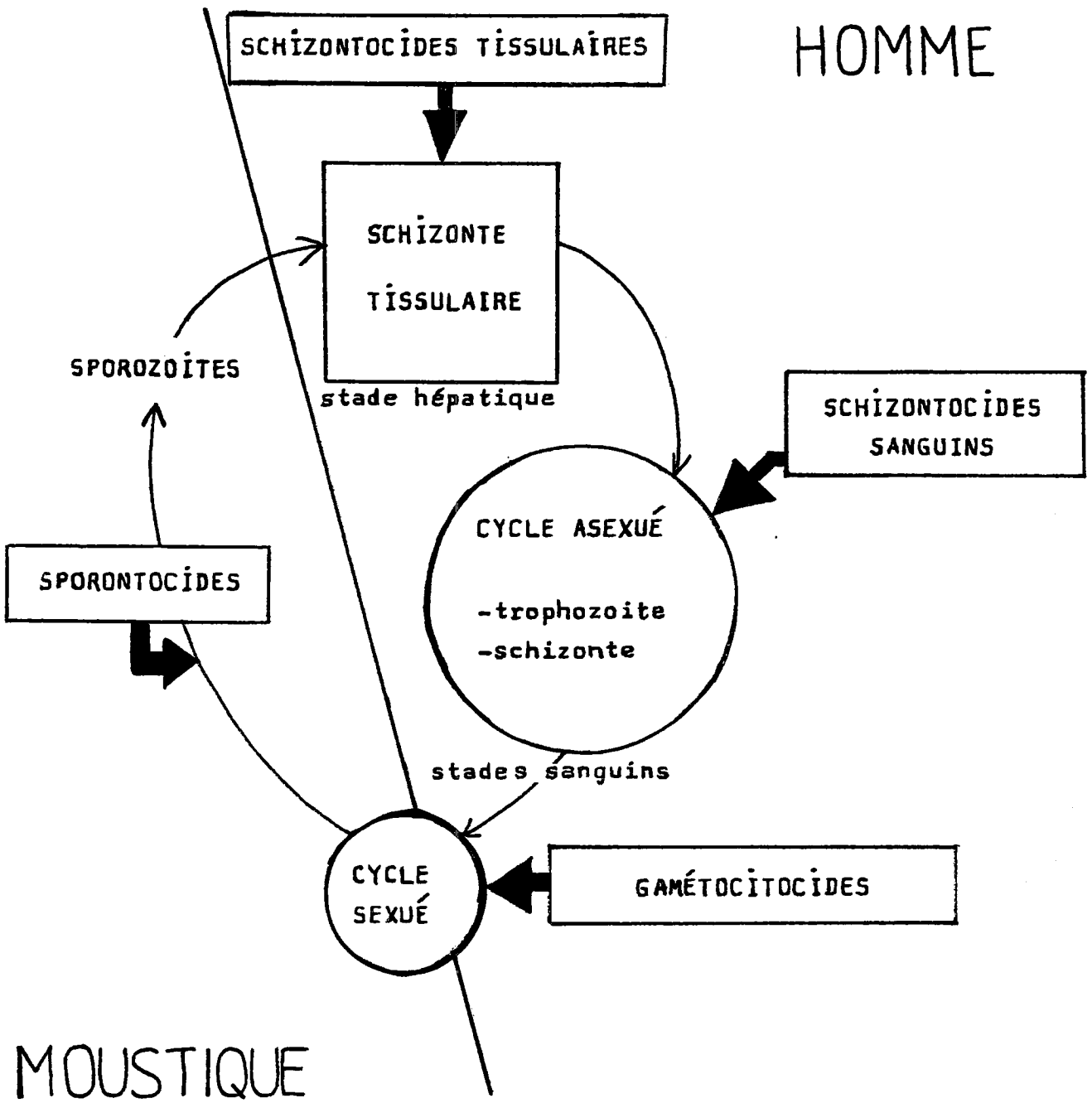


Figure 3 - Cibles des antimalariques

GROUPE I : SCHIZONTOCIDES SANGUINS ELECTIFS OU PLASMODICIDES

• Noyau quinoléine

4-quinoléine méthanol

QUININE

MEFLOQUINE

Amino-4-quinoleines

CHLOROQUINE

AMODIAQUINE

CYCLOQUINE

PIPERAQUINE

• Noyau phénanthrène

9-phénanthrène méthanol

HALOFANTRINE

• Lactones sesquiterpéniques

QINGHAOSU & DERIVES

GROUPE II : ANTIMETABOLITES OU PLASMODISTATIQUES

• Antifoliques

SULFAMIDES

SULFONES

• Antifoliniques

PYRIMETHAMINE

PROGUANIL

TABLEAU I : CLASSIFICATION DES SCHIZONTOCIDES

2. Les amino-4-quinoléines

Chloroquine (Nivaquine^R)

Amodiaquine (Flavoquine^R)

Cycloquine piperazine (utilisées à l'étranger)

- Schizontocides sanguins d'action rapide et prolongée.
(gamétocides sur P. vivax, P. ovale, P. malariae et sur les formes immatures de P. falciparum).
- Elles sont utilisées en prophylaxie et dans le traitement des infections sensibles à P. falciparum et des infections à P. vivax, P. ovale, P. malariae.
- Cependant, dès le début des années 1960, sont apparues les premières souches chloroquinorésistantes tant en Amérique du Sud qu'au Sud Est Asiatique. Depuis, les résistances se sont étendues entraînant une résurgence du paludisme : elles forment une large bande, de Vanuatu jusqu'aux régions centrales et du sud de l'Inde pour ce qui concerne Asie et Océanie. En Amérique du Sud, toutes les régions sont touchées à l'exception de l'Argentine, du Paraguay et du Pérou, pays dans lesquels il n'y a pas de paludisme à P. falciparum : (Bunnag D. et coll 1987). Il faut savoir que les chimiorésistances ne concernent que P. falciparum en dehors des souches mélanésiennes de P. vivax dont les formes tissulaires ne sont pas détruites par la primaquine.

En Afrique, les résistances sont apparues plus tardivement : en effet, signalées à Madagascar en 1975 (Goasquen 1975), elles sont observées en Tanzanie et au Kenya en 1977-78 pour constituer le premier foyer africain de résistance. Depuis, des cas de résistance sont décrits d'un bout à l'autre de l'Afrique (Nguyen Dinh 1985) et ont gagné récemment l'Afrique de l'Ouest. Le premier cas de chloroquinorésistance in vitro a été signalé au Burkina Faso en 1983 par Baudon et coll, puis au Gabon en 1984 (Burchard), en 1985 au Cameroun (Sansonezzi et coll) et au Congo (Le Bras et coll), en enfin au Bénin en 1986 (Le Bras et coll).

Depuis, la situation n'a fait que s'aggraver et au 12 juin 1989, seuls sept pays africains sont encore indemnes de résistance : Egypte, Guinée-Bissau, Mauritanie, Cap Vert, Ile Maurice, Sao Tomé et Príncipe (Ringwald et coll 1989). Selon l'OMS, c'est le Sud du Sahara qui est le plus gravement touché en Afrique et la chloroquine a perdu son utilité en combattant la principale maladie de cette région.

La résistance croisée entre les différentes quinoléines touche actuellement davantage l'amodiaquine que la quinine en Afrique et la polychimiorésistance touche principalement les souches fortement chloroquinorésistantes (Le Bras et Coll 1987).

De plus, à la suite d'effets secondaires à type d'hépatites toxiques et d'agranulocytose, l'amodiaquine a été déconseillée d'utilisation en prophylaxie.

3. Les amino-8-quinoléines

On n'utilise plus que la primaquine (non disponible en France). C'est un schizontocide tissulaire. C'est également un gamétocytocide puissant qui a pu être utilisé en Asie en campagne de masse.

Il est néanmoins toxique et son emploi en est restreint : indiqué dans la destruction des formes exoérythrocytaires de P. vivax et P. ovale c'est-à-dire la prévention des rechutes de ces deux espèces.

4. Les antimétabolites : antifoliques et antifoliques

4.1. Antifoliques

1. Les biguanides

Le Proguanil commercialisé seulement dans les pays impaludés anglophones sous le nom de Paludrine^R.

Son action est triple puisqu'il est :

Schizontocide tissulaire I^{re} notamment sur P. falciparum

Schizontocide sanguin d'action lente

Sporontocide

Curatif médiocre, on le réserve à l'usage prophylactique. Il est utilisé dans les zones de chloroquinorésistance, en association avec la chloroquine ou l'amodiaquine, mais il existe de nombreuses souches résistantes à ce produit (Charmot 1987).

2. Les diamino-2-4-pyrimidine

La pyrimétamine : Malocide^R en France
 Daraprime^R dans les pays impaludés anglophones
 schizontocide d'action lente et sporontocide.

Elle se heurte à de graves problèmes de chimiorésistance et est actuellement utilisée en prophylaxie individuelle ou associée à un sulfamide pour réaliser une association curative dans les formes non graves ou en relai d'un traitement à la quinine (cf plus bas).

4.2. Les antifoliques : sulfamides et sulfones

Schizontocides d'action lente et sporontocides.

Toujours utilisés en association avec la pyrimétamine qui renforce leur action :

1. Ainsi l'association sulfone - pyriméthamine (Maloprime^R) utilisé en prophylaxie (Charmot 1987)
2. et l'association sulfadoxine - pyrimétanine (Fansidar^R) indiqué dans le traitement des infections à P. falciparum chloroquinorésistantes déconseillée en prophylaxie à cause des effets secondaires cutanés sévères (Charmot 1987).

Coulaud (1986) rapporte l'état des résistances au Fansidar^R en Asie où, dans certaines zones de Thaïlande, le pourcentage atteint 50 à 60 %. Gentilini (1984) y décrit 70 à 90 % de résistance avec la frontière Thaïlande-Cambodge comme une zone de multirésistance.

Gentilini et Duflo (1986) rapportent qu'en 1983 se développent des résistances à ce même produit en Afrique de l'Est, pouvant atteindre parfois selon Coulaud (1986) jusqu'à 40 % des souches.

5. Les molécules récentes

Deux amino-alcools sont d'excellent schizontocides sanguins actifs sur les souches chloroquino résistantes.

1. Analogue structural de la quinine : 4-quinoléine-méthanol : la méfloquine (Lariam^R depuis 1986 en France)

Caractérisé par une demi-vie longue 15 ± 6 jours.

Devrait être réservé à la prophylaxie ou au traitement des souches de P. falciparum résistantes aux amino-4-quinoléines.

Elle semble active partout sauf en Thaïlande dans les zones de résistances à la quinine (Charmot et Le Bras 1986). Mais toutes les souches résistantes à la quinine ne le sont pas à la méfloquine (Charmot 1987).

La méfloquine est utilisée en Asie depuis peu de temps, et déjà on signale 20 à 25 % de souches résistantes dans certaines zones (Coulaud et coll 1986). Le Bras (1987) rapporte qu'en Afrique les souches très sensibles à la chloroquine peuvent être d'une moindre sensibilité à la méfloquine ce qui témoigne de l'excessive variabilité des souches rencontrées.

2. 9-phénanthrène méthanol : l'halofantine (Halfan^R depuis 1989 en France)

Sa demi-vie est beaucoup plus brève (2 à 4 jours). Cette molécule est encore en cours d'expérimentation mais a néanmoins été commercialisée à titre curatif seul en 1989.

3. Qinghaosu et dérivés semi-synthétiques

Le qinghaosu est un sesquiterpène extrait d'une plante appelée qinghao (Artemisia annua).

Les sesquiterpènes sont des schizontocides actifs sur les souches chloroquinorésistantes.

Leur posologie est encore à l'étude et aucun n'est encore commercialisé (Charmot 1987).

Le paludisme de 1989 pose ainsi de nombreux problèmes :

- d'une part, la lutte antivectorielle n'a pas atteint son but destructeur.
- d'autre part, les antimalariques voient leur efficacité amoindrie par les résistances : le nombre des souches de P. falciparum chloroquinorésistantes s'accroissent, avec parallèlement, la survenue de souches polychimiorésistantes et la baisse de sensibilité de certaines souches à la quinine jusqu'ici épargnée.

Il paraît donc urgent de trouver des solutions de rechange.

Celle qui semble prometteuse est la voie de la vaccination. Un vaccin antipalustre conférant une immunité complète serait à même de préserver les sujets neufs allant en pays d'endémie et les nouveaux-nés de ces mêmes pays.

Mais qu'en est-il vraiment de ce "rêve" et qu'elles difficultés cache la mise au point d'un tel vaccin ? C'est ce que nous nous proposons d'étudier dans la suite de notre travail.

II - LA VACCINATION ANTIPALUSTRE

Avant d'évoquer les travaux sur la vaccination antipalustre et les difficultés rencontrées par les différentes équipes à ce sujet, on décrira les mécanismes immunitaires intervenant au cours d'une infection palustre et susceptibles d'expliquer certains écueils sur lesquels achoppent les chercheurs.

II.1. RAPPEL SUR LES MECANISMES IMMUNITAIRES INTERVENANT DANS LE PALUDISME

II.1.1. La réponse de l'Hôte face au Parasite

II.1.1.1. La résistance naturelle

L'immunité naturelle est liée aux caractéristiques érythrocytaires, mais demeure relativement rare dans son expression.

Elle s'observe d'une part, lorsqu'il y a un défaut ou un blocage des récepteurs membranaires pour les mérozoïtes :

- les sujets de phénotype érythrocytaires DUFFY négatif, c'est-à-dire dont le génotype est Fy (a - b -) sont résistants à l'infection par P. vivax. En effet, la pénétration du mérozoïte dans l'hématie nécessite un récepteur sur la membrane érythrocytaire, constitué principalement par l'antigène DUFFY. Ce phénomène, fréquent dans la race noire, expliquerait l'absence de P. vivax en Afrique intertropicale (Gentilini et Duflo 1986).
- les sujets En (a -), dont les globules rouges sont dépourvus de tout ou partie de la glycophorine A, sont moins sensibles à l'infection par P. falciparum. Cette glycoprotéine semble en effet nécessaire à l'invasion du parasite dans les hématies pour constituer l'un des principaux récepteurs. (Salmon et coll 1984).

D'autre part, les hémoglobinoses peuvent intervenir également :

- la drépanocytose ou hémoglobinoase S exerce un effet protecteur contre l'infection à P. falciparum. On évoque plusieurs mécanismes parmi lesquels sont principalement retenus : la destruction des parasites par des cristaux d'hémoglobine S, et/ou la diminution du K^+ intra érythrocytaire, élément nécessaire à la vie du parasite.

Cette tare génétique qui touche la race noire, expliquerait sa persistance en zone impaludée par sélection naturelle.

Enfin, le déficit en glucose 6 phosphate deshydrogénase (G6PD) confère une protection inconstante vis-à-vis du paludisme.

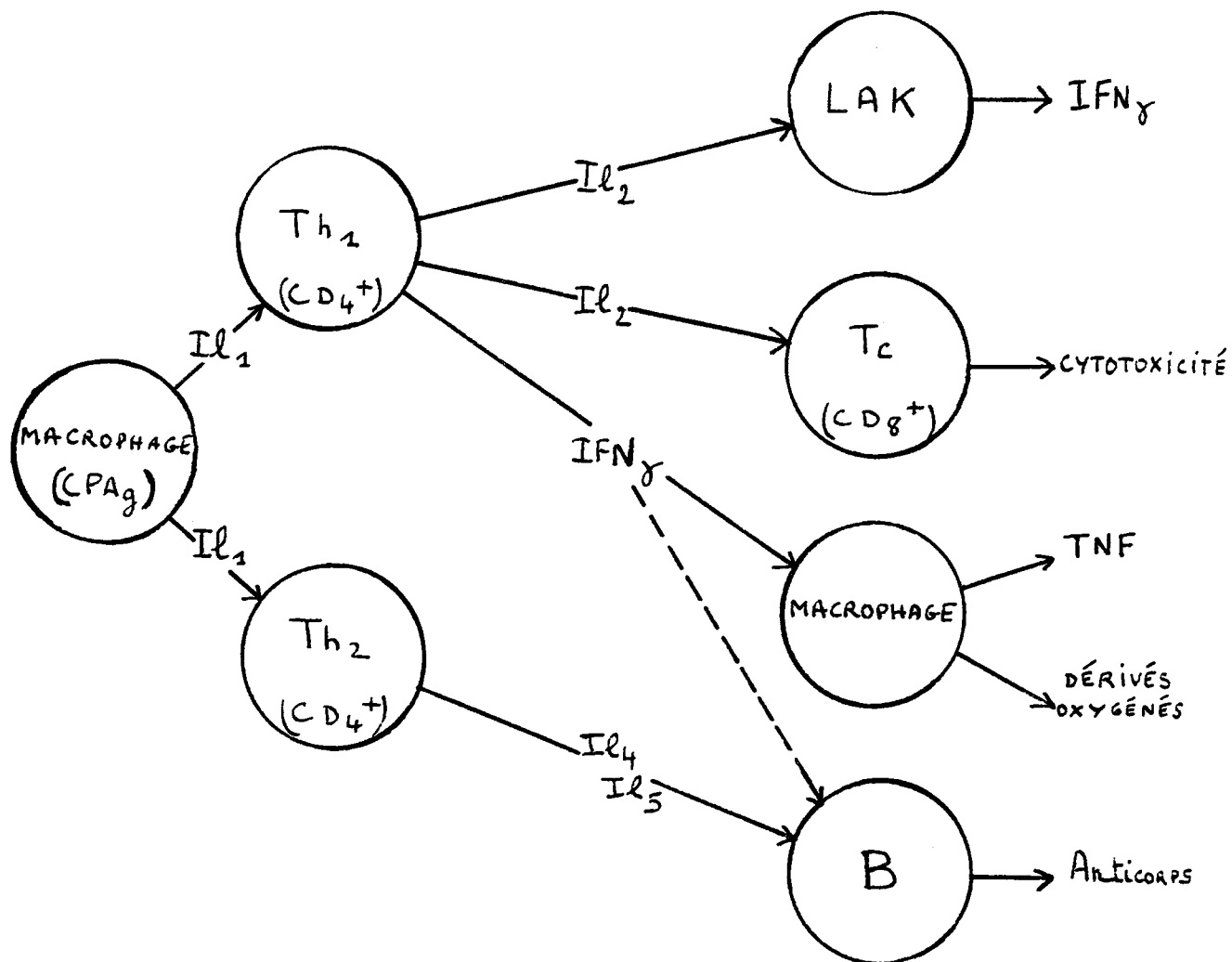
II.1.1.2. - La résistance acquise

Elle obéit aux mécanismes classiques de la réponse immune (cf figure 4)

1. Prémunition

La résistance acquise n'est en fait qu'une prémunition c'est-à-dire un état d'équilibre précaire entre l'hôte et son parasite. Elle s'établit lentement après de très nombreuses piqûres régulières, les sujets neufs n'opposant aucune résistance. On admet pour les enfants vivant en zone impaludée, qu'ils sont prémunis vers 4 ou 5 ans. La prémunition disparaît rapidement (1 à 2 ans) après le départ d'une zone d'endémie.

Cet état de prémunition est associé à un faible taux d'anticorps sériques spécifiques qui en cas d'infestation limiterait la multiplication du parasite, rendant le neuropaludisme exceptionnel. La parasitémie est habituellement modérée, et les manifestations cliniques peu intenses.



- CPAg = cellule présentatrice de l'antigène.
 Il = interleukine. } lymphokines.
 IFN γ = interféron gamma. }
 TNF = Tumor necrosis factor = Facteur nécrosant les tumeurs.
 (cytotoxine produite par les macrophages.)
 LAK = Lymphokine-activated killer-cell.
 = Cellule killer activée par les lymphokines.
 Th = Lymphocyte T helper.
 Tc = Lymphocyte T cytotoxique.
 B = lymphocyte B.

Figure 4 - Représentation schématique des mécanismes immunitaires

2. Mécanismes

L'infection palustre induit une immunité à médiation humorale, qui est le marqueur principal de la défense contre l'infection, et une immunité cellulaire qui, tout en jouant un rôle dans le maintien de l'immunité, aurait également une place active dans son établissement, comme des études récentes tendent à le prouver.

Dans le cycle plasmodial, 4 stades peuvent être la cible d'une réponse immunitaire protectrice :

- Le sporozoïte, stade infectieux
- Le stade de la schizogonie hépatique
- Le stade de la schizogonie érythrocytaire : mérozoïtes et schizontes ou stades sanguins asexués
- Le stade sexué, constitué par les gamétocytes

La communauté scientifique, après avoir tout d'abord démontré l'importance de l'immunité humorale dans l'établissement d'une protection contre les stades du sporozoïte et stades sanguins asexués (Clyde et coll 1973(b)) s'est tournée ensuite vers les formes extracellulaires, supposant qu'elles étaient la cible privilégiée d'une réponse protectrice. Les recherches se sont donc orientées vers l'étude des structures antigéniques des sporozoïtes et des mérozoïtes. Puis on s'est aperçu que les gamétocytes engendraient une réponse immunitaire, capable d'interrompre le cycle sexué chez l'anophèle (Vermeulen et coll. 1985).

Récemment, enfin, l'équipe de Schofield (1987) a démontré l'existence d'une immunité cellulaire dirigée contre les formes hépatiques.

Ainsi, bien qu'il semble artificiel de séparer immunité humorale et cellulaire, étroitement imbriquées, nous utiliserons ce plan pour décrire les mécanismes mis en jeu.

3. Immunité humorale spécifique protectrice - Antisporozoïte

Le sporozoïte constitue le stade infectieux : il transite dans le sang pendant une courte période après la piqûre d'un anophèle vecteur, puis atteint le foie.

Des expériences d'immunisation chez l'animal et des dosages d'anticorps sériques chez des sujets hyperimmuns ont démontré l'existence d'anticorps antisporozoïtes. Ces anticorps sont spécifiques d'espèce, de stade, mais pas de souche et confèrent une protection néanmoins incomplète après transfert massif. Le titre des anticorps antisporozoïtes est proportionnel au nombre de piqûres d'anophèles c'est-à-dire au nombre de sporozoïtes injectés (Clyde et coll 1973(a)) ; de plus, dans les régions endémiques, les niveaux d'anticorps croissent avec l'âge des sujets (Druilhe et coll 1986).

On évoque plusieurs mécanismes d'action pour ces anticorps :

- Activation du complément : - Induisant des altérations de la membrane du parasite.
 - augmentant la sensibilité à d'autres médiateurs chimiques, favorisant ainsi la phagocytose.
- Neutralisation par inhibition de l'adhérence du sporozoïte sur les cellules cibles (Hollingdale et coll 1982 et 1984)
- Plus récemment, hypothèse selon laquelle les anticorps pourraient agir en inhibant le développement intracellulaire des stades hépatiques (Mazier et coll 1986).

Cependant, ainsi que le souligne Miller (1986), on ignore l'importance prise par l'immunité antisporozoïte dans la résistance au paludisme, sachant que les sujets vivant en zone endémique ont aussi des anticorps dirigés contre les stades sanguins qui participent eux aussi à la défense anti-palustre.

- Immunité humorale anti-stades sanguins

L'immunité antimérozoïte est difficile à étudier car ceux-ci sont retrouvés pendant un temps très court dans la circulation sanguine. Les anticorps sont spécifiques d'espèce, de stade, et de souche. Ce sont principalement des IgG et IgM, dont l'action est indépendante du complément. Les niveaux d'anticorps anti-mérozoïtes sont corrélés avec le statut clinique dans 70 à 80 % des cas (Deans & Cohen 1983).

Plusieurs mécanismes sont évoqués pour expliquer l'effet protecteur contre les mérozoïtes :

- Inhibition de la réinvasion des globules rouges : des expériences de Fandeur (1984) montrent qu'il n'y a pas de corrélation entre le blocage de l'invasion des mérozoïtes et le transfert de l'immunité, ce qui suggère l'intervention d'effecteurs cellulaires.
- Mort intracellulaire : ici les anticorps jouent le rôle d'agent de destruction du parasite intraglobulaire. Il est à noter que Jensen en 1983, a également mis en évidence dans le sang d'adultes soudanais un facteur sérique qui n'est pas une immunoglobuline et qui est capable de tuer les parasites intra globulaires en culture.

- réversibilité de la cytoadhérence : les sera qui bloquent l'antigène parasitaire exprimé en surface des hématies parasitées inhibent l'adhérence à l'endothélium, et permettent l'élimination des hématies infectées, grâce aux mécanismes effecteurs de l'immunité à médiation cellulaire au niveau de la rate (Male et coll 1988).
- Activation des macrophages et opsonisation selon les mécanismes classiquement décrits.
- Cytotoxicité dépendante des anticorps (A.D.C.C.) dont les effecteurs sont les cellules killers, les monocytes ou les polynucléaires, phénomène important dans l'immunité antimalarique (Deans & Cohen 1983).

4. Immunité cellulaire

- Antisporozoïte

L'immunité antisporozoïte est thymodépendante : elle fait intervenir des cellules T helper qui coopèrent avec les lymphocytes B pour la synthèse d'anticorps spécifiques. Cependant, les lymphocytes B et T ne reconnaissent pas le même épitope sur un antigène donné : autrement dit, un épitope B ne stimulera pas les T helpers s'il n'est pas couplé à un épitope T. On rappelle qu'un épitope est la partie la plus élémentaire de l'antigène capable d'induire une réponse immune. (cf figure 5)

Des expériences récentes ont apporté la preuve que les anticorps antisporozoïtes ne confèrent pas à eux seuls une immunité antisporozoïte complète. Ainsi les expériences de Chen (1977) montrent que des souris immunisées avec des sporozoïtes irradiés puis traitées par injection d'anticorps anti chaîne μ , résistent quand même à l'infestation par des sporozoïtes virulents d'une plasmodie murine.

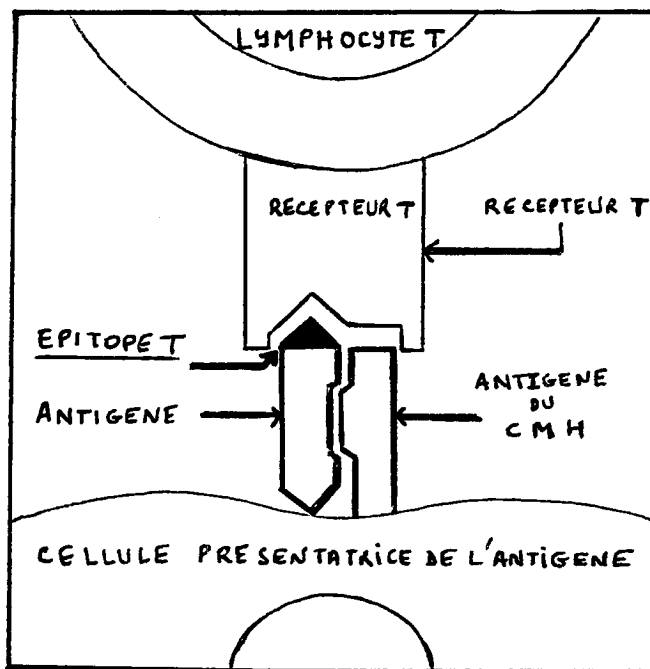


Figure 5 - Représentation schématique d'un épitope T.
(d'après Male et coll 1988)

Par la suite, d'autres auteurs, se fondant sur l'hypothèse selon laquelle les hépatocytes parasités n'expriment aucun antigène plasmodial à leur surface, ont suggéré que ces formes exoérythrocytaires (EEF) n'étaient pas exposées aux anticorps (Nussenzweig & Nussenzweig 1986). De plus aucune cellule inflammatoire n'est présente autour des formes exoérythrocytaires intrahépatiques, suggérant l'action d'éventuels médiateurs chimiques sécrétés à distance par des cellules stimulées par l'infection palustre, via les sporozoïtes.

Ainsi, quelques études ont montré l'effet de l'interféron ($\text{IFN}\gamma$) sur les EEF. Une faible quantité d' $\text{IFN}\gamma$, injectée avant l'injection de sporozoïtes infectieux diminue la parasitémie, et prolonge la période pré-patente chez des souris, alors qu'une injection d' $\text{IFN}\gamma$ suivant de 72 heures celle des sporozoïtes ne produit aucun effet (Ferreira et coll 1986). Pour montrer l'effet de l' $\text{IFN}\gamma$ sur les EEF, Ferreira utilise une sonde à DNA et met en évidence que l' $\text{IFN}\gamma$ murin est capable à des degrés variables selon les doses injectées d'inhiber le développement des EEF de P. berghei chez les rongeurs, et ceci indépendamment du nombre de sporozoïtes injectés.

La preuve est donc faite, chez la souris, de l'effet de l' $\text{IFN}\gamma$, dans l'immunité ant sporozoïte. On précise que l' $\text{IFN}\gamma$ est une lymphokine sécrétée par les lymphocytes T stimulés, et douée de propriétés immunostimulantes.

Une expérience réalisée chez le chimpanzé, avec de l' $\text{IFN}\gamma$ humain montre un allongement de la période prépatente et une diminution de la parasitémie, après injection successive de l' $\text{IFN}\gamma$ puis de sporozoïtes de P. vivax (Nussenzweig V. et Nussenzweig R. 1986).

Enfin, dans un système in vitro, sur cultures cellulaires d'hépatome humain, Schofield (1987) montre que des cellules traitées par l' $\text{IFN}\gamma$ humain 24 heures avant l'incubation avec des sporozoïtes de P. berghei ne permettent pas la multiplication du parasite, l'effet inhibiteur variant avec la dose d' $\text{IFN}\gamma$. Poursuivant ses investigations Schofield essaie de trouver les populations cellulaires productrices d' $\text{IFN}\gamma$ dans les conditions

naturelles de l'infection palustre : lymphocytes T helpers ($CD4^+$) ou T cytotoxiques ($CD8^+$). En effet, leur expérience chez le rat justifie l'intérêt porté à l' $IFN\ \gamma$ puisqu'elle montre que la neutralisation de l' $IFN\ \gamma$ endogène est capable de détruire partiellement l'immunité établie chez les rats, si on leur injecte de nouveau des sporozoïtes infectieux.

- Ainsi selon les auteurs, les cellules T $CD8^+$, stimulées par l'infection palustre, sont d'une part capables de synthétiser de l' $IFN\ \gamma$, et d'autre part d'agir comme lymphocytes cytotoxiques vis-à-vis des hépatocytes exprimant en surface des antigènes sporozoïtaires ou d'origine EEF.

L'hypothèse selon laquelle les hépatocytes expriment des néoantigènes parasitaires, quoique divergente de celle de Nussenzweig (1986), est reprise par Langsley (1988) qui ajoute que les cellules hépatiques, exprimant l'antigène HLA de classe I, sont capables de servir de cellules présentatrices de l'antigène.

- Autre source possible d' $IFN\ \gamma$, les T helper stimulés, l' $IFN\ \gamma$ agissant alors sur les macrophages dont l'action cytotoxique s'exprime à travers le relargage de dérivés oxygénés et de "tumor necrosis factor" (T.N.F.) (Mosmann et coll 1987).

Ainsi, l'immunité ant sporozoïte, s'équilibre entre trois pôles :

- Le titre des anticorps neutralisants
- Le degré et le type de réponse cellulaire
- La charge en sporozoïtes infectieux.

- Immunité cellulaire anti stades sanguins

L'immunité dirigée contre les stades sanguins fait intervenir les effecteurs cellulaires précédemment décrits :

- Cellules T helpers, agissant dans la coopération avec les cellules B pour la production d'anticorps spécifiques ou comme source de lymphokines pour activer d'autres cellules, macrophages et cellules "natural killer" (NK), qui à leur tour pourraient sécréter des facteurs létaux pour le parasite (Allison 1981 dans Deans 1983).
- Cellules T cytotoxiques : leur rôle dans l'immunité contre les stades sanguins est cependant plus discutable. On sait en effet que l'activation des T cytotoxiques est restreinte par les produits de Classe I du système HLA, et ceux-ci ne s'expriment pas sur les hématies humaines.

5. Immunité acquise non spécifique

L'infection palustre est modulée par des mécanismes immunologiques non spécifiques : ainsi, des agents comme l'adjuvant complet de Freund (ACF), le Bacille de Calmette Guérin (BCG) ou Corynebacterium parvum peuvent induire le relargage de médiateurs d'action cytolytique non spécifique, capables d'entraîner des altérations parasitaires. Ces mécanismes sont mal compris ; cependant, ils pourraient faire intervenir l'IFN γ (Deans et Cohen 1983).

Cela explique l'utilisation quasi-constante d'adjuvants de l'immunité dans la préparation des vaccins.

II.1.2. Le parasite face à son hôte : les mécanismes d'échappement

Résultat de l'adaptation du parasite à son hôte naturel, un équilibre s'est établi entre les deux protagonistes. Le parasite s'est plu à déjouer les barrières immunitaires élevées par l'hôte grâce à divers mécanismes d'échappement responsables du succès de son implantation chez l'hôte, dont nous évoquerons ci-après quelques aspects.

II.1.2.1. Localisation intracellulaire

L'immunologie nous apprend que les parasites intracellulaires sont soumis préférentiellement à l'immunité à médiation cellulaire. La localisation dans la cellule semble protéger de l'action des anticorps, comme cela s'opère par ailleurs avec d'autres parasites comme les Leishmania ou des bactéries comme les Chlamidiae.

II.1.2.2. Echappement à la reconnaissance

Le parasite, à l'image d'un quidam voulant passer inaperçu, se cache derrière un aspect différent de celui sous lequel on le rencontre habituellement, et utilise plusieurs artifices :

1. Diversité antigénique

Au sein d'isolats naturels de P. falciparum, on observe l'expression de différents isoenzymes, des sensibilités différentes aux antimalariques, et surtout l'expression alternative d'épitopes différents sur certaines protéines parasitaires. Cependant, on ignore encore les bases moléculaires de cette diversité antigénique (Miller et coll 1986).

L'étude de Mc Bride (1982) concernant les antigènes de P. falciparum illustre également les différences antigéniques existant d'une souche à l'autre pour un même stade.

2. variations antigéniques au cours du stade évolutif

Le passage par différents stades évolutifs s'accompagne de modifications antigéniques : certains antigènes sont communs à différents stades, alors que d'autres sont spécifiques d'un seul stade. L'évolution d'un stade à l'autre, s'accompagne parfois de la fragmentation d'une protéine en protéine de plus faible poids moléculaire.

3. Protéines de diversion

Le parasite est capable de libérer des antigènes susceptibles de dévier la réponse immunitaire : ceci a été montré avec P. knowlesi dont les sporozoïtes traités par un immun serum anti CSP, sont capables de relarguer la couche superficielle de leur CSP pour détourner les anticorps de leur cible. Ce retard va permettre au sporozoïte d'atteindre un hépatocyte hôte.

Autre protéine de diversion chez P. falciparum : l'antigène soluble relargué par les mérozoïtes dans la vacuole du schizonte, il contient des épitopes répétés et subit une variation antigénique pouvant agir comme une protéine déviant le système immunitaire (Male et coll 1988).

4. Variations antigéniques au sein d'un même stade

Les variations phénotypiques s'expriment à travers mutations et recombinaisons au cours de la méiose, ou à travers l'expression alternative des gènes d'une famille multigénique, comme cela se produit pour les trypanosomes (Male et coll 1988). La plupart de ces variations antigéniques ont été décrites pour les formes sanguines asexuées : ceci pourrait s'expliquer par l'intense pression immunologique qu'elles subissent de la part du système immunitaire et de par leur division rapide, excellente source de mutations (Miller et coll 1986).

II.1.2.3. Suppression de la réponse immunitaire de l'hôte

1. Rôle des antigènes solubles parasitaires

Les antigènes solubles libérés par le parasite sont capables de réduire la réponse immunitaire de l'hôte. Cette immunosuppression non spécifique, est une caractéristique universelle des infections parasitaires et touche l'immunité à médiation humorale et cellulaire (Roitt et coll 1985).

L'étude de Ballet (1986), chez des sujets impaludés à P. falciparum montre la présence d'antigènes circulants dans le sang des sujets, sans préciser s'ils sont libres ou complexés à des anticorps, et met en évidence un déficit de l'immunité à médiation cellulaire. Des tests cutanés à la phytohémagglutinine (PHA) et un test de transformation lymphoblastique vis-à-vis d'antigènes spécifiques et non spécifiques, ont été utilisés dans l'exploration de l'immunité à médiation cellulaire. Ces expériences suggèrent le rôle inhibiteur direct des antigènes parasitaires circulants sur les mécanismes d'activation lymphocytaire.

2. Complexes immuns circulants

Les complexes immuns circulants sont constitués d'antigènes solubles associés à des anticorps et apparaissent vers le 4ème ou 5ème jour d'une infection primaire. Ils provoquent une baisse du C_3 et du C_4 ce qui est à l'origine d'un déficit de l'immunité humorale spécifique protectrice (On rappelle que C_3 et C_4 sont des fractions du complément nécessaire à l'action lytique des anticorps).

3. Activation polyclonale

L'infection palustre déclenche une élévation du taux d'Ig M et Ig G sans spécificité démontrable vis-à-vis d'aucun antigène parasitaire. Si les cellules T (helper) contribuent à l'élévation généralisée de la production des immunoglobulines, il semble qu'une grande partie soit le fait d'antigènes libérés par le parasite pour agir directement comme activateurs polyclonaux des lymphocytes B (Deans 1983).

II.1.2. 4. Echappement à la réponse de l'hôte

On a précédemment décrit le rôle des knobs, protéines parasitaires exprimés en surface des globules rouges parasités, dans la survenue des phénomènes liés au neuropaludisme. Mais ceci constitue également un échappement aux défenses immunitaires naturelles de l'hôte. En effet, ces hématies parasitées par P. falciparum, vont adhérer à l'endothélium vasculaire grâce aux knobs. Cette adhésion empêche l'élimination de ces globules parasités au niveau de la rate (Male et coll 1988).

Cependant, la liste n'est pas exhaustive. De nombreux mécanismes d'échappement restent incompris et cet inconnu constitue une entrave importante dans la voie de la vaccination.

II.2. LA VACCINATION

II.2.1. Historique

Si l'on s'attache à l'étymologie du mot "vaccination", on retrouve deux noms : JENNER et PASTEUR.

En effet, Jenner est à l'origine de la prophylaxie antivariolique puisqu'en inoculant un extrait de pustule d'un sujet atteint par la vaccine (affection bénigne due au cow-pox des vaches, vacca = vache en latin) il le protège contre la variole.

De son côté, Pasteur, en l'honneur de ce médecin anglais, Jenner, donne le nom de vaccination au procédé destiné à produire une réponse immunitaire adéquate pour une protection au long cours : en 1885, il réalise le premier vaccin antirabique utilisable chez l'homme, ouvrant ainsi la voie des vaccinations.

Depuis cette date, au fil des nouvelles découvertes technologiques et scientifiques, de nombreux vaccins ont été introduits en prophylaxie humaine : variole, diphtérie, poliomyélite, tuberculose ont pratiquement disparu depuis l'application à grande échelle de la pratique des vaccinations.

Cependant, les vaccins actuellement utilisés posent pour certains, quelques problèmes :

- une efficacité limitée tant au niveau du degré, que de la durée de la protection conférée, cela étant particulièrement vrai pour le vaccin anticholérique.
- des effets secondaires non négligeables, surtout avec le vaccin contre la typhoïde (T.A.B.) et le vaccin coquelucheux.

Aussi, de plus en plus fréquemment, on s'oriente vers l'obtention de fractions purifiées immunogènes plutôt que vers des souches atténuées présentant des risques de réversion à la virulence.

Actuellement, trois axes se dessinent dans la recherche vaccinale :

- le premier a trait à l'amélioration de la distribution des vaccins existants dans les pays en voie de développement, sous l'égide de l'O.M.S., dans le cadre des programmes élargis de vaccination (P.E.V.).
- Le second est celui de l'amélioration des vaccins actuels.
- Le dernier vise au développement de nouveaux vaccins. C'est grâce au progrès technologiques de ces dix dernières années que l'espoir de produire des vaccins contre toutes les pathologies infectieuses transmissibles à l'homme a pu naître. Parmi eux, le vaccin antipalustre occupe une bonne place.

II.2.1.1. Les nouvelles approches technologiques

1. Production d'anticorps monoclonaux

La technique des hybridomes, élaborée en 1975 par Kohler et Milstein permet de produire un anticorps homogène, monoclonal, en grande quantité, qui ne reconnaît qu'un seul déterminant antigénique (épitope) d'un antigène (Ag) complexe.

Les anticorps monoclonaux ont trouvé de nombreux domaines d'application, parmi lesquels figurent l'analyse des antigènes et l'identification d'épitopes spécifiques.

2. Technique de recombinaison génétique

La technique de l'ADN recombinant a ouvert la voie des manipulations génétiques. Outre son utilisation pour la production de sondes génétiques, elle permet :

- La modification du génôme microbien avec la possibilité d'introduire un vecteur recombinant
- L'identification détaillée de la séquence nucléotidique codant pour une protéine donnée
- La production de protéines spécifiques

3. Les autres progrès technologiques

D'autres aspects technologiques moins spectaculaires que les deux précédents, mais néanmoins essentiels, se sont greffés là-dessus :

- La synthèse chimique des oligo-peptides et polysides
- Diverses techniques de fractionnement des protéines et d'analyse des fractions : techniques chromatographiques utilisant différents supports selon le substrat étudié, et dont la plus remarquable dans la résolution est sûrement la chromatographie liquide haute performance ou CLHP. De même, toutes les techniques électrophorétiques largement utilisées pour séparer les protéines, ont vu accroître leurs performances à travers la technique d'immunoblotting, qui trouve des applications dans la recherche vaccinale pour la caractérisation des peptides plasmodiaux. On rappellera simplement que cette technique associe une migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide suivi par le transfert sur gel de cellulose sur lequel on fait agir directement un sérum ou des anticorps monoclonaux. La révélation s'opère grâce à des immunoglobulines marquées par une enzyme, ou radiomarquées.

- La capacité accrue des programmes informatiques dont une application est la visualisation de la conformation tridimensionnelle des épitopes, permettant la prédiction de leur localisation précise.
- La technique de l'immortalisation des clones lymphocytaires T, a ouvert la voie de la connaissance du répertoire de ces cellules vis-à-vis des antigènes thymodépendants et confirmé l'importance de la présentation de l'antigène associé aux produits des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH, système HLA chez l'homme) (Kaufmann 1984).

Cette technique a permis de montrer également toute l'importance des lymphocytes T dans l'induction de la protection acquise.

II.2.1.2. Les nouveaux modèles animaux

Les modèles expérimentaux, pour leur abord facile, servent souvent de base à l'étude des plasmodies humaines, malgré leurs inévitables différences. Cependant, il faut bien savoir que les résultats ne sont que difficilement transposables, vu l'importance que l'on sait des relations spécifiques hôte-parasite.

Depuis peu, de nouveaux modèles animaux utilisant des primates sont disponibles pour l'étude des plasmodies humaines : pour le cycle érythrocytaire, l'utilisation du singe Saimiri développée par l'Institut Pasteur en Guyane avec P. falciparum et P. vivax, semble plus facile que celle du chimpanzé, ou de l'Aotus en voie de disparition (Gentilini et coll 1984). Cependant, la sensibilité du Saimiri, vis-à-vis de P. falciparum reste modeste, sa reproduction difficile en captivité et la mortalité atteint presque 30 % après infestation.

Devant toutes ces difficultés, et aussi parce que l'utilisation des singes est très onéreuse, la découverte des cultures cellulaires a révolutionné l'étude des plasmodies permettant de réserver les animaux aux tests ultimes (contrôle de l'immunité, tolérance aux préparations vaccinales).

II.2.1.3. Les cultures cellulaires

En 1976, Trager et Jensen ont mis au point la culture cellulaire des stades sanguins de P. falciparum : tous les stades du cycle asexué sont observés. De nombreuses modifications ont été apportées à la technique initiale et on a pu obtenir des gamétocytes infectieux pour le moustique, étape importante pour la mise au point de vaccins anti-gamètes et anti-sporozoïtes.

Une étape supplémentaire a été franchie par Mazier qui réalise la culture *in vitro* des stades hépatiques de P. vivax (1984) puis P. falciparum (1985) sur hépatocytes humains.

Les plasmodies animales comme P. berghei par exemple, ont, pour leur part, été cultivées plus précocément (Hollingdale et coll 1981).

Plusieurs inconvénients restent cependant inhérents à la technique :

- Lourdeur des contraintes techniques
- Coût non négligeable
- Rendement assez faible
- Modification des parasites au cours de la culture

Cependant, les cultures cellulaires sont largement mises à profit en recherche fondamentale, permettant d'étudier les relations du parasite avec sa cellule hôte (facteurs nutritionnels ou chimiques de survie, facteurs immunologiques, mécanismes de pénétration cellulaire).

Outils de la recherche appliquée, les cultures cellulaires permettent aussi l'étude de l'action des antimalariques de synthèse à travers des tests de chimiosensibilité tel que le test de RIECKMAN ou microtest O.M.S. (Rieckman et coll 1978), ainsi que la mise au point de tests d'invasion ou d'inhibition de l'invasion des sporozoïtes (Hollingdale et coll 1984).

II.2.2.2. Les trois axes

Trois principaux axes de recherche sont actuellement développés pour l'élaboration d'un vaccin antipalustre : le stade infectieux et les stades sanguins sexués et asexués.

Cependant, ils offrent des perspectives différentes :

- un vaccin ant sporozoïte doit entraîner une immunité complète. Destiné en priorité aux sujets neufs et aux enfants vivant en pays d'endémie, il doit s'appliquer également au reste de la population afin de diminuer le taux de transmission. C'est le seul vaccin *senso stricto*, puisqu'il doit être efficace à 100 % pour ne laisser échapper aucun sporozoïte à son contrôle.
- un vaccin antistades sanguins asexués doit entraîner une immunité à peu près semblable à l'immunité naturelle. Destiné à diminuer la morbidité et la mortalité, notamment sur des groupes sensibles (enfants de moins de 4 ans) des régions endémiques, il ressemble davantage à un "super-traitement" qu'à un vaccin.
- un vaccin antigamétocyte ne développerait pas d'immunité chez l'hôte. C'est un vaccin altruiste destiné à diminuer le taux de transmission par le vecteur.

A l'heure actuelle, on tend à penser qu'un vaccin vraiment efficace contre le paludisme devrait contenir des sous-vaccins contre chacun des stades du parasite.

En outre, seules deux voies de fabrication sont applicables : l'une utilise la technique du DNA recombinant, l'autre la synthèse peptidique. En effet, les cultures cellulaires ont un coût élevé et les antigènes obtenus n'offrent pas un degré de purification suffisant.

Enfin, le choix de l'immunogène s'oriente vers un élément essentiel à la survie du parasite d'un point de vue fonctionnel plus que conformationnel, de telle sorte qu'une quelconque mutation ne puisse conduire qu'à la mort du parasite. Mais il semble hélas que ces antigènes de survie du parasite ne soient que très peu immunogènes.

II.2.2.1. La vaccination ant sporozoïte

De très nombreuses équipes se sont engagées dans le pari de la vaccination ant sporozoïte, et il semble que la difficulté majeure réside dans la compréhension des relations hôte-parasite.

1. Les premiers essais sur l'animal

Les premiers essais d'immunisation sont réalisés sur des modèles expérimentaux, animaux de laboratoire auxquels on injecte des sporozoïtes atténués issus de plasmodies spécifiques de l'espèce animale correspondante. L'immunité conférée est d'abord évaluée in vivo, par réinjection de sporozoïtes, virulents cette fois, et par la suite des tests in vitro sont réalisés pour évaluer la réponse humorale.

Ce sont les oiseaux qui ont fait l'objet des premières études. Ainsi, l'injection de sporozoïtes de plasmodies aviaires, tués ou inactivés par les ultra violets, engendre chez les oiseaux une immunité partielle (Mulligan et coll 1941). D'autres auteurs observent également, chez les oiseaux, le développement d'une immunité incomplète après injection de sporozoïtes inactivés de P. falciparum en présence, pour certains groupes, d'un adjuvant (saponine) (Richards 1966). La protection est appréhendée par l'injection de sporozoïtes virulents de la même espèce, tandis que les anticorps spécifiques sont détectés par agglutination (in vitro) de sporozoïtes homologues, après contact avec les sera des oiseaux immunisés. Cette étude permet de mettre en évidence la spécificité de stade, et le rôle des anticorps dans l'immunité ant sporozoïte, aussi bien que le rôle des adjuvants de l'immunité dans le renforcement de la réponse immune de l'hôte.

Chez les rongeurs, l'injection de sporozoïtes irradiés de P. berghei entraîne une immunité protectrice vis-à-vis d'injections de sporozoïtes vivants de la même espèce : l'immunité observée est partielle et des injections répétées améliorent la protection (Nussenzweig et coll 67) . D'autres études montrent une diversité antigénique plus importante entre deux stades d'une même espèce plasmodiale, qu'entre deux stades identiques d'espèces différentes (Nussenzweig et coll 1969). Mais alors que l'on progresse pas à pas, une amélioration dans la technique d'immunisation voit le jour en 1970 : elle consiste en l'introduction (chez les rongeurs) de sporozoïtes de P. berghei par les piqûres d'anophèles infestés puis irradiés. Cette pratique évite l'introduction de matériel tissulaire inhérent à la dissection des glandes salivaires des anophèles infestés, d'où sont extraits les sporozoïtes. L'application principale, mais peu utilisée pour des raisons pratiques, se situe sur le plan des essais de vaccination de l'homme, pour éviter le risque de sensibilisation au cours de l'immunisation.

Troisième volet des expérimentations animales, les primates ont fait l'objet du même type d'essai que les oiseaux et les rongeurs : en effet, l'injection de sporozoïtes irradiés de P. knowlesi protège les singes de l'infection engendrée par des sporozoïtes infectieux de la même espèce.

Au cours d'une étude sur le singe Saimiri, la présence d'anticorps ant sporozoïtes, est observée à travers un test in vitro, nommé par la suite circum sporozoite protein reaction (C.S.P. réaction) décrite par Vanderberg (1969) par la formation d'un précipité caractéristique à l'une des extrémités du sporozoïte. Cependant, ces mêmes auteurs ne manquent pas d'émettre quelques restrictions quant à la corrélation à établir entre la présence d'anticorps générateurs de la CSP réaction et la protection conférée in vivo (Nussenzweig, et coll 1970).

2. Les premiers essais chez l'homme

De l'oiseau au primate, il ne reste qu'un petit pas à franchir pour se tourner vers l'homme, pour lequel on oriente les travaux vers l'obtention d'une immunité dirigée contre P. falciparum.

La première expérience se déroule sur trois volontaires : elle permet surtout de prendre des repères tels que l'évaluation de la dose de radiations à soumettre aux sporozoïtes, ou de la quantité de sporozoïtes réellement efficaces pour protéger contre les piqûres d'anophèles infestants (Clyde et coll 1973b). Des résultats concordants avec les études effectuées chez l'animal sont recueillis.

D'autres recherches effectuées sur un volontaire permettent de compléter ces premiers résultats, et conclure à l'existence d'une immunité antisporozoïte spécifique d'espèce, non de souche.

Cependant, les auteurs s'interrogent sur la durée de la protection conférée (Clyde et coll 1973a). Certains rapportent une durée d'immunité de quinze semaines (Rieckman et coll 1974), tandis que d'autres confirment la courte durée de l'immunité conférée par piqûre d'anophèles infestants mais irradiés : inférieure à 3 mois, avec des souches de P. falciparum, de 3 à 6 mois avec P. vivax (Clyde et coll 1975).

Jusque là le rôle majeur de l'immunité humorale dans l'immunité antisporozoïte ne fait aucun doute. Aussi cherche-t-on à améliorer les tests *in vitro* permettant d'évaluer cette protection médiée par les anticorps. L'équipe de Nardin, en 1978, utilisant notamment la technique d'IFI et la CSP réaction aboutissent à trois conclusions :

- Présence d'antigènes spécifiques de stade en surface des sporozoïtes d'espèces murines, simiennes et humaines.
- Présence d'antigènes communs entre sporozoïtes ayant subi un traitement physique ou chimique (dessiccation) et stades sanguins.
- Enfin, l'immunisation avec des sporozoïtes irradiés mais intacts donne naissance en priorité à des anticorps spécifiques de stade.

Les résultats de ces diverses études ne traitent que de l'aspect sérique de la réponse anticorps, et c'est la mise au point des nouvelles techniques d'analyse, qui permettront de s'intéresser à l'équipement antigénique et immunogène du sporozoïte, à l'origine de cette réponse humorale.

3. Structures de la C.S.P. des plasmodies

- Identification

C'est grâce à l'utilisation des anticorps monoclonaux qu'il a été possible d'identifier la "circum sporozoite protein" des plasmodies animales et humaines.

Ainsi, dès 1980 Potocnjak produit un anticorps monoclonal dirigé contre une protéine de surface des sporozoïtes de P. berghei : protéine immunogène de poids moléculaire 44 000 D (Pb 44). Il démontre que les anticorps produits sont spécifiques d'espèce et confèrent une immunité complète qui varie cependant avec la charge des sporozoïtes infectieux et le titre des anticorps de l'animal immunisé. Ces anticorps agissent par leur fragment Fab pour entraîner la neutralisation des sporozoïtes et les auteurs suggèrent que le mode d'action passe par le blocage de l'infectivité des sporozoïtes ou de leur multiplication intra hépatique.

Enfin, ayant montré que le résultat de la vaccination par des sporozoïtes atténués était plus efficace que le transfert passif d'immunoglobulines, il suggère l'intervention de mécanismes à médiation cellulaire dans l'établissement de l'immunité ant sporozoïte.

Par la suite, d'autres auteurs se sont intéressés au mécanisme d'action des anticorps anti Pb 44. Au cours d'une étude où la spécificité de stade et d'espèce est confirmée, Aikawa en 1981 montre la présence de la Pb 44 sur des sporozoïtes infestés de P. berghei et sur des coupes de foie de rat infecté par P. berghei : les auteurs suggèrent que la Pb 44 participe au processus de reconnaissance des cellules hépatiques, préalable à la

pénétration du sporozoïte dans l'hépatocyte. L'équipe d'Hollingdale (1981), démontre sur cultures cellulaires où le cycle asexué de P. berghei a été reproduit que le Fab des anticorps anti Pb 44 empêche l'attachement des sporozoïtes de P. berghei sur les cellules cibles en culture. Ceci pousse les auteurs à penser que la Pb 44 est étroitement liée au processus d'entrée des sporozoïtes de P. berghei dans les hépatocytes (Hollingdale et coll 1982).

Des études similaires sont réalisées sur d'autres modèles. Ainsi, l'équipe de Cochrane (1982) s'attache à caractériser les antigènes sporozoïtaires de P. knowlesi. Pour cela, il produit des anticorps monoclonaux dirigés contre trois protéines de poids moléculaire 42, 50 et 52 KD, les 2 derniers étant les précurseurs de la première, protéines membranaires des sporozoïtes de P. knowlesi. La plupart de ces anticorps monoclonaux neutralisent l'infectivité des sporozoïtes (test in vivo).

D'autre part, les auteurs observent des réactions croisées entre les antigènes de la membrane du sporozoïte de P. knowlesi et de deux autres espèces plasmodiales, P. cynomolgi et P. falciparum, suggérant l'appartenance de ces antigènes protecteurs à une famille commune de protéines présentes à la surface des sporozoïtes.

De la même façon, on produit des anticorps monoclonaux dirigés contre les sporozoïtes de deux plasmodies humaines : P. falciparum et P. vivax (Nardin et coll 1982) et, grâce à des réactions d'IFI, on démontre la distribution des protéines reconnues par les anticorps monoclonaux sur toute la surface membranaire des sporozoïtes. On met en évidence des protéines spécifiques d'espèce mais aussi, là encore, des protéines communes entre P. knowlesi, P. cynomolgi et P. falciparum laissant supposer une communauté antigénique à ce niveau. Zavala (1983) va plus loin, suggérant que les anticorps ne reconnaissent qu'une seule région immunodominante de la CSP, protéine couvrant pourtant toute la surface membranaire du sporozoïte, puisque les épitopes reconnus par les sera des sujets immunisés sont les mêmes que ceux reconnus par les anticorps monoclonaux. De plus, les auteurs supposent la présence d'au moins deux épitopes identiques au sein de cette région immunodominante.

- Structure

C'est en fait le clonage des gènes codant pour les différentes C.S.P. qui apporteront les confirmations aux précédentes hypothèses, ainsi que beaucoup d'autres informations.

Les premières études qui ont permis d'identifier le gène codant pour la CSP portent sur P. knowlesi (Osaki et coll 1983). Ce gène est unique dans le génôme, s'exprime à un très haut degré au stade du sporozoïte et pas du tout au niveau des autres stades, suggérant une étroite régulation dont la base reste inconnue. Cependant le gène a été isolé à partir du DNA des formes asexuées érythrocytaires et non des sporozoïtes. Les auteurs ont cloné le gène de la CSP afin d'en obtenir la structure nucléotidique, en utilisant des phages recombinants. Ainsi, l'on peut constater que 40 % de la chaîne polypeptidique de la CSP est constituée par une unité de 12 acides aminés (AA) répétée 12 fois en suivant. Cette région est flanquée de régions contenant des AA chargés, puis d'une séquence "signal", hydrophobe, amino terminale (N terminale) et d'une séquence d'ancrage, hydrophobe, carboxyterminale (C terminale). La CSP est ancrée dans la membrane cellulaire par 20 AA carboxyterminaux. Or il existe des boucles dans cette région C terminale faisant suite à l'oxydation de paires de cystéine et à la formation de ponts disulfure : ces boucles exposent principalement les unités répétitives avec ou sans la région N terminale. Les résultats de Zavala (1983) sur P. berghei montrant qu'au sein de la CSP, il existe une région immunodominante, suggèrent que le peptide répétitif d'Osaki est le seul à interagir avec le système immunitaire : le reste de la protéine restant dissimulé ou inaccessible.

En 1984, l'équipe d'Enéa a réussi à cloner le gène codant pour la CSP de P. falciparum. Il en décrit la séquence nucléotidique pour déduire la structure peptidique de la protéine codée. Ce gène semble également unique dans le génôme.

L'étude de la séquence nucléotidique du gène de la CSP de P. falciparum est approfondie grâce à une souche brésilienne (Dame et coll 1984). Le gène code pour une protéine de 412 AA et la protéine contient 41 fois la répétition d'un térapeptide dont 37 fois Asn-Ala-Asn-Pro et 4 fois Asn-Val-Asp-Pro (Asn : asparagine - Ala : Alanine - Pro : proline - Val : valine - Asp : acide aspartique). (cf figure 6)

Les auteurs établissent une comparaison avec la CSP de P. knowlesi dont le gène a été cloné par Osaki en 1984³, ce qui amène plusieurs remarques : d'abord l'identité de taille, puis la similarité de la structure globale, avec une séquence signal hydrophobe N-terminale, une séquence d'ancrage C terminale hydrophobe, des régions constituées d'AA chargés, enfin une région centrale constituée de peptides répétés. Il existe, de plus, deux régions présentant le degré d'homologie le plus fort entre les deux séquences, appelées Région I et Région II (cf figure 7), et, à ce stade, certains pensent qu'elles sont impliquées dans la fixation aux cellules cibles hépatiques, pouvant aussi servir de support immunogène invariant.

La CSP de P. vivax est ensuite la cible des investigations. Arnot en 1985, clone le gène codant pour la CSP de P. vivax et le compare aux deux précédemment décrites. La séquence peptidique de P. vivax est constituée de 373 AA, avec une région centrale emportant 19 fois la répétition d'un nonapeptide Asp-Arg-Ala-Asp ou Ala-Gly-Gln-Pro-Ala-Gly (Arg : arginine - Gly : glycolle - Gln : glutamine).

La structure générale du gène est comparable aux deux précédemment décrits. L'analyse des séquences nucléotidiques montre une étroite homologie entre le gène de la CSP de P. vivax et P. knowlesi et à l'opposé peu de ressemblance avec P. falciparum.

On peut remarquer que, dans ce cas comme dans les précédents, seul un petit nombre d'AA différents, entre dans la constitution des structures répétitives.

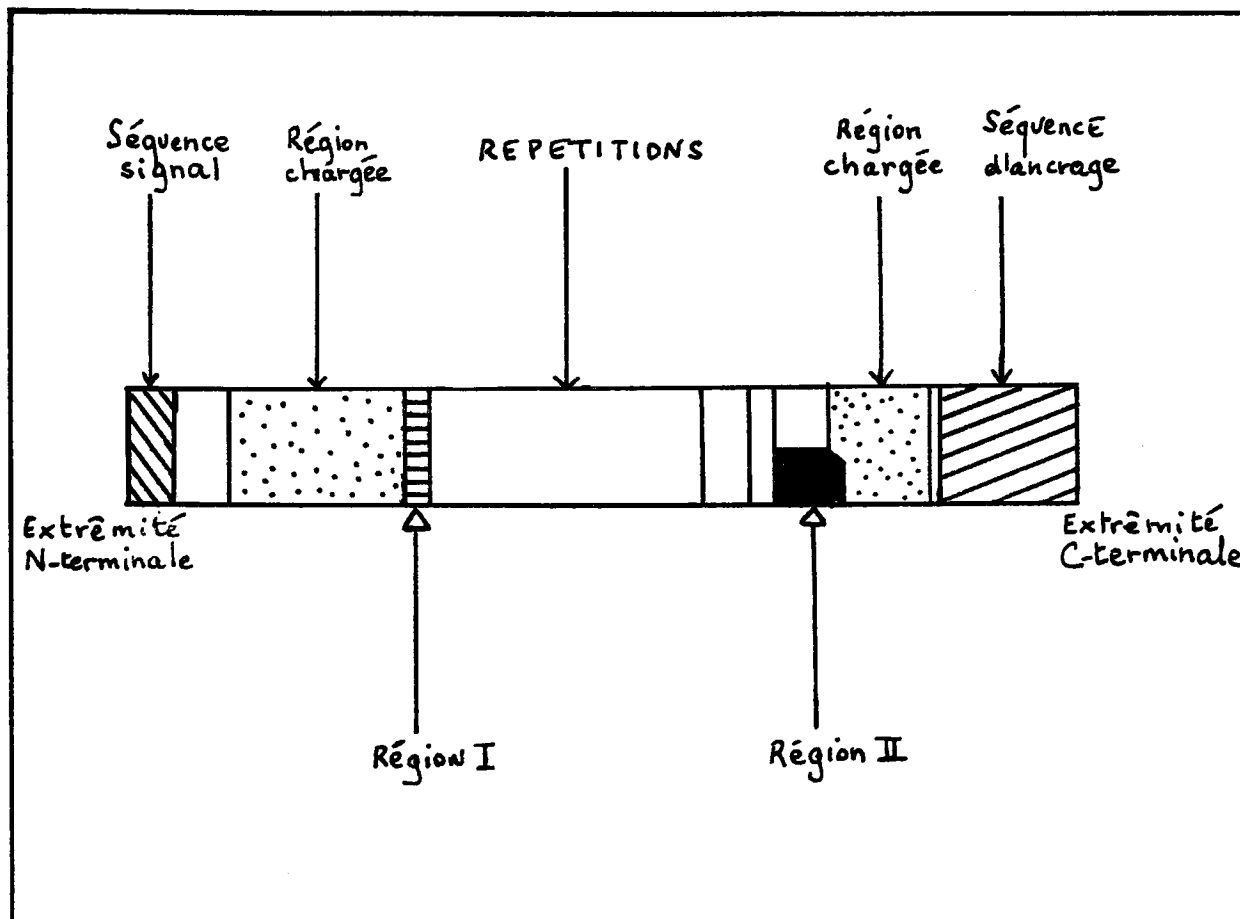


Figure 6 - Représentation schématique de la CSP de *P. falciparum* (d'après Mitchell 1989)

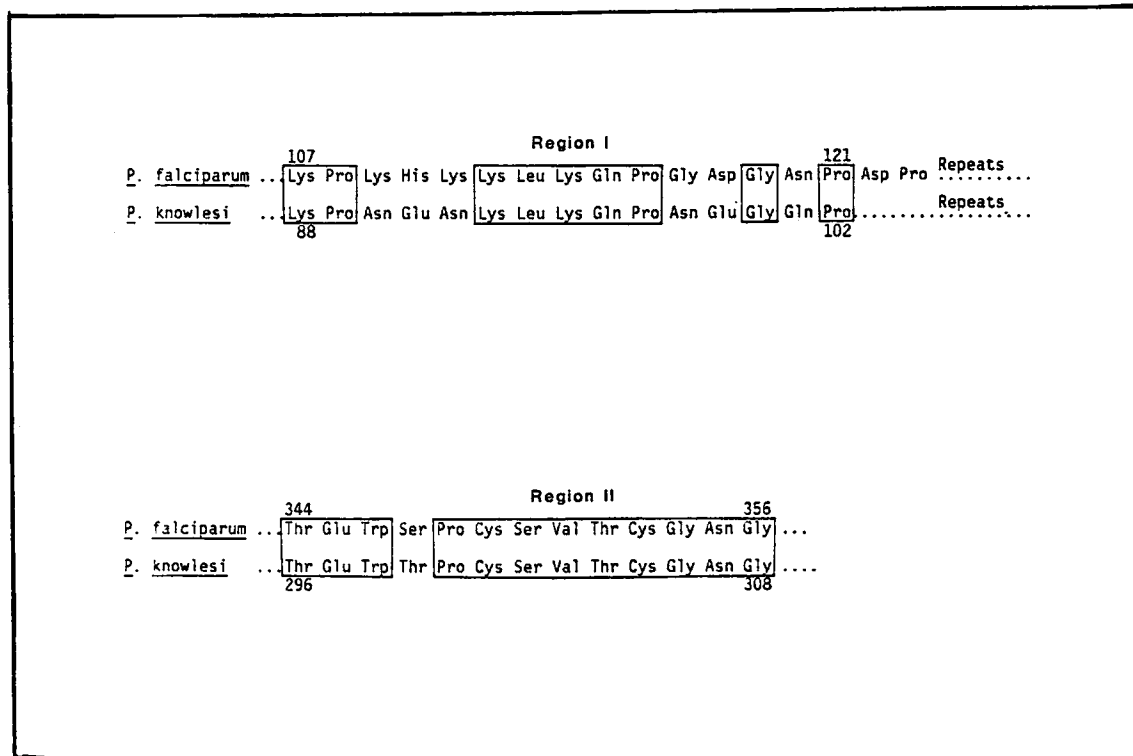


Figure 7 - CSP de P. falciparum et P. knowlesi :
Regions I et II.
 (d'après Dame et coll 1984)

Ensuite ces auteurs confirment l'existence d'un épitope immunodominant au sein des structures répétitives ajoutant qu'il est stable dans les souches d'origines géographiques différentes.

Par ailleurs, selon les mêmes auteurs, P. vivax et P. falciparum se distinguent des plasmodies simiennes par la remarquable stabilité des épitopes de la CSP.

D'autres équipes cherchent à savoir si les séquences répétitives sont constantes dans les souches géographiquement éloignées, grâce à un anticorps monoclonal dirigé contre les épitopes immunodominants de la CSP de P. vivax et de P. falciparum. Les résultats montrent à travers 16 souches de P. falciparum et 8 souches de P. vivax que les épitopes immunodominants respectifs sont présents dans tous les isolats. Cette découverte trouvera plusieurs applications dont l'utilisation d'un test immunoradiométrique à 2 sites (I.R.M.A.) pour identifier les sporozoïtes chez les anophèles et déterminer le ou les espèces transmises par le vecteur, et l'utilisation d'un peptide synthétique dans les tests sérologiques à visées diagnostique ou épidémiologique.

Grâce à une sonde à DNA, issue d'une souche brésilienne de P. falciparum, Weber (1985) confirme la constance de la séquence peptidique de la C.S.P. au sein de 18 souches de P. falciparum. Seules de légères variations dans la longueur du gène de la CSP sont observées ; de plus, les variations ne sont observées qu'au niveau du DNA génique, alors que la séquence peptidique est constante. Les résultats de Weber sont compatibles avec l'existence d'un seul gène par haploïde, et l'étude permet de conclure au caractère hautement constant du peptide répétitif de la région centrale de la CSP de P. falciparum : Asn-Ala-Asn-Pro (NANP en dénomination internationale des AA).

- Interprétation

La présence quasi constante d'épitopes répétitifs au sein des diverses CSP a conduit les chercheurs à s'interroger sur leur rôle exact et plusieurs hypothèses sont proposées.

Ainsi, certains pensent qu'ils servent à augmenter la réponse immune de l'hôte afin de le protéger contre les superinfestations par les plasmodies de la même espèce. L'établissement d'une nouvelle espèce plasmodiale chez l'hôte ne dépendrait que de la modification de la séquence peptidique de ces épitopes (Vergara et coll 1985).

L'équipe des Nussenzweig (1986) quant à elle, opte pour l'interaction de ces épitopes avec les hépatocytes de l'hôte. Etant donné le nombre élevé des répétitions, s'il s'opère une variation de l'une des sous-unités, il n'y aura pas de conséquence dans l'attachement des sporozoïtes aux hépatocytes.

Troisième hypothèse, que nous avons déjà évoquée dans le précédent chapitre sur l'immunité antipalustre : l'échappement à l'immunité développée par l'hôte (cf II.1.2.2).

S'il est difficile et prématuré de choisir l'une des trois éventualités citées plus haut, il est évident qu'aucune des hypothèses n'exclut les autres et que la liste n'est pas exhaustive.

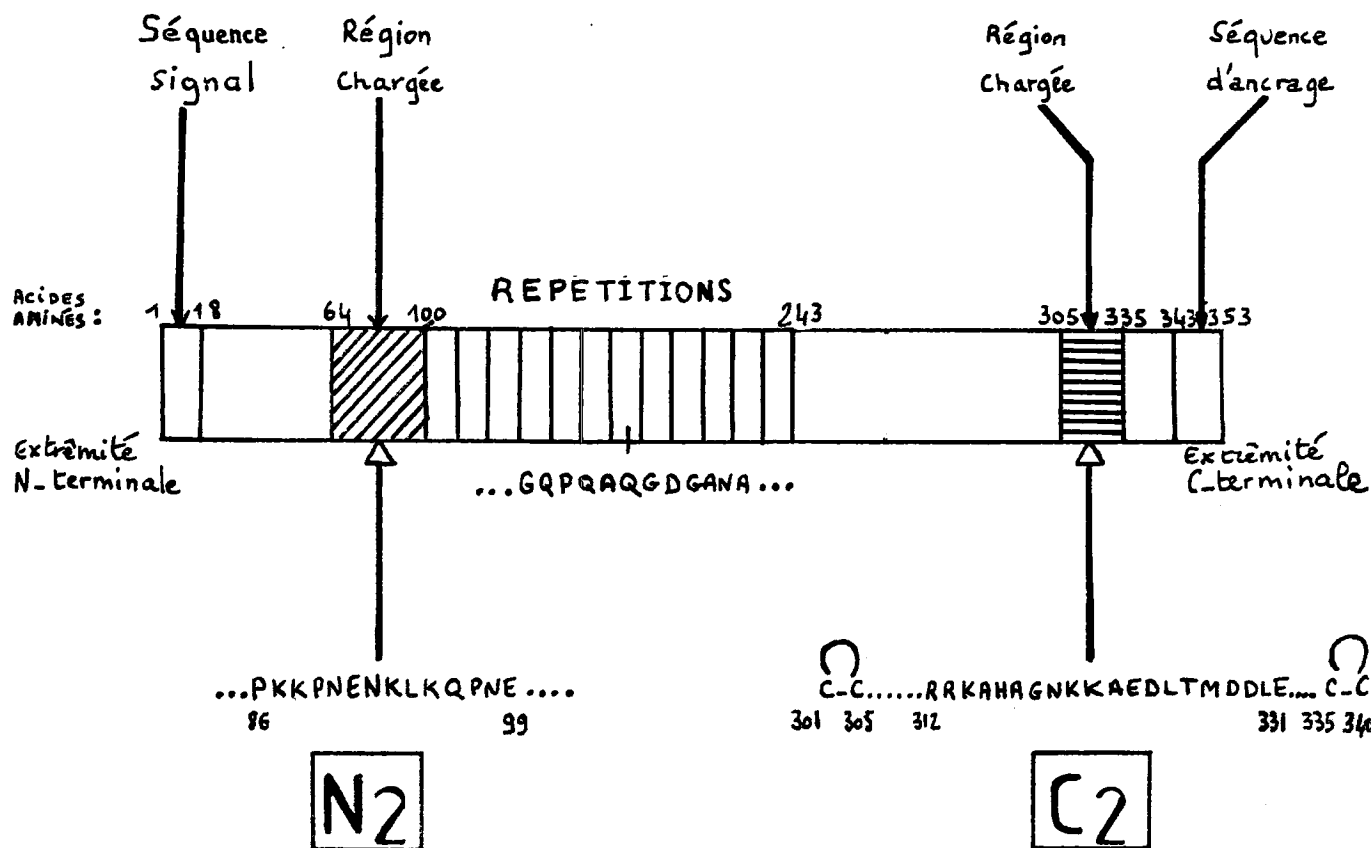
4. Obtention de fractions immunogènes

Quand on s'est aperçu qu'au sein de souches plasmodiales de la même espèce mais d'origine géographique différente, les régions de répétition de la CSP demeurent constantes, et sont capables de susciter, dans certaines conditions, une réponse humorale protectrice, les chercheurs ont adopté l'idée d'en faire un élément constitutif du vaccin ant sporozoïte.

On a produit des peptides variés dans leur nature et leur taille mais tous constitutifs de la CSP et de très nombreuses études se sont attachées à la recherche de ces fractions immunogènes. Il est à noter que c'est surtout l'immunité humorale développée par ces peptides qui a tout d'abord été évaluée.

Vergara (1985) s'est intéressé à P. knowlesi. On se rappelle que la structure de la CSP décrite par OSAKI en 1983 comportait une région de répétition (12 AA répétés 12 fois en suivant) flanquée de régions contenant des acides aminés chargés, puis d'une séquence signal N terminale, et d'une séquence d'ancrage C terminale. Vergara réalise donc, d'une part, la synthèse de 2 peptides appartenant aux régions contenant des AA chargés (peptides N₂ accolé aux peptides répétitifs par le pôle N terminal, et peptide C₂, plus proche de la région C terminale) et d'autre part, un peptide de la région de répétition (cf figure 8). Cette étude permet d'affirmer que le peptide contenant l'épitope répétitif est spécifique d'espèce, contrairement à N₂ et C₂ des CSP de P. falciparum et P. knowlesi. N₂ possède un haut degré de conservation et les anticorps anti N₂ inhibent l'infectivité des sporozoïtes, mais de façon partielle. Cela suggère néanmoins pour le peptide N₂ un rôle non négligeable au sein du sporozoïte, qualité requise pour faire partie d'un vaccin ant sporozoïte.

L'équipe de BALLOU (1985) synthétise des peptides de taille variée, appartenant à la région de répétition de P. falciparum, et des peptides des régions I et II de la CSP de la même espèce, régions non répétitives décrites par Dame en 1984). (cf figure 6). L'immunogénicité des peptides est évaluée après leur couplage à une protéine porteuse ou "carrier", chez la souris et le lapin.



A=Alanine	H=Histidine	N=Asparagine	S=Sérine
C=Cystéine	I=Isoleucine	P=Proline	T=Thréonine
D=Acide aspartique	K=Lysine	G=Glutamine	V=Valine
E=Acide glutamique	L=Leucine	R=Arginine	Y=Tyrosine
G=Glycine	M=Méthionine		

Figure 8 - Représentation schématique de la CSP de *P. Knowlesi* et détail de la séquence des acides aminés constitutifs de N₂ et C₂.
(d'après Vergara 1985)

Il s'avère que seuls les anticorps anti-peptides de la région centrale (AA répétés) présentent une fonction biologique. Celle-ci est évaluée à l'aide de la CSP réaction et de l'inhibition de l'infectivité des sporozoïtes (ISI) *in vitro*, correspondant à l'inhibition de l'invasion des cellules d'hépatome humain, décrite par Hollingdale et coll en 1984. D'après les auteurs, les peptides de la région I et II ne sont pas impliqués dans la reconnaissance des récepteurs de l'hépatocyte, ce qui élimine leur candidature comme partie prenante d'un vaccin.

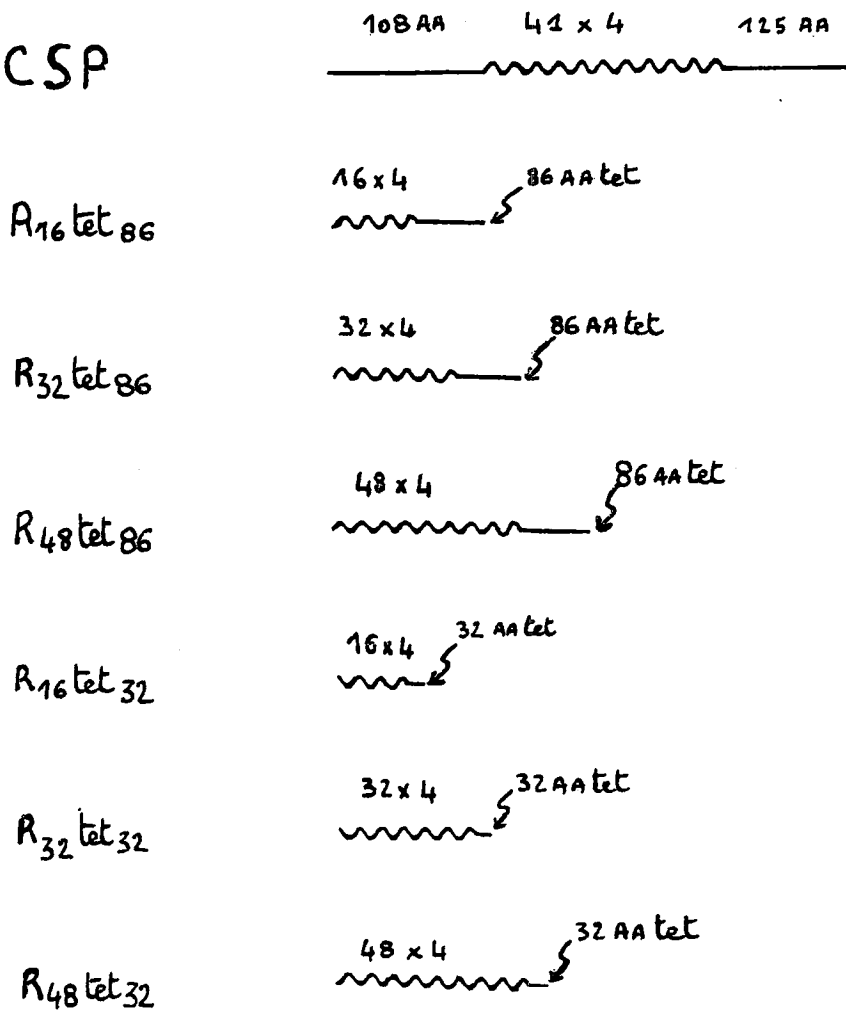
Par ailleurs cette étude utilisant une protéine porteuse soulève quelques réserves :

- la limitation de la quantité de peptides pouvant être couplée au "carrier",
- la sensibilisation de l'hôte conduisant à une clairance rapide de l'antigène couplé,
- la suppression "carrier spécifique" de la réponse à l'épitope décrite par Herzenberg (1980). Celui-ci montre sur un modèle murin qu'une protéine "carrier" est susceptible d'engendrer une suppression de la réponse humorale vis-à-vis de l'épitope qui lui est couplé, lorsqu'elle est introduite pour la seconde fois dans l'organisme. D'où problème si la vaccination nécessite des rappels.

Les chercheurs se sont donc orientés vers les peptides de la région centrale de la CSP.

Ainsi Young (1985), obtient la production par recombinaison génétique dans E. coli des peptides appartenant aux séquences répétitives de la CSP de P. falciparum. De taille supérieure aux peptides synthétisés dans l'étude de Ballou (1985), ils possèdent 16, 32 et 48 unités (cf figure 9) couplées à une séquence de taille variable, constituée d'une partie de la protéine codée par le gène de résistance à la tétracycline contenu dans un plasmide recombinant d'E. coli.

CSP



(AA = ACIDE AMINÉ)

Figure 9 - Représentation schématique de peptides de la CSP de *P. falciparum* obtenus par recombinaison génétique dans *E. coli*.
(d'après Young et coll 1984)

Les peptides obtenus sont ainsi décrits :

R ₁₆ tet ₈₆	R ₁₆ tet ₃₂
R ₃₂ tet ₈₆	R ₃₂ tet ₃₂
R ₄₈ tet ₈₆	R ₄₈ tet ₃₂

Avec R = répétition = Asn-Val-Asp-Pro ou Asn-Ala-Asp-Pro

16 ; 32 ; 48 = nombre de répétitions

tet_x = région codée par le gène de résistance à la tétracycline dont x représente le nombre d'AA constitutif de cette région.

seuls les peptides couplés à tet₃₂ sont purifiés puis injectés à la souris en présence ou non d'adjuvants.

L'expérience confirme la nécessité des adjuvants et atteste l'immunogénicité des trois peptides testés. Cependant, R₁₆ tet₃₂, le plus court des trois, apparaît moins performant que les deux autres puisqu'il engendre des titres anticorps moins élevés (en E.L.I.S.A.).

On peut donc en conclure que la longueur des peptides joue un rôle important dans le titre des anticorps obtenus.

Ceci devra être pris en compte dans une éventuelle fabrication par synthèse peptidique, cette autre technique produisant difficilement de longs peptides.

Enfin, il faut insister sur le fait que l'immunité est évaluée à travers des tests in vitro ce qui ne permet aucunement de prédire la protection conférée in vivo.

Complément à l'étude de Young, l'équipe d'Hoffman (1986) tente de préciser le rôle exact des anticorps antisporozoïtes à travers des tests comparant l'ELISA, la C.S.P. réaction et I.S.I. chez des sujets vivant en pays d'endémie. Plusieurs conclusions sont apportées :

- le peptide R₃₂ tet₃₂ peut être utilisé comme antigène dans un test ELISA destiné à détecter le taux des anticorps des sujets vivant en zone endémique.
- Les anticorps ainsi détectés (ELISA) ne sont pas systématiquement doublés d'une activité biologique en CSP réaction et ISI.

Les auteurs émettent trois hypothèses à ce sujet :

- La faible affinité des anticorps détectés en ELISA pour les peptides constitutifs de la CSP
- La reconnaissance d'épitopes non impliqués dans la CSP reaction et en I.S.I.
- Les anticorps détectés en ELISA ne seraient que des anticorps anti-stade sanguins ne croisant avec les épitopes du sporozoïte qu'en ELISA, la moins spécifique de ces trois réactions.

Enfin, la même équipe d'Hoffman (1987) au cours d'un screening réalisé chez des sujets vivant au Kenya montre qu'il n'y a pas de différence significative du titre des anticorps entre les sujets immunisés de façon naturelle et ceux immunisés avec le peptide R₃₂ tet₃₂ (Ballou 1987) à travers l'ELISA et l'IFI. Ainsi, la preuve est faite qu'il est possible de reproduire les conditions naturelles d'infection, au moins sur le plan du titre en anticorps.

Même si l'obtention d'un haut titre en anticorps, paraît essentiel, il a semblé également important d'étudier le mécanisme d'action de ces anticorps afin d'en évaluer l'impact.

L'équipe de Mazier (1986) a étudié l'effet des anticorps obtenus par immunisation de souris en présence d'adjuvant avec des peptides répétitifs de la CSP de P. falciparum issus de la recombinaison génétique ($R_{16} tet_{32}$, $R_{32} tet_{32}$, $R_{48} tet_{32}$) ou de la synthèse chimique. L'IFI est utilisée pour analyser l'effet des anticorps sur l'infectivité des sporozoïtes vis-à-vis des cellules hépatiques humaines en culture, tandis que l'ELISA mesure de façon quantitative le titre des anticorps. Les auteurs notent l'absence de corrélation entre les résultats obtenus en ELISA et en IFI.

De plus, les anticorps obtenus après injection de peptides synthétiques ou recombinants exercent un effet inhibiteur sur l'attachement, la pénétration et le développement intracellulaire. Cet effet n'est pas toujours total et dépend du titre.

Enfin, il semble que les anticorps anti-sporozoïtes continuent d'exercer un effet inhibiteur après traversée du sporozoïte dans l'hépatocyte : ceci correspond à un effet à long terme, indépendant du titre des anticorps du sérum testé. Mais on ignore néanmoins si les anticorps peuvent pénétrer dans l'hépatocyte ou non.

Enfin, complétant les études précédentes, le travail de Zavala (1985) est particulièrement intéressant. Il étudie les sera de sujets gambiens vivant en région endémique pour tenter d'établir une corrélation entre les anticorps naturellement acquis et les peptides appartenant aux régions répétitives. Il montre ainsi que l'épitope immunodominant de la CSP de P. falciparum, est contenu dans un dodécapeptide synthétique $(NANP)_3$ avec N = asparagine, A = alanine, P = proline. On souligne qu'un épitope immunodominant correspond à l'épitope dont la majorité des anticorps sériques portent la spécificité.

A la lumière de ces résultats, (NANP)₃ a été couplé à une protéine porteuse, le toxoïde tétanique, pour tester son immunogénicité en présence d'adjuvant complet de Freund chez l'animal. De hauts titres en anticorps spécifiques sont obtenus, et sont capables de bloquer, *in vitro*, l'infectivité des sporozoïtes, l'inhibition étant dépendante du titre en anticorps.

Autre fait essentiel, dans une étude de Weber et Hockmeyer, en 1985, toutes les souches d'origine géographiques différentes examinées par les deux équipes contiennent ce peptide (NANP)₃, confirmant ainsi les résultats de Zavala.

Il semble donc clair, que dans un vaccin multivalent, la partie dirigée contre les sporozoïtes contiendra au moins l'épitope (NANP)₃ puisqu'il apparaît comme un épitope B, capable de stimuler les lymphocytes B à produire des anticorps.

La question est de savoir si les peptides de la CSP, synthétiques ou recombinants, sont également capables d'engendrer des réponses, cellulaires, et notamment la sécrétion d'IFN γ dont on a vu l'importance plus haut (cf II.1.1.2.).

Un des moyens utilisés pour l'exploration de l'immunité à médiation cellulaire emploie des tests de prolifération des lymphocytes (du sujet immunisé) *vis-à-vis* de l'antigène spécifique. Chez l'animal on travaille sur les lymphocytes spléniques, tandis que chez l'homme seuls les lymphocytes périphériques sont accessibles.

Egan (1987) confirme, chez la souris, la nécessité de stimuler l'immunité cellulaire lors de l'immunisation avec des peptides vaccinaux. Pour cela, il utilise deux types de peptides :

1. Peptide synthétique, contenant 2 octapeptides de la région de répétition, couplé à une protéine porteuse
2. Peptide obtenu par recombinaison génétique contenant l'intégralité de la région de répétition de la CSP de P. falciparum et injecté en présence d'adjuvant.

et comme témoins de l'expérience, l'administration parallèle de la protéine seule, et des injections successives de sporozoïtes irradiés.

Les résultats obtenus avec les peptides sont quantitativement et qualitativement différents de ceux obtenus après immunisation par injection de sporozoïtes irradiés. En effet bien que dans les trois cas l'obtention de hauts titres en anticorps testés en ELISA, CSP réaction et ISI soient obtenus, seules les souris immunisées avec des sporozoïtes irradiés sont protégées face aux piqûres d'anophèles infestés par P. falciparum. Cela suggère, à l'évidence, que le mécanisme de l'immunité induite par les sporozoïtes irradiés diffère de celui engendré par les sous-unité vaccinales.

Par la suite, le transfert de cellules T (issues de la rate de souris immunisées avec des sporozoïtes irradiés) contrairement au transfert de cellules B (de même provenance) confère une protection aux souris réceptrices vis-à-vis de sporozoïtes infectieux.

A l'inverse, le transfert de cellules spécifiques de souris immunisées avec les différents peptides, ne protège pas les souris réceptrices. Quelques hypothèses sont présentées par les auteurs pour expliquer l'absence de stimulation des cellules T par les peptides vaccinaux :

- Les peptides synthétiques semblent trop courts pour contenir un épitope T.
- Les peptides recombinants, quoique assez longs, ne contiennent pas d'épitope T, soit parce qu'il n'appartient pas à la région de répétition de la CSP, soit que la présentation est inadéquate pour engendrer une réponse T.

Mais avant d'aller plus loin dans la recherche d'un ou de plusieurs épitopes T, trois équipes pionnières en la matière ont testé des préparations vaccinales ant sporozoïtes de l'homme. Ces essais ont enrichi le répertoire des connaissances sur le sujet, et ont engendré de nouveaux axes de recherche.

5. Trois essais de vaccination sur l'homme

Tous les essais ont été réalisés sur des volontaires humains : deux par des équipes américaines, le troisième par une suisse. Les deux types de peptides, synthétiques ou recombinants, ont été utilisés, en présence d'adjuvants. Enfin, l'immunité humorale et cellulaire ont été explorées à chaque fois.

- Première tentative (Ballou et coll 1987).

L'équipe de Ballou injecte à 15 volontaires le peptide obtenu par recombinaison génétique, R₃₂ tet₃₂, en présence d'un adjuvant, l'hydroxyde d'aluminium. Trois ou quatre injections, selon les groupes de sujets choisis, sont réalisées à 1 mois d'intervalle dans un protocole incluant cinq concentrations différentes du peptide.

Le peptide R₃₂ tet₃₂ est défini ainsi :

MDP (NANP)₁₅ (NVDP) (NANP)₁₅ NVDP tet₃₂

avec :

M = méthionine ; D = acide aspartique

P = proline ; V = valine

N = asparagine ; A = alanine

et prend le nom FSV-1 = Falciparum sporozoïte vaccine-1

L'évolution des anticorps chez les sujets vaccinés est détectée en ELISA (vis-à-vis de l'antigène R₃₂ LR, avec LR = deux premiers acides aminés de tet₃₂) I.F.I., C.S.P. réaction, I.S.I.

Les anticorps sont titrés une semaine après la première injection, puis toutes les 2 semaines pendant 16 semaines et au moment de l'épreuve avec les sporozoïtes infectieux sur 6 sujets vaccinés et 2 non vaccinés.

Les résultats montrent une bonne tolérance du vaccin. La cinétique d'apparition des anticorps est rapide : en ELISA, on détecte des immunoglobulines dès la deuxième semaine, avec essentiellement des IgG.

La majorité des sujets, environ 80 %, possèdent de hauts titres en anticorps qui se maintiennent pendant 2 à 3 semaines, puis baissent avec une demi-vie de 28 jours.

Les taux d'anticorps obtenus dépendent de la dose de FSV-1 injectée. De plus, les titres atteints après injection de la dose maximale de FSV-1, sont comparables aux taux le plus élevés chez les sujets vivant en zone d'endémie palustre.

Il n'y a pas de corrélation entre les titres anticorps détectés en ELISA, et les résultats de la C.S.P. réaction ou de l'I.S.I., ni d'ailleurs entre l'intensité des tests de prolifération lymphocytaire et le taux d'anticorps décelés ou la dose de FSV-1 injectée.

Cinquante semaines après la première injection de FSV-1, 6 parmi les 15 volontaires reçoivent une 4ème injection de vaccin. Ils sont ensuite exposés aux piqûres d'anophèles infestés avec des sporozoïtes de P. falciparum. La protection de ces 6 sujets est corrélée avec le niveau des anticorps, mais seul le patient ayant les titres les plus élevés ne développera pas de parasitémie détectable.

Fait important, on a pu remarquer ici que l'injection de sporozoïtes par voie naturelle n'augmentait pas les titres en anticorps spécifiques. De plus, le test de prolifération des lymphocytes vis-à-vis de R₃₂ LR acquiert une évolution parallèle aux taux des anticorps antisporozoïtes. Cela permet aux auteurs de penser qu'un épitope T serait présent dans la région de répétition de la CSP de P. falciparum mais ne ferait pas partie de FSV-1.

Au vu de ces résultats, il semble donc qu'ici aussi, la protection conférée soit dépendante du titre en anticorps. La discordance entre la stimulation de l'immunité humorale et l'immunité à médiation cellulaire, indique qu'il reste à trouver un ou plusieurs épitopes T pour augmenter non seulement la réponse des B lymphocytes, mais aussi afin de mettre en jeu les effecteurs cellulaires dans la protection antiparasitaire. La stimulation de tels épitopes présents sur le parasite permettrait un renforcement de la protection en situation d'infestation naturelle.

- Deuxième tentative (Herrington et coll 1987)

Pour sa part, Herrington choisit un peptide synthétique qu'il injecte à 35 volontaires dans un protocole en double aveugle, en 3 injections, distantes d'un mois.

Le peptide utilisé est (NANP)₃ l'épitope immunodominant de la CSP de P. falciparum selon la formule (Acetyl-cystéine (NANP)₃ OH) couplé à une protéine porteuse, le toxoïde tétanique et injecté en présence d'adjuvant, l'hydroxyde d'aluminium.

Les anticorps sont testés en ELISA vis-à-vis de NANP et en IFI vis-à-vis de sporozoïtes de P. falciparum

De même que pour FSV - 1, le vaccin est ici bien toléré. Les titres en anticorps dépendent de la dose injectée mais n'augmentent pas avec les rappels. Ces anticorps détectés n'ont pas donné de positivité dans la C.S.P. réaction.

Tous les tests de prolifération lymphocytaires effectués avec les lymphocytes périphériques des sujets sont restés négatifs vis-à-vis de (NANP)₃ et (NANP)₅₀, ce qui suggère l'absence d'épitope T au sein de (NANP)₃.

Afin de reproduire les conditions naturelles de l'infection, trois sujets parmi ceux ayant le plus haut titre anticorps, sont exposés aux piqûres d'anophèles infestés par P. falciparum.

La différence entre le délai d'apparition de la parasitémie du groupe vacciné et du groupe contrôle (non vacciné) est significative. Cependant, un seul parmi les trois volontaires, ne développera jamais de parasitémie détectable, jusqu'à 29 jours après les piqûres d'anophèles (date de fin de l'expérience).

Cet essai de vaccination effectué chez l'homme, quoique décevant, conduit à s'interroger devant la faible réponse anticorps obtenue. Les auteurs se demandent la véritable portée de la formulation du vaccin, peptide et protéine porteuse, sur la mise en jeu de l'immunité. Qu'en est-il de l'effet "porteur spécifique", déjà évoqué dans de précédents chapitres, et de la restriction de la réponse T par le complexe majeur d'histocompatibilité (système HLA), phénomène décrit par ailleurs chez la souris (Good et coll 1986, Del Giudice et coll 1986).

- Troisième tentative (Etlinger et coll 1988)

Permettant d'étendre les résultats d'Herrington, Etlinger teste chez 11 volontaires, un peptide couplé au toxoïde tétanique à peu près identique à celui utilisé par l'équipe précédente, injecté en présence d'Al(OH)₃. Les anticorps sont détectés en ELISA, I.F.I., immunoblotting et des tests de prolifération lymphocytaires sont également réalisés.

Une bonne tolérance est observée chez tous les volontaires. Le vaccin entraîne la production d'anticorps anti (NANP)₃ chez 7 sur 11 volontaires (ELISA), des anticorps antisporozoïtes chez 6 sur 11 volontaires (IFI), et des anticorps anti C.S.P. de P. falciparum chez 7 sur 11 volontaires (immunoblot). Cependant, jamais on n'atteint des titres comparables à ceux des sujets vivant en pays d'endémie palustre.

De plus, les titres des anticorps anti-peptides n'augmentent qu'après de multiples injections.

Autre fait remarquable, après la seconde injection, la réponse IgM persiste alors qu'il n'y a pas de différence significative dans les taux d'anticorps (anti-peptide ou anti-sporozoïtes) entre la première injection et la deuxième injection. Ce phénomène a déjà été observé sur des modèles animaux par plusieurs équipes, cela correspondant à un effet de suppression "carrier spécifique" avec production d'une réponse IgM contre le peptide conjugué à la protéine porteuse, et une diminution globale de la réponse IgG (Schutze et coll 1987). Le problème est de savoir si un sujet ayant été préalablement exposé à la molécule porteuse utilisée dans le vaccin anti-sporozoïte sera ou non victime de la suppression de la réponse au peptide par la protéine porteuse, ou si, comme le montre certaines études chez la souris (Herzenberg et coll 1982) un nombre élevé de rappels pourrait gommer cet effet.

Enfin, les tests de prolifération lymphocytaire sont décevants : les réponses vis-à-vis de (NANP)₃ ou (NANP)₂₀ sont de courte durée, et de faible amplitude par rapport à celles que l'on peut observer avec d'autres antigènes.

En conséquence, les auteurs en concluent eux-aussi, que (NANP)₃ n'est pas un bon épitope T. On peut remarquer cependant que les rares clones de lymphocytes à proliférer sont de phénotype CD4⁺ (c'est-à-dire qu'ils portent l'antigène reconnu par les anticorps monoclonaux du "Cluster of differentiation CD 4") comme tous les T helpers.

A la suite de ces trois expériences de vaccination anti-sporozoïtes chez l'homme, il est clair que la recherche s'oriente désormais sur l'identification d'un ou plusieurs épitopes T, puisqu'il s'avère que l'épitope immunodominant de la CSP de P. falciparum n'est pas un bon épitope T. Quelques équipes se penchent déjà sur le sujet comme nous allons le voir à présent :

6. A la recherche d'épitopes T

La nécessité de trouver des épitopes T s'exerce à deux niveaux. Le premier pour la stimulation des $CD4^+$, ou T helpers, intervenants pour le renforcement de la production des anticorps par les lymphocytes B, le second pour la stimulation des $CD8^+$, ou lymphocytes cytotoxiques, effecteurs cellulaires directs ou indirects par l'intermédiaire des lymphokines.

On sait de façon générale, que la réponse T est restreinte par le CMH (complexe majeur d'histocompatibilité appelé système HLA chez l'homme). Autrement dit, les lymphocytes ne reconnaissent un antigène qu'en association avec les produits de classe I ($CD8^+$) ou de classe II ($CD4^+$). Mais qu'en est-il de la réponse à la stimulation palustre ?

Des études ont démontré, chez la souris, que la réponse humorale au peptide synthétique (NANP)₄₀ ne s'opère qu'en présence de l'allèle b de la région I-A du CMH murin (= système H2) (Del Giudice et coll 1986). Les mêmes résultats ont été obtenus avec (NANP)₆ pour Good (1986).

Cependant, chez les souris non répondeuses, dans l'étude de Del Giudice (1986), on obtient quand même une réponse anticorps en utilisant l'adjuvant complet de Freund (ACF). Cela suggère que l'obtention de taux élevés d'anticorps, nécessite :

- la présence d'un épitope T aussi peu restreint que possible par les gènes de la réponse immune pour que le nombre de répondeurs soit maximal,

ou

- la présence de plusieurs épitopes T restreints différemment par le C. M. H. pour augmenter les chances de vacciner tout le monde.

Quoiqu'il en soit, on ignore dans quelle mesure l'homme est soumis aux mêmes degrés de restriction syngénique que la souris, mais il est établi qu'en pays d'endémie palustre, les taux d'anticorps antisporozoïtes varient d'un sujet à l'autre à l'intérieur d'une même classe d'âge (Good et coll 1988).

- Identification d'épitopes T efficaces chez l'homme
(cf figure 10)

L'équipe de Good (1987) a mis en évidence un épitope T situé en dehors de la région de répétition, dont il a testé l'efficacité chez la souris en le couplant au peptide synthétique (NP(NANP)₅NA). Il obtient de hauts titres en anticorps spécifiques chez des souris qui ne répondent pas à l'injection de NP(NANP)₅NA émulsionné dans l'ACF. Il souligne qu'il existe un nombre restreint d'épitopes T immunodominants reconnus par les T helpers.

L'épitope T qu'il met en évidence, appelé Th2R, situé de l'acide aminé 326 à 343, fait partie de la région de la CSP sujette à des variations antigéniques. Th2R stimule les T helpers mais ne semble pas activer les lymphocytes cytotoxiques.

Dans une autre étude, la même équipe de Good (1988) isole trois peptides identifiés comme trois épitopes T immunodominants grâce à un travail sur des sujets d'Afrique de l'Ouest (Gambie). Tous les trois sont également situés dans des régions de variation antigénique de la CSP de P. falciparum. Parmi eux on reconnaît Th2R, décrit précédemment.

Good ne précise pas le phénotype des lymphocytes T reconnaissant des épitopes T identifiés mais Kumar (1988) démontre sur modèle murin, qu'il n'existe qu'un épitope T présent sur la CSP de P. falciparum capable de stimuler les lymphocytes cytotoxiques CD8⁺. De plus cet épitope se situe dans une région variable (AA 368 à 390).

Mais l'espoir renaît avec Sinigalia (1988) qui décrit un épitope T, situé dans une région constante de la CSP de P. falciparum: CS.T₃.

Des études sont en cours pour déterminer le niveau de la restriction génétique concernant cet épitope T.

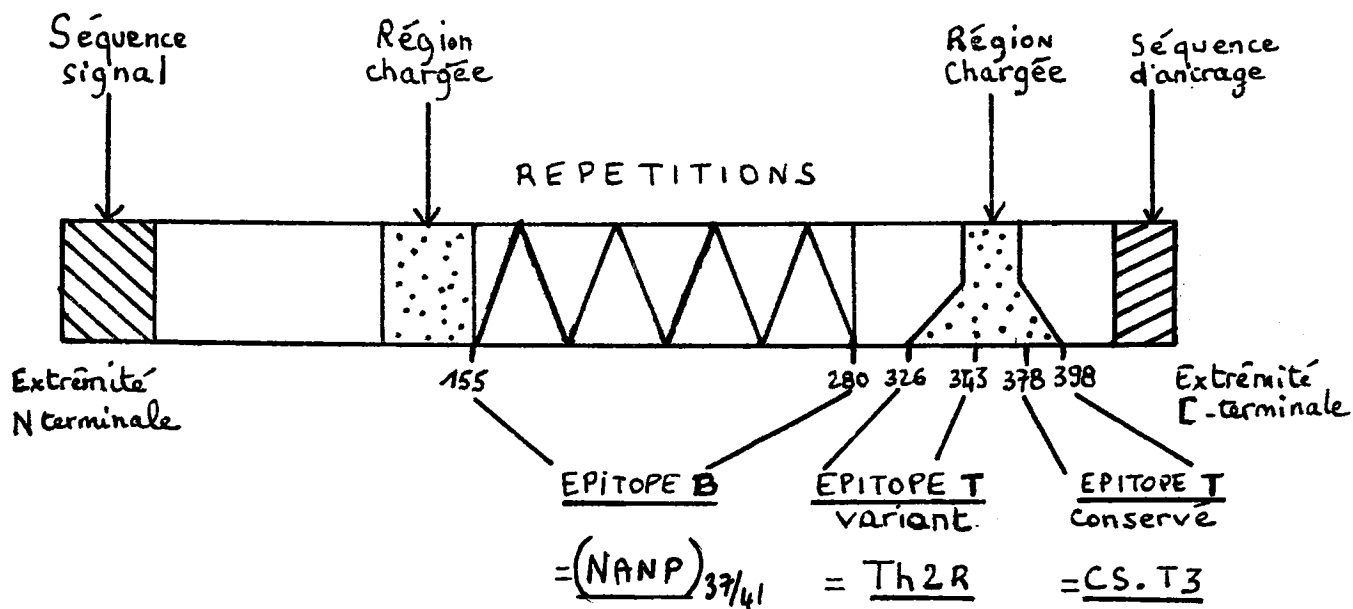


Figure 10 - Représentation schématique des épitopes T de la CSP de *P. falciparum* (d'après Langsley 1988)

- La stimulation artificielle des T lymphocytes : quel risque

Une équipe s'est récemment intéressée aux facteurs impliqués dans l'immunopathogénicité, source d'anémie, thrombopénie, glomérulonéphrite ou syndrome cérébral para paludéen sur modèle murin.

Ils relient la présence de cellules T(L₃T₄+) au neuro paludisme et à la thrombopénie. Aussi, la question est de savoir, à condition que cette étude soit transposable à l'homme, ce que l'on doit penser d'un vaccin, contenant des épitopes T, si la stimulation de lymphocytes T peut accroître les phénomènes immunopathologiques avec un résultats inverse de celui escompté ? (Grau et coll 1987).

7 - Conclusion

Bien que l'on ne dispose pas encore du vaccin antiparazoïte, la somme des connaissances acquises à ce sujet ces dernières années est considérable.

Il est maintenant bien clair qu'un tel vaccin doit mettre en jeu l'immunité humorale et cellulaire.

Il contiendra au moins l'épitope B immunodominant de la CSP de P. falciparum (NANP)₃ couplé à une protéine porteuse et associé à un ou plusieurs épitopes T.

Le problème actuel est de savoir si l'on trouvera un ou plusieurs épitopes T, qui soit à la fois d'origine parasitaire, aussi peut restreint que possible par le CMH, stimulant les CD4⁺ et les CD8⁺ et situé en dehors des régions cibles des variations antigéniques, pour permettre son utilisation à l'échelle mondiale.

Le défi est grand pour un enjeu qui l'est encore davantage.

II - 2.2.2. La vaccination contre le stade érythrocytaire asexué

Le stade erythrocytaire asexué présente une complexité antigénique plus grande que celle du sporozoïte. Aussi de très nombreux antigènes ont-ils été étudiés afin de déterminer les peptides protecteurs.

Cependant, il faut rappeler que, contrairement au vaccin ant sporozoïte, ce vaccin ne cherche pas à établir une immunité complète mais un état comparable à la prémunition des adultes vivant en pays endémique.

Néanmoins, contrairement à la vaccination contre le stade sporozoïte, la vaccination contre les stades sanguins de P. falciparum présente un réel danger. En effet, dans le cas précis de P. falciparum, les schizontes sont séquestrés dans les capillaires sanguins et n'apparaissent pas dans le sang périphérique. Aussi, la parasitémie détectée ne tient pas compte du fait que, après maturation, les trophozoïtes transformés en schizontes quittent le sang périphérique d'où une raréfaction des parasites. Aussi, il est bien difficile, à ce moment-là de savoir si cette diminution de la parasitémie traduit l'effet d'une réponse immune ou la conséquence de la schizogonie avec le risque alors d'une remontée rapide de la parasitémie 48 heures après. Aussi, les critères définis pour l'instauration d'un traitement antimalarique palliatif sont-ils difficiles à établir dans ce contexte.

1. Présentation

La plupart des antigènes des stades érythrocytaires asexués sont décrits en surface du mérozoïte, mais les hématies parasitées expriment également des antigènes d'origine plasmodiale au niveau de la membrane érythrocytaire. En effet, l'invasion suivie du développement du parasite dans l'hématie s'accompagne de nombreux changements au niveau morphologique fonctionnel et antigénique, à la surface du globule rouge.

Le mérozoïte présente à l'un de ses pôles une structure invasive lui permettant de franchir la membrane érythrocytaire. Cette structure appelée "complexe apical", est constituée de plusieurs éléments ou organelles : une membrane trilamellaire, le cytosquelette constitué de microtubules et le complexe rhoptrie-micronème. Les rhoptries sont des organelles en forme d'amphore, limitées par une membrane et opaque aux électrons. Les micronèmes constituent un autre type d'organelle : plus nombreux que les précédentes, ils constituent plus d'un tiers antérieur du parasite et sont reliés aux rhoptries au niveau de la zone apicale.

Lors de sa pénétration le mérozoïte dépose en surface du globule rouge une protéine de poids moléculaire 155 KD située dans les micronèmes. Une partie de cette protéine s'insère dans la membrane érythrocytaire, tandis que le reste est relargué dans le plasma.

De nombreux autres antigènes s'insèrent dans la membrane globulaire, libérés par les stades plus matures : trophozoïtes et schizontes. A la différence des antigènes du mérozoïte, les autres antigènes érythrocytaires sont exposés plus longuement au système immunitaire, facilitant ainsi son action.

Comme pour la vaccination antisporozoïte, les antigènes protecteurs ont été recherchés grâce aux anticorps : car on sait depuis des années que le transfert passif d'immunoglobulines au cours de la grossesse confère une protection aux enfants pendant les premiers mois de la vie sans pour autant empêcher leur impaludation.

Plusieurs approches ont été tentées pour étudier cet effet :

- L'inhibition, par les sera immuns ou les anticorps monoclonaux, de la croissance du parasite en culture sur érythrocytes humains en sachant toutefois qu'il existe des sera non protecteurs, et que la concordance des résultats observés in vitro et in vivo n'est pas toujours évidente.

- La phagocytose des hématies parasitées. Mercereau - Puyjalon rapporte, en 1987, une étude de J.C. Michel montrant que les sera protecteurs *in vivo* sont tous capables de promouvoir la phagocytose des hématies parasitées alors que les sera non protecteurs ne le sont pas. D'où l'hypothèse de la présence d'antigènes protecteurs en surface des hématies.

2. Identification des antigènes protecteurs :

- Par les anticorps monoclonaux

C'est bien sûr *P. falciparum*, la cible de la plupart des travaux.

Depuis Trager et Jensen en 1976, le développement des cultures cellulaires permet d'étudier l'inhibition du développement parasitaire par les anticorps monoclonaux. Ces derniers sont en général dirigés contre des antigènes situés en surface du parasite, mérozoïte ou schizonte.

Les principaux antigènes étudiés par cette méthode sont des protéines de poids moléculaire : 41 KD, 76 KD, 140 KD, 190 KD. Ils sont tous synthétisés au stade schizonte, et s'associent ensuite à la membrane du parasite.

Le peptide 190 KD, dont le poids moléculaire varie selon les laboratoires de 185 à 200 KD, est le plus étudié : il correspond à la protéine principale de la surface du schizonte. Il subit des modifications au cours de la formation des mérozoïtes donnant naissance à des antigènes de poids moléculaire plus faible, dont certains restent en surface des mérozoïtes alors que d'autres sont éliminés. Les trois principales protéines présentes à la surface du mérozoïte, dérivés du peptide 190 KD sont les peptides de poids moléculaire 83 KD, 42 KD et 19 KD.

Suite à de nombreux travaux, Holder (1985) clone le gène de la P195 puis en décrit la structure nucléotidique. Ce peptide P 195 présente, près de l'extrémité N terminale, une région contenant des répétitions de deux tripeptides. La comparaison de différents clones issus d'un même isolat de P. falciparum montre des variations au sein de ces répétitions.

Cependant, la P 195, malgré un polymorphisme accentué, présente des régions assez conservées à travers des souches d'origine géographiques différentes. Cela a notamment été montré dans l'étude de Schwartz (1986) portant sur une souche d'Afrique de l'Est (souche Wellcome) et un isolat thaïlandais isolé à 12 ans d'écart. Il est à noter que la partie C terminale du fragment de 42 KD, est particulièrement bien conservée dans les clones étudiés par Schwartz. Il semble que ce soit en relation avec les propriétés fonctionnelles de la protéine qui pourrait avoir un rôle dans l'attachement du mérozoïte à l'hématie.

- Par la recherche des protéines du mérozoïte nécessaire à sa pénétration dans l'hématie

L'équipe de Perlmann en 1984, a identifié une protéine de poids moléculaire 155 KD (Pf 155), située dans les micronèmes du mérozoïte, et déversée en surface de l'hématie lors de l'invasion. Une partie de la protéine s'insère dans la membrane érythrocytaire tandis que l'autre partie est relarguée dans le plasma. Les auteurs ont établi une corrélation entre la présence d'anticorps anti Pf 155 et la protection chez l'homme : leur taux est faible chez les enfants et élevé chez les adultes.

Deloron (1987) confirme ces résultats dans une étude sur 230 sujets classés, non pas d'après leur âge, mais d'après leurs antécédents d'infection palustre. L'évaluation des titres anticorps est réalisée à travers les mêmes tests (IFI, CELL ELISA = ELISA avec globules rouges infestés utilisés comme antigènes) qu'utilise Perlmann. Ceci assure à la Pf 155 un rôle indéniable dans la protection contre les stades sanguins.

D'autres auteurs ont obtenu, grâce à des techniques de recombinaison génétique, l'expression de protéines parasitaires dans E. coli (Coppel et coll 1984). Ils ont sélectionné les clones grâce aux sera immuns humains. Ainsi, ils isolent un clone contenant des séquences codant pour le polypeptide parasite correspondant à celui de Perlmann (Pf 155). Cet antigène est nommé RESA : Ring-infected Erythrocyte Surface Antigen : en effet, des marquages en immunofluorescence indirecte montrent que le RESA est présent essentiellement à la surface d'hématies parasitées par des trophozoïtes jeunes, l'intensité de la fluorescence étant bien plus faible pour les hématies abritant des formes plus matures. Cet antigène est présent dans plusieurs isolats d'origine géographique diverse, suggérant sa relative constance au sein des différentes souches.

La détermination de la séquence nucléotidique a révélé la présence de deux séquences répétitives. L'une, correspondant à l'extrémité C terminale (en 3'), est constituée de répétitions de 8 AA (Glu-Glu-Asn-Val-Glu-His Asp-Ala) suivie par des répétitions de 4 AA (Glu-Glu-Asn-Val) et de 3 AA (Glu-Glu-Val), le bloc N terminal (en 5') contenant une série de répétitions imparfaites d'un motif de 11 AA (Asp-Asp-Glu-His-Val-Glu-Glu-Pro-Thr-Val-Ala) (His = histidine - Thr : thréonine).

D'autre part, il semble que le dépôt du RESA en surface de l'hématie rende celle-ci sensible au système immunitaire. En effet, une réponse immune anti RESA pourrait interférer avec l'invasion du mérozoïte ou la lyse prématurée des hématies récemment infectées, ce qui suggère une importance fonctionnelle de cet antigène.

L'équipe de Perlmann confirme, en 1987, à travers des souches de P. falciparum cultivées dans différents laboratoires ou isolées chez des sujets vivant dans différents pays d'endémie palustre, l'absence de diversité antigénique de la Pf 155. De plus, celle-ci semble être l'antigène majeur exposé à la surface de l'hématie par le parasite puisque la majorité des anticorps des sera immuns sont dirigés contre cette protéine. La constatation de l'absence de diversité antigénique laisse entrevoir la possibilité de l'intégrer dans un vaccin.

- Par des sera hyperimmuns de sujets vivant en région endémique

On a cherché à mettre en évidence les épitopes immunodominants reconnus par les sera de sujets hyperimmuns des régions endémiques. Ce genre d'analyse a permis de montrer que les populations immunes ont des anticorps dirigés contre les mêmes antigènes que les sujets non immuns, mais en quantité bien plus élevée (Deloron et coll 1987).

Cependant, l'étude de Berzins (1986) a permis de montrer la présence d'anticorps réagissant en DOT-BLOT-ELISA) avec un octapeptide de la Pf 155 dans les sera de sujets vivant en pays d'endémie palustre (Liberia et Colombie). Ces anticorps constituent une fraction significative des anticorps dirigés contre la Pf 155. Cela suggère un rôle d'épitope immunodominant pour ce peptide composé comme suit :

Glu-Glu-Asn-Val-Glu-His-Asp-Ala.

Aussi, les auteurs ont cherché à mettre en évidence le rôle de cet antigène dans le processus d'invasion des mérozoïtes. Ils utilisent le test d'inhibition de l'invasion des mérozoïtes dans les hématies et montrent que la fraction des anticorps spécifiquement dirigés contre cet octapeptide, inhibe à un degré plus élevé que le reste des anticorps anti-Pf 155, l'invasion des mérozoïtes. Ainsi, celui-ci pourrait jouer un rôle majeur dans le processus d'invasion des hématies et constituer le support privilégié d'un vaccin. Cependant, il faut nuancer l'effet observé dans ce test in vitro d'avec la réalité biologique. De plus les anticorps ne sont peut être pas les seuls, là encore, à agir in vivo comme le suggèrent Collins (1986).

- Par les anticorps protecteurs chez un modèle expérimental utilisant les primates

Des souches de P. falciparum asiatiques et africaines ont été adaptées au singe écureuil (Saimiri sciureus). Cet animal présente l'avantage de développer une cinétique d'apparition des anticorps identique à celle observée dans les primo-infections humaines. Ces préparations d'IgG issues de singes résistant à l'infection montrent un pouvoir protecteur puissant. Grâce à l'analyse immuno-chimique, on a pu mettre en évidence les polypeptides reconnus par ces sera protecteurs, ce qui a permis d'isoler plusieurs antigènes définis par leur poids moléculaire : 41, 71, 72, 76, 90 et 96-100 KD (Dubois et coll 1988).

Une fois caractérisés, il ne reste plus qu'à les synthétiser par voie chimique ou recombinaison génétique puis les tester dans un modèle animal avant d'en faire l'essai sur l'homme.

3. Vaccination contre les formes érythrocytaires asexués chez des modèles animaux

- Vaccination contre P. Yoelli chez la souris

Les premiers succès ont été obtenus chez la souris par Holder et Freeman (1981) avec des protéines parasitaires purifiées de P. yoelii, de poids moléculaire 230-235 KD homologue de la protéine de P. falciparum de poids moléculaire 185-200 KD, présente sur les mérozoïtes et schizontes.

* JENDOUBI M., DUBOIS P., PEREIRA DA SILVA L.,
Characterisation of one polypeptide antigen potentially
related to protective immunity against the blood
infection by P. falciparum in the squirrel monkey.
J. Immunol. ¹⁹⁸⁵, 134, 1941-1945.

* PAUILLAC S., DUBOIS P., JENDOUBI M., DEDET J.P.,
PEREIRA DA SILVA L.,
Immunisation of the squirrel monkey against the
blood infection by Plasmodium falciparum: role
of the soluble polypeptides 30.000 and 72.000 purified
from culture forms.
Ann. Institut Pasteur. 1987.

- Vaccination contre *P. falciparum* chez les primates avec des polypeptides purifiés

Ultime étape avant d'aborder les essais chez l'homme, les primates ont fait l'objet d'essais d'immunisation avec des protéines parasitaires purifiées. Les fractions purifiées de différents poids moléculaires se sont révélées très immunogènes chez les primates et l'innoculation d'épreuve, réalisée avec des globules rouges parasités de la souche homologue, a révélé un très bon niveau de protection.

Ainsi, des singes écureuils immunisés avec la fraction peptidique de 75 KD issue d'une souche de *P. falciparum*, offrent un haut degré de protection face à l'inoculation de parasites virulents homologues. Tous les singes vaccinés ont présenté dans leur sérum des anticorps dirigés contre deux peptides de 90 et 72 KD qui sont ainsi reliés à l'établissement de la protection. ~~D'~~ ~~autre~~ part, les auteurs ont cherché à savoir si ces deux candidats au vaccin étaient l'objet de variations antigéniques à travers différents isolats, ce qui rendrait, dans l'affirmative, leur candidature caduque. Il s'avère que les deux polypeptides Mr 90 KD et Mr 72 KD (Mr pour "Mérozoïtes") ont une structure constante au sein d'isolat de diverses régions endémiques (Afrique de l'Est, Amérique du Sud, Asie du Sud Est) (Jendoubi et Pereira 1987).

Parallèlement, des résultats très encourageants ont été obtenus lors d'immunisations de singes écureuil avec des peptides purifiés de 140 à 200 KD. Les singes ont présenté des réponses anticorps homogènes et précises contre ces polypeptides ; de plus, l'inoculation d'épreuve a entraîné une protection partielle vis-à-vis d'une souche hétérologue de *P. falciparum*. Cependant, des résultats encore plus satisfaisants ont été obtenus avec le polypeptide purifié de 41 KD (Perrin et coll 1984).

D'autres auteurs ont comparé chez le singe Aotus l'immunogénicité de la protéine 185-200 KD, de ses fractions protéiques dérivées ainsi que l'association protéine 185-200 avec des protéines présentes sur les rhoptries. Tous les essais ont été réalisés en présence d'adjuvant complet de Freund. Il s'avère que seule la protéine 185-200 KD entraîne chez les singes Aotus une protection complète vis-à-vis d'une souche homologe. Or, ce résultat très positif diffère des rapports de la littérature dans lesquels, néanmoins, l'inoculation d'épreuve est réalisée avec une souche homologe. Cela suggère un polymorphisme antigénique au sein de cette protéine 185-200 K (Siddiqui et coll 1987).

Mac Bride, qui a travaillé sur 37 souches de P. falciparum issues de diverses régions endémiques a précisé que le répertoire de la diversité antigénique est limité. Ainsi, un recombinant multivalent pourrait contourner le problème de polymorphisme antigénique dans la protéine 185-200 KD (Mac Bride et coll 1985).

- Vaccination avec des peptides synthétiques ou recombinants

Richman et Reese (1988) ont étudié la P 75, fraction protéique issue de la P 185-200, pour en rechercher le ou les épitopes immunodominants. Ils ont synthétisé trois peptides dérivés de la P 75 pour immuniser des lapins, en présence d'adjuvant complet de Freund. Deux peptides de 13 et 19 résidus ont été utilisés après couplage à une protéine porteuse, tandis qu'un dimère de 28 résidus, donc plus long que les deux précédents peptides, a été injectée sans couplage.

Les meilleurs résultats sont obtenus avec le dimère qui engendre de hauts titres IgM et IgG en ELISA.

Cette étude a permis également de préciser que les taux d'anticorps obtenus par immunisation expérimentale peuvent varier selon des facteurs extérieurs à l'épitope lui-même, tels que la nature de la protéine porteuse, de l'agent de couplage et des rapports dans les doses utilisées, ou encore la pureté de la protéine porteuse.

Il faut noter cependant qu'une autre étude précédemment citée (Siddiqui et coll 1987) discute les propriétés immunogènes de la P 75 et ne la considère pas comme un fragment protéique dérivé de la P 185-200. De plus, puisque les singes Aotus protégés après une immunisation expérimentale ne possèdent pas tous des anticorps anti P 75, les auteurs ne lui reconnaissent pas un rôle important dans la protection contre les stades sanguins asexués.

Chez les primates, les essais d'immunisation avec des peptides synthétiques ou recombinants ont été réalisés avec deux types de molécules :

Le premier correspond à tout ou partie de la protéine majeure de la surface du schizonte de P. falciparum, de poids moléculaire 185-200 KD. Cheung en 1986, utilise la technique de recombinaison génétique dans E. coli pour produire cette protéine. De plus différents peptides dérivés sont obtenus par synthèse chimique. Des expériences d'immunisation de lapins en présence d'adjuvant complet de Freund, montrent que les peptides synthétiques sont moins immunogènes que la protéine native 185-200 KD, et l'expliquent par une différence conformationnelle, puisque les peptides ne reproduisent pas la même structure spatiale que la protéine native.

Confirmant d'autres études, les auteurs constatent une diversité antigénique de la protéine native, qui porte essentiellement sur les séquences répétitives présentes dans la P 185-200 et la P 83, principale protéine issue du clivage de la précédente et exprimée en surface des mérozoïtes. Cette constatation a pour support l'analyse de la réactivité des anti sera des lapins avec les peptides de différents isolats et clones de P. falciparum.

Enfin, les essais d'immunisation de singes écureuils avec les différents peptides synthétiques sont assez décevants pour n'engendrer que des titres anticorps relativement bas. Cependant, trois, sur les quatre singes testés, contrôlent leur parasitémie 22 jours après l'inoculation d'épreuve, sans aucune chimiothérapie.

L'équipe de Patarroyo, en 1987, synthétise 18 peptides, correspondant à différents fragments de protéines parasitaires présentes sur les mérozoïtes et les stades sanguins plus matures de P. falciparum (schizontes) de poids moléculaire 155 KD, 83 KD, 55 et 35 KD.

La protéine de 155 KD correspond à Pf 155, tandis que celle de 83 KD est issue du clivage de la P 195.

Le pouvoir immunogène de ces 18 peptides est testé sur des singes Aotus trivirgatus après couplage à la sérum albumine bovine et en présence d'ACF. Aucune préparation vaccinale n'engendre de protection complète après l'inoculation d'épreuve réalisée avec des parasites infectieux de P. falciparum (les auteurs ne précisent pas si l'inoculation d'épreuve est réalisée avec une souche homologue ou hétérologue de celle choisie comme modèle pour la synthèse des 18 peptides.)

Par contre une association de trois peptides, introduits selon le même protocole que précédemment pour les 18 peptides, entraîne une meilleure protection chez les singes que toutes celles obtenues avec les 18 peptides testés isolément. Ces trois peptides (SPf 55.1, SPf 35.1, SPf 83.1) (correspondant à la partie N terminale des protéines de 55, 35, et 83 KD respectivement) entraînent l'apparition, chez les singes, de titres anticorps plus élevés que les peptides isolément testés (titres mesurés en DOT-BLOT-ELISA et IFI).

Les résultats sont les suivants : trois, sur les six singes immunisés avec le mélange des trois peptides, développeront des signes cliniques à minima avec une parasitémie maximale égale à 5 % dont l'apparition est retardée par rapport aux groupe contrôle face à l'inoculation d'épreuve. Les trois autres n'auront aucun signe clinique et une parasitémie indétectable, trois mois encore après l'infestation.

Dans cette étude, on note l'absence de corrélation entre le titre anticorps et la protection conférée, ce qui pourrait suggérer l'intervention d'autres mécanismes plus complexes que les seuls anticorps. Aucune interprétation n'est donnée par les auteurs à ce sujet.

Le deuxième type de molécule dont le pouvoir immunogène est testé chez les singes est le RESA (Ring-infected Erythrocyte Surface Antigen).

L'équipe de Collins teste le pouvoir immunogène de protéines recombinantes contenant des fragments de RESA chez les singes Aotus en présence d'ACF. Les sera sont testés en IFI vis-à-vis du RESA et en ELISA vis-à-vis des quatre peptides utilisés, tandis que l'inoculation d'épreuve est réalisée avec une souche hétérologue de P. falciparum (Collins et coll 1986).

Quatre groupes sont définis :

Le groupe I reçoit l'antigène 28

Le groupe II reçoit l'antigène 632

Le groupe III reçoit l'antigène 631 + 633

Le groupe IV = groupe contrôle

Sur les 14 singes immunisés, seuls 9 sont protégés. Tous les singes protégés, ont de hauts titres en anticorps de même spécificité que le peptide immunisant. Cependant, seuls les sera du groupe I c'est-à-dire des singes ayant reçu le peptide de la région 3' (C terminale), réagissent en immunofluorescence vis-à-vis du RESA, à des titres plus ou moins élevés.

Cette étude ne permet pas de définir un peptide protecteur puisque tous les peptides, ou mélanges de peptides, sont capables d'entraîner une protection partielle sans qu'aucun n'entraîne de protection complète à 100 %, c'est-à-dire, chez tous les singes du groupe testé

Berzins a choisi d'étudier pour sa part, la partie C terminale de la Pf 155, et notamment l'octapeptide Glu-Glu-Asn-Val-Glu-His-Asp-Ala qu'il synthétise pour ensuite le coupler à une protéine porteuse et immuniser des lapins en présence d'ACF (Berzins et coll 1986).

Le rôle immunogène de l'octapeptide est démontré chez les lapins qui développent des anticorps anti-octapeptide réagissant aussi avec la protéine native, la Pf 155.

Autre équipe à s'être intéressée à la partie C terminale de la Pf 155, Aslund et coll (1987) obtiennent une protéine contenant 4 fois le même octapeptide que précédemment par recombinaison génétique dans E. coli. Cette protéine est injectée avec ou sans ACF à des lapins dont les sera sont ensuite étudiés. Les anticorps des lapins, testés en ELISA, IFI et immunoblot, réagissent avec l'octapeptide synthétique et les extraits de mérozoïtes de P. falciparum. De plus, ces anticorps inhibent la réinvasion des mérozoïtes de la même espèce (in vitro) et ceci de façon bien plus intense quand on enrichit les sera avec les fractions IgG (issues de ces mêmes sera), élués à partir d'extraits de mérozoïtes et donc spécifiques de P. falciparum. Enfin, si l'on analyse en immunoblotting des extraits de mérozoïtes de P. falciparum avec les sera des lapins immunisés, seul le polypeptide de poids moléculaire 155 KD est reconnu. Donc les anticorps obtenus sont hautement spécifiques de la Pf 155 dont on a vu plus haut la corrélation entre la présence d'anticorps dirigés contre elle et la protection conférée chez l'homme vis-à-vis des stades sanguins (Perlmann et coll 1987).

Cette expérience offre une alternative à la synthèse peptidique, et évite l'utilisation d'une protéine porteuse.

Enfin, au vu de tous ces résultats, il semble que la partie C terminale de la Pf 155, soit particulièrement immunogène. Peut-être l'octapeptide qui la constitue et qui est décrit plus haut, joue-t-il le rôle d'épitope immunodominant, et pourquoi pas, de candidat au vaccin puisqu'il appartient à une région stable de la protéine ?

4. Vaccination de l'homme : l'essai de Patarroyo 1988

L'essai est réalisé sur 13 volontaires, divisés en 5 groupes. Neuf sujets reçoivent 2 ou 3 injections de deux polymères synthétiques de haut poids moléculaire SPf (66)30 et SPf (105)20, à différentes doses selon les groupes. Le groupe contrôle (3 personnes) reçoit une solution saline, tandis que le dernier sujet sert d'hôte pour l'obtention des formes sanguines asexuées utilisées dans l'inoculation d'épreuve. Celle-ci est réalisée, selon les groupes, 60 à 80 jours après la première immunisation.

Pour toutes les injections des peptides, l'adjuvant utilisé est l'hydroxyde d'aluminium.

Le peptide SPf(66)30 (cf figure 11) est constitué par les trois polypeptides testés chez les singes Aotus par Patarroyo (1987) et doués d'un effet protecteur partiel chez ces primates, en association avec l'épitope B immunodominant de la CSP de P. falciparum : NANP.

Le SPf (105)20 est encore plus hétérogène que le précédent. Il est constitué par l'association de différents peptides de P. falciparum :

- de l'épitope B immunodominant de la CSP
- d'un épitope T de la CSP (décrit par Good en 1987, et appelé Th 2R)
- du peptide SPf 83.18, constitutif de la P83
- de la région 5' de la Pf 155

ces deux derniers peptides étant exprimés par les stades sanguins de P. falciparum.

Globalement, les polymères sont bien tolérés : on décrit un seul cas de rash cutané, contrôlé par les corticoïdes et l'adrénaline.

Les anticorps sont détectés en ELISA vis-à-vis des 2 polymères synthétiques.

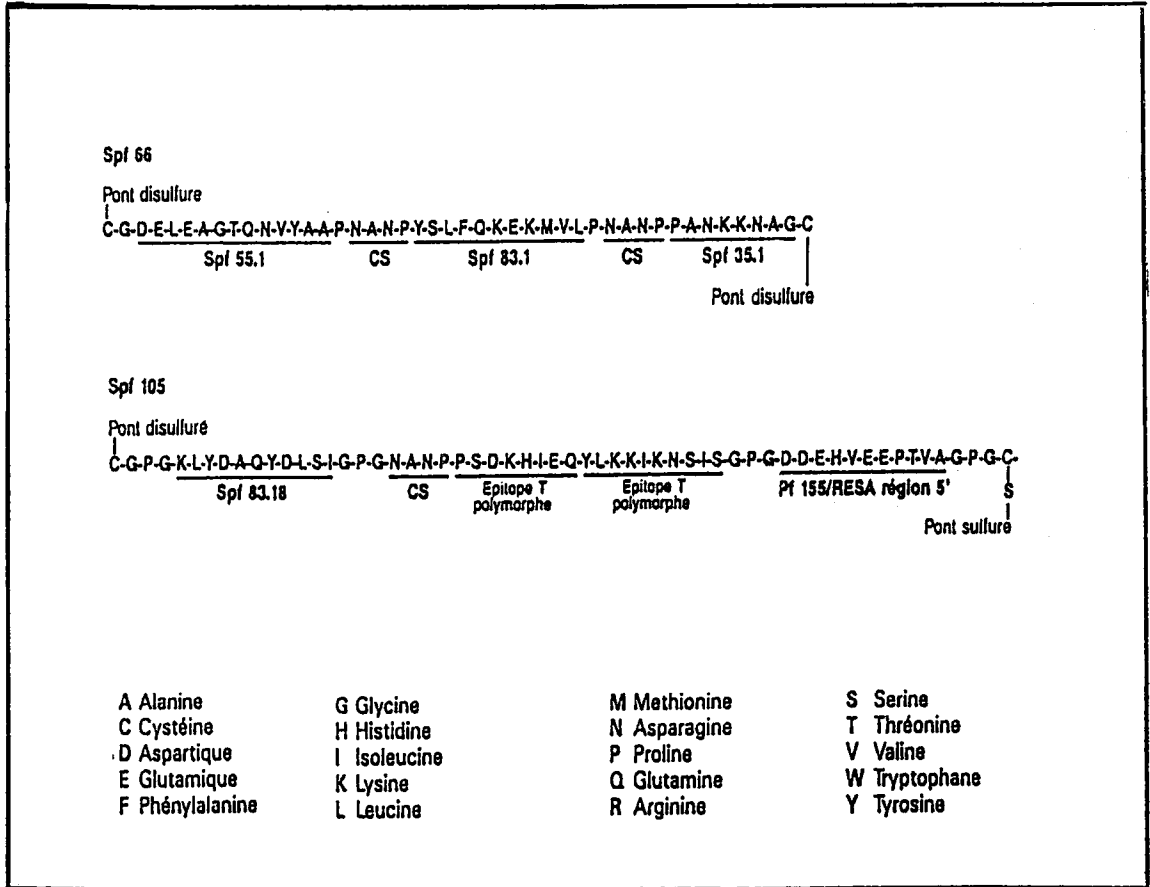


Figure 11 - Représentation schématique des peptides constitutifs du vaccin de Patarroyo (1988). (d'après Langsley 1988).

Les résultats montrent que le polymère SPf (105)20 n'entraîne pas d'effet protecteur chez les 4 sujets testés. Par contre, 3 sur 5 sujets immunisés avec SPf (66)30, sont capables de contrôler leur infection à bas bruit, avec diminution progressive de la parasitémie, dont la plus élevée atteindra 0,46 % au 9ème jour, et guérison spontanée au 21ème jour après l'infection avec une parasitémie nulle.

Aucun anticorps anti-NANP n'a été détecté en ELISA. Par contre, les sera de tous les volontaires contiennent des anticorps détectés en IFI contre les antigènes portés par les mérozoïtes et les schizontes.

L'immunité cellulaire, explorée par des tests de prolifération des cellules mononucléées, donnent des résultats assez décevants. De plus, il n'y a pas de corrélation avec les titres anticorps détectés, ni avec le niveau de protection.

En conclusion de cette première expérience de vaccination contre les stades sanguins chez l'homme, on peut considérer que la SPf (66)30 a entraîné une protection partielle chez l'homme face à l'inoculation des stades sanguins de P. falciparum. Cependant, la protection n'est pas complète et apparemment ne touche pas l'immunité à médiation cellulaire. De plus l'introduction d'une partie de l'épitope immunodominant de la CSP de P. falciparum n'entraîne pas la synthèse d'anticorps anti-NANP, ce à quoi l'on pouvait peut-être s'attendre puisqu'il a été démontré que seul $(\text{NANP})_x$, avec $x \gg 3$, a des propriétés immunogènes (Zavala et coll 1985).

Il a été bien établi que le choix des peptides constitutifs d'un vaccin, doit éviter en tout premier lieu, l'utilisation de protéines dont on sait qu'il existe des variants à travers différents isolats : ceci sélectionnerait des populations non immunes où les variants se multiplieraient librement. Or parmi les protéines utilisées par Patarroyo, Miller rapporte qu'il y a au moins deux acides aminés qui diffèrent dans l'un des peptides utilisés pour le vaccin, en comparaison avec la séquence peptidique d'un isolat de P. falciparum, décrite par Mackay et coll (Dans Miller ~~et coll~~ 1988).

En conséquence, avant de poursuivre les essais débutés chez l'homme par Patarroyo, il semble nécessaire de continuer les tests chez les primates, afin de trouver la combinaison optimale des peptides conférant la meilleure protection. Il paraît en effet essentiel, pour la construction d'un vaccin efficace, d'associer plusieurs peptides originaires des stades sanguins du fait du nombre élevé des antigènes de ces stades.

5. Peptides, enzymes et protection

Dans cette optique, deux peptides de 41 et 76 KD méritent une attention particulière. La protéine 41 KD, qui représente une des trois principales protéines, présente à la surface du mérozoïte et la P 76 dont certains cependant, discutent le rôle protecteur (Siddiqui et coll 87) ont un rôle potentiel dans le développement de la protection. Perrin montre aussi l'effet protecteur d'une protéine native des rhoptries de 41 KD chez des singes écureuils (Perrin et coll 1985).

Or, il a été montré récemment que ces deux protéines sont des enzymes. La protéine 41 KD est une aldolase, enzyme clé du métabolisme des hydrates de carbone. D'autre part, la P 76 est une protéase. Or, on sait que l'invasion des hématies par les mérozoïtes dépend d'une protéase de type serine-protéase dont l'activation est étroitement régulée (Langsley et coll 1988).

Il apparait donc que l'invasion des mérozoïtes dans les hématies soit sous dépendance enzymatique. Ainsi, l'inhibition de l'action de ces enzymes, par une voie autre que celle de l'immunologie ouvre un nouvel axe de recherche dans la lutte antimalarique.

6. Conclusion

Les stades sanguins asexués sont caractérisés par une multitude d'antigènes, et le travail des chercheurs pour trouver un peptide immunogène susceptible d'entrer dans la composition d'un vaccin s'en trouve plus long et plus ardu.

Cependant, il se dégage de tous les travaux effectués jusqu'ici l'existence de protéines immunogènes et invariante. On retiendra la P42 issue du clivage de la P195, qui semble non seulement constante mais aussi immunogène, et ce, au moins chez les primates ; et la Pf 155 (ou RESA) dont un octapeptide appartenant à la région C terminale offre l'espoir d'un épitope immunodominant.

Enfin, le premier essai sur l'homme d'un vaccin dirigé contre les stades sanguins asexués, et constitué par un polypeptide de haut poids moléculaire évitant l'utilisation d'une protéine porteuse, même s'il est décevant dans son résultat final, montre combien d'inconnues restent encore à éclaircir avant de trouver "la solution miracle". Cette solution passera peut-être par l'inhibition d'enzymes parasitaires, quittant ainsi le domaine de l'immunologie.

II.2.2.3. La vaccination contre les stades sexués

1. Présentation

A la différence des deux précédents, le vaccin dirigé contre les stades sexués est un vaccin altruiste. En effet, celui-ci n'entraînerait aucune modification clinique chez l'homme vacciné, mais participerait à double titre à une réduction de la transmission du parasite :

- D'une part, en réduisant l'infestation des anophèles vecteurs, et par conséquent en diminuant l'incidence des piqûres infestantes chez l'homme, la baisse du niveau de transmission pourrait entraîner l'éradication de la maladie dans les zones de faible endémicité.
- D'autre part, ce vaccin constituerait la prolongation de l'efficacité d'un vaccin dirigé contre les stades sanguins asexués, en inhibant la transmission des parasites mutants et résistants au vaccin.

On rappelle que les gamétocytes mâles et femelles présents chez l'homme, ne sont pas fécondables. Les anophèles au cours de leur repas sanguin, ingèrent, entre autres, les stades sexués, qui sortent des hématies et se transforment en gamète mâle (microgamète) et femelle (macrogamète) capables d'entrer dans le cycle sexué. A ce moment, chez le moustique, les gamètes extracellulaires deviennent cibles des anticorps antigamétocytes aspirés en même temps que les gamétocytes. Les zygotes résultants de la fécondation vont exprimer de nouveaux antigènes en surface.

Actuellement, les études sur les antigènes cibles de l'immunité sont moins avancées que dans la vaccination antisporozoïte ou antimérozoïte, tant il est clair que la priorité porte sur un vaccin directement actif sur la maladie. Cependant, il semble que le répertoire antigénique présent sur les gamètes et zygotes soit moins complexe que pour les stades sanguins asexués, ce qui laisse espérer une avancée plus rapide.

2. Le pouvoir immunogène des gamètes : l'immunité bloquant la transmission

Les premières études ont été réalisées sur des modèles animaux. Ainsi, l'équipe de Carter et Chen (1976) a étudié le pouvoir immunogène de préparations de gamètes de P. gallinaceum chez les poulets. Les gamètes sont issus de poulets infectés par cette espèce, purifiés, puis irradiés par les rayons ultra-violet. Plusieurs concentrations de gamètes mâles sont utilisées et les auteurs obtiennent de 80 à 100 % de réduction de l'infectivité des Aedes aegypti, l'effet variant dans le même sens que la dose. L'infectivité est appréhendée après dissection des moustiques et décompte des oocystes, sept jours après piqûre des poulets vaccinés.

Les mêmes résultats sont obtenus avec des gamètes femelles, indiquant que mâle ou femelle, les gamètes expriment les mêmes antigènes.

Cette expérience a permis de montrer le pouvoir immunogène des préparations de gamètes de P. gallinaceum chez les poulets.

D'autres études allant dans le même sens ont été réalisées sur des primates.

Ainsi Gwadz et Koentz (1984) ont immunisé des singes Rhésus avec des microgamètes de P. knowlesi émulsionnés dans l'adjuvant complet de Freund à différentes concentrations. Les plus fortes concentrations de gamètes, 10^7 (1 injection) et 10^6 (2 injections), ont entraîné chez les primates une immunité bloquant la transmission du parasite aux anophèles (A. dirus).

Cette immunité persiste 6 années chez la plupart des singes non splénectomisés : 4/5 bloquent totalement l'infectivité des gamètes, le dernier la bloque à 80 %.

Au cours de l'étude, l'immunité est testée par inoculation de schizontes infectieux de la même espèce, obtenus in vivo à partir d'un singe Rhésus infecté par P. Knowlesi. Il apparaît que ces inoculations d'épreuve renforcent l'immunité antigamète chez les singes immunisés. Il reste à savoir si l'infection naturelle peut avoir le même effet chez des individus immunisés artificiellement (par un vaccin) puisqu'il a été démontré que des sujets vivant en pays d'endémie à P. falciparum ne développent pas d'immunité humorale antigamète (Carter et coll 1979). Cependant, des études plus récentes démontrent la présence d'anticorps bloquant la transmission de P. vivax chez des sujets vivant en pays d'endémie (Mendis 1987). Les titres en anticorps étant augmentés après chaque réinfestation.

3. Identification des antigènes cibles par les anticorps monoclonaux

- Les antigènes des gamètes

Les anticorps monoclonaux ont été utilisés pour identifier les antigènes cibles présents sur les gamètes des plasmodies animales et humaines.

Ainsi, l'équipe de Kaushal (1983) étudie les antigènes des gamètes de P. gallinaceum grâce aux anticorps monoclonaux qui entraînent un blocage de l'infectivité des Aedes aegypti.

Il apparaît que les IgG sont capables d'agir en synergie. Certains n'agissent qu'en présence de complément pour conduire à la lyse des gamètes et zygotes avec un blocage total de l'infectivité.

Ceci suggère, d'une part, le rôle des anticorps dans l'immunité antigamète, d'autre part, la reconnaissance de plusieurs épitopes différents du fait de leur action synergique.

Dans la présente étude, tous les IgG reconnaissent la même série de trois protéines de poids moléculaire 260, 56 et 54 KD. Celles-ci semblent donc représenter les cibles principales de l'immunité antigamète pour P. gallinaceum.

L'équipe de Harte (1985a) a mis en évidence la présence d'un antigène majeur, une protéine de 42 KD, sur les gamètes de P. yoelii nigeriensis. L'anticorps monoclonal issu des travaux de cette même équipe reconnaît la protéine 42 KD et une série de protéines de poids moléculaire 67, 50, 57 et 35 KD protéines purifiées en chromatographie d'affinité à partir de gamètes mâles de P. yoelii nigeriensis. L'injection de ces antigènes purifiés entraîne chez des souris ^{BALB/c} la production d'anticorps, qui ne donnent en Western Blot qu'une seule bande, correspondant à la protéine de 42 KD. Ces anticorps sont spécifiques de stade. L'immunisation des souris entraîne le blocage de la transmission de P. yoelii nigeriensis aux moustiques dans des proportions de 85 % à 95 %. Le blocage atteint 99,7 % si les souris reçoivent 2 doses de vaccin et confirme donc qu'une immunité antigamète peut être développée sur un modèle expérimental murin.

Les antigènes cibles de l'immunité antigamète de P. falciparum ont été étudiés par Renner et coll en 1983. C'est à partir de culture de P. falciparum selon la technique d'Ifediba et Vandenberg (1981), que sont obtenus les gamètes. Différents isolats de P. falciparum sont cultivés, Brésil, Libéria, Asie du Sud-Est constituant les trois pays d'origine de ceux-ci. Les anticorps monoclonaux sont obtenus selon la technique classique, grâce à l'immunisation de souris BALB/c.

L'association de deux anticorps monoclonaux entraîne le blocage de la transmission de P. falciparum par Anophèles freeborni à 99 %, sans action du complément, tandis que l'un des deux anticorps est capable d'entraîner 90 % d'inhibition de la transmission en présence de complément. La sélection de ces 2 anticorps monoclonaux responsables du blocage de la transmission, a permis de tester des extraits de gamètes de P. falciparum dans une réaction d'immunoprécipitation afin de déterminer les antigènes cibles. Cela a abouti à l'identification de trois protéines de poids moléculaire 255, 59 et 53 KD ; celles-ci sont présentes au sein des isolats brésilien et africain. Dans des conditions opératoires non réductrices, les poids moléculaires des protéines précipitées par les anticorps monoclonaux, passent à 235, 49 et 46 KD.

Il n'existe pas de réaction croisée avec P. gallinaceum. On peut néanmoins remarquer la similitude de la taille des antigènes reconnus par les anticorps monoclonaux bloquant la transmission pour les deux espèces, P. falciparum et P. gallinaceum. C'est l'analyse nucléotidique qui étayera ou non ces ressemblances.

D'aucuns se sont intéressés à la biosynthèse de ces antigènes cibles. En effet, Kumar et coll 1984 étudient la production de trois protéines de poids moléculaire 260, 59 et 53 KD présentes sur les gamètes de P. falciparum et cibles des anticorps monoclonaux responsables du blocage de la transmission (Rener et coll 83).

Les auteurs montrent que ces protéines sont synthétisées au début de la maturation des gamétocytes et sont présentes sur les gamètes qui cessent rapidement de les produire et de les exprimer à leur surface. Ces protéines sont absentes des ookinètes et des stades sanguins asexués ce qui suggère une spécificité de stade. Enfin, les protéines de faible poids moléculaire 48/45 KD ne dérivent pas de la protéine 260 KD. Ces résultats sont confirmés par Vermeulen (1985), qui étudie cependant des protéines de poids moléculaire sensiblement différent puisqu'il s'agit des peptides 240/230 KD et 48/45 KD. Les différences de taille pourraient s'expliquer par l'origine des isolats, ou encore la spécificité des anticorps monoclonaux sélectionnés par les deux équipes.

Les 230 KD et 48/45 KD sont exprimées en surface des macrogamètes et non sur les ookinètes. Cependant leur rôle diverge selon Vermeulen. Ainsi, les 48/45 KD sont impliqués dans le processus de la fertilisation des macrogamètes par les microgamètes, alors que la 230 KD ne joue sûrement pas de rôle dans la fécondation bien qu'elle fasse partie du complexe moléculaire précipité par les anticorps monoclonaux à côté de 48/45 KD.

La 230 KD n'est pas glycosylée alors que 48/45 KD le sont : la glycosylation pourrait jouer un rôle dans l'immunogénicité de ces protéines. D'autre part, le doublet 48/45 KD possède des épitopes en commun, la présence de groupements non chargés, peut-être un peptide signal permettrait de les distinguer (Vermeulen 1986). Par ailleurs, on a montré que ces protéines ne possèdent pas de structure répétitive (Vermeulen et coll 1985). On a pu remarquer en effet que c'était souvent le cas pour les antigènes plasmodiaux.

Enfin, tous les épitopes sont sensibles aux conditions réductrices. Cette propriété empêchera la synthèse de peptides recombinants dans E. coli si tous les épitopes immunodominants s'avèrent être conformationnels. En effet, la synthèse de peptides dans une bactérie ne permet pas de reproduire la forme exacte de la protéine native, avec sa structure tertiaire ou quaternaire et par ce fait ne reproduit pas les épitopes non linéaires.

- Les antigènes du zygote

De nouveaux antigènes sont exprimés à ce stade.

N'existant pas chez l'homme, il n'y a pas d'anticorps dirigés contre ces antigènes au cours d'une infection naturelle.

La protéine majeure présente en surface du zygote et de l'ookinète a un poids moléculaire de 25 KD. C'est une glycoprotéine synthétisée au début de la gamétogénèse mais à très faible taux par rapport au niveau d'expression par le zygote. C'est la cible principale de l'immunité bloquant la transmission. Cette protéine joue un rôle important dans le développement de l'ookinète en oocyste puisque les anticorps anti 25 KD, bloquent totalement la transmission sans inhiber la formation de l'ookinète (Vermeulen et coll 1985). Tous les antigènes présents sur le zygote sont détruits par réduction ce qui suggère que la structure tertiaire est maintenue par des ponts disulfure. Ainsi tous les épitopes des stades sexués sont de nature conformationnelle, ce qui complique leur étude (Vermeulen et coll 1986).

Récemment l'équipe de Kaslow (1988) a cloné le gène codant pour la glycoprotéine 25 KD présente sur les zygotes et ookinètes de P. falciparum. Cela leur a permis de déduire la séquence peptidique qui consiste en une séquence signal, N terminale, une séquence C terminale hydrophobe et la répétition à quatre reprises d'un domaine présentant des homologies avec le facteur de croissance de l'épiderme. On pense que cette protéine (25 KD) pourrait jouer le rôle de récepteur pour les cellules épithéliales du moustique à travers lesquelles les zygotes doivent passer pour se développer dans la paroi de l'estomac.

Il semble toutefois difficile d'imaginer l'utilisation de la protéine 25 KD comme vaccin, puisqu'une telle immunité ne serait pas renforcée au cours des infections naturelles de l'homme par P. falciparum.

4. Gamètes et variations antigéniques

Après avoir démontré que les anticorps monoclonaux dirigés contre les principales protéines présentes sur les gamètes de P. falciparum, 240-230 KD et 48/45 KD, étaient capables d'entraîner une immunité bloquant la transmission, il était nécessaire d'en étudier la constance sur différents isolats. Ainsi Graves (1985) étudie la présence de ces protéines sur des gamètes et zygotes de P. falciparum issus de 12 isolats d'origine géographique différente grâce à 3 anticorps monoclonaux produits par Rener (1983). Il montre que les deux anticorps monoclonaux responsables (dans l'étude de Rener) de bloquer en synergie, et sans complément, la transmission de P. falciparum à A. freeborni réagissent avec les antigènes des gamètes de la même espèce en immunofluorescence et immunoprécipitation. Une seule réaction négative est observée sur un isolat libérien avec l'un des deux anticorps, montrant que les 2 anticorps reconnaissent des épitopes différents. Cependant, l'association de ces 2 anticorps est incapable de bloquer l'infectivité de cet isolat libérien chez A. freeborni avec ou sans complément. On peut suggérer que l'anticorps en

défaut, reconnaît un antigène ayant subi une mutation ou bien rendu inaccessible à l'anticorps ou absent sur l'isolat en question. Il est surprenant de constater que l'association des deux anticorps dont l'un est efficace ne soit pas au moins indifférente et qu'elle semble ici plutôt antagoniste.

Plus récemment, Quakyi (1987) montre que l'épitope, reconnu par des anticorps monoclonaux réagissant uniquement avec la protéine 230 KD, est présent sur des souches de P. falciparum d'origine géographique différente (Afrique, Brésil, Honduras). Ces premières études sont en faveur d'une conservation des motifs antigéniques, en attendant confirmation par la séquence protéique.

5. Anticorps et immunité bloquant la transmission

De nombreux auteurs s'accordent à dire que les anticorps antigamètes impliqués dans l'immunité bloquant la transmission agissent en agglutinant les microgamètes bloquant ainsi la fertilisation tandis que d'autres agissent en présence de complément et conduisent donc à la lyse du parasite.

De plus, l'on s'est aperçu que l'effet de ces anticorps antigamètes dépendait de leur titre : il n'agissent pour bloquer la transmission qu'à titre élevé. Plusieurs études l'attestent.

Munesighe en 1986 montre que le blocage de la transmission de P. vivax à A. tessellatus dépend du titre des anticorps antigamétocytes. Seuls les lapins immunisés avec des gamétocytes de P. vivax et ayant des titres supérieurs ou égaux à 1/640ème en immunofluorescence, entraînent une interruption de la transmission à 100 %.

D'autres auteurs utilisent un modèle murin pour étudier l'immunité antigamète de P. falciparum. Ils produisent des anticorps monoclonaux grâce à l'utilisation de cellules spléniques de souris immunisées avec des gamètes et des zygotes de P. falciparum, et sélectionnés pour leur aptitude à reconnaître exclusivement la protéine 230 KD. Là encore, ces anticorps sont capables de bloquer l'infectivité de P. falciparum chez A. freeborni, en présence de complément uniquement et l'intensité du blocage augmente avec les titres en anticorps.

Un des buts de la vaccination antigamète est donc d'obtenir un titre élevé d'anticorps spécifiques. La question est de savoir combien de temps seront maintenus ces titres élevés et si l'infection naturelle sera capable de jouer ce rôle de renforcement de l'immunité.

6. Immunité cellulaire antigamètes

Dans toutes les études précédemment citées, seule l'immunité humorale est explorée. Encore peu d'études portent sur le rôle de l'immunité cellulaire dans le blocage de l'infectivité des gamétocytes, mais l'étude en est délicate.

Harte (1985b) étudie chez la souris la durée de l'immunité conférée par l'injection de microgamètes de P. yoelii nigeriensis et en analyse les mécanismes. L'épreuve montre que l'immunité bloquant la transmission est encore efficace à 100 % 12 mois après l'immunisation, cependant que les anticorps antigamètes reviennent à leur taux de base après le 4ème mois.

Ainsi un autre mécanisme semble intervenir à côté de l'action des anticorps. Or le transfert passif de cellules spléniques des souris immunisées à des souris sauvages, confère une protection complète contre les stades sexués. L'analyse des cellules spléniques montre que l'immunité conférée est T dépendante et passerait par une réduction de l'exflagellation des gamètes mâles.

Selon les auteurs, l'immunité cellulaire agit en premier lieu pour diminuer le nombre de gamétocytes et diminuer la transmission (par réduction de l'exflagellation), puis intervient l'immunité humorale pour agglutiner les microgamètes, l'intervention des T helpers étant nécessaire pour l'obtention d'une réponse spécifique.

Une étude originale qui va dans le même sens que la précédente a été réalisée en 1987 par GOOD sur les lymphocytes de sujets n'ayant pas d'antécédent clinique d'infection malarique. Il étudie la réponse proliférative des différents clones vis-à-vis de gamètes de P. falciparum. Le phénotype des lymphocytes T proliférants suggère que les gamètes portent des antigènes susceptibles de stimuler les T helpers. Néanmoins dans cette étude, on ne peut pas savoir si les lymphocytes T concernés sont vierges ou ont déjà été exposés à des antigènes croisés avec ceux qui sont présents sur les gamètes.

7. Conclusion

On a vu que l'immunité humorale contre les stades sexués nécessitait l'obtention de titres élevés en anticorps, aussi, il semble que la participation des lymphocytes T helpers dans le rôle de coopération B et T, pour renforcer la synthèse des anticorps, prend une place importante, même si cette question est en attente. Il reste donc à étudier la séquence en acides aminés des protéines immunodominantes présentes sur les gamètes et zygotes de P. falciparum (230 KD, 48/45 KD, 25 KD) puis des autres espèces ensuite, et enfin, identifier les épitopes T invariants présents sur les gamétocytes et susceptibles d'engendrer une réponse antigamète à la suite d'immunisation artificielle.

La question est de savoir comment les généticiens et les chimistes contourneront le problème des structures conformationnelles pour la synthèse des protéines immunogènes dont les épitopes épousent ces structures, notamment les 48/45 KD et 25 KD, si tant est que cette dernière soit retenue, puisque absente chez l'homme au cours d'une infection naturelle.

COMMENTAIRES

Quel intérêt y a-t-il à l'heure actuelle, à s'intéresser au vaccin anti-palustre ? Voilà bien la question qu'on est tenté de se poser, quand la presse spécialisée et non spécialisée remettent régulièrement le sujet sur la sellette, à travers des titres parfois tapageurs.

Pour saisir l'ampleur de ce problème, il faut sûrement se référer à la place qu'occupe encore, en 1989, le paludisme dans le monde.

Immédiatement, vient à l'esprit l'étendue de l'endémie palustre dans les pays tropicaux et subtropicaux où l'on compte des centaines de millions de personnes soumises à l'infection. Parmi elles, on dénombre hélas, un pourcentage très élevé de décès avec, au premier rang, les enfants en bas âge, victimes les plus sensibles au seul agent mortel du paludisme, Plasmodium falciparum.

Mais à qui ou à quoi imputer la responsabilité de ces faits sinon à la résistance développée par la maladie face aux deux moyens actuels de lutte, les insecticides d'une part, et les antimalariques du groupe des amino-4-quinoléines d'autre part ?

Néanmoins, le paludisme sévit aussi dans les pays industrialisés tempérés, et ce, sous forme de cas importés dont le nombre augmente chaque année. Cela ne doit pas être négligé et devrait au moins servir à sensibiliser les habitants de ces pays aux problèmes actuels de cette affection.

Ces cas d'importation, qui surviennent parfois à la suite d'une prophylaxie négligée de la part des voyageurs (touristes, professionnels en déplacement), sont surtout la conséquence du développement de la chloroquinorésistance de P. falciparum.

Devant ces signes d'alarme, la lutte contre la résistance a donné naissance à des produits de remplacement :

- Nouveaux insecticides, hélas coûteux et dont l'épandage devient de plus en plus aléatoire en regard des territoires toujours plus vastes à couvrir,
- Nouveaux antimalariques, bien difficiles à trouver d'une part, quand on constate que seules deux molécules ont été retenues, la méfloquine et l'halofantrine, après l'analyse de 250 000 molécules, de distribution limitée, d'autre part, pas tellement pour un problème de coût, mais surtout pour éviter d'engendrer des résistances vis-à-vis des dernières armes thérapeutiques, même s'il reste la quinine, inébranlable garant de la santé des paludéens.

Aussi, aucun moyen de lutte, même coûteux, n'est épargné pour essayer d'enrayer ce fléau, et les immunologistes sont venus au secours des pharmacologues pour essayer de trouver une solution de rechange.

Quelle sera alors la place d'un vaccin antipalustre sur l'échiquier mondial du paludisme ? La question est de savoir, s'il permettra de reléguer les antimalariques aux seules pages de la Pharmacopée ou s'il viendra uniquement compléter leur action. Néanmoins, et là est sans doute la véritable interrogation : existera-t-il un jour, un vaccin anti palustre ?

Certains pessimistes pourraient facilement noircir le tableau en insistant sur l'absence à l'heure actuelle, de ce vaccin dont on leur parle déjà depuis quelques années.

Les autres, optimistes et/ou utopistes, dresseront la liste des résultats obtenus à ce jour, depuis les premiers essais réalisés au début du siècle, un peu artisanaux en regard des outils actuels de la recherche, pionniers cependant en la matière !

Nous nous sommes donc placés du côté des seconds, pour recenser les éléments qui pourront peut-être un jour servir à la fabrication de ce vaccin antipaludique.

Ce travail consiste en une revue de la littérature sur la vaccination contre P. falciparum afin d'avoir une vue globale sur la question, et de mieux comprendre à quels niveaux se situent exactement les problèmes rencontrés par les équipes de recherche.

L'importance de l'enjeu, dont le vaccin est peut-être la clé, nous a également poussé à approfondir les raisons des échecs essayés jusqu'ici.

Au cours de cette étude, on a pu remarquer que l'essentiel des recherches porte sur l'espèce la plus dangereuse, Plasmodium falciparum. En effet, l'urgence du problème ne permet pas aux chercheurs d'étendre leur champ d'investigations aux trois autres espèces bénignes pour l'homme : cela fera sans doute l'objet des recherches à venir.

En dehors du stade hépatique, d'analyse plus récente, trois stades du parasite retiennent l'attention : le sporozoïte, le mérozoïte, le gaméto-cyte.

Néanmoins, dans cette analyse, on s'aperçoit que le chapitre traitant de la vaccination ant sporozoïte occupe la plus grande partie. Cela est le reflet de l'importance donnée à ce stade par les chercheurs.

En effet, un vaccin ant sporozoïte, s'il était efficace à 100 % éviterait toute infestation, et serait donc la solution idéale. Aussi ces travaux sont-ils parmi les plus avancés, en comparaison de ceux réalisés sur les deux autres stades.

En ce qui concerne les stades sanguins asexués, c'est sans doute le nombre et la complexité des antigènes exposés sur les mérozoïtes et les schizontes qui ont retardé les progrès. Cependant, un essai de vaccination contre ces stades réalisés sur l'homme illustrent déjà les travaux réalisés en la matière.

Enfin, le stade gaméto-cyte, pour ne présenter qu'une solution à long terme, par blocage de la transmission au niveau des anophèles, a mobilisé l'attention des chercheurs plus tardivement.

Ces deux derniers axes de recherche font donc l'objet de moins de travaux de la part des équipes de chercheurs et ceci transparait dans la moindre place qui leur est consacrée ici.

Cependant, un regain d'intérêt est apparu quand on s'est aperçu qu'un vaccin antipalustre serait sans doute plus efficace s'il était constitué d'un mélange de sous-vaccins dirigés contre les différents stades du cycle plasmodial.

Dans ces trois stades, les chercheurs se sont attachés, à chaque fois, à identifier les antigènes les plus spécifiques, les plus immunogènes, et les plus constants.

Les outils d'analyse sont les mêmes pour les trois axes, et grâce au développement de nouveaux moyens d'étude du parasite *in vitro*, à la découverte de nouveaux modèles animaux, et à l'essor de nouvelles techniques biochimiques et immunologiques encore plus performantes, la recherche sur la vaccination antipaludique a pu progresser réellement depuis les années 1970.

Néanmoins, il faut savoir, d'une part, que si les techniques de production des parasites *in vitro* sont à peu près totalement maîtrisées, elles restent délicates à entreprendre ; d'autre part, les modèles animaux sont très coûteux et leur maintien en captivité, notamment en ce qui concerne les singes, engendre beaucoup de problèmes, sans compter les taux de mortalité non négligeables enregistrés au cours des essais.

Les moyens existent donc, mais sont d'un abord plutôt délicat. Aussi, seuls les équipes de recherche très performantes s'attèlent au problème, travaillant uniquement sur des thèmes très précis.

La coopération nationale et internationale permet heureusement de relier les différents domaines de recherche.

A travers les trois axes de recherche, c'est toujours la protection humorale que l'on a cherché en premier lieu à reproduire artificiellement :

Dans l'axe ant sporozoïte, les premières découvertes mettent en évidence un épitope B. Mais devant la faible réponse humorale engendrée par celui-ci et enregistrée au cours des trois essais réalisés chez l'homme, on s'est interrogé pour trouver très vite des explications. Aussi deux nouveaux pôles de recherche se sont dégagés.

1. Recherche d'un ou plusieurs épitopes T, capables de stimuler les T helpers pour augmenter la réponse humorale spécifique de l'épitope B. De tels travaux ne sont pas encore à l'ordre du jour pour les deux autres stades où l'on n'a pas encore très bien défini l'ensemble des épitopes B, susceptibles d'engendrer des anticorps protecteurs.
2. Etude du rôle de l'immunité cellulaire dans la protection conférée contre les sporozoïtes, étude qui commence à être bien étayée dans la littérature.

Quels sont donc les résultats obtenus ?

A la lumière des essais réalisés chez les animaux, les équipes ont pris le pari de tester des préparations vaccinales chez des volontaires. Hélas, tous les quatre se sont soldés par des demi-échecs puisqu'aucun n'a entraîné de protection à 100 % .

Néanmoins, plusieurs traits se dessinent maintenant pour la construction d'un vaccin contre P. falciparum :

- Du côté vaccin ant sporozoïte, la composition en est très claire puisqu'il devra contenir l'épitope B immunodominant de la CSP de P. falciparum (NANP)₃, couplé à une protéine porteuse et associée à un ou plusieurs épitopes T.

La difficulté réside maintenant dans l'isolement d'un épitope T parasitaire appartenant à une région constante : cela semble être le cas pour l'épitope CS.T₃, récemment décrit, et dont il reste à étudier le niveau de restriction génétique.

- Du côté des stades sanguins asexués les choses ne sont pas si claires. Néanmoins la Pf 155 (= RESA) est sans doute la protéine la plus immunogène du mérozoïte, puisque les anticorps anti-Pf 155 sont capables d'engendrer une protection vis-à-vis de l'invasion des hématies par les mérozoïtes. Plusieurs études attestent l'immunogénité d'un octapeptide situé dans la partie C terminale de la Pf 155 qui serait, rien n'est moins sûr, le peptide immunodominant de cette protéine.

Cependant, le vaccin essayé par l'équipe colombienne de Patarroyo (1988), ne l'utilise pas, pour préférer utiliser une partie N terminale de la protéine.

Dans cet essai la protection partielle conférée ne semble pas intéresser l'immunité à médiation cellulaire, ce qui concorde avec les notions générales sur l'immunité contre les stades sanguins.

- Le stade gamétocyte de son côté, n'a été le centre d'aucun essai vaccinal chez l'homme, ce qui montre tout le retard pris dans ce domaine.

Cependant, des protéines immunogènes présentes sur le gamétocyte ont déjà été identifiées (230 KD, 48/45 KD). Ici aussi, la nécessité de la mise en jeu de la coopération LT/LB se fait sentir, et la découverte d'un ou plusieurs épitopes T spécifiques de ce stade et constant, ouvrira vraiment la voie à ce type de vaccin.

On doit néanmoins tempérer l'optimisme puisque l'on sait que les épitopes contenus dans ces protéines du gamétocyte sont tous de nature conformationnelle, ce qui rend impossible leur obtention par les voies utilisées pour les deux autres stades, synthèse peptidique et recombinaison génétique.

Aussi, avant de poursuivre les essais vaccinaux, d'autres études sont indispensables pour éliminer certaines inconnues en jeu ; il est souhaitable donc de définir pour chaque axe certaines orientations :

- Pour le vaccin antisporeozoïte, c'est la recherche d'un ou plusieurs épitopes T stables et dont le niveau de restriction génétique soit assez bas pour permettre son(leurs) utilisation(s) à grande échelle. L'idée d'utiliser plusieurs épitopes T, différemment restreints est alors très séduisante.
- En ce qui concerne le vaccin antimérozoïte, c'est l'identification des épitopes B potentiels, constants, et par la suite le(les) indispensable(s) épitope(s) T, avec les mêmes contraintes que précédemment.
- Enfin, pour le vaccin altruïste antigamétocyte, presque tout reste encore à faire.

CONCLUSION

Depuis les vingt dernières années, des résultats considérables ont été obtenus dans la voie de la vaccination antipalustre : le parasite et son cycle sont mieux connus, les mécanismes qui sous-tendent l'affection sont mieux compris et les outils devant permettre la fabrication du vaccin sont de mieux en mieux maîtrisés.

Plusieurs axes de recherche sont poursuivis : si ce n'est que récemment que l'on s'intéresse au stade hépatique, les sporozoïtes, mérozoïtes et gamétocytes représentent les voies classiques dans lesquelles se sont spécialisées les différentes équipes de chercheurs à travers le monde.

Dans chaque voie des résultats sont obtenus et les essais vaccinaux se multiplient, surtout chez l'animal mais aussi, ce qui est plus nouveau, chez l'homme.

Pourtant, en 1989, le vaccin antipalustre n'existe pas. Pourquoi ?

Il semble d'abord qu'il y ait quelques voies nouvelles, délaissées jusqu'à présent, qu'il faille approfondir. C'est le cas de l'immunité à médiation cellulaire ou de l'étude des enzymes parasitaires et par le fait, de leur inhibition.

Il se pourrait ensuite que des problèmes "annexes" doivent être résolus : étude des adjuvants, amélioration de la synthèse peptidique permettant de résoudre les problèmes de protéine porteuse ou nouvelles techniques de génie génétique utilisant virus et levures : tout cela est probablement aussi d'une extrême importance dans la mise au point d'un vaccin.

Quoiqu'il en soit, on peut néanmoins tracer le "portrait robot" du vaccin tel qu'il apparaît à l'aube des années 1990 :

Né de la collaboration des parasitologues, des immunologistes et des biochimistes, ce devrait être un vaccin qui du point de vue chimique serait :

- multivalent : constitué d'un mélange des antigènes des différents stades
- fabriqué par recombinaison génétique ou synthèse peptidique
- nécessitant l'aide d'un adjuvant
- thermostable car devant être utilisé en majorité en zone tropicale

A cela devrait bien entendu s'ajouter :

- une utilisation aisée chez l'enfant
- une efficacité en un nombre restreint d'injections
- un coût limité

Quant à donner la date à laquelle ce vaccin sera disponible, personne ne s'y aventure plus tant ceci est devenu de plus en plus difficile.

Il reste cependant à souhaiter que les échecs et les "espoirs déçus" successifs subis ces dernières années n'érousent ni l'entrain des chercheurs ni surtout celui des bailleurs de fond !

Il est en effet nécessaire que la lutte continue et s'intensifie pour qu'enfin soit vaincu cette affection qui tue encore beaucoup trop en 1989 :

le paludisme.

AIKAWA M., YOSHIDA N., NUSSENZWEIG R., NUZZENZWEIG V.,
The protective antigen of malarial sporozoites (P. berghei) is a differentiation antigen.

J. IMMUNOL., 1981, 126(6), 2494-2495.

ANONYME

Le point sur les antipaludiques.

LABORAMA, 1987, 26, 4-8.

ARNOT D.E., BARNWELL J.W., TAM S.P., NUSSENZWEIG R., NUSSENZWEIG V.,
ENE A V.,

Circum sporozoite protein of P. vivax : gene cloning and characterisation of the immunodominant epitope.

SCIENCE, 1985, 230, 815-818.

ASLUND L., SIOLANDER A., WAHLGREN M., WAHLIN B., RUANGJIRACHUPORN W.,
BERZINS K., WIGZELL H., PERLMANN P., PETTERSON U.,

Synthetic gene construct expressing a repeated and highly immunogenic epitope of the P. falciparum antigen : Pf 155.

Proc. Natl. Aca. Sci. USA, 1987, 84, 1399-1403.

BALLET J.J., DRUILHE P., BRASSEUR P., LOOAREESUWANS., CHANTAVANICH P.,
THARAVANIJ S.,

Influence of circulating malarial antigens on cell mediated immunity in acute P. falciparum malaria.

Acta tropica, 1986, 43, 255-262.

BALLOU W.R., ROTHBARD J., WIRTZ R.A., GORDON D.M., WILLIAM J.S.,
GORE R.W., SCHNEIDER I., HOLLINGDALE M., BEAUDOUIN R.L., MALDY W.L.,
MILLER L.H., HOCKMEYER W.I.,

Immunogenicity of synthetic peptides from circumsporozoite protein of P. falciparum.

Science, 1985, 228, 996-999.

BALLOU W.R., SHERWOOD J.A., NEVA F.A., GORDON D.M., WIRTZ R.A.,
WASSERMAN G.F., DIGGS C.L., HOFFMAN S.L., HOLLINGDALE M., HOCKMEYER W.T.,
SCHNEIDER I., YOUNG J.F., REEVE P., CHULAY J.D.,

* Safety and efficacy of a recombinant DNA Plasmodium falciparum
sporozoite vaccine.

Lancet, 1987, 8545, i, 1277-1281.

BAUDON D., GUIGEMDE T.R., QUEDRAOGO J.B.,

Surveillance of Plasmodium falciparum sensitivity to chloroquine in West
Africa. Interest of using in vivo tests with a dose of 5 or 10 mg/kg.

Bull. Soc. Path. Ex., 1987, 80(3 bis), 469-476.

BERZINS K., PERLMANN H., WAHLIN B., CARLSSON J., WAHLGREN M.,
UDOMSANGPETCH R., BJÖRKMAN A., PATARROYO M.E., PERLMANN P.,

Rabbit and human antibodies to a repeated aminoacid sequence of a
P. falciparum antigene, Pf 155, react with the nature protein and inhibit
merozoite invasion.

Proc. Natl. Aca. Sci. USA, 1986, 83, 1065-1069.

BRANDICOURT O., DRUILHE P., DIOUF F., CICERON L., DANIS M.,

Etude in vitro de la chimiosensibilité des souches sénégalaises de
P. falciparum.

Bull. Soc. Fr. Parasit., 1985, 1, 19-22.

BRAUN-BRETON C., ROSENBERRY T.L., PEREIRA DA SILVA L.,

Induction of the proteolytic activity of a membrane protein in Plasmodium
falciparum by phosphatidyl inositol - specific phospholipase C.

Nature, 1988, 332, 457-459.

BUNNAG D., HARINASUTA T.,

The current status of drug resistance in malaria.

Int. J. Parasitol., 1987, 17(1), 169-180.

BURCHARD G.D., HORSTMANN R.D., WERNSDORFER W.H., DIETRICH M.,
Plasmodium falciparum malaria : Resistance to chloroquine but sensitivity
to mefloquine in GABON. A prospective study.

Tropen. Med. Parasitol., 1984, 35, 1-4.

CARTER N., CHEN D.H.,

Malaria transmission blocked by immunisation with gametes of the malaria
parasite.

Nature, 1976, 263, 57-60.

CARTER R., GWADZ T.W., GREEN I.,

Naturally acquired immunity and antimalaria antibodies in relation to
infectivity to mosquitoes in endemic P. falciparum malaria.

In : "Immunodiagnostic techniques in malaria" UNDP/WORLD/BANK/WHO Special
program for research and training in Tropical Diseases - Geneva, 1979,
P. 105-121.

① CHARMOT G.,

Pharmacologie clinique. Les antipaludiques.

Sem. Hop. Paris, 1987, 18(4), 1435-1542.

CHARMOT G., LEBRAS J.,

Le paludisme chimioresistant en 1986.

Med. Mal. Inf., 1986, 16(5 bis) 334-338.

CHEN D.H., TIGELAAR R.E., WEINBAUM F.I.,

Immunity to sporozoite-induced malaria infection in mice :

I. The effect of immunization of T and B cell-deficient mice.

J. Immunol., 1977, 118, 1322-1327.

CHEUNG A., LEBRAN J., SHAWA. R., HERKLI B., STOCKER J., CHIZZOLINI C.,
SANDER C., PERRIN L.H.,

Immunisation with synthetic peptides of a P. falciparum antigen induces
anti-merozoites antibodies.

Proc. Natl. Aca. Sci. USA, 1986, 83, 8328-8332.

CLYDE D.F., Mc CARTHY V.C., MILLER R.M., HORNICK R.B.,
Specificity of protection of man immunized against sporozoite induced
falciparum malaria.

AM. J. Med. Sci., 1973(a), 266, 398-403.

CLYDE D.F., Mc CARTHY V.C., MILLER R.M., WOODWARD W.E.,
Immunisation of man against falciparum and vivax malaria by use of atte-
nuated sporozoites.

AM. J. Trop. Med. Hyg., 1975, 24(3), 397-401.

CLYDE D.F., MOST H., Mc CARTHY V.C., VANDERBERG J.P.,
Immunisation of man against sporozoite-induced falciparum malaria.

Am. J. Med. Sci., 1973(b), 266, 169-173.

COCHRANE A.H., SANTORO F., NUSSENZWEIG V., GWADZ R.W., NESSENZWEIG R.,
Malarial antibodies identify the protective antigens of sporozoites of
P. knowlesi.

Proc. Natl. Aca. Sci. USA, 1982, 79, 5651-5656.

COLLINS W.E., ANDERS R.F., PAPPALOANOU M., CAMPBELL G.H., BROWN G.U.,
KEMP D.J., COPPEL R.L., SKINNER J.C., ANDRYSIK P.M., FAVALORO J.,
CORCORAN L.M., BRODERSON J.R., MITCHELL G.F., CAMPBELL C.C.,
Immunisation of Aotus monkeys with recombinant proteins of an erythrocyte
surface antigen of P. falciparum.

Nature, 1986, 323, 259-262.

COPPEL R.L., COWMAN A.F., ANDERS R.F., BIANCO A.E., SAINT R.B., LINGELBACH
K.R., KEMP D.J., BROWN G.V.,

Immune sera recognize an erythrocyte P. falciparum antigen composed of
repeated amino acid sequences.

Nature, 1984, 310, 789-791.

DAME J.B., WILLIAMS J.L., Mc CUTCHAN T.F., WEBER J.L., WIRTZ R.A.,
HOCKMEYER W.T., MALOY W.L., HAYNES J.O., SCHNEIDER I., ROBERT S.D.,
SANDERS L., REDDY E.P.,

Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen of the
sporozoite of the human malaria parasite P. falciparum.

Science, 1984, 225, 593-599.

DEANS J.A., COHEN S,
Immunology of malaria.

Ann. Rev. Microbiol., 1983, 37, 25-49.

DEANS J.A., JEAN W.C.,

Structural studies on a putative protective P. knowlesi merozoite antigen.

Mol. Bioch. Parasitol., 1987, 26, 155-166.

DEL GIUDICE G., COOPER J.A., MERINO J., VERDINI A.S., PESSI A., TOGNA
A.R., ENGERS H.D., CORRADIN G., LAMBERT P.H.,

The antibody response in mice to carrier free synthetic polymers of
Plasmodium falciparum circum sporozoite repetitive epitope is I. ab
restricted : possible implications for malaria vaccines.

J. Immunol., 1986, 137, 2952-2955.

DELORON P. , LEBARS J., SAVEL J., COULAUD J.P.,

Antibodies to the Pf 155 antigen of Plasmodium falciparum measurment by
cell-ELISA and correlation with expected immune protection.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 1987, 37(1), 22-26.

DRUILHE P., PRADIER O., MARC J.P., MILTGEN F., MAZIER D., PARENT G.,

Levels of antibodies to P. falciparum sporozoites surface antigen reflect
malaria transmission rates and are persistent in absence of reinfection.

Infect. Immun., 1986, 53(2), 393-397.

DUBOIS P., PEREIRA DA SILVA L.,

Vaccination contre le paludisme : état actuel et perspectives.

Rev. Prat., 1988, 38(18), 1173-1177.

EGAN J.E., WEBER J.L., BALLOU R., HOLLINGDALE M.R., MAJARIAN W.R., GORDON D.M., MALOY W.L., HOFFMAN S.L., SIRTZ R.A., SCHNEIDER I., WOOLETT G.R., YOUNG J., HOCKMEYER W.T.,

Efficacy of murine malaria sporozoite vaccines. Implications for human vaccine development.

Science, 1987, 236, 453-456.

ENEA V., ELLIS J., ZAVALA F., ARNOT D.E.,

DNA cloning of P. falciparum circum sporozoite gene : aminoacide sequence of repetitive epitope.

Science, 1984, 225, 628-630.

ETLINGER H.M., FELIX A.M., GILLESSEN D., HEIMER E.P., JUST M., PIUK J.R.L., SINIGAGLIA F., STURCULER D., TAKALS B., TRZECIAKA., MATILE H.,

Assessment in humans of a synthetic peptide based vaccine against the sporozoite of the human malaria parasite, P. falciparum.

J. Immunol., 1988, 140, 626-633.

FANDEUR F., DUBOIS P., GYSIN J., DEDET J.P., PEREIRA DA SILVA L.,

In vitro and in vivo studies on protective and inhibitory antibodies against P. falciparum in the Saimiri monkeys.

J. Immunol., 1984, 132(1), 432-437.

FERREIRA A., SCHOFIELD L., ENEA V., SCHELLKENS H., MEIDE P., COLLINS W.E., NUSSENZWEIG R., NUSSENZWEIG V.,

γ -IFN inhibits the development of exoerythrocytic forms of malaria parasites.

Science, 1986, 232, 881-884.

GENTILINI M., DUFLO B.,

Medecine Tropicale - 4ème édition.

Flamarion Ed, Paris, 1986, 837 PP.

○ GENTILINI M., MOUCHET J., DRUILHE P.,

Actualité du paludisme.

Rev. prat., 1984, 34, 1957-1970.

GOASGUEN J., GENTELET B., MOREAU J.P., FOURQUET R., GOULANGES P.,
Paludisme chloroquinorésistant ? A propos des deux premiers cas malgaches.
Arch. Inst. Pasteur Madagascar, 1975, 44(1), 143-145.

GOLVAN Y.J.,
Eléments de parasitologie médicale.
Flamarion Ed., Paris, 1978, 616 PP.

GOOD M.F., BERZOFKY J.A., MALOY W.L., HAYASHI Y., FUJJI N., HOCKMEYER W.,
MILLER L.H.,
Genetic control of the immune response in mice to a Plasmodium falciparum
sporozoite vaccine.
J. Exp. Med., 1986, 164(2), 655-660.

GOOD M.F., MALOY W.L., LUNDE M.N., MARGALIT H., CORNETTE J.L., SMITH G.L.,
MOSS B., MILLER L.H., BERZOFKY J.A.,
Construction of a synthetic immunogen : use of new T helper epitope on
malaria circumsporozoite proteins.
Science, 1987, 235, 1059-1062.

GOOD M.F., POMBO D., QUAKYI I., RILEY E.M., HOUGHTEN R.A., MENON A.,
ALLING D.W., BERZOFKY J.A., MILLER L.H.,
Human T-cell recognition of the CSP of P. falciparum. T-Cell domains
map to the polymorphic regions of the molecule.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 85(4), 1199-1203.

GOOD M.F., QUAKYI I.A., SAUL A., BERZOFKY J.A., CARTER R., MILLER L.R.,
Human T clones reactive to the sexual stages fo Plasmodium falciparum
malaria.
J. Immunol, 1987, 138, 306-311.

GRAU F.E., DEL GIUDICE G., LAMBERT P.H.,
Host immune response and pathological expression in malaria : possible
implications for malaria vaccines.
Parasitol., 1987, 94, 5123-5137.

GRAVES P.M., CARTER R., BURKOT T.R., RENER J., KAUSHAL D.G.,
WILLIAMS J.L.,

Effects of transmission blocking monoclonal antibodies on different
isolates of P. falciparum.

Infect. Immun., 1985, 48, 611-616.

GWADZ R.W., KOONTZ L.C.,

P. knowlesi : persistence of transmission blocking immunity in monkeys
immunized with gamete antigens.

Infect. Immun., 1984, 44, 137-139.

HARTE P.G., ROGERS N., TARGETT G.A.T.,

Vaccination with purified microgamete antigens prevents transmission of
rodent malaria.

Nature, 1985 a, 316, 258.

HARTE P.G., ROGERS N.C., TARGETT G.A.T.,

Role of T-cells in preventing transmission of rodent malaria.

Immunol., 1985 b, 56, 1-7.

HERRINGTON D.A., CLYDE D.F., LOSONSKY G., CORTESIA M., MURPHY J.R., DAVIS
J., BAQAR S., FELIX A.M., HEIMER E.P., GILLESSEN D., NARDIN E.,
NUSSENZWEIG R., NUSSENZWEIG V., HOLLINGDALE M.R., LEVINE M.M.,

Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine
against Plasmodium falciparum.

Nature, 1987, 328, 257-259.

HERZENBERG L.A., TOKUHISA T.,

Epitope specific regulation carrier-specific induction of suppression for
IgG anti hapten antibody responses.

J. exp. Med., 1982, 155, 1730.

HOFFMAN S.L., WISTAR R., BALLOU W.R., HOLLINGDALE M.R., WIRTZ R.A., SCHNEIDER I., MARWOTO H.A., HOCKMEYER W.T.,
Immunity to malaria and naturally acquired antibodies to the circum sporozoite protein of Plasmodium falciparum.
N. Engl. J. Med., 1986, 315(10), 601-606.

HOFFMAN S.L., OSTER G.N., PLOWE C.V., WOOLLETT G.R., BEIER J.C., CHULAY J. D., WIRTZ R.A., HOLLINGDALE H.R., MUGAMBI M.,
Naturally acquired antibodies to sporozoites do not prevent malaria : vaccine development implications.
Science, 1987, 137, 639-642.

HOLDER A.A., FREEMAN R.R.,
Immunisation against blood stages rodent malaria using purified parasite antigens.
Nature, 1981, 294, 361.

HOLDER A.A., LOCKYER M.J., ODINK K.G., SANDHU J.S., RIVEROS-MORENO V., NICHOLLS S.C., HILLMAN Y., DAVEY L.S., TIZARD M.L.V., SCHWARZ R.T., FREEMAN R.R.,
Primary structure of the precursor to the three major surface antigens of P. falciparum merozoites.
Nature, 1985, 317, 270-273.

HOLLINGDALE M.R., Mc CULLOUGH M., LEEF J.L., BEAUDOIN R.L.,
In vitro cultivation of the exoerythrocytic stage of Plasmodium berghei from sporozoites.
Science, 1981, 213, 1021-1022.

HOLLINGDALE M.R., NARDIN E.H., THARAVANI J., SCHWARTZ A.L., NUSSENZWEIG R.,
Inhibition of entry of Plasmodium falciparum and P. vivax sporozoites into cultured cells ; an in vitro assay of protective antibodies.
J. Immunol., 1984, 132, 909-913.

HOLLINGDALE M.R., ZAVALA F., NUSSENZWEIG R., NUSSENZWEIG V.,
Antibodies to the protective antigen of Plasmodium berghei sporozoites
prevent entry into cultured cells.

J. Immunol., 1982, 128, 1929-1930.

HYDE J.E., ZOLG J.W., SCAIFE J.C.,

Isolation and characterisation of ribosomal RNA from the human malaria
parasite Plasmodium falciparum.

Mol. biochem. Parasitol., 1981, 4, 283-290.

IFEDIBA T., VANDERBERG J.P.

Complete in vitro maturation of Plasmodium falciparum gametocytes.

Nature, 1981, 294, 364-366.

JENDOUBI M., PEREIRA DA SILVA L.,

Polypeptides antigens Mr 90 000 and 72 000 related to protective immunity
against the blood form of Plasmodium falciparum in the squirrel monkey
show stable characteristics in stains from different geographic origins.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 1987, 37(1), 9-16.

JENSEN J.B., BOLAND M.T., ALLAN J.S., CARLIN J.M., VANDEWAA J.A., DIVO
A.A., AKOOD M.A.S.,

Association between human serum-induced crisis forms in cultured
Plasmodium falciparum and clinical immunity to malaria in Sudan.

Infect. Immun., 1983, 41(3), 1502-1511.

KASLOW D.C., QUAKYI I., SYIN C., RAUM M.G., KEISTER D.B., COLLIGAN J.E.,
Mc CUTCHAN T.F., MILLER L.H.,

A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains
EGF - like domains.

Nature, 1988, 333, 74-76.

KAUFMANN S.H.E.

T-cell clones and their products : experimental clones for the immunopro-
phylaxis and immunotherapy of intracellular infections.

Infections, 1984, 12, 124.

KAUL D.K., RAVENTOS-SUAREZ C., OLSON J.A., NAGEL R.L.,
The role of membrane knobs in microvascular obstruction induced by
Plasmodium falciparum - infected erythrocytes.

Trans. Assoc. Am. Physicians, 1985, 98, 204-211.

KAUSHAL D.C., CARTER R., RENER J., GROTENDORST C.A., MILLER L.H.,
HOWARD R.J.,
Monoclonal antibodies against surface determinants on gametes of
Plasmodium gallinaceum block transmission of malaria parasites to mosqui-
toes.

J. Immunol., 1983, 131, 2557-2562.

KOHLER G., MILSTEIN C.,
Continuous cultures of fused cells secreting antibody predefined specifi-
city.

Nature, 1975, 256, 495-496.

KUMAR S., MILLER L.H., QUAKYI I.A., KEISTER D.B., HOUGHTEN R.A.,
MALOY L.H., MOSS B., BERZOFKY J.A., GOOD M.F.,
Cytotoxic T-cells specific for the CSP of P. falciparum.

Nature, 1988, 334, 258-260.

LAGRANGE P.H.

L'avenir des vaccinations : vaccins de l'avenir.

Ann. Inst. Pasteur / Immunol, 1985, 136D, 313-334.

LANGSLEY G.,

Paludisme : vers un vaccin multivalent.

Biofutur, septembre 1988, 23-30.

LE BRAS J., CHARMOT G., COULAUD J.P.,

Emergence épidémique du paludisme chimiorésistant en République Populaire
du Congo, au 2ème semestre 1985.

Bull. Epidemiol. Hebdo., 1985, 52, 2.

LE BRAS J., DELORON P., COULAUD J.P., COULANGES P.,
Evolution de la chimiorésistance du paludisme à P. falciparum en Afrique
et à Madagascar entre 1983 et 1985.

Bull. Soc. Path. exot., 1985, 78(5 bis), 673-675.

LE BRAS J., SIMON F., FOULON G., LAMBERT F.,
Evolution de la chimiosensibilité du paludisme en 1985.

Bull. Epidemiol. Hebdo., 1986, 25, 97-100.

LE BRAS J., SIMON ., RAMANAMIRIJA J.A., CARMEL H.B., HATIN I., DELORON P.,
PORTE J., MARCHAIS H., CLAUSSE J.L., BIAUD J.M., SARROUY J., GUIGUEMDE
T.R., CARME B., CHARMOT G., COULAUD J.P., COULANGES P.,
Sensibilité de P. falciparum aux quinoléines et stratégies thérapeuti-
ques : comparaison de la situation en Afrique et à Madagascar entre 1983
et 1986.

Bull. Soc. Path. Exot., ¹⁹⁸⁷80(3 bis), 471-489.

Mac BRIDE J.S., NEWBOLD C.I., ANAND R.,
Polymorphism of high molecular weight schizont antigen of the human
malaria.

J. Exp. Med., 1985, 161(1), 160-180.

Mac BRIDE J.S., WALLIKER D., MORGAN GI,
Antigenic diversity in the human malaria parasite Plasmodium falciparum.
Science, 1982, 217, 254-257.

MALE D., CHAMPION B., COOKE A.,
IMMUNOLOGIE : le système immunitaire et sa régulation.
MEDSI / Mc GRAW-HILL, ed., Paris 1988.

MAZIER D., BEAUDOIN R.L., MELLOUK S., DRUILHE P., TEXIER B., TROSPER J.,
MILTGEN F., LANDAU I., PAUL C., BRANDICOURT O., GUGUEN-GUILLOUZO C.,
LANGLOIS P.,

Complete development of hepatics stages of P. falciparum in vitro.
Science, 1985, 227, 440-442.

MAZIER D., LANDAU I., DRUILHE P., MILTGEN F., GUGUEN-GUILLOUZO C.,
BACCAM D., BAXTER J., CHIGOT J.P., GENTILINI M.,
Cultivation of the liver forms of P. vivax in human hepatocytes.
Nature, 1984, 307, 367-369.

MAZIER D., MELLOUK S., BEAUDOIN R.L., TEXIER B., DRUILHE P., HOCKMEYER W.,
TROSPER J., PAUL C., CHAROENVIT Y., YOUNG J., MILTGEN ., CHEDID L.,
CHIGOT J.P., GALLEY B., BRANDICOURT O., GENTILINI M.,
Effect of antibodies to recombinant and synthetic peptides of
P. falciparum sporozoites in vitro.
Science, 1986, 231, 156-159.

MENDIS K.N., IHALAMULLAR I., DAVID P.H.,
Diversity of P. vivax - induced antigens on the surface of infected human
erythrocytes.

* AM. J. Trop. Med. Hyg, 1988, 38(1), 42-46.

MENDIS K.N., MUNESIGHE Y.D., DE SILVA Y.N.Y., DERAGALLA I., CARTER R.,
Malaria transmission-blocking immunity induced by natural infections of
P. vivax in humans.
Infect. Immun., 1987, 55, 369-372.

MERCEREAU-PUYJALON O.,
Les antigènes protéiques de Plasmodium falciparum.
Ass. anc. el. inst. Pasteur, 1987, 30, 9-14.

MILLER L.H., HOWARD R.J., CARTER R., GOOD M.F., NUSSENZWEIG V.,
NUSSENZWEIG R.S.,
Research toward malaria vaccines.
Sciences, 1986, 234, 1349-1355.

* MILLER L.H.,
Effective vaccines for humans.
Nature, 1988, 332, 109-110.

MOSSMANN T.R., COFFMAN R.L.,

Two types of mouse helper T-cell clone : Implications for immune regulation.

Immunology today, 1987, 8 (7 et 8), 223-227.

MULLIGAN H.W., RUSSEL P.F., MOHAN B.N.,

Active immunisation of fowls against Plasmodium gallinaceum by injection of killed homologous sporozoites.

J. Mal. Inst. India, 1941, 4, 25-34.

MUNESIGHE Y.D., MENDIS K.N., CARTER R.,

Antigamete antibodies block transmission of human vivax malaria to mosquitoes.

Parasite Immunol., 1986, 8, 231-238.

NARDIN E.H., NUSSENZWEIG R.S.,

Stage specific antigens on the surface membrane of sporozoites of malaria parasites.

Nature, 1978, 274, 55-57.

NARDIN E.H., NUSSENZWEIG R.S., COLLINS W.E., HARINASUTA K.T., TAPCHAISRI P., CHOMCHARN Y.,

Circumsporozoite protein of human malaria parasites P. falciparum and P. vivax.

J. Exp. Med., 1982, 156, 20-30.

NGUYEN-DINH P.,

Etudes sur la chimiorésistance de P. falciparum en Afrique : données actuelles.

Ann. Soc. Belge. Med. Trop., 1985, 65 (suppl.2), 105-113.

NUSSENZWEIG V., NUSSENZWEIG R.S.,

Development of a sporozoites malaria vaccine.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 1986, 35(4), 678-688.

NUSSENZWEIG R.S., VANDERBERG J., MOST H., ORTON C.,
Prospective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites
of Plasmodium berghei.

Nature, 1967, 216, 160-162.

NUSSENZWEIG R.S., VANDERBERG J., MOST H., ORTON C.,
Immunity in simian malaria induced by irradiated sporozoites.

J. Parasitol., 1970, 56, 252.

OSAKI L.S., SUEC. P., NUSSENZWEIG R.S., NUSSENZWEIG V., GODSON G.N.,
Structure of the Plasmodium knowlesi gene coding for the circum sporozoite
protein.

Cell, 1983, 34, 815-822.

PATARROYO M.E., AMADOR R., CLAVIJO P., MORENO A., GUZMAN F., ROMERO P.,
TASCON R., FRANCO A., MURILLO L.A., PONTON G., TRUJILLO G.,
A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood
stages of Plasmodium falciparum malaria.

Nature, 1988, 332, 158-161.

PATARROYO M.E., ROMERO P., TORRES M.L., CLAVIJO P., MORENO A., MARTINEZ
A., RODRIGUEZ P., GUZMAN E., CABEZAS E.,
Induction of protective immunity against experimental infection with
malaria using synthetic peptides.

Nature, 1987, 328, 629-632.

PERLMANN H.K., BERZINS K., WAHLGREN M., CARLSSON J., BJORKMAN A.,
PATARROYO M.E., PERLMANN P.,
Antibodies in malarial sera to parasites antigens in the membrane of ery-
throcytes infected with early asexual stages of P. falciparum.

J. Exp. Med., 1984, 159, 1686-1704.

PERLMANN H.K., BERZINS K., WAHLIN B., VDOMSANGPETCH R.,
RUANGHIRACHISPORN WI., WAHLGREN M., PERLMANN P.,
Absence of antigenic diversity in Pf 155, a major parasite antigen in
membranes of erythrocytes infected with Plasmodium falciparum.
J. Clin. Microbiol., 1987, 25(12), 2347-2354.

PERRIN L.H., MERKLI B., LOCHE M., CHIZZOLINI C., SMART J., RICHLE R.,
Antimalarial immunity in Saimiri monkeys : immunisation with surface com-
ponents of asexual blood stages.
J. Exp. Med., 1984, 160, 441-451.

PERRIN L.H., MERKLI B., GABRA M.S., STOCKER J.W., CHIZZOLINI C.,
RICHLE R.,
Immunisation with Plasmodium falciparum merozoite surface antigen induces
a partial immunity in monkeys.
J. Clin. Invest., 1985, 75, 1718-1721.

PERRIN L.H., RAMIREZ E., LAMBERT P.H., MIESHER P.A.,
Inhibition of P. falciparum growth in human erythrocytes by monoclonal
antibodies.
Nature, 1981, 280, 301-303.

POTOCNAK P., YOSHIDA N., NUSSENZWEIG R., NUSSENZWEIG V.,
Monovalent fragments (Fab) of monoclonal antibodies to a sporozoite sur-
face antigen (Pb44) protect mice against malarial infection.
J. Exp. Med., 1980, 151, 1504-1513.

QUAKYI I.A., CARTER R., RENER J., KUMAR N., GOOD M.F., MILLER L.H.,
The 230-kDa gamete surface protein of P. falciparum is also a target for
transmission blocking antibodies.
J. Immunol., 1987, 139, 4213-4217.

RENER J., GRAVES P., CARTER R., WILLIAMS J.L., BURKOT T.R.,
Target antigens of transmission blocking immunity on gametes of
P. falciparum.
J. Exp. Med. 1983, 158, 976-981.

- RICHARDS W.I.H.G.,
Active immunisation of chicks against P. gallinaceum by inactivated homologous sporozoites and erythrocytic parasites.
Nature, 1966, 212, 1492-1494.
- RICHMAN S.J., REESE R.T.,
Immunologic modeling of a 75 kDa malarial protein with carrier free synthetic peptides.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 85, 1662-1666.
- RIECKMANN K.H., CARSON P.E., BEAUDOIN R.L., CASSELS J.S., SELL K.S.,
Sporozoites induced immunity in man against an ethiopian strain of P. falciparum.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1974, 68, 258-259.
- RIECKMANN K.H., SAX L.J., CAMPBELL G.H., MEEMA J.E.,
Drug sensitivity of Plasmodium falciparum.
Lancet, 1978, 1, 22-23.
- RINGWALD P., LEBRAS J., DOURY J.C.,
Chimiosensibilité du paludisme à Plasmodium falciparum en France en 1988.
Bull. Epidémiol. Hebdo., 1989, 23, 93-95.
- ROITT I., BROSTOFF J., MALE D.,
Immunologie fondamentale et appliquée.
MEDSI ed., PARIS, 1985.
- ROUE R., TALARDIN F., BUISSON Y., DALY J.P., SIMON F., CHABIERSKY M., LEBRAS J., SALIOU P.,
Aspects actuels du paludisme d'importation à P. falciparum chimio-résistant.
Bull. Soc. Path. Exot., 1987, 80, 497-504.

- SALMON C., CARTRON J.P., ROUGER P.,
Susceptibility to diseases : Blood group and parasitism.
In "Human Blood Groups".
MASSON ed., PARIS 1984, 460 pp.
- SANSONETTI P.J., LE BRAS J., VERDIER F., CHARMOT G., DUPONT B.,
LA PRESLE C.,
Chloroquine-resistant Plasmodium falciparum in Cameroon.
Lancet, 1985, i, 1154-1155.
- SCHOFIELD L., VILLAQUIRAN J., FERREIRA A., SCHELLEKENS H.,
NUSSENZWEIG R., NUSSENZWEIG V.,
Gamma-interferon, CD8⁺, T cells, and antibodies required for immunity to
malaria.
Nature, 1987, 330, 664-666.
- SCHOFIELD L., THARAVANIJ S., SAUL A., DO ROSARIO V., KIDSON C.,
A specific S. antigen of P. falciparum is expressed in a proportion of
primary isolates in Brazil. Thailande and Paua New Guinea.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1985, 79, 493-494.
- SCHUTZE M.P., LECLERC C., VOGEL F.R., CHEDID L.,
Epitope suppression in synthetic vaccine models : analysis of the effec-
tors mechanisms.
Cell. Immunol., 1987, 104, 79-84.
- SCHWARZ R.T., RIVEROS-MORENO V., LOCKYER M.J., NICHOLLS S.C., DAVEY C.S.,
HILLMAN Y., SANLHU J.S., FREEMAN R.R., HOLDER A.A.,
Structural diversity of the major surface antigen of P. falciparum mero-
zoites.
Mol. Cell. Biol., 1986, 6(3), 964-968.

SIDDIQUI W.A., TAM L.Q., KRAMER K.J., HUIG S.S., CASE S.E., YAMAGA K.M.,
CHANG S.P., CHAN E.B.T., SIU-CHOW KAN,

Merozoites surface coat precursor protein coompletely protects Aotus mon-
keys against P. falciprum malaria.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84(9), 3014-3018.

SINDEN R.E.

A cell biologist's view of host cell recognition and invasion by malarial
parasites.

Trans. Soc. Trop. Med. Hyg., 1985, 79, 598-605.

SINIGALLIA F., GUTTINGER M., GILLESEN D., DORAN D.M., TABACS B., MATILE
H., TRZECIAK A., PINK J.R.,

Epitopes recognised by human T lymphocytes on malaria circumsporozoite
protein.

Eur. J. Immunol., 1988, 18, 633-636.

TRAGER W., JENSEN J.B.,

Reports : Human malaria parasites in continuous culture.

Science, 1976, 193, 673-675.

VANDERBERG J., NUSSENZWEIG R., MOST H.,

Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites
of P. berghei.

Milit. Med., 1969, 134, 1183-1190.

VERGARA U., RUIZ A., FERREIRA A., NUSSENZWEIG R.S., NUSSENZWEIG V.,

Conserved group-specific epitopes of the circumsporozoite proteins revea-
led by antibodies to synthetic peptides.

J. Immunol., 1985, 134, 3445-3448.

VERMEULEN A.N., PONNUDURAI T., BECKERS P.J.A., VERHAVE J.P., SMITS M.A., MEUWISSEN J.H.E. Th.,

Sequential expression of antigens on sexual stages of P. falciparum accessible to transmission-blocking antibodies in the mosquito.

J. Exp. Med., 1985, 162, 1460-1476.

VERMEULEN A.N., Van DEURSEN J., BRAKENHOFF R.H., LENSEN T.H.W., PONNUDURAI T., MEUWISSEN H.E.Th.,

Characterisation of P. falciparum sexual stage antigens and their biosynthesis in synchronised gametocyte cultures.

Mol. Bioch. Parasitol., 1986, 20, 155-163.

WEBER J.L., HOCKMEYER W.T.,

Structure of the circumsporozoite protein gene in 18 strains of P. falciparum.

Mol. Bioch. Parasitol., 1985, 15, 305-316.

YOUNG J.V., HOCKMEYER W.T., GROSS M., BALLOU W.R., WIRTZ R.A., TROSPER J.H., BEAUDOIN R.L., HOLLINGDALE M.R., MILLER L.H., DIGGS C.L., ROSENBERG M.,

Expression of P. falciparum circumsporozoite proteins in E. Coli for potential use in human malaria vaccines.

Science, 1985, 228, 958-962.

ZAVALA F., COCHRANE A.H., NARDIN E.H., NUSSENZWEIG R., NUSSENZWEIG V.,

Circumsporozoite proteins of malaria parasite contain a simple immunodominant region with two or more identical epitopes.

J. Exp. Med., 1983, 157, 1947-1957.

ZAVALA F., MASUDA A., GRAVES P.M., NUSSENZWEIG V., NUSSENZWEIG R.S.,

* Ubiquity of the repetitive epitope of the circumsporozoite proteins in different isolates of human malaria parasites.

* J. Immunol., 135(4), 2790-2793.

1985

ZAVALA F., TAM J.P., HOLLINGDALE M.R., COLHRANE A.H., QUAKYI I.A.,
NUSSENZWEIG R.S., NUSSENZWEIG V.,

Rationale for development of a synthetic vaccine against P. falciparum
malaria.

Science, 1985, 228, 1436-1440.