

Titration des immunoglobulines G anti-*Plasmodium falciparum* chez les enfants atteints de paludisme grave au CHU de Yopougon.**Titration of anti-*Plasmodium falciparum* Immunoglobuline G in children with severe malaria at the teaching hospital of Yopougon.**

M. Coulibaly¹, H. Sansan², Y. Cissoko⁴, P. Kouakou², R. Yeboah², AM. Timite³, MF. Sombo².

1. Service du Laboratoire de biologie médicale de l'Hôpital Sominé DOLO de Mopti

2. UFR Sciences Médicales, Laboratoire d'Immunologie, CHU Cocody. Abidjan

3. CHU de Yopougon, Service de Pédiatrie

4. Hôpital de Gao, Service des Urgences

Auteur correspondant : Dr Modibo COULIBALY, Service du Laboratoire de

biologie médicale de l'Hôpital Sominé DOLO Email : modibocoulibaly@yahoo.com

Résumé

Objectifs : La pathogénie du paludisme dépend de l'interaction du plasmodium et le système immunitaire de son hôte. L'objectif de cette étude était d'évaluer la relation entre la parasitémie et le titre des Immunoglobulines de classe G anti-*Plasmodium falciparum*.

Patients et Méthodes : Cette étude transversale a concerné 37 enfants âgés de 0 à 15 ans souffrant de paludisme grave ayant été consultés au service de pédiatrie du centre hospitalier universitaire de Yopougon en Côte d'Ivoire. Le titre des IgG anti-*P. falciparum* a été évalué par immunofluorescence indirecte.

Résultats : La parasitémie variait entre 360 et 400000 trophozoïtes avec une moyenne de 48525 trophozoïtes/mm³. La concentration en hémoglobine variait entre 3,4 et 10,7 g/dL avec une moyenne de 6,28 g/dL. Les plaquettes variaient entre 17 et 506 .10³/mm³ avec une moyenne de 110,18.10³/mm³. Le titre des IgG anti- *P. falciparum* variait entre 40 et 320 avec une moyenne de 220. L'hyperparasitémie (parasitémie \geq 100000 trophozoïtes/mm³) était présente uniquement chez les patients de 0 à 5 ans. La moyenne du titre des IgG anti-*P. falciparum* était significativement plus élevée chez les sujets ayant une parasitémie $<$ 100000 trophozoïtes/mm³ comparés à ceux présentant une parasitémie \geq 100000 (110 vs 233,3) p = 0,017 test U de Mann-Withney.

Conclusions : Le paludisme grave et l'hyperparasitémie (\geq 100000 trophozoïtes/mm³) sont plus fréquents chez les enfants de 0 à 5 ans et touche plus les garçons que les filles. Les anticorps IgG anti-*P. falciparum* ont été retrouvés chez tous les patients.

Mots clé : *P. falciparum*, Paludisme grave, Titre Immunoglobuline G.

Abstract

Objectives: Severe malaria pathogenesis depends on the interaction of Plasmodium and its host immune system. The main goal of this study was to ascertain the relationship between parasitemia and Immunoglobulin G titre.

Design: This cross-sectional study included 37 children aged from 0 to 15 years with severe malaria who came at Yopougon teaching hospital pediatric ward in Ivory

Coast. Patients antibody IgG against *falciparum* malaria was assessed by using Indirect Fluorescence Antibody Test.

Results: Parasitemia ranged between 360 and 400000/mm³ trophozoites with an average of 48525 trophozoites / mm³. Hemoglobin concentration ranged between 3.4 and 10.7 g/dL with an average of 6.28 g/dL. Platelets varied between 17 and 506 x10³/mm³ with a mean of 110.18x10³/mm³. The titer of Immunoglobulin G against *Pf* ranged from 40 to 320 with an average of 220. Hyperparasitaemia (parasitaemia ≥ 100,000 trophozoites /mm³) was present only in patients aged from 0 to 5 years. The mean titer of anti-*Pf* IgG was significantly higher in subjects with parasitaemia <100000 trophozoites / mm³ compared with those with parasitaemia ≥ 100000 (110 vs 233.3) p = 0.017, U test of Mann-Whitney.

Conclusions: Severe malaria and hyperparasitaemia (≥ 100000 trophozoites/mm³) are more common in children aged from 0 to 5 years and affects more boys than girls. IgG antibodies against *P. falciparum* were found in all patients.

Key words: Immunoglobulin G titer, *P. falciparum*, Sever malaria.

INTRODUCTION

La pathogénie de l'infection par le *Plasmodium falciparum* dépend de l'interaction entre le parasite et le système immunitaire de l'hôte. Cette interaction aboutit à la mise en place d'une réponse immunitaire innée qui est une condition nécessaire pour qu'une réponse adaptative puisse se développer [1]. La réponse adaptative comporte les composantes cellulaire, humorale et la formation de cellules mémoires [2-3]. Il est admis que les IgG jouent un rôle crucial dans le développement de l'immunité contre les antigènes de la phase érythrocytaire du *P. falciparum* [4-5]. Cependant, il existe peu de données sur la relation entre la parasitémie et le titre des IgG anti- *P. falciparum*. Notre étude avait pour but d'étudier les relations entre la parasitémie et le titre des anticorps anti- *P. falciparum* chez les enfants atteints de paludisme grave en Côte d'Ivoire.

PATIENS ET METHODES

Nous avons réalisé une étude prospective transversale avec un recrutement exhaustif du mois d'août à octobre 2010 au service de pédiatrie du centre hospitalier universitaire (CHU) de Yopougon. Elle a concerné 37 enfants âgés de 0 à 15 ans ayant

une goutte épaisse positive associée à un critère de gravité clinique ou biologique. Nous avons prélevé 2 ml de sang sur tube EDTA et 2 ml sur tube sec au niveau du pli du coude avant tout traitement antipaludéen. Les tubes secs ont ensuite été centrifugés à 3000 tours par minute pendant 5 minutes et des aliquotes de sérum ont été réalisés dans des tubes Eppendorf® et conservés à -20 degrés Celsius en attendant la détermination des titres d'anticorps. La numération globulaire et la parasitémie ont été directement réalisées sur le tube EDTA au laboratoire d'hématologie du CHU de Yopougon. Les gouttes épaisses ont été colorées au Giemsa 5% et lus au microscope Olympus™ à l'objectif 100 à immersion par rapport à 300 leucocytes. L'estimation de la densité parasitaire effectuée sur la base de 7500 leucocytes par millimètre cube de sang. La numération globulaire a été réalisée à l'automate Sysmex Kx-21™. Après homogénéisation à l'agitateur rotatif, le sang total est dilué au 1/80 000 dans un liquide isotonique conducteur puis la suspension circule à travers le micro-orifice d'un tube possédant de chaque côté une électrode immergée (interne et externe). Les particules traversant l'orifice un à un créent une différence

de potentiel (ddp) proportionnelle à leur volume. La série d'impulsion est mesurée et comptée donnant ainsi le nombre et le volume des cellules. L'immunofluorescence indirecte a été réalisée au laboratoire d'immuno-hématologie du CHU de Cocody. Les sera ont été dilués au 1/20 et 1/40 en PBS (Phosphate Buffer Saline, réf. 75 511) pour le dépistage. La recherche d'anticorps IgG anti-*P. falciparum* a été faite en utilisant le kit Falciparum-Spot IFTM de BioMérieux composé de globule rouge parasités fixés sur lame, un conjugué Fluoline H (réf. 75603), l'Evans Blue (réf. 75 491) et le Fluorep (réf. 75 521). Le mode opératoire de cette a été décrit de façon détaillée par Soler CP et al, 2003 [17]. Les données ont été saisies et analysées sur le logiciel SPSS (Statistical Package For Social Science) version 18.0 [CHICAGO, IL, USA]. Le test U de Mann-Withney a été utilisé pour la comparaison des moyennes du titre des IgG anti-*Pf*. Le seuil de signification statistique a été fixé à un $p \leq 5\%$.

RESULTATS

Les tableaux I et la figure 1 décrivent la distribution des patients selon le sexe et les tranches d'âge. En effet, nous avons trouvé une prédominance masculine sex-ratio = 2,7. L'intervalle d'âge allant de 0 à 5 ans était la plus représentée 28/37 soit (75,68%). La moyenne d'âge était de 4 ans avec un écart type de 3 ans. Nous avons noté une prédominance de la forme anémique 9/37 soit (24,32%) suivi par les formes neurologiques convulsives et comateuses avec respectivement 7/37 (18,92%) et 6/37 (13,52%). Le tableau II décrit les paramètres clinico-biologiques. En effet, la parasitémie variait entre 360 et 400000 trophozoites/mm³ avec une moyenne de 48524 trophozoites. Les titres d'IgG étaient compris entre 40 et 320

avec une moyenne de 220. Quant au taux d'hémoglobine, il variait entre 3,4 et 10,7 g/dL avec un taux moyen de 6,28 g/dL. Par ailleurs, les thrombocytes allaient de 17 à 506.10³/mm³ avec la classique thrombopénie au cours du paludisme grave matérialisée par un décompte moyen des plaquettes à 110,18.10³ plaquettes/mm³. En définissant l'hyperparasitémie comme étant une parasitémie ≥ 100000 trophozoites/mm³ comme indiquée sur le tableau III, elle a été retrouvée chez 4 sujets sur 37 soit 10,8%. Il faut noter que ces 4 sujets appartenaient tous à l'intervalle d'âge de 0 à 5 ans. La figure 2 montre que la moyenne du titre des IgG anti-*P. falciparum* était significativement plus élevée chez les sujets ayant une parasitémie < 100000 trophozoites/mm³ comparée à ceux présentant une parasitémie supérieure ou égale à 100000 (110 vs 233,3) $p = 0,017$ avec le test U de Mann-Withney. En contraste, le tableau IV montre que la moyenne du titre d'IgG anti-*P. falciparum* n'était significativement pas différent en fonction de l'existence ou non d'anémie sévère (concentration d'hémoglobine ≤ 5 g/dL) 204,35 vs 245,71 ($p = 0,234$ avec le test U de Mann-Withney). Cependant, les patients présentant une anémie sévère avaient les plus bas titres d'IgG anti-*P. falciparum*.

DISCUSSION

Nous avons effectué une étude transversale prospective. Cette étude a concerné 37 cas de paludisme grave ayant été consultés au service de pédiatrie du CHU de Yopougon d'août à octobre 2010. Les examens de laboratoire ont été effectués au laboratoire du CHU de Yopougon et d'immuno-hématologie du CHU de Cocody. L'objectif principal de l'étude était de déterminer le titre des

anticorps IgG anti- *P. falciparum* au cours du paludisme grave chez des enfants de 0 à 15 ans. Le paludisme grave a été confirmé pour chaque patient par des examens cliniques et biologiques. Les titres des IgG ont été déterminés par immunofluorescence indirecte (IFI) en utilisant le kit Falciparum-Spot IF™ [Bio Mérieux]. Les lames ont été lues au microscope à fluorescence à fond noir. Le sex ratio était de 2,7. En ce qui concerne l'âge les extrêmes variaient entre 0 et 13 ans avec une moyenne de 4 ans. La tranche d'âge de 0 à 5 ans était majoritaire 28/37 soit 75,68%. Ceci est en accord avec les données de la littérature qui stipulent que la tranche d'âge de 0 à 5 ans paye le lourd tribut de cette maladie [6-7]. Parmi les signes de gravités, nous avons observé 9/37 d'anémie sévère isolée soit 24,32% suivi par la convulsion 7/37 soit 18,92% et le coma 6/37 (16,22%). Ces résultats corroborent ceux d'Asse KV et al, 2003 [6] qui avaient aussi trouvé à Bouaké que la forme anémique était la plus fréquente soit 76%. La température variait entre 37°C et 40°C avec une moyenne de 38,36°C. Cette moyenne témoigne de l'hyperthermie chez la majorité des patients. Nous avons trouvé des températures plus ou moins normales chez certains patients cela pourrait être dû à une auto médication à un antipyrétique avant l'arrivée au CHU. La concentration en hémoglobine variait entre 3,4 et 10,7 g/dL avec une moyenne de 6,8 g/dL. L'anémie sévère du paludisme grave selon l'OMS (Hb ≤ 5g/dL) a été observée chez 24,32% des patients. La moyenne d'hémoglobine était comparable à celle obtenue par Hien et al, 2007 (6,4g/dL) [8]. L'anémie au cours du paludisme grave résulte de plusieurs mécanismes comme l'hyper activation de la rate impaludée, l'inhibition de l'hématopoïèse par le TNF et

l'induction de l'apoptose des hématies parasités [9-10]. D'autres auteurs ont suggéré une forte participation du complément dans l'hémolyse au cours du paludisme grave. En effet, il a été démontré que les voies d'activation du complément dépendante du C3 (la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines) sont activées au cours du paludisme grave [8, 11]. A ceux-ci s'ajoute la voie des protéases intrinsèques : il s'agit de la thrombine, des neutrophiles et macrophages activés qui ont tous la propriété de sécréter des serines protéases capables d'activer directement la C5 [12]. Les plaquettes variaient entre 17 et 506.10³/mm³ avec une moyenne de 110.10³/mm³. Malgré la présence de thrombopénie profonde chez certain patient, nous n'avons pas observé la présence d'hémorragie cutanéomuqueuse chez ces patients. Le mécanisme de la thrombopénie en absence de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) est d'origine immunologique. Une étude a montré que les plaquettes s'attachent aux globules rouges infectés via la liaison CD36-PfEMP1 aidant ainsi l'élimination des parasites [13], ce qui soulève les questions suivantes : le ciblage des plaquettes dans le traitement du paludisme et l'utilisation de l'aspirine pour traiter la fièvre au cours du paludisme qui pourrait compromettre le rôle joué par les plaquettes dans la clairance parasitaire [14]. Le *P. falciparum* a été la seule espèce plasmodiale retrouvée chez les patients. La densité parasitaire variait entre 360 et 400000 trophozoites/mm³ de sang observé avec une moyenne de 48525 trophozoites/mm³. Eholié S. P et al. 2004 [15] avaient obtenu une densité parasitaire moyenne de 27200 trophozoites/mm³. Cette différence s'explique par le fait de l'âge : la série d'Eholié concernait les adultes et les enfants. La parasitémie ≥ 100000

trophozoites/mm³ a été observé chez 4/37 soit (10,8%) tous âgés de moins de 5 ans. L'étude réalisée par Rogier C et al. [16] au Sénégal en 2001 dans des conditions d'endémicité comparables va dans le même sens. Le titre des IgG anti- *P. falciparum* variait entre 40 et 320 avec une moyenne de 220. Il a été démontré depuis longtemps qu'il existe des anticorps naturels anti- *P. falciparum* chez des individus vivant en zone d'endémie palustre suite à l'exposition au parasite qui stimule le système immunitaire [17]. En définissant l'hyperparasitémie comme étant une parasitémie >100000 trophozoites/mm³, nous avons trouvé une association entre la moyenne géométrique des titres d'IgG anti- *P. falciparum* et la classe de parasitémie. En effet, les sujets hyperparasitémiques avaient un titre d'IgG anti- *P. falciparum* significativement inférieur à ceux qui avaient une parasitémie ≤100000 trophozoites/mm³; 110 et de 233, p = 0,017 avec le test U de Mann-Whitney. Ce qui suggère que le titre des IgG pourrait contrôler la parasitémie. MBengue B et al. 2016 [5] et Mohamed SN et al. 2016 [18] ont eu des résultats similaires. En revanche, nous n'avons pas trouvé d'association entre l'anémie sévère (Hb ≤ 5 g/dl), l'anémie modérée (Hb > 5g/dL) et le titre des IgG anti- *P. falciparum* 204,35 vs 245,71 ; test U de Mann-Whitney, p = 0,234. Ceci s'explique par le mécanisme physiopathologique de l'anémie du paludisme grave relevant beaucoup plus de l'apoptose induite par l'hémozoïne du *P. falciparum* qui serait responsable de la destruction des précurseurs érythroïdes et même des hématies non parasitées [9, 19] ainsi que de l'action du complément que d'une action dépendante des IgG anti- *P. falciparum* [8, 20-21].

CONCLUSION

Dans cette étude, le paludisme grave et l'hyperparasitémie (≥ 100000 trophozoites/mm³) sont plus fréquents chez les enfants de 0 à 5 ans et touche plus les garçons que les filles. Les anticorps IgG anti- *P. falciparum* ont été retrouvés chez tous les patients.

REFERENCES

1. Louis H. Miller, Dror I. Baruch, Kevin Marsh & Ogobara K. Doumbo. The pathogenic basis of malaria. *Nature* 2002;415(6872):673-9.
2. Scholzen A, Sauerwein RW. Immune activation and induction of memory: lessons learned from controlled human malaria infection with *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*. 2016;143(2):224-35.
3. Barry A, Hansen D. Naturally acquired immunity to malaria. *Parasitology*. 2016 ;143(2):125-8.
4. Amanfo SA, Mduluzza T, Midzi N, Cavanagh DR, Mutapi F. Seroepidemiology of *Plasmodium* species infections in Zimbabwean population. *Malar J*. 2016 May 10;15(1):267.
5. Mbengue B, Kpodji P, Sylla Niang M, Varela ML, Thiam A, Sow A et al. Profiles of IgG responses against CSP, GLURP and LSA-3NR2 in urban malaria (Dakar): relations with haemoglobin levels and parasite densities. *Bull Soc Pathol Exot*. 2016;109(2):91-98.
6. Asse K.V, Brouh Y, Plo K.J. Paludisme grave de l'enfant au centre hospitalier universitaire (CHU) de Bouaké en république de Côte d'Ivoire. *Archives de pédiatrie* 2003;10(1):62.
7. Nzeyimana I, Henry M.C., Dossou-Yovo J., Doannio J.M., Diawara L., Carnevale P. Épidémiologie du paludisme dans le sud-ouest forestier de la Côte d'Ivoire (région de Taï). *Bul Soc Pathol Exot* 2002;95 (2):89-94.
8. Hien S, Akre D.P, Dasse S.R, Siransy B, Kouame R, N'Guessan K et

- al. Rôle du complément dans la survenue de l'anémie au cours du paludisme grave à *Plasmodium falciparum* chez les enfants de 0 à 72 mois suivis à l'hôpital méthodiste de Dabou, Côte d'Ivoire. *J. sci. pharm. Boil* 2007;8 (1):85-90.
9. Thawani N, Tam M, Bellemare MJ, Bohle DS, Olivier M, de Souza JB et al. *Plasmodium* products contribute to severe malarial anemia by inhibiting erythropoietin-induced proliferation of erythroid precursors. *J Infect Dis.* 2014;209 (1):140-149.
10. Totino PR, Magalhães Ad, Alves EB, Costa MR, de Lacerda MV, Daniel-Ribeiro et al. *Plasmodium falciparum*, but not *P. vivax*, can induce erythrocytic apoptosis. *Parasit Vectors.* 2014;(7):484-8.
11. Zhou J, Feng G, Beeson J, Hogarth PM, Rogerson SJ, Yan Y et al. CD14(hi)CD16+ monocytes phagocytose antibody-opsonised *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes more efficiently than other monocyte subsets, and require CD16 and complement to do so. *BMC Med.* 2015, (13):154.
12. Biryukov S, Stoute JA. Complement activation in malaria: friend or foe? *Trends Mol Med.* 2014;20(5):293-301.
13. McMorran BJ, Wiczorski L, Drysdale KE, Chan JA, Huang HM, Smith C et al. Platelet factor 4 and Duffy antigen required for platelet killing of *Plasmodium falciparum*. *Science.* 2012;338(6112):1348-51.
14. Greenbaum DC, FitzGerald GA. Platelets, pyrexia, and plasmodia. *N Engl J Med* 2009;361(15): 526-8.
15. Eholié S. P, Ehui E, Adou-Bryn K, Kouamé K. E, Tanon A, Kakou A et al. Paludisme grave de l'adulte autochtone à Abidjan (Côte d'Ivoire). *Santé publique* 2004;97 (5):340-4.
16. Rogier C., Parzy D., Spiegel A. Histoire naturelle et épidémiologie du paludisme. In J M.Saissy, éd. *Paludisme grave.* Paris: Arnette ; 200.p.1-22.
17. Soler CP , Gerome P , Soullie B , Tisedre F , Bejan H , Yvetot J et al. Comparison of techniques used to screen blood donations for malaria antibodies. *Medecine Tropicale.* 2003;63(6):587-9.
18. Mohamed SN, Hassan DA, El Hussein AM, Osman IM, Ibrahim ME, Mohamed HS et al. The Association of High Prevalence of Trophozoites in Peripheral Blood with Lower Antibody Response to *P. falciparum* Infected Erythrocytes among Asymptomatic Children in Sudan. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:7987686.
19. Totino PR, Magalhaes AD, Silva LA, Banic DM, Daniel-Ribeiro CT et al. Apoptosis of non-parasitized red blood cells in malaria: a putative mechanism involved in the pathogenesis of anaemia. *Malar J* 2010;2(9):350.
20. Huber-Lang M, Younkin, E.M, Sarma, J.V, Riedemann, N, McGuire, S.R, Lu, K.T, et al. Generation of C5a by phagocytic cells. *Am J Pathol* 2002;161(5): 1849-59.
21. Karlee L. Silver, Sarah J. Higgins, Chloe R, McDonald et al. Kain. Complement driven innate immune response to malaria: fuelling severe malarial diseases. *Cellular Microbiology* 2010;12(8):1036-45.

Tableau I : Distribution des patients selon le sexe.

Sexe	Effectif	Pourcentage
Masculin	27	72,97
Féminin	10	27,03
Total	37	100

Le sex ratio était de 2,7.

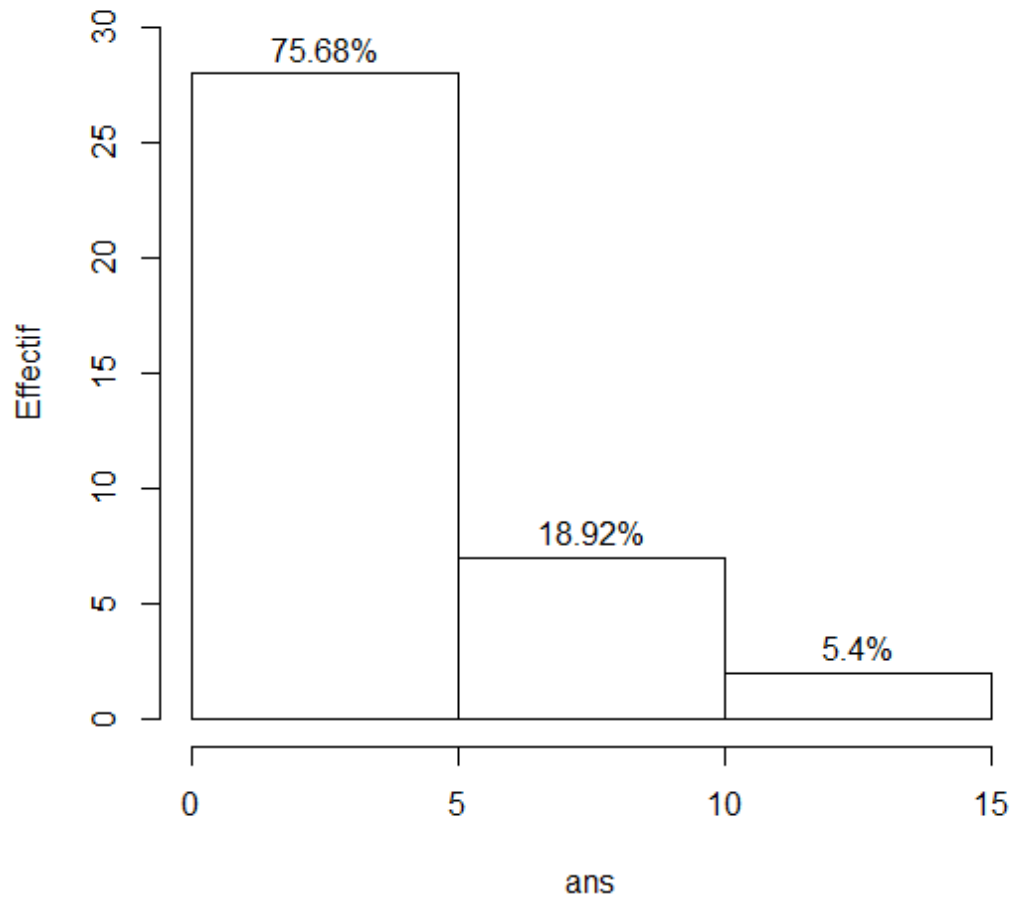
**Figure 1** : répartition des sujets selon les classes d'âge

Tableau II : Statistique descriptive des paramètres clinico-biologiques.

Paramètres	Effectif	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart type
Age (an)	37	1,0	13,0	4,243	3,10
Poids (kg)	37	5	38	14,25	6,96
Température (°C)	37	37,00	40,00	38,36	0,97
Hb (g/dL)	37	3,40	10,70	6,28	1,90
Plaquettes (/mm ³)	37	17,00	506,00	110,18.10 ³	106,31
Parasitémie (/mm ³)	37	360	400000	48524,59	74003,77
Titre IgG	37	40	320	220,00	105,19

Tableau III : Densité parasitaire des sujets selon les tranches d'âges.

Tranche d'âge	Densité parasitaire (trophozoites/mm ³)		Total
	≥ 100000	< 100000	
[0-5 ans]	4	24	28
] 5-10 ans]	0	7	7
] 10-15 ans]	0	2	2
Total	4	33	37

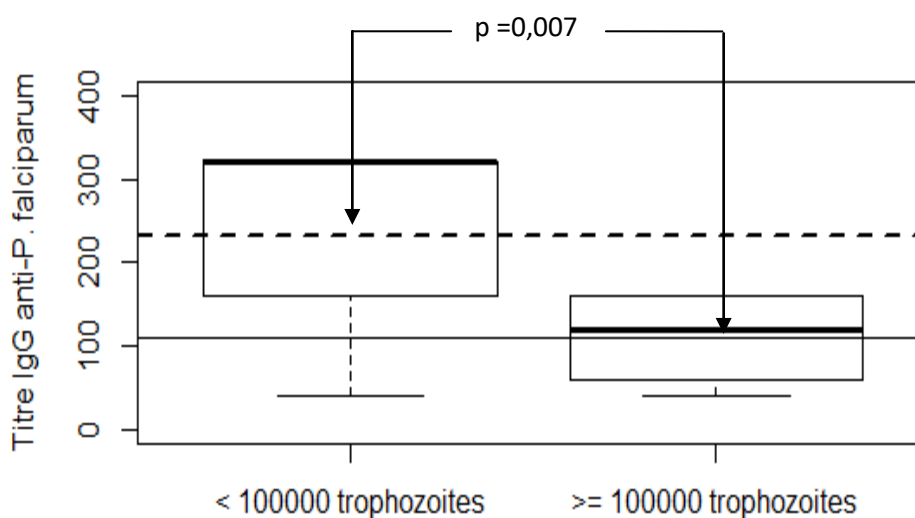
**Figure 2** : distribution du taux d'IgG selon la parasitémie

Tableau IV : Distribution des titres des IgG selon la classe d'anémie.

Classe d'anémie	Effectif	Moyenne IgG	Ecart-type
Anémie sévère (Hb \leq 5g/dL)	9	173,33	93, 80
Anémie modérée (Hb $>$ 5g/L)	28	235,00	105,78

La moyenne du titre était comparable entre les deux groupes $p= 0,234$.