



HAL
open science

Utilisation de biomarqueurs de plasmodium dans le cadre de la prévention du paludisme transfusionnel au Sud-Bénin

Sossa Pascal Atchadé

► **To cite this version:**

Sossa Pascal Atchadé. Utilisation de biomarqueurs de plasmodium dans le cadre de la prévention du paludisme transfusionnel au Sud-Bénin. Immunologie. Université de Strasbourg; Université d'Abomey-Calavi (Bénin), 2014. Français. NNT : 2014STRAJ127 . tel-01228589

HAL Id: tel-01228589

<https://theses.hal.science/tel-01228589v1>

Submitted on 13 Nov 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

**THESE DE DOCTORAT
EN COTUTELLE INTERNATIONALE**



N°.....

N° 60

Présentée devant

L'Université de Strasbourg
Ecole Doctorale Sciences de la Vie
et de la Santé, France

et

L'Université d'Abomey-Calavi
Ecole Doctorale des Sciences
de la Vie, BENIN

**Pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Strasbourg et de l'Université d'Abomey-Calavi**

*Mention: Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité: Parasitologie & Physiopathologie*

**UTILISATION DE BIOMARQUEURS DE *PLASMODIUM* DANS
LE CADRE DE LA PREVENTION DU PALUDISME TRANSFUSIONNEL
AU SUD-BENIN**

Par

Sossa Pascal ATCHADE

Le 1^{er} Février 2014

Composition du Jury :

Président: Professeur Fatiou TOUKOUROU

Rapporteur: Professeur Nicaise NDAM TUIKUE

Rapporteur: Professeur Comlan de SOUZA

Examineur: Professeur Yves HANSMANN

Co-Directeur de thèse : Professeur Ermanno CANDOLFI

Directeur de thèse : Professeur Ambaliou SANNI

Année 2013-2014



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

**THESE DE DOCTORAT
EN COTUTELLE INTERNATIONALE**



N°.....

N° 60

Présentée devant

L'Université de Strasbourg
Ecole Doctorale Sciences de la Vie
et de la Santé, France

et

L'Université d'Abomey-Calavi
Ecole Doctorale des Sciences
de la Vie, BENIN

**Pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Strasbourg et de l'Université d'Abomey-Calavi**

*Mention: Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité: Parasitologie & Physiopathologie*

**UTILISATION DE BIOMARQUEURS DE *PLASMODIUM* DANS
LE CADRE DE LA PREVENTION DU PALUDISME TRANSFUSIONNEL
>AU SUD-BENIN**

Par

Sossa Pascal ATCHADE

Le 1^{er} Février 2014

Composition du Jury :

Président: Professeur Fatiou TOUKOUROU

Rapporteur: Professeur Nicaise NDAM TUIKUE

Rapporteur: Professeur Comlan de SOUZA

Examineur: Professeur Yves HANSMANN

Co-Directeur de thèse : Professeur Ermanno CANDOLFI

Directeur de thèse : Professeur Ambaliou SANNI

Année 2013-2014

DEDICACES

JE

RENDS

GRACE

A

Dieu le Père

J'ai tout reçu de toi Seigneur et je t'offre cette œuvre.

Le chemin a été long et parfois difficile, mais jamais je n'ai cessé de sentir ta présence dans ma vie.

Que tout mon être soit ton instrument pour soulager ceux qui souffrent dans leur chair, pour ta plus grande gloire.

Ainsi soit-il !

A

La Vierge Marie

Bienheureuse Mère, tu n'as jamais cessé d'intercéder pour moi auprès de ton fils Jésus-Christ mon Sauveur.

Protège-moi de ton manteau Virginal et apprends-moi à toujours faire la volonté du Père.

Sois bénie Rose Mystique.

REMERCIEMENTS

Je remercie mon directeur de thèse, Professeur Ermanno CANDOLFI, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je lui exprime toute ma reconnaissance pour avoir guidé ce travail de recherche en accompagnant chaque étape tout en me laissant une grande liberté. Nos échanges m'ont permis de m'enrichir tant sur le plan professionnel que personnel.

Je tiens également à remercier mon co-directeur de thèse, Professeur Ambaliou SANNI, pour avoir accepté de diriger ce travail. Votre analyse scientifique expérimentée et rigoureuse a été une aide plus que précieuse dans l'élaboration de cette thèse.

Je voudrais exprimer ma profonde gratitude à Cécile DODERER-Lang, pour son implication et sa contribution considérable dans la réalisation de ce travail mais également pour son dynamisme et son enthousiasme quotidiens.

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel de recherche et de diagnostic de l'institut de Parasitologie et Pathologie Tropicale, qui chacun à sa manière, a partagé ma vie au laboratoire et en particulier Sylvie FERROTEY, Ahmed ABOUBACAR pour leur soutien, leurs conseils avisés ainsi que leur contribution.

J'aimerais remercier mes proches, amis et famille qui m'ont accompagné durant cette période, mes enfants qui ont partagé mes avancées et qui m'ont soutenu également dans les moments de doutes.

Je remercie mon père et ma mère qui m'ont inculqué des valeurs morales comme l'abnégation et la volonté. Ce travail correspond à l'aboutissement d'une partie de leur éducation. Je suis extrêmement fier de les remercier pour tout cela.

Mes sincères remerciements vont également aux Docteurs Nicodème CHABI et Casimir D. AKPOVI qui, plus que des amis, ont pris ce travail

comme le leur. Veuillez recevoir l'expression de mon profond attachement et de ma profonde gratitude.

A mes amis : Aline TCHINTCHIN, Lysette DJIDOMI C. KINSSOU, Anne ADOUKONOU à qui Je souhaite une brillante carrière et beaucoup de réussite dans la vie.

AU Président de notre Jury

Nous vous exprimons notre vive gratitude pour l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury. Veuillez accepter, Monsieur le Président, l'expression de notre profond respect.

Aux membres de Jury

Vous êtes très occupés, pourtant vous avez accepté juger ce travail afin d'apporter votre touche de maître ; c'est un grand honneur que vous faites à notre modeste personne.

Hommages respectueux.

Enfin, il y a des remerciements plus difficiles que d'autres.

A mon épouse Rosine ESSE

Toi qui m'as soutenu avec amour, persévérance et partage, je demande au Seigneur de veiller sur notre union.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	PAGES
DEDICACES	3
REMERCIEMENTS	6
TABLE DES MATIERES	9
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES	16
LISTE DES ABREVIATIONS ET ANNEXES	20
RESUME	24
ABSTRAT	25
INTRODUCTION	26
PARTIE I : Synthèse bibliographique	30
1.1 <i>Plasmodium</i> , agent pathogène du paludisme.....	31
1.1.1 Systématique du <i>Plasmodium</i> et des Apicomplexes.....	33
1.1.2 Origine des Apicomplexes.....	33
1.1.3 Cycle des Plasmodies parasites de l’homme.....	35
1.1.3.1 Cycle chez les hommes.....	35
1.1.3.2 Cycle chez l’anophèle vecteur.....	37
1.1.4 Organisation moléculaire du parasite.....	38
1.1.4.1 Polymorphisme génétique du plasmodium.....	38
1.1.4.2 L’apicoplaste.....	39
1.1.4.3 Relation parasite globule rouge.....	41
1.1.4.4 Trafic des protéines entre le <i>Plasmodium</i> et l’érythrocyte infecté.....	42
1.1.4.5 Les antigènes plasmodiaux et leurs rôles.....	43
1.1.4.5.1 <i>Plasmodium falciparum</i> « Histidine Rich Protein 2 » (PfHRP-2).....	43
1.1.4.5.2 Lactate Deshydrogenase plasmodiale.....	44

1.2.5.13 HLA-B53 et le paludisme.....	54
1.2.5.14 Système immunogène Duffy et le paludisme.....	54
1.2.6 Fasciées épidémiologique du paludisme au Bénin.....	55
1.2.6.1 République du Bénin.....	55
1.2.6.2 Climat et paludisme au Bénin.....	55
1.2.6.3 Vecteurs impliqués dans la transmission du paludisme au Bénin.....	56
1.2.7 Diagnostic du paludisme.....	56
1.2.7.1 Examen clinique.....	56
1.2.7.2 Examen sanguin au microscope.....	57
1.2.7.3 Tests de diagnostic rapide : TDR.....	58
1.2.7.4 Méthodes de biologie moléculaire au laboratoire.....	59
1.2.7.5 Diagnostic immunologique.....	59
1.2.7.6 Limite des techniques de diagnostic du paludisme dans la qualification des poches de sang.....	60
1.2.8 Médicaments antipaludiques.....	61
1.2.8.1 Les schizonticides.....	61
1.2.8.2 Les inhibiteurs des acides nucléiques ou antimétaboliques.....	61
1.2.8.3 Les associations d'antipaludiques.....	62
1.2.9 La chimiorésistance du <i>Plasmodium</i>	62
1.2.9.1 Les origines de la résistance.....	63
1.2.9.2 L'étude de la chimiorésistance.....	63
1.2.9.3 Les gènes de résistances.....	64
1.2.9.4 Les mécanismes de la résistance.....	64
1.2.9.4.1 La résistance aux anti-métabolites.....	65
1.2.9.4.2 La résistance aux lysosomotropes.....	65
1.2.9.4.3 Résistance du <i>Plasmodium falciparum</i>	

aux antipaludiques au Bénin.....	65
1.2.10 Lutte et mesures préventives contre le paludisme.....	65
1.2.10.1 Les organismes de lutte contre le paludisme.....	66
1.2.10.2 Lutte contre les vecteurs.....	66
1.2.10.3 Le vaccin contre le paludisme.....	67
1.2.10.4 Un premier vaccin contre le paludisme ?.....	67
1.3 Paludisme transfusionnel.....	68
1.3.1 Problématique du paludisme transfusionnel.....	70
PARTIE II : Matériel et Méthodes.....	71
2.1 Cadre de travail.....	72
2.2 Matériel.....	72
2.2.1 Matériel de laboratoire.....	72
2.2.1.1 Réactifs.....	72
2.2.2 Matériel biologique.....	73
2.2.2.1 Culture des parasites.....	73
2.2.2.2 Préparation d'antigène total natif de <i>Plasmodium</i> <i>Falciparum</i>	73
2.2.2.3 Préparation de pLDH recombinant (rpLDH).....	74
2.2.2.4 Production des protéines recombinantes (Marqueurs moléculaires de <i>Plasmodium</i>)	74
2.2.3 Matériel humain.....	75
2.2.3.1 Sélection des donneurs au Bénin.....	75
2.2.3.2 Sélection des échantillons pour le calcul de la sensibilité de l'ELISA- pLDH.....	76
2.2.3.3 Sélection des échantillons pour le calcul de la spécificité de l'ELISA-pLDH.....	76
2.3 Méthodes.....	76

2.3.1 Examen microscopique : goutte épaisse/ frottis.....	76
2.3.2 Examen sérologique : Elisa-Malaria Anti body Test.....	77
2.3.3 Dépistage de l'antigène pLDH par	
« apDia n.v. » Elisa-Malaria Antigène Test.....	78
2.3.4 Evaluation des protéines recombinantes par ELISA.....	80
2.3.5 Recherche de mutations génétiques chez les souches de	81
<i>Plasmodium</i> isolées	
2.3.6 Analyse statistique des données	81
PARTIE III : Résultats et Discussion.....	82
3.1 Résultats.....	83
3.1.1 Données sociodémographiques.....	83
3.1.1.1 Répartition des donneurs enquêtés par saison.....	83
3.1.1.2 Répartition des donneurs selon l'âge et le sexe	83
3.1.1.3 Les antécédents de paludisme rapportés par les donneurs.....	85
3.1.1.4 Mesures de préventions utilisées par les donneurs.....	85
3.1.2 Prévalence du paludisme asymptomatique selon les résultats de la goutte	
épaisse (GE) et de l'étalement mince.....	85
3.1.2.1 Variation de la transmission des espèces plasmodiales selon les	
saisons.....	88
3.1.3 Prévalence des anticorps et de l'antigène pLDH du <i>Plasmodium</i>	89
3.1.4 Performance diagnostique comparée des trois techniques : microscopie,	
ELISA-pLDH et ELISA-anticorps.....	92
3.1.5 Calcul de la Sensibilité (Se) et de la Spécificité (Sp) de l'ELISA-pLDH...	93

3.1.5.1	Délectabilité de l'ELISA-pLDH	94
3.1.6	Evaluation des protéines recombinantes.....	97
3.1.7	Prévalence des mutations associées à la résistance de <i>Plasmodium falciparum</i> à la chloroquine et à la sulfadoxine-pyriméthamine.....	99
	DISCUSSION	101
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	104
	CONCLUSION	105
	PERSPECTIVES	106
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	109
	ANNEXE 1	124
	ANNEXE 2	125
	ANNEXE 3	126
	ANNEXE 4	131

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

PAGES

Tableau I : Répartition géographique des espèces plasmodiales humaines 32

Tableau II : Critères de diagnostic du paludisme grave ou compliqué..... 57

Tableau III : Répartition des donneurs selon le sexe et l'âge..... 84

Tableau IV : Répartition des donneurs parasités en fonction du sexe..... 84

Tableau V : Récapitulatif des résultats GE/frottis sanguin..... 86

Tableau VI : Variation de la parasitémie chez les 295 donneurs
positifs en Goutte épaisse..... 87

Tableau VII : Espèces plasmodiales identifiées..... 88

Tableau VIII : Taux de positivité par saison de l'ELISA pLDH et
ELISA Anticorps dans la détection de *Plasmodium*
chez les donneurs de sang..... 90

Tableau IX : Etude comparative des résultats de l'ELISA pLDH et
l'ELISA anticorps dans le dépistage du paludisme
asymptomatique chez les donneurs de sang Béninois..... 90

Tableau Xa : Résultats comparatifs de la goutte épaisse et de l'ELISA
pLDH dans le diagnostic du paludisme asymptomatique
chez les donneurs de sang au sud du Bénin..... 91

Tableau Xb : Résultats comparatifs de la goutte épaisse et de l'ELISA- Anticorps dans le
diagnostic du paludisme asymptomatique chez les donneurs de sang au sud du Bénin. 92

Tableau XI : Résultats comparés d'ELISA-pLDH(Ag) et ELISA-Anticorps (Ac) dans une
population de 266 paludéens confirmés par la microscopie..... 95

Tableau XII : Détectabilité de ELISA-pLDH évaluée avec rplDH et des globules rouges
infectés par *P.falciparum* (*Pf* iRBCs)..... 97

Tableau XIII : Résultats comparés de l'ELISA-Ac (Ag natif de *P.falciparum*) et ELISA à base
des marqueurs recombinants (rec. *Pf+Pm+Po*) chez les donneurs de sang béninois (n = 1358) 90

Tableau IX : Etude comparative des résultats de l'ELISA pLDH et l'ELISA anticorps dans le
dépistage du paludisme asymptomatique chez les donneurs de
sang.....90

Tableau XIV : Répartitions de la prévalence des trois espèces et associations d'espèces
plasmodiales chez les donneurs de sang béninois, selon le marqueur moléculaire et la
technique utilisée (n = 290 positifs divisés en 274 *P. f.*, 1 *P. f* + *P. o* et 15 *P. f* + *P.m*) et des
donneurs négatifs (n = 1068) identifiés par microscopie. 98

Tableau XV : Prévalence des mutations associées à la résistance de *Plasmodium falciparum* à
la chloroquine, pyriméthamine et sulfadoxine..... 100

Figure 1 : Carte de la population mondiale exposée au paludisme à Plasmodium falciparum aux vues de l'incidence mesurée en 2007.....	26
Figure 2 : L'arbre de vie et origine des Apicomplexes selon Cavalier-Smith.....	34
Figure 3 : Arbre représentant l'organisation des eucaryotes en six règnes.....	35
Figure 4 : Stades érythrocytaires du parasite Plasmodium falciparum sur Frottis sanguin coloré au MGG.....	37
Figure 5 : Cycle de Plasmodium falciparum.....	38
Figure 6 : Représentation schématique d'un parasite Apicomplexe.....	40
Figure 7 : Origines du plaste des Apicomplexes.....	41
Figure 8 : Développement de Plasmodium au cours du cycle érythrocytaire.....	42
Figure 9 : Trafic des protéines entre les différents compartiments cellulaires de Plasmodium falciparum et l'érythrocyte infecté.....	43
Figure 10 : Représentation schématique d'un mérozoïte de Plasmodium falciparum.....	46
Figure 11 : Moustique femelle du genre anophèles se gorgeant.....	48
Figure 12 : Taux de prévalence de poches de sang infectées observé dans certains pays en Afrique.....	69
Figure 13 : Principe ELISA-Malaria Antigène Test.....	79
Figure 14a : Distribution des donneurs et prévalence du paludisme asymptomatique par saison selon la microscopie au sud du Bénin.....	83
Figure 14b : Prévalence du paludisme asymptomatique selon la microscopie pendant la saison pluvieuse et la saison sèche chez les donneurs de sang au sud du Bénin.....	89
Figure 15 : Prévalence comparée du paludisme asymptomatique chez les donneurs de sang béninois (n= 2515) selon les résultats de la microscopie, de ELISA-pLDH et ELISA-anticorps, durant les 4 saisons de l'année de l'étude.....	
Figure 16 : Détectabilité de pLDH de P.falciparum et de pLDH Recombinant.....	96

Figure 17: Taux de séroprévalence du paludisme à base de marqueurs recombinants et de l'antigène native chez les donneurs de sang au Sud du Bénin..... 99

Figure 18 : Evolution saisonnière de la séroprévalence de *Plasmodium* à base d'ELISA antigène natif et d'ELISA Rec (rPfMSP1+ rPfAMA1, rPoMSP1 et rPmMSP1 chez 1235 donneurs de sang au Sud du Bénin. LRS (Long Rainy season), SDS (short dry season), SRS (Short Rainy season), LDS (Long dry Season)..... 99

LISTE DES ABREVIATIONS ET ANNEXES

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

Ac: Anticorps
Ag: Antigène
ADN: Acide Désoxyribonucléique
AMA-1: Apical Membrane Antigene 1
AABB: American Association of Blood Banks
ARN: Acide Ribonucléique
APAD: acétyl-pyridine-adénine-dinucléotide
BSA: Bovine Serum Albumin
CDTS : Centre Départemental de Transfusion sanguine
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CS : Circum Sporozoïte
CSP1 : CircumSporozoïte
DO : Densité Optique
DP : Densité parasitaire
EDTA: Ethylène Diamine Tétra Acétique
EDQM: European Directorate for the Quality of Medicines
ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GE: Goutte Epaisse
GPI: GlycosylPhosphatidylInositol
GSP : Grande Saison des Pluies
GSS : grande saison sèche
HRP: Horseradish peroxidase
HRP-2: Histidine Rich Protein 2
IFI : Immuno Fluorescence Indirecte
IgA : Immunoglobuline A
IgE : Immunoglobuline E
IgG : Immunoglobuline G
IgM : Immunoglobuline M
INSAE : Institut National de Statistique et de l'Analyse Economique
IPTG : Isopropyl-B-D-galactosidase
iRBCs: infected Red Blood Cell
MABs: monoclonal Antibodies
MVI: *Malaria Vaccine Initiative*

MBP: Maltose Binding Protein
MCR: *Medical Research Council*
MGG: May Grünwald-Giemsa
Min: Minute
MSP-1 : Merozoite Surface Protein 1
MS : Ministère de la Santé
CQ : Chloroquine
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ON : Over Night
PSP : petite saison des pluies
PSS : petite saison sèche
PBS: Phosphate Buffer Salin
PBST: Phosphate Buffer Saline-Tween
PCR : Polymerase Chain Reaction
Pfcr1 : *P. falciparum* chloroquine resistance transporter
Pfdhfr : *P. falciparum* dihydrofolate reductase
Pfdhps : *P. falciparum* dihydropteroate synthase
Pgh1 : P-glycoprotein homologue
Pfmdr1 : *P. falciparum* multidrug-résistance 1
Pf : *Plasmodium falciparum*
pH : Potentiel Hydrogène
pLDH : parasite Lactate Dehydrogenase
PNLP : Programme National de Lutte contre le Paludisme
RPMI: Roswell Park Memorial Institut
SIDA : Syndrome d'Immunodéficience Acquise
TBE : Tris Borate EDTA
TDR : Test de Diagnostic Rapide
TMB : TétraMéthylBenzidine
TPT : Transmission du paludisme par la transfusion
µm : Micromètre
VHB : Virus de l'Hépatite B
VHC : Virus de l'Hépatite C
VIH : Virus de l'Immunodéficience humaine
WHO: World Health Organization

LISTE DES ANNEXES

- ANNEXE 1: Is a *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH) enzyme-linked immunosorbent (ELISA)-based assay a valid tool for detecting risky malaria blood donations in Africa?
- ANNEXE 2: The ears of the African elephant: unexpected high seroprevalence of *Plasmodium ovale* and *P. malariae* in Benin.
- ANNEXE 3: FICHE D'ENQUETE
- ANNEXE 4: Participation au Congrès
- Congrès SFP-SFMM-GPLF, Faculté de Médecine de Strasbourg-du 18 au 20 mai 2011.
 - 4^e Journées Scientifiques et Technologiques du 08 au 13 Décembre 2008 (Campus Universitaire d'Abomey-Calavi).

RESUME

Le paludisme ou *malaria* est une maladie parasitaire due à un protozoaire. Il est transmis principalement à l'homme par la piqûre de la femelle d'un moustique du groupe des anophèles. La transfusion sanguine représente la 3^e voie potentielle de transmission de *Plasmodium*. L'incidence du paludisme a entraîné une augmentation de la proportion des donneurs de sang ayant été en contact avec le parasite. Le premier objectif de ce travail de thèse est d'analyser l'immuno-réactivité de marqueurs biologiques de dépistage de *Plasmodium* dans les poches de sang pour prévenir le paludisme transfusionnel et plus spécifiquement, il s'agit de déterminer par goutte épaisse (GE) et Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), la prévalence du paludisme asymptomatique chez les donneurs de sang au Sud du Bénin. Le second objectif est de répertorier les marqueurs moléculaires les plus adéquats pour la recherche d'antigène et d'anticorps de *Plasmodium*, utilisables en dépistage de masse dans les centres de transfusion sanguine. Deux mille cinq cent quinze (2515) donneurs ont été inclus dans cette étude durant une période de 10 mois répartie en quatre saisons. La prévalence observée par la GE toutes saisons confondues, est de 11,72 %. Trois espèces de *Plasmodium* ont été identifiées : *Plasmodium falciparum* 95,0 % ; *Plasmodium malariae* 5,0 % et *Plasmodium ovale* 0,34 %. Le marqueur moléculaire pLDH est retrouvé chez 965 donneurs avec la technique de « apDia Antigen ELISA » représentant une prévalence de 38,40%. Il y a une différence significative dans la distribution des taux d'antigène pLDH entre les saisons chez les donneurs au sud du Bénin ($P < 0,05$). Le taux d'anticorps anti- *Plasmodium* évalué par ELISA-Anticorps est de 74 % avec une variation significative selon les saisons ($P < 0,05$). Le sérodiagnostic du paludisme par ELISA-pLDH, ELISA-antigène total et ELISA à base des marqueurs recombinants (Rec. PfMSP1+ PfAMA1), a révélé un pic d'anticorps anti- pLDH pendant la petite saison des pluies, traduisant ainsi une saison de forte transmission du paludisme. Les taux d'anticorps contre les espèces *P. ovale* et *P. malariae* ont atteint leur maximum durant la grande saison sèche. Nous avons remarqué que la détection de l'antigène pLDH de *Plasmodium* par ELISA pourrait être un outil intéressant pour la qualification des poches de sang en zone d'endémie palustre. L'immuno-réactivité des marqueurs Rec. PfMSP1+ PfAMA1 est intéressante pour la recherche des anticorps anti-*Plasmodium* et le suivi épidémiologique du paludisme.

Mots clés : Paludisme; Transfusion; *Plasmodium falciparum*; Marqueurs moléculaires; Anticorps.

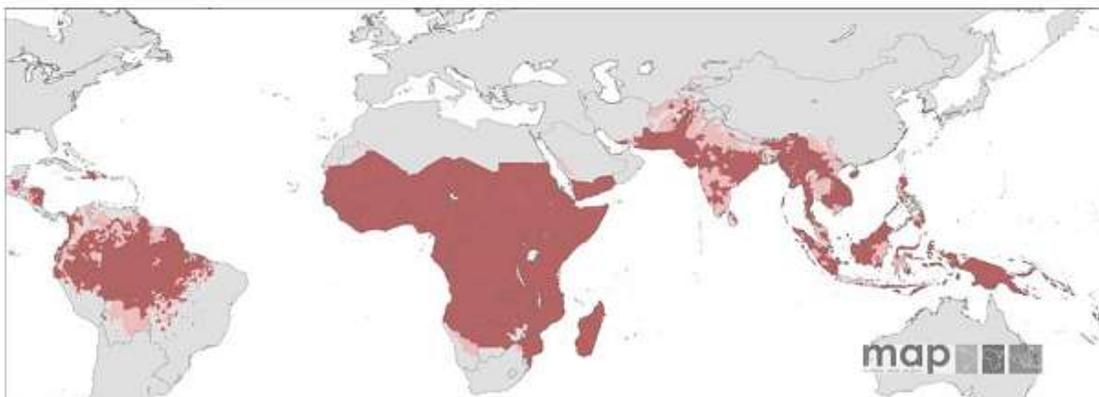
ABSTRACT

Malaria is a disease due a protozoan. It is transmitted to humans by the bite of a mosquito form Anopheles group. Blood transfusion is the third potential way of malaria transmission. Incidence of Malaria has increased the proportion of blood donors suspected to be contaminated by Plasmodium sp.. The goal of that study is to determine the immunoreactivity of some biomarkers that could be used for the prevention of the blood transfusion transmitted malaria. For that purpose we used thick and thin blood film microscopical determination and an Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay technology detecting malaria antigen (pan-pLDH) and malaria antibodies. These methods were used for the screening of 2515 blood donors during ten following months in southern-Benin, sample were separated in the 4 following seasons observed in Western Africa. The overall prevalence of Plasmodium estimated by microscopy was 11.72%. Three species were identified: 95% of *P. falciparum*; 5% *P. malariae* and 0.34% of *P. ovale*. At contrary, pan-pLDH was found in 38.4% of donors. A significant difference ($p<0.05$) was observed in prevalence considering the seasons. Detection of Plasmodium - antibodies directed to recombinant –PfMSP1, PfAMA1, PoMSP1, PmMSP1) or crude *P. falciparum* antigens revealed a prevalence of 74% varying also significantly among the four seasons ($p<0.05$). The peaks of antibodies for all species as well as of pLDH were observed during long dry season. These observation lead to a discussion on the opportunity to use pan-pLDH detection by ELISA for the screening of blood transfusion in endemic countries and the use of Plasmodium recombinant antigen based ELISA for the blood transfusion screening in an endemic countries and for epidemiological survey.

Keywords: Malaria, Transfusion, *Plasmodium falciparum*, molecular markers, antibodies

INTRODUCTION

Le paludisme est une maladie parasitaire due à un protozoaire transmis principalement à l'homme par la piqûre de la femelle d'un moustique du groupe des anophèles vecteurs. Le parasite appelé *Plasmodium*, fut découvert en 1880 par Laveran, médecin militaire français. Le *Plasmodium* infecte les cellules hépatiques de sujet infecté puis circule dans le sang en colonisant les globules rouges et en les détruisant. Le paludisme est responsable d'au moins 300 millions d'infection par an, soit 10 cas de paludisme par seconde [1]. En 2010, 219 millions de cas de paludisme ont été recensés avec 660 000 décès chez les enfants de moins de 5 ans [1]. Le paludisme touche essentiellement les pays de la zone intertropicale dont l'Afrique, l'Asie du sud- Est et l'Amérique du sud. Sur la figure 1, les zones géographiques stables c'est à dire celles où l'incidence parasitaire annuelle est supérieure à 0,1 sont représentées en rose tandis les zones non stables, où l'incidence parasitaire annuelle est inférieure à 0,1 sont représentées en rouge (Figure 1) [2]. L'estimation annuelle est de 2,7 millions le nombre de morts attribués au *Plasmodium falciparum* dont 80 à 90% en Afrique sub-saharienne. Les enfants et les femmes enceintes sont les plus vulnérables ; 10 à 20% des enfants qui survivent à un accès de paludisme grave, présentent des séquelles neurologiques graves et handicapantes [3]. Malgré l'amélioration des techniques de diagnostic, de la chimiothérapie et la lutte contre les anophèles, le paludisme humain se maintient encore dans de vastes régions du globe. Il pose toujours en médecine d'importants problèmes en santé publique, et chaque fois qu'il est possible, l'intensification de la recherche aidera à résoudre [4].



OMS, 2007 [3].

Figure 1 : Carte de la population mondiale exposée au paludisme à *Plasmodium falciparum* aux vues de l'incidence annuelle mesurée en 2007.

 : Incidence > 0,1%  : Incidence < 0,1%

Actuellement, près de 2 milliards de personnes (soit 40%) de la population mondiale vivent dans les zones impaludées situées essentiellement dans la ceinture tropicale et subtropicale du globe [3]. Ces régions endémiques concernent plus de 100 pays qui sont socio-économiquement les plus pauvres du monde. En Afrique, on estime actuellement à 200 millions le nombre de malades et à 1 million le nombre d'enfants en bas âge qui en meurent chaque année. En 2008, l'OMS a évalué l'incidence du paludisme entre 300 à 500 millions de cas par an, responsable d'une mortalité de 1,5 à 2,7 millions, dont plus de 90% surviennent en Afrique sub-saharienne [5]. Ce taux de mortalité serait de 1,2 millions d'après toujours l'OMS en 2012. Il existe actuellement une aggravation des facteurs de risque lié à cette infection : le changement climatique mondial associé à la dégradation des services sanitaires, aux conflits armés, aux déplacements massifs des populations et à l'apparition des souches plasmodiales multi résistantes aux antipaludiques [6,7]. L'espoir n'est pas perdu car dans un rapport en 2013, l'OMS a noté des avancées majeures en matière de lutte contre le paludisme, ce qui a conduit à 3,3 millions de vies sauvées selon les estimations. Au sud du Bénin, le paludisme représente 37 % des causes de recours aux soins chez les adultes, 41 % chez les enfants de moins de 5 ans dans les formations sanitaires. Le paludisme se situe au premier rang des affections dont souffrent les communautés [8]. Le mode de contamination le plus fréquent est l'impaludation par piqûre d'un moustique anophèle femelle. Les deux vecteurs les plus incriminés sont *Anopheles gambiae* et *Anopheles melas* mais au Bénin c'est l'*Anopheles funestus* qui est le plus impliqué. [9,10].

Le placenta étant un lieu d'accumulation des parasites, la contamination transplacentaire est fréquente chez la femme enceinte. La transfusion sanguine représente la 3^{em} voie potentielle de transmission de *Plasmodium*. Les couches les plus vulnérables sont les femmes enceintes et les enfants de moins de 5 ans. L'incidence annuelle du paludisme simple et du paludisme sévère est de 139 pour 1000 habitants en 2006. [11,12]. Le paludisme occupe donc la première place des maladies infectieuses sur le plan mondial. Son incidence a entraîné une augmentation de la proportion des donneurs de sang ayant été en contact avec le parasite. Les souches de *Plasmodium* qui circulent à bas brut chez les donneurs de sang, sont souvent multi résistantes (mutations génétiques) aux antipaludiques couramment utilisés et assurent ainsi la dissémination de la résistance. Il est donc nécessaire d'inclure dans les tests de sécurisation des poches de sang, le dépistage du *Plasmodium* [13]. Les mesures réglementaires actuelles concernant le paludisme (interrogatoire dans les zones d'endémie) et (recherche d'anticorps dans les zones non endémiques), ne permettent pas d'éliminer

totalemment le risque de paludisme transfusionnel. Toutefois, les travaux préliminaires indiquent que la détection concomitante d'anticorps et d'antigènes palustres par des techniques commercialisées, adaptées aux centres de transfusion sanguine selon leur localisation (zone endémique ou non endémique) pourrait améliorer la gestion du risque transfusionnel du paludisme [7]. De nos jours, cette sécurité transfusionnelle vis-à-vis du paludisme devient de plus en plus préoccupante dans les pays développés. Le dernier guide pour la préparation, l'utilisation et l'assurance de qualité des composés sanguins, édité par « l'European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care » du Conseil de l'Europe, a édicté des règles strictes de validation des produits sanguins obtenus de donneurs ayant voyagé ou vécu dans des zones d'endémie malarique [14]. Par contre, les pays dans lesquels le paludisme est endémique, on note un manque cruel de contrôle de sécurité requise aussi bien chez les donneurs que chez les receveurs dans le domaine du paludisme. La revue de médecine transfusionnelle « *Transfusion* » organe de « American Association of Blood Banks » (AABB) a remarqué qu'aucun des pays bénéficiaires du programme AABB n'a fait mention du risque du paludisme transfusionnel dans leurs rapports sur l'état des lieux de la transfusion sanguine dans leurs pays respectifs [15]. Les donneurs de sang sont très contrôlés pour le VIH, le VHC ou la syphilis, plus rarement pour le VHB et jamais pour le *Plasmodium*. La capacité de répondre à la demande des produits sanguins pour les indications majeures demeure la première préoccupation des responsables de centres de transfusion en Afrique intertropicale [16,17]. Si de grands efforts sont faits dans la sécurité anti-infectieuse des autres pathogènes, la recherche de stratégies propres est indispensable pour la sécurité transfusionnelle vis-à-vis du paludisme en zone d'endémie palustre [18,19]. Il n'existe au Bénin comme ailleurs en Afrique intertropicale, aucune politique de détection de *Plasmodium* dans les poches de sang, dans les centres de transfusion sanguine. Les résultats attendus des recherches faites dans le cadre de cette thèse sont définis par les objectifs ci-après :

Objectif général

Analyser l'immuno-réactivité de marqueurs moléculaires de dépistage de *Plasmodium* dans les poches de sang pour prévenir le paludisme transfusionnel.

Objectifs spécifiques

- Etablir la prévalence du paludisme asymptomatique chez les donneurs de sang au sud du Bénin.

- Comparer entre elles la transmission saisonnière du paludisme chez les donneurs de sang au sud du Bénin.
- Mesurer l'antigénicité de biomarqueurs de *Plasmodium* (*PfMSP1*, *PfAMA1*), *P. ovale* (*PoMSP1*) ; *P. malariae* (*PmMSP1*) en zone d'endémie palustre comme le Bénin.
- Rechercher les mutations génétiques impliquées dans la résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques chez les donneurs de sang béninois.

Le développement de la thèse s'articule autour de trois points : la première partie est consacrée à la synthèse bibliographique; la deuxième partie a porté sur le matériel et les méthodes utilisés pour l'établissement de la prévalence du paludisme asymptomatique chez les donneurs de sang et enfin, la troisième partie est consacrée aux résultats et discussions suivit de conclusion et des perspectives qu'offrent ces résultats dans le domaine de la sécurité transfusionnelle vis-à-vis du paludisme

PARTIE I
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Plasmodium, agent pathogène du paludisme

Le *Plasmodium* est un parasite protiste du phylum des Apicomplexes. Cinq espèces sont naturellement infectieuses pour l'homme (Tableau I).

- *Plasmodium falciparum*

Plasmodium falciparum est l'espèce la plus dangereuse, responsable d'une fièvre tierce maligne. Dans les régions équatoriales, il est transmis toute l'année avec des recrudescences en saisons pluvieuses. Dans les régions subtropicales, il ne survient qu'en période chaude et humide (Afrique sub-saharienne, Asie, Océanie, Amérique Centrale et Sud) [2]. Sa période d'incubation est de 7 à 15 jours.

- *Plasmodium malariae*

Il sévit en Afrique, de manière beaucoup plus sporadique. Il se différencie des autres espèces par une incubation plus longue (15 à 21 jours), par une périodicité différente de la fièvre (cycle érythrocytaire de 72 heures responsable d'une fièvre quarte) et surtout par sa capacité à entraîner des reviviscences très tardives (jusqu'à 20 ans après le retour de la zone d'endémie). L'infection est bénigne mais *P. malariae* peut parfois entraîner des complications rénales.

- *Plasmodium vivax*

Très largement répandu en Amérique du Sud et en Asie, il est beaucoup plus rarement observé en Afrique. Sa période d'incubation est de 11 à 13 jours, mais on peut observer des rechutes (accès de reviviscence) 3 à 4 ans après la contamination. L'infection par *P. vivax* est classiquement considérée comme bénigne (fièvre tierce bénigne, c'est-à-dire due à un cycle érythrocytaire de 48 heures) mais en zone d'endémie il peut avoir des répercussions graves sur l'état de santé des populations, notamment par l'intermédiaire des anémies chez l'enfant.

- *Plasmodium ovale*

Il sévit en Afrique intertropicale du Centre de l'Ouest et dans certaines régions du Pacifique. Il provoque une fièvre tierce bénigne, comme *P. vivax* dont il est très proche. Son incubation est de 15 jours au minimum mais peut-être beaucoup plus longue et aller jusqu'à 4 ans. Son évolution est

bénigne mais on peut observer, comme avec *P. vivax*, des rechutes tardives (5 ans). Schématiquement on dit que *P. ovale* remplace *P. vivax* là où cette dernière espèce n'existe pas [20].

- *Plasmodium knowlesi*

Habituellement inféodé aux singes (macaque) de l'Asie du Sud-est *Plasmodium knowlesi* est une souche proche de *Plasmodium malariae*. Au microscope, *P. knowlesi* ressemble au conventionnel *P. malariae*, mais le confondre pourrait être gravissime. Des infestations humaines ont été rapportées en Asie du Sud-est. Ces cas d'infections humaines ont été attribués par erreur à *Plasmodium malariae*. L'évolution des infestations à *Plasmodium knowlesi* sont graves et doivent être traitées comme des cas de paludisme à *Plasmodium falciparum*. Actuellement, plusieurs centaines de cas ont été rapportés chez l'homme dont entre autre 5 cas au Philippines, dont 4 mortels [21,22].

Tableau I : Répartition géographique des espèces plasmodiales humaines

ESPECES PLASMODIALES	ZONES CONCERNEES
<i>Plasmodium falciparum</i>	Afrique Sub-saharienne Asie- Océanie Amérique centrale et du Sud
<i>Plasmodium malariae</i>	Afrique
<i>Plasmodium vivax</i>	Afrique Asie Amérique Centrale et du Sud Amérique Centrale et du Sud
<i>Plasmodium ovale</i>	Océanie-Amazonie Afrique Asie Afrique
<i>Plasmodium knowlesi</i>	Asie du Sud-est

Singh et coll., 2004 [21].

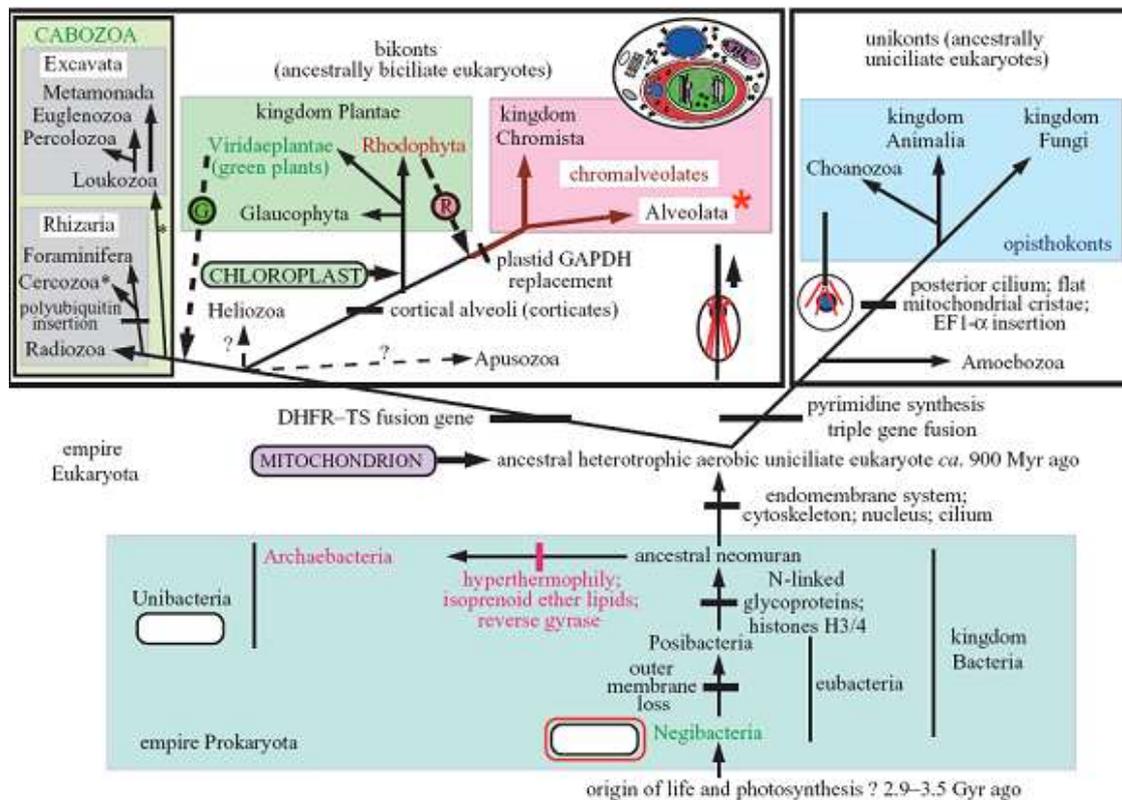
1.1.1 Systématique du *Plasmodium* et des Apicomplexes

Le phylum des Apicomplexes appartient à l'embranchement du règne des protistes. Ce sont des protozoaires unicellulaires pathogènes pour plusieurs animaux et l'homme. Ils sont caractérisés par une sporogonie dans leur cycle cellulaire et possèdent un complexe apical. Le complexe apical regroupe des organites spécialisés qui sont : les rhoptries, les granules denses et les micronèmes qui participent aux mécanismes d'invasion des cellules hôtes. Le phylum des Apicomplexes regroupe outre les espèces plasmodiales des humains, d'autres espèces de *Plasmodium* parasites de plusieurs animaux. Il s'agit de *P.berghei* ; *P.knowlesi* ; *P. yoeli* ; *P.chaubodi* ; *P.lophurae* ; *P.gallinaceum* ; *P.cynomolgi* ; *P.innu* etc. Il existe d'autres genres comme *Babesia* (agent de la babésiose ou piroplasmose) , *Theileria* (agent de la théleriase) , *Cryptosporidium* (agent de la cryptosporidiose) ; *Toxoplasma* (agent de la toxoplasmose) , *Neospora* (agent de la néosporose) ...etc. La classification fine de ces parasites fait l'objet de nombreuses révisions. La révision la plus récente de la classification des Apicomplexes au sein des Eucaryotes par la *Society of protozoologists* a tenu compte des avancées de la recherche fondamentale [23] sur les approches morphologiques, les voies de synthèses biochimiques, phylogénétiques et moléculaires. La dernière version de cette classification a retenu le terme « protistes » pour désigner les eucaryotes et les Apicomplexes dont le *Plasmodium*. Ils appartiennent, avec (les *Cillés* et les *Dinoflagellés*) au rang des *Alvéolés* qui eux-mêmes constituent avec les *Stramenopiles*, les *Haptophytes* et les *Cryptophycées* le super-groupe de *Chromalvéolés* [24].

1.1.2 Origine des Apicomplexes

Il existe aujourd'hui deux hypothèses : la première repose sur une classification du vivant en six règnes. [25], dont un règne procaryote qui regroupe Negibacteries (phyla des Posibacteries et les Archaeobactéries) et cinq règnes Eucaryotes (protozoaires, animaux, champignons, plantes et chromistes. Un scénario établissant des relations entre ces six règnes a été proposé.. Les protozoaires sont composés de quatre groupes qui sont : Alvéolés, Cabozoa, Amibes, choanoflagellés et du phylum des Apusozoa. Ces deux groupes relèvent à la fois d'Unicontes (issus d'une cellule Eucaryote ancestrale uniciliée) et de Bicontes (issus d'une cellule ancestrale biciliée (Figure 2). Dans cette représentation, la racine des Eucaryotes se situerait au niveau du lien ancestral entre Bicontes et Unicontes. Ce scénario repose sur des données moléculaires, ultrastructurales et paléontologiques. Il tient notamment compte des théories endosymbiotiques de l'origine de la

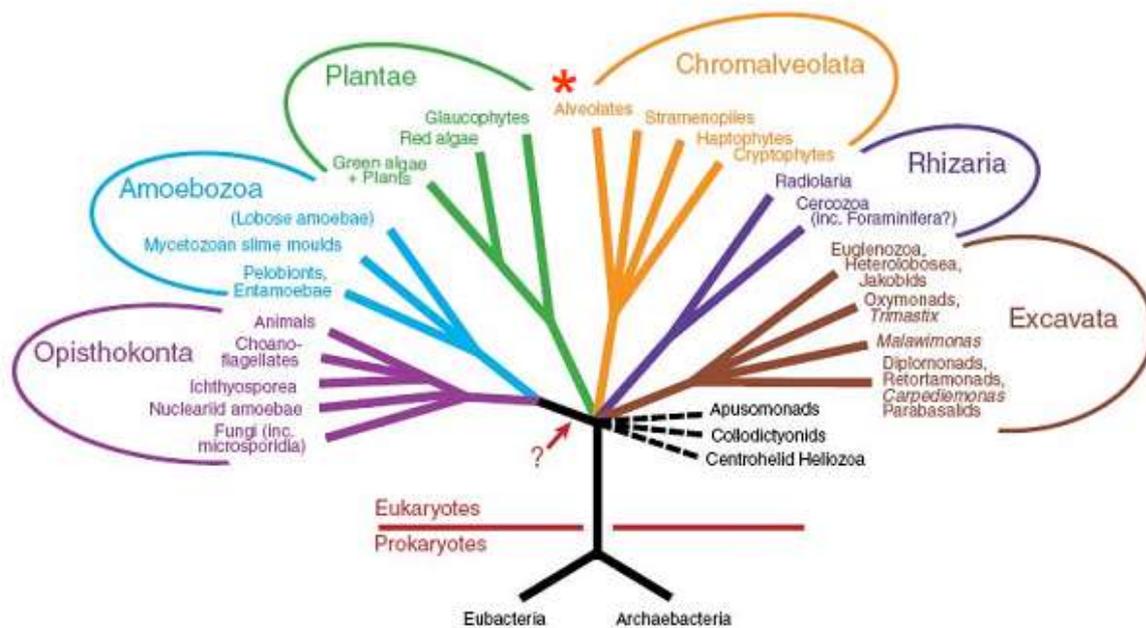
mitochondrie et du chloroplaste (acquis lors de l'ingestion de Negibacteries distinctes par un Eucaryote primitif) de l'origine des Chromalveolés par l'ingestion d'une algue rouge unicellulaire par un Eucaryote unicellulaire.



Cavalier-Smith et coll., 2004 [25]

Figure 2 : L'arbre de vie selon Cavalier-Smith [25]. Le signe (*) indique le groupe dans lequel les Apicomplexes sont classés (dans le groupe des Alvéolés).

La seconde hypothèse repose sur une division des eucaryotes en six groupes majeurs [26]: Opistocontes, Amibes, Plantes, Excavata (groupe auquel appartiennent notamment les Trypanosomatidés), Rhizaria (groupe auquel appartiennent les Foraminifères et les Chlorarachniophytes) et Chromalveolés (groupe dans lequel se situent les Apicomplexes (Figure 3). Dans cette représentation, les questions des relations exactes entre ces six groupes ainsi que la position de la racine des Eucaryotes ne sont pas résolues. Dans la nouvelle classification, *Plasmodium* peut être défini précisément comme un *Apicomplexa Aconoidasida* (conoïde absent du complexe apical au cours des stades asexués), *Hémosporidie* avec un ookinète mobile donnant des sporozoïtes produits par schizogonie [23].



Adl et coll., 2005 [23].

Figure 3 : Arbre représentant l'organisation des eucaryotes en six règnes. La flèche indique la position hypothétique de la racine [26]. Le signe (*) indique le groupe dans lequel les Apicomplexes sont classés (groupe des Alvéolés).

1.1.3 Cycle des Plasmodies parasites de l'homme

Les agents pathogènes du paludisme humain sont des parasites hétéroxènes à deux hôtes : l'homme et un moustique femelle hématozoaire du genre *Anopheles*. Le développement du parasite est en partie sexué (fécondation suivie d'une sporogonie) chez le moustique et asexué (schizogonie) chez l'homme.

1.1.3.1 Cycle chez l'homme

Au cours d'un repas sanguin de l'anophèle infectieuse et après régurgitation, plusieurs dizaines de sporozoïtes sont injectés dans l'organisme humain. Ces sporozoïtes atteignent rapidement le foie par la circulation sanguine ; ils y subissent une série de multiplications asexuées appelées schizogonie exoérythrocytaire. Au bout de 7 à 10 jours de divisions parasitaires et après éclatement

des hépatocytes infectées, des millions de mérozoïtes sont libérés dans la circulation sanguine où ils infectent des globules rouges ; c'est l'amorce de la schizogonie érythrocytaire qui de façon cyclique va se répéter un certain nombre de fois (les mérozoïtes issus de l'éclatement des schizontes, réinfectent de nouveaux globules rouges et le développement se poursuit).

Des formes dormantes de *Plasmodium vivax* et de *Plasmodium ovale* appelées hypnozoïtes peuvent cependant persister au sein des hépatocytes. Leurs réactivations provoquent des Rechutes qui peuvent avoir lieu plusieurs mois, voire plusieurs années après l'infection.

Le parasite prend trois formes distinctes successives au cours de son cycle de développement érythrocytaire qui dure 48 heures pour *Plasmodium falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax* et 72 heures pour *P. malariae*.

- le stade anneau, puis le trophozoïte caractérisé par un cytoplasme annulaire coloré en bleu et un noyau coloré en rouge par le May- Grunwald Giemsa ; pendant ce stade, le parasite synthétise ses macromolécules, dégrade l'hémoglobine et synthétise un pigment, l'hémozoïne.
- le stade schizonte plurinucléé, observé au microscope optique laisse apparaître la différenciation de futurs mérozoïtes (Figure 4).
- le stade gamétocyte qui apparaît après un certain nombre de cycles endoérythrocytaires ; certains parasites se différencient en gamétocytes mâles (macrogamétocytes) et femelles (microgamétocytes. Ces gamétocytes ne poursuivent leur développement en gamètes que s'ils sont ingérés par l'anophèle femelle.

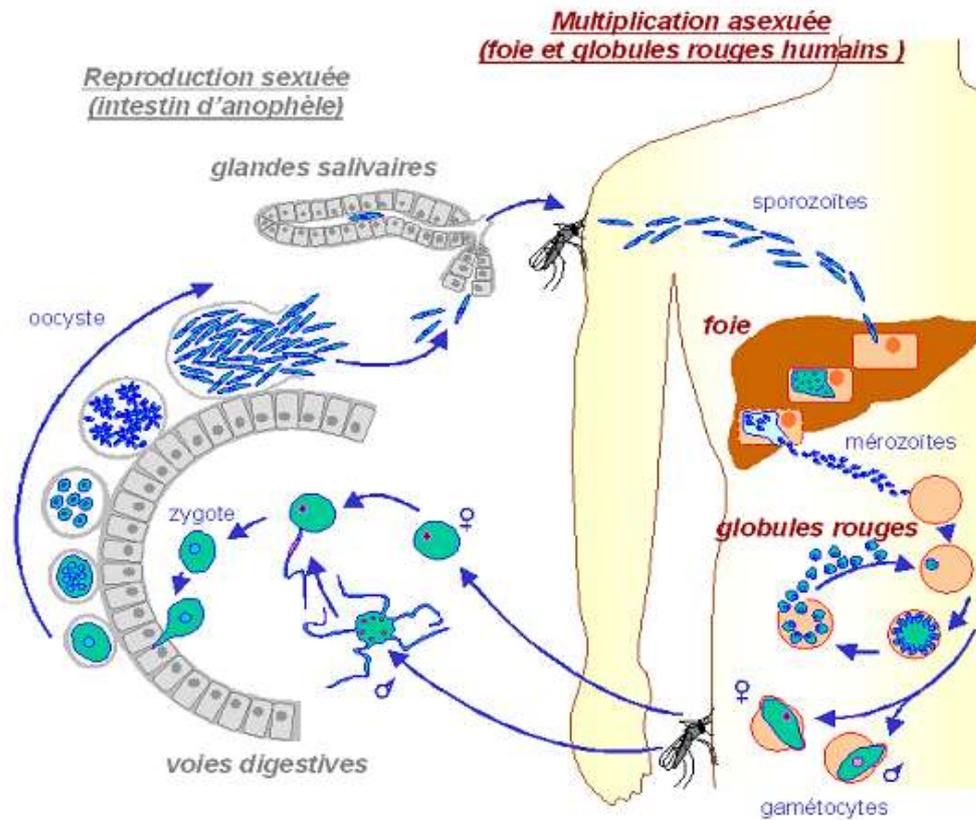
Au cours du cycle érythrocytaire du parasite, l'éclatement des schizontes libérant des mérozoïtes infectieux, provoque des accès plus ou moins réguliers de fièvres dont la durée dépend de l'espèce plasmodiale.



Figure 4 : Stades érythrocytaires du parasite *Plasmodium falciparum*. Frottis sanguin (étalement mince) effectué sur culture de lignée clonale 3D7 de *P. falciparum*, observé après fixation au méthanol puis coloration de Romanovsky-Giemsa.

1.1.3.2 Cycle chez l'anophèle vecteur

L'évolution en gamète s'effectue dans la lumière de l'estomac de l'anophèle sous l'action combinée d'une baisse de température, de l'augmentation du pH et de la présence de l'acide xanthurinique. Il se produit un processus de division et d'exflagellation qui aboutit à la libération de gamète mâles [27]. La fécondation conduit à un zygote mobile (ookinète), diploïde, qui va subir une méiose pour donner un oocyste implanté dans l'épithélium de la paroi stomacale de l'insecte. Cet oocyste produit alors des sporozoïtes par sporogonie successives. Ceux-ci migrent vers les glandes salivaires du moustique et sont aptes à infecter de nouveaux individus (Figure 5) lors d'un prochain repas sanguin [28]. La durée de cette maturation est étroitement liée à la température extérieure. Elle est de 24°C pour *P. falciparum*.



Billker et coll., 2000 [27].

Figure 5 : Cycle de *Plasmodium falciparum*. La transmission du parasite de l'anophèle à l'homme s'effectue au cours d'un repas sanguin.

1.1.4 Organisation moléculaire du parasite

1.1.4.1. Polymorphisme génétique du *Plasmodium*

Le matériel génétique du *Plasmodium falciparum* comporte trois types d'acides nucléiques : mitochondriales, nucléaires et plasmiques. Ils sont utilisés pour l'étude de la diversité génétique du parasite. Son caryotype possède 14 chromosomes de taille différente, allant de $25 \cdot 10^6$ à $30 \cdot 10^6$ paires de bases. Pour la différenciation des clones recrudescent des clones de nouvelles infections, on utilise généralement les protéines de surface des mérozoïtes (*msp1*, *msp2*). Les brassages inter et intra chromosomiques affectant certains gènes et les pressions immunitaires sont les principales sources de

l'émergence du polymorphisme au niveau des antigènes qui sont à l'origine des résistances. La protéine *Pfcr*, codée par un gène muté et impliquée dans la résistance à la chloroquine en est un exemple.

- Le gène de *P. falciparum* chloroquine resistance transporter (*Pfcr*) (chromosome 7) code une protéine de transport de la membrane de la vacuole digestive où s'accumule normalement la chloroquine. La mutation Lys76Thr du gène *Pfcr* (remplacement d'un acide aminé lysine par une thréonine au niveau du codon 76) est associée à la résistance à la chloroquine [29,30].

- Le gène de *P. falciparum* dihydrofolate réductase (*Pfdhfr*) est situé sur le chromosome 4 ; il code une enzyme, la dihydrofolate réductase de la voie des folates, indispensable pour la synthèse d'ADN. Elle est inhibée par les antifoliques comme la pyriméthamine et le cycloguanil dont elle est la cible moléculaire. La mutation Ser108Asn du gène de la DHFR est associée à la résistance de *P. falciparum* aux antifoliques comme sulphadoxine-pyriméthamine [30].

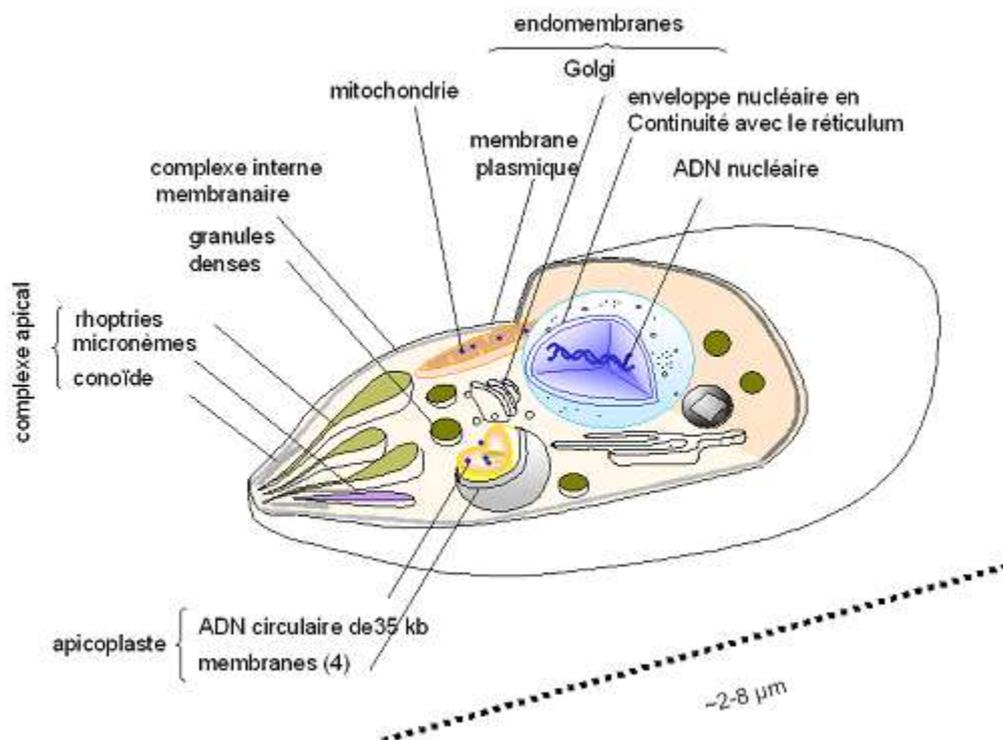
- Le gène de *P. falciparum* dihydroptéroate synthase gene (*Pfdhps*) code une enzyme de la voie des folates appelée dihydroptéroate synthase (DHPS). Elle est inhibée par les sulfones et les sulfamides comme la sulfadoxine et la dapsonne dont elle est la cible moléculaire. Les mutations Ser436Ala, Ser436Phe, Ala437Gly et Lys540Glu du gène *dhps* confèrent une résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine [30].

- Le gène *P. falciparum* multidrug-résistance 1 (*Pfmdr1*) situé sur le chromosome 5, code une protéine du nom de P-glycoprotéine homologue (Pgh1) de la superfamille des ABC transporteurs, homologue des pompes d'efflux de médicaments présentes dans les cellules résistantes aux anticancéreux [31]. Sa mutation Asn86Tyr a été associée à la résistance à l'amodiaquine et d'échec thérapeutique avec la combinaison amodiaquine + sulphadoxine-pyriméthamine [32].

1.1.4.2. L'apicoplaste

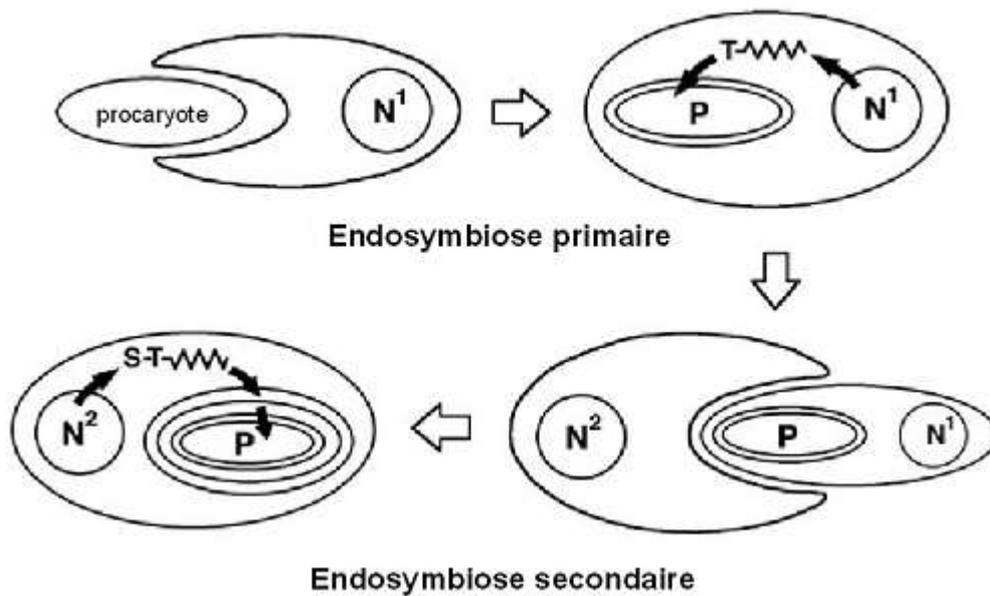
Dans la plus part de cas, les protozoaires parasites à mode de vie intracellulaire possèdent une structure plastidiale non photosynthétique (Figure 6) et contenant un ADN circulaire de 35 kb, isolé en 1991 [33-35]. L'organite qui le contient, baptisé apicoplaste, a été détecté par microscopie puis par hybridation in situ en 1996 [36] et se caractérise par 4 membranes limitantes. Sur le plan

phylogénétique, cette structure plastidiale a pour origine une endosymbiose secondaire (Figure 7) entre deux eucaryotes, avec ingestion d'une algue rouge unicellulaire ancestrale par un protozoaire ancêtre de l'ensemble des Apicomplexes. Le plaste de l'algue rouge résulte lui-même d'une endosymbiose primaire par une cyanobactérie et un eucaryote primitif. L'endosymbiose secondaire a été suivie d'une disparition de la plupart des structures subcellulaires de l'algue et s'est accompagnée d'un transfert génétique vers le noyau de la cellule hôte. Le plaste est par conséquent la seule structure membranaire apparemment conservée: l'apicoplaste des Apicomplexes se trouve alors limité par trois à quatre membranes.



Bisanz et coll., 2006a [37]

Figure 6 : Représentation schématique d'un parasite Apicomplexe. Outre les éléments indispensables à toute cellule eucaryote, les caractéristiques communes aux formes invasives des Apicomplexes sont : la présence d'un complexe apical composé d'organites vésiculaires sécrétoires indispensables à l'invasion (rhoptries, micronèmes et granules denses). Le conoïde, structure présente dans le complexe apical de nombreux Apicomplexes, est absent chez les genres *Plasmodium*, *Babesia* et *Theileria*.

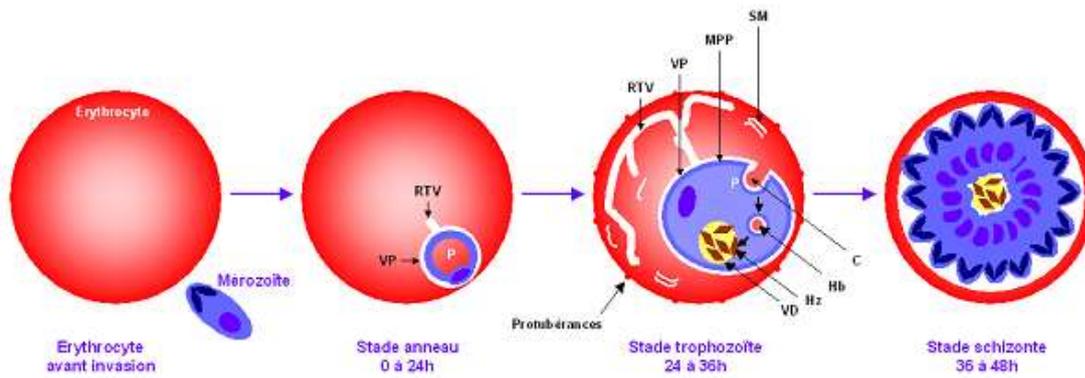


Waller et coll., 2005 [38].

Figure 7 : Origines du plaste des Apicomplexes. S, peptide signal ; T, peptide de transit ; P, plaste ; N1, noyau de l'algue rouge unicellulaire ; N2, noyau de l'Apicomplexe.

1.1.4.3 Relation parasite globule rouge

Le globule rouge est une cellule hôte au sein de laquelle se développe le *Plasmodium*. C'est une cellule à forte concentration en hémoglobine (30 pg/GR). Son cytosquelette est composé de spectrines et d'actines qui lui confèrent sa flexibilité à travers les capillaires [39]. Le globule rouge est dépourvu d'organites intracellulaires (noyau, mitochondrie, réticulum endoplasmique...etc.). Le globule rouge mûr ne possède pas de complexe majeur d'histocompatibilité (MCH), ce qui permet au *Plasmodium* une fois à l'intérieur, d'échapper au système immunitaire de l'homme parasite. Dès son entrée dans le globule rouge, *Plasmodium falciparum* met en place un système membranaire permettant son développement intraérythrocytaire du stade anneau au trophozoïtes puis schizonte. Lors de ce processus, il induit notamment la formation d'une vacuole parasitophore qui le sépare du cytoplasme de la cellule hôte et au sein de laquelle il se développe (Figure 8). Dès le stade anneau, un réseau tubulo-vésiculaire est formé. Par ailleurs, un intense trafic vésiculaire d'hémoglobine entre le compartiment cytoplasmique érythrocytaire et la vacuole digestive du parasite se met en place [40]. Au stade schizonte, les futurs mérozoïtes se développent et leur individualisation requiert la production d'une importante quantité de nouvelles membranes pour la reproduction de ses organites et la formation des nouveaux parasites [41].



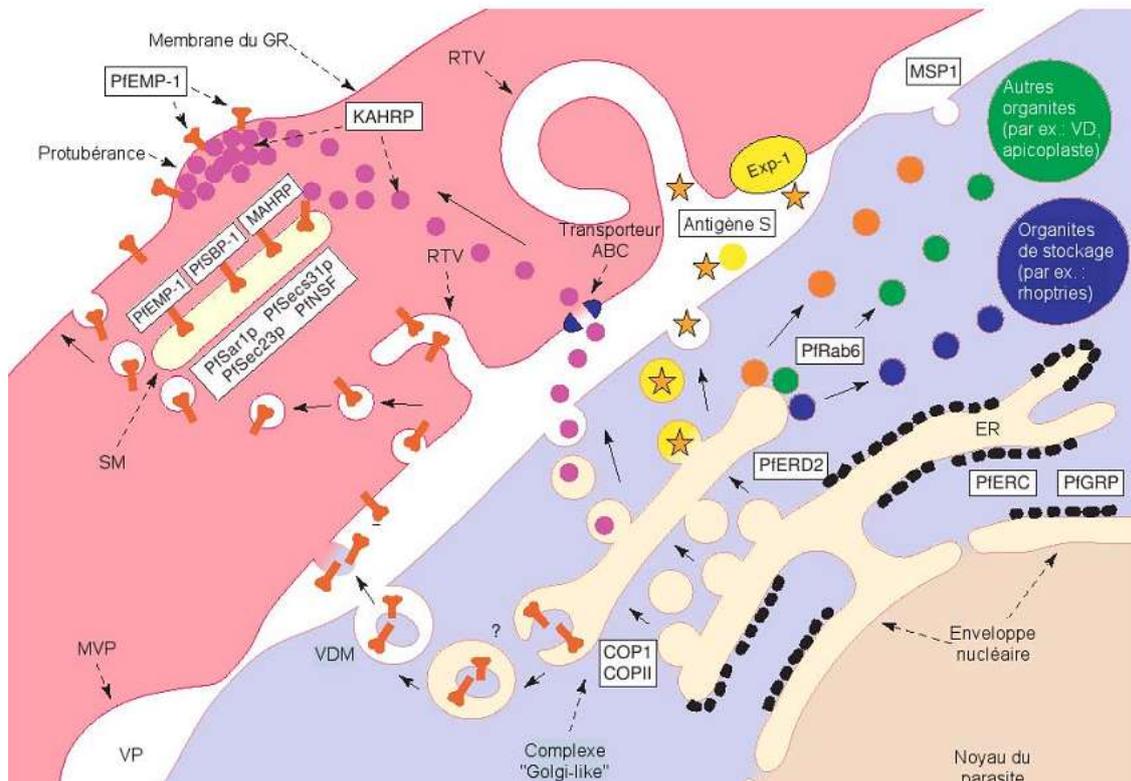
Haldar et coll., 2002 [41].

Figure 8 : Développement de *Plasmodium* au cours du cycle érythrocytaire.

P, parasite ; RTV, réseau tubulo-vésiculaire ; VP, vacuole parasitophore ; MPP, membrane plasmique parasitaire ; SM, Structures de Maurer; C, Cytostome ; Hb, hémoglobine ; Hz, hémozoïne, produit de la digestion de l'hémoglobine ; VD, vacuole digestive

1.1.4.4 Trafic des protéines entre le *Plasmodium* et l'érythrocyte infecté

Le trafic des protéines entre les différents compartiments cellulaires de *Plasmodium falciparum* et l'érythrocyte infecté est illustré par la figure N°9. Les protéines solubles parasitaires destinées à l'exportation sont dirigées vers le réticulum endoplasmique par la voie classique de reconnaissance d'une séquence signal N-terminale hydrophobe (appelée peptide signal) afin de permettre leur expression dans leur différents compartiments.



Cooke et coll., 2004 [42].

Figure 9 : Trafic des protéines entre les différents compartiments cellulaires de *Plasmodium falciparum* et l'érythrocyte infecté. ER, réticulum endoplasmique ; VDM, vésicules à double membrane ; MPP, membrane plasmique parasitaire ; VP, vacuole parasitophore ; MVP, membrane de la vacuole parasitophore ; VD, vacuole digestive ; RTV, réseau tubulo-vésiculaire ; SM, structure de Maurer Les protéines de *P. f.* déjà caractérisées sont encadrées.

1.1.4.5 Les antigènes plasmodiaux et leurs rôles

1.1.4.5.1 *Plasmodium falciparum* «Histidine Rich Protein 2» (PfHRP2)

La protéine 2 riche en histidine (PfHRP2) est une protéine soluble produite par les stades asexués et les jeunes gamétocytes de *P. falciparum*. Elle est riche en acides aminés histidine (H) et alanine (A) avec épitope (tandem repeat) A-H-H entrecoupés d'A-H-H-A-A-A. Cette protéine est produite spécifiquement chez le *Plasmodium falciparum*, mais certaines souches ont une délétion du gène. Il existe de nombreux polymorphismes (PfHRPI, PfHRPII, PfHRPIII) dans l'ordre de leur

découverte, mais anti-génétiquement invariants [43-45]. PfHRPI est associée à l'expression des « knobs » à la surface des hématies infectées par des souches « knobs+ » : la protéine est retrouvée dans la membrane des globules rouges et dans le cytosquelette. Les knobs sont des protubérances de la membrane érythrocytaire et sont impliqués dans la physiopathologie de l'accès palustre grave. PfHRPII est exprimée par toutes les souches de *Plasmodium falciparum* « knob+ » et « knobs - ». PfHRPIII a été la dernière protéine découverte. Elles sont synthétisées et exprimée à la surface des globules rouges et sécrétée dans le plasma, pendant le cycle érythrocytaire lors de la rupture des schizontes. Sa demi-vie longue de près de 3 semaines après une crise de paludisme en fait un bon marqueur. La principale application de la PfHRP-II est son utilisation dans le diagnostic du paludisme avec des tests de diagnostic rapides (TDR) [46-48]. Cependant, le portage de cet antigène dans une population vivant en zone holo-endémique pour le paludisme risque de diminuer l'intérêt de l'usage de ce marqueur diagnostic.

1.1.4.5.2 Lactate Déshydrogénase plasmodiale

La pLDH (parasite Lactate Déshydrogénase) est une enzyme de la voie glycolytique produite par les différentes espèces de *Plasmodium* mais possédant des isomères spécifiques à chacune des espèces [49-50]. Elle est synthétisée par les stades érythrocytaires asexués et par les gamétocytes. La pLDH a la capacité d'utiliser le 3-acétyl-pyridine-adénine-dinucléotide (APAD) comme analogue du NAD dans la conversion du lactate en pyruvate [44,51]. La pLDH utilise l'APAD beaucoup plus rapidement (environ 200 fois) que les LHD humaines ; cette propriété est mise à profit dans le test Malstat® qui mesure l'activité enzymatique à partir d'un échantillon sanguin parasité [52]. L'antigène pLDH de *Plasmodium* est considéré comme un marqueur précis de la présence du parasite dans le sang et utilisé pour cela dans les TDR destinés aux pays endémiques. Récemment, l'ELISA pLDH est développée pour le screening de nouvelles molécules anti-*Plasmodium* in-vitro [52,53]. L'essai a été ensuite modifié pour la détection de l'antigénémie chez les patients atteints de paludisme et commercialisé [54]. Les données récentes acquises dans le laboratoire de l'IPPTS, indiquent que la sensibilité du test pLDH ELISA permet de détecter un parasite par μL de sang soit une détectabilité supérieure à celle de l'examen microscopique. Mais la demi-vie de la pLDH est courte et la présence de cet antigène est sensible à un traitement même inefficace anti-*Plasmodium*. Le risque de faux négatif est donc élevé. Toutefois, il existe des anticorps monoclonaux permettant de détecter la pLDH des quatre espèces plasmodiales humaines responsables du paludisme transfusionnel.

1.1.4.5.3 L'aldolase

L'aldolase est une enzyme de la voie glycolytique produites par les quatre espèces plasmodiales et retrouvée dans les membranes des stades schizontes [55,51]. Expérimentalement elle induit une immunité protectrice dans un modèle animal [55] et possède une demi-vie courte. Elle est spécifique des 4 espèces de plasmodium. L'aldolase est une cible détectée par certains tests de diagnostic rapides combinés à la recherche de l'antigène PfHRP2. Une étude réalisée sur différents isolats de *Plasmodium falciparum* et de *Plasmodium vivax* a montré que le gène de l'aldolase est hautement conservé au sein de ces deux espèces [56]. Comme pour la pLDH, cet antigène est employé dans le screening de nouvelles molécules anti-*Plasmodium* [50].

1.1.4.5.4 Merozoite Surface Proteine 1(MSP1)

Pf MSP1 (*Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Proteine 1) est la principale protéine exprimée à la surface des mérozoïtes et joue un rôle déterminant dans l'invasion des hématies [57]. Elle est synthétisée pendant la schizogonie sous forme d'un précurseur de 195 kDa et subit un processus de protéolyse conduisant à la libération de la partie C terminale de 42 kDa [58]. Cette partie C terminale de la protéine est la plus immunogène. Elle est présente chez toutes les espèces de *Plasmodium* et est ancrée à la surface du mérozoïte par une ancre moléculaire de type GlycosylPhosphatidylInositol (GPI).

1.1.4.5.5 Circum Sporozoïte (CSP1)

CSP1 est une protéine majeure de surface de la forme infectante du parasite (Sporozoïte). C'est une protéine qui favorise l'adhésion du parasite aux cellules cibles de la glande hépatique et de l'intestin du moustique. Les anticorps dirigés contre l'antigène CSP1 ne sont retrouvés que dans la phase primaire de l'infection.

1.1.4.5.6 Pf AMA1 (*Plasmodium falciparum* Apical membrane antigen1)

Pf AMA1 est une protéine présente dans toutes les espèces de *Plasmodium* et synthétisée lors de la phase asexuée [59]. Elle est constituée de trois domaines : cytoplasmique, transmembranaire et ectoplasmique. Le domaine ectoplasmique est le plus immunogène. La protéine est stockée dans les micronèmes du complexe apical du parasite à la surface du sporozoïte ou du mérozoïte (Figure 10). Elle intervient dans les étapes d'invasion du parasite dans les cellules hépatiques et érythrocytaires [60].

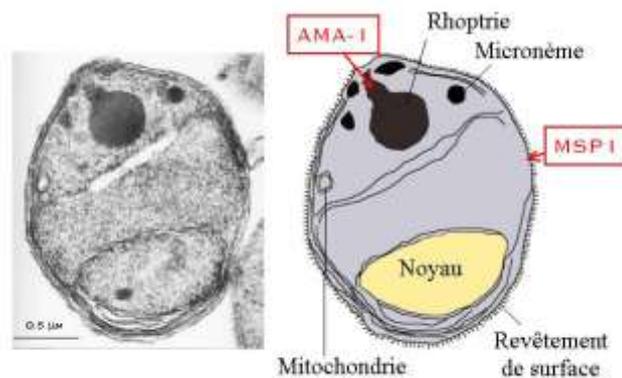


Figure 10 : Représentation schématique d'un mérozoïte de *Plasmodium falciparum*. La localisation de quelques antigènes de surface est indiquée en rouge. (Photo reproduite avec l'aimable autorisation du Dr. Peter David, Unité d'Immunologie Moléculaire des Parasites.

1.2 Le paludisme

1.2.1 Définition

Le paludisme encore appelé *malaria* en anglais vient du mot latin *palus, paludis* qui signifie «marais» et de l'italien *mala aria* ou «mauvais air». C'est une parasitose due à des hématozoaires du genre *Plasmodium*, transmise par des moustiques du genre *Anopheles*.

1.2.2 Historique

La présence d'ADN de *Plasmodium* a été détectée chez les momies égyptiennes, il y a 2500 ans avant notre ère. Les signes cliniques ont été décrits pour la première fois dans le papyrus d'Ebers, l'un des plus anciens traités égyptiens [61]. C'est au IV^e siècle avant notre ère, que le médecin helléniste Hippocrate décrit les signes du paludisme et en particulier la fièvre, dans le «Livre des épidémies» et «Consultation». Le médecin Charles Alphonse Laveran officier des armées, remarque en 1880, dans le sang des individus atteints de fièvre en Constantine en Algérie, des parasites qu'il nomme *Oscillaria malariae*. Il observe aussi que les parasites disparaissent à la suite d'une administration de quinine [62]. En 1885, deux chercheurs italiens Marchiafava et Celli, malgré leur première réticence, confirment finalement les travaux de Laveran. Ils observent un organisme amiboïde responsable des fièvres des marais qu'ils nomment *Plasmodium*, terme utilisé actuellement pour désigner le parasite. Les zoologistes italiens Grassi, Bastianelli, et Bignami découvrent ensuite le rôle exact du moustique femelle anophèle suite à l'infection d'individus volontaires sains avec des moustiques prélevés dans des zones impaludées. Ils décrivent le cycle complet de développement de *Plasmodium* chez l'anophèle en 1899. A la fin du XIX^e siècle un médecin britannique du nom de Sir Ronald Ross en poste en Inde, découvre le moustique Anophèle comme vecteur du parasite [63]. En 1897, celui-ci dissèque des moustiques nourris avec le sang infecté de patients atteints de paludisme. Il observa clairement différentes formes de développement du parasite chez le moustique : les oocystes sur la paroi de l'estomac, larguant les sporozoïtes, ainsi que la présence de sporozoïtes au niveau des glandes salivaires. Il reçut pour cette découverte le prix Nobel de la médecine en 1902. Louis C. Alphonse Laveran fut récompensé pour l'ensemble de ses travaux sur les protozoaires par le prix Nobel de la médecine en 1907.

1.2.3 Les vecteurs du paludisme

Une vingtaine d'espèces d'anophèles femelles sont capables de transmettre le paludisme. Les femelles anophèles se nourrissent du sang (Figure 11) pour la maturation de leurs œufs [12]. Elles prennent leur repas sanguin de préférence au crépuscule et continu dans la nuit où elles sont attirées par le CO₂, l'acide lactique et le sébum dégagés par les humains ou les animaux. Leur champ d'action varie de 20 m à 2 km [64]. Les anophèles se reproduisent dans l'eau et chaque espèce a ses préférences (eau douce de faible profondeur, flaque d'eau, eau d'empruntes laissées par le sabot des animaux). La transmission est intense dans les régions où les vecteurs ont une durée de vie relativement longue. Toutes les espèces d'anophèles ne sont pas vectrices du paludisme humain. Les plus importantes sont : *Anopheles gambiae* en Afrique, *Anopheles darlingi* en Amérique du Sud, *Anopheles stephensi* en Asie. Au Bénin l'espèce d'*Anopheles gambiae* est la plus incriminée et la plus résistante aux insecticides couramment utilisés dans l'agriculture [65]. La transmission du paludisme est plus intense dans les régions où la durée de vie des vecteurs est plus longues à cause du climat et de la température qui leurs sont favorables.



Mackinon et coll., 2004 [66]

Figure 11: Moustique femelle du genre anophèles se gorgeant de sang

1.2.4 Modes de contamination du paludisme

1.2.4.1 Contamination par le vecteur

La transmission vectorielle du parasite à l'homme s'effectue via la piqûre de l'anophèle infectieuse (porteuse de sporozoïtes au sein de ses glandes salivaires) au cours d'un repas sanguin. C'est le principal mode de contamination.

1.2.4.2 Contamination par la transfusion

Les quatre espèces de Plasmodium pathogènes pour l'homme (*P.falciparum* ; *P. malariae* ; *P. ovale* ; *P. vivax*), peuvent être transmises par la transfusion. La contamination peut se produire avec un très faible nombre de parasite [57,67]. Les parasites du *Plasmodium* peuvent être transmis par transfusion sanguine, par partage d'une seringue souillée. La transmission peut avoir lieu, non seulement à partir de la transfusion du culot globulaire mais également possible à partir des autres produits sanguins (plasma frais, concentré leucocytaire, plaquettes ...etc.). Par contre, le risque de transmission du paludisme ne concerne pas les produits dérivés du plasma qui subissent des transformations lors de leur conditionnement, rendant la survie d'éléments parasitaires quasiment impossible. La viabilité des parasites dans les poches de sang est directement dépendante de la viabilité des hématies. Les techniques actuelles employant des solutions de conservation de type SAG (Saline Adénine Glucose) et Mannitol permettent une conservation des poches de sang de 3 à 6 semaines et donc de parasites, puisque ces derniers peuvent survivre à une température de 4°C pendant plusieurs jours voire des semaines [46 ; 68]. Les premiers cas de paludisme transfusionnel remontent en 1919 au Canada [69]. En 1932, Stein décrit deux cas de paludisme transfusionnel chez des enfants à partir du sang d'un même donneur [70]. Ces cas surviennent parfois des années après la transfusion sanguine [71,72]. De nos jours, le manque de données dans la plupart des pays dans lesquels le paludisme est endémique est la source principale de la négligence du paludisme transfusionnel. La présence de *Plasmodium* n'est recherchée dans aucune poche de sang avant transfusion. La transfusion sanguine est une voie potentielle de transmission du Plasmodium, mais il n'existe encore aucun consensus sur les mesures à prendre pour prévenir le paludisme post-transfusionnel. En zone d'endémie [19]. Dans les pays non endémiques du paludisme, le mal existe à travers le brassage des populations de ces pays par les voyages dans les zones endémiques du paludisme.

1.2.4.3 Contamination par voie placentaire

Les parasites du paludisme peuvent aussi être transmis par voie placentaire, de la mère au fœtus (paludisme congénital). La femme enceinte est particulièrement vulnérable au paludisme [73]. En zone d'endémie, la prévalence du paludisme au cours de la grossesse varie de 5 à 40% selon les pays. La prévalence est plus élevée chez les primigestes que chez les multipares. Les anémies maternelles sont plus fréquentes et plus sévères

1.2.5 Manifestations physiologiques du paludisme

1.2.5.1 Accès palustre simple

C'est la forme la plus fréquente. La fièvre est toujours présente à plus de 40°C et souvent associée à divers symptômes : syndrome pseudo-grippal (asthénie, algies multiples, céphalées) et troubles digestifs (vomissements et parfois diarrhées). La primo-invasion apparaît chez des sujets non immunisés c'est-à-dire des enfants âgés de moins de 5 ans en zone d'endémie et des adultes non immunisés. L'accès palustre ou accès à fièvre périodique, est la forme classique chez les sujets adultes immuns. Cette forme peut évoluer avec des phases de rémission et recrudescence. Chez les sujets faiblement immunisés, il existe à tout moment un risque de passage à la forme grave ou compliquée.

1.2.5.2 Paludisme cérébral ou neuropaludisme

Il est uniquement provoqué par *Plasmodium falciparum*. Cette forme peut être retrouvée à tout âge, quelque soit le sexe. Cependant, elle est plus rencontrée chez les enfants de quatre mois à six ans. Le paludisme grave peut apparaître de façon brutale, parfois foudroyante, avec une fièvre, des convulsions et un coma qui constituent la triade symptomatique caractéristique. L'évolution de la maladie dépend de la rapidité et de la qualité de la prise en charge hospitalière. En l'absence de traitement, la mort survient en deux à trois jours.

1.2.5.3 Paludisme viscéral évolutif

Il est autrefois appelé cachexie palustre, associant fièvre intermittente modérée, anémie et cytopénie. Il est observé chez les enfants de 2 à 5ans atteints une splénomégalie modérée. Le paludisme viscéral évolutif est un signe de débordement de l'organisme qui doit à tout prix se défendre contre la maladie palustre en s'attaquant successivement aux formes sanguines et tissulaires [42].

1.2.5.4 Paludisme de la femme enceinte

Deux cas de figures existent selon le faciès épidémiologique de la région où l'on se trouve. Dans les zones de forte transmission, le paludisme de la femme enceinte se manifeste par une faible parasitémie sanguine. Les femmes ne présentent pas de signes particuliers alors que les parasites intraérythrocytaires ont envahi les globules rouges par la petite circulation au niveau du placenta. Dans les zones d'hypo ou de méso-endémie, les femmes enceintes présentent des infections sévères associées à des quantités élevées de parasites dans le sang avec une anémie associée à une hypoglycémie et des œdèmes des poumons. Dans tous les cas, la grossesse est émaillée de problèmes à type de contractions prématurées, d'avortement spontané et de mortalité au moment de l'accouchement. La malaria congénitale touche environ 5 % des nouveau-nés de mères infectées et est en relation directe avec la parasitémie au niveau du placenta. L'infection du placenta par le *Plasmodium falciparum* se traduit souvent par un faible poids du bébé à la naissance et tout particulièrement chez les primipares.

1.2.5.5 Paludisme à *Plasmodium falciparum* chez l'enfant

Ce paludisme est à l'origine de 1 à 3 millions de décès chaque année et touche essentiellement les enfants africains et se manifeste par :

- des troubles neurologiques avec des convulsions pouvant aller jusqu'au coma.
- une hypoglycémie
- une augmentation de l'acidité du sang (acidose métabolique)

- une anémie sévère. Contrairement aux autres formes de paludisme, le paludisme de l'enfant ne s'accompagne pas souvent d'une atteinte rénale à type d'insuffisance de filtration des reins ni d'une collection liquidienne dans les poumons (œdème pulmonaire aigu).

1.2.5.6 Splénomégalie tropicale

Dénommée actuellement splénomégalie palustre hyper-immune, cette forme se rencontre chez quelques individus qui vivent en zone d'endémie palustre. Ces personnes présentent une réponse immunologique anormale aux infections dues à *Plasmodium falciparum*. La pathologie se traduit, en dehors de la splénomégalie, par une hépatomégalie, l'élévation d'un certain type d'immunoglobulines dans le sang (IgM, anticorps anti-plasmodium) et du nombre des lymphocytes à l'intérieur des sinusoides hépatiques [43]. La biopsie du foie et l'examen au microscope optique permettent de faire le diagnostic. Les symptômes sont : tiraillement abdominal ; présence d'une masse abdominale ; douleurs abdominales violentes et péri-spléniques (inflammation des tissus environnant la rate) ; anémie avec absence de parasites dans le sang. Dans le cas des infections à répétition les individus présentent une prolifération des lymphocytes avec apparition d'un syndrome lymphoprolifératif malin. Ces malades présentent une résistance aux antimalariques d'où une élévation du taux de mortalité.

1.2.5.7 Fièvre bilieuse hémoglobinurique

Cette forme de complication du paludisme à *Plasmodium falciparum* est devenue rare. Elle survient chez des individus vivant en zone d'endémie palustre et pratiquant une chimioprophylaxie fantaisiste à base de quinine ou d'autres molécules de synthèse comme l'halofantrine (dérivé phénanthrène-méthanol Halfan[®]). Elle est consécutive à un éclatement des globules rouges à l'intérieur des vaisseaux provoquant une hémolyse intravasculaire aiguë, massive et brutale responsable d'une anémie rapidement profonde [74]. Au plan clinique, elle est caractérisée par : une fièvre élevée, un état de choc avec prostration, un ictère et des urines de plus en plus foncées contenant des cylindres hyalins. Les examens de laboratoire révèlent : une anémie, une hémoglobinurie avec des urines couleur porto. Elle se termine souvent par une insuffisance rénale mortelle appelée nécrose tubulaire aiguë, due à la destruction des tubules rénaux

1.2.5.8 Immunité contre le paludisme

L'hôte de *Plasmodium*, peut acquérir une immunité non stérilisante appelée prémunition, après plusieurs années d'infection répétées. Il s'agit d'une immunité contre la maladie et non contre le parasite [75]. Il y a une grande variabilité des réponses à l'infection palustre entre des individus vivant dans les mêmes zones d'endémie. Dans les régions où la transmission est forte, une grande proportion des porteurs de *Plasmodium falciparum* ne présente pas de symptômes ; c'est l'immunité clinique. Avec l'âge et les contacts répétés homme/parasite, s'installe une prémunition qui fait appel à des mécanismes de résistance à l'infection parmi lesquels les protéines «interférons» métabolisées et excrétées par le foie jouent un rôle majeur dans l'immunité antiparasite ou tolérance à l'infection [76]. Cette immunité est labile car elle disparaît en l'absence de contacts fréquents entre l'homme et le parasite. Elle disparaît après 12 à 24 mois si le sujet quitte la zone d'endémie.

Par ailleurs, l'immunité dirigée contre le *Plasmodium falciparum* est fortement spécifique de la ou des souches parasitaires présentes.

1.2.5.9 Facteurs génétiques et le paludisme

Les facteurs génétiques peuvent protéger contre le paludisme. Ces facteurs sont souvent liés à des déficits génétiques qui sont soit des mutations ou des délétions [77].

1.2.5.10 Drépanosytose et paludisme

Le mot drépanocytose vient du (grec *drepanos*, qui signifie «faucille», caractérisant la forme allongée des globules rouges chez les personnes atteintes de cette maladie appelée aussi anémie falciforme. Cette tare provient d'une modification de la chaîne β de l'hémoglobine (hémoglobine S), ce qui entraîne une déformation des hématies [78]. Dans les hématies déformées, l'hémoglobine se cristallise et empêche le *Plasmodium* de pénétrer dans les globules rouges. Les hématies falciformes n'arrivent pas à traverser les fins capillaires ni la barrière que constitue le filtre de la rate où elles sont détruites ; ceci entraîne une mauvaise oxygénation des organes et sont à l'origine de véritables complications pouvant aller à la mort chez les sujets homozygotes (HbS / HbS). Les drépanocytaires constituent une sélection naturelle d'où leur nombre élevé, dans les populations africaines soumises à une forte pression du paludisme [79].

1.2.5.11 Thalassémie et paludisme

Les sujets porteurs du gène SS ont une modification des taux de synthèse des chaînes de globines. Elle a pour conséquence une fatigue intense et une mauvaise circulation du sang empêchant ainsi le *Plasmodium* de survivre à l'intérieur du globule rouge [80].

1.2.5.12 Déficit en Glucose-6 Phosphate Déshydrogénase et paludisme

Le déficit génétique en Glucose-6 phosphate déshydrogénase (G6PD), appelé aussi *favisme*, est une enzyme antioxydante. Elle protège normalement contre les effets du stress oxydatif dans les globules rouges et éviterait le paludisme grave.

1.2.5.13 HLA-B53 et paludisme

Le HLA-B53 est associé à un faible risque du paludisme grave. Cette molécule CMH (Complexe majeur d'histocompatibilité) de classe I présente dans le foie est un antigène des lymphocytes T qui lutte contre le stade sporozoïte. Cet antigène encodé par IL4 (Interleukine-4), favorise la prolifération et la différenciation des cellules B productrices d'anticorps. Une étude des peuls du Burkina Faso, qui ont moins de deux attaques du paludisme ont des taux d'anticorps beaucoup plus élevés contre le *Plasmodium* que les groupes voisins [79]. L'étude a montré que l'allèle IL4-524T était impliqué dans cette médiation, d'où la possibilité que ce pourrait être un facteur de résistance contre le paludisme.

1.2.5.14 Système immunogène Duffy et le paludisme

Les sujets dont les érythrocytes sont dépourvus de certains antigènes de groupe sanguin, sujets FY (-1,-2,-3,-6) dans la classification des systèmes immunogènes FY, (anciennement système Duffy), ne peuvent être contaminés par *Plasmodium vivax*, *P. malariae*, et *P. knowlesi*. Cela expliquerait la sélection de ces sujets très fréquents dans la race noire.

1.2.6 Fasciées épidémiologique du paludisme au Bénin

1.2.6.1 République du Bénin

La République du Bénin est un pays de l’Afrique de l’Ouest située dans la zone intertropicale. Elle est limitée au Nord par le fleuve Niger, au Sud par l’Océan Atlantique, à l’Ouest par le Togo, au Nord-Ouest par le Burkina Faso et à l’Est par le Nigéria. D’une superficie de 112 622 km², le Bénin s’étend sur 670 km du fleuve Niger au nord à la côte atlantique au sud. Le territoire du Bénin est découpé en douze départements dont six au sud du pays. La population du Bénin selon le dernier recensement est d’environ 8 800 000 habitants avec plus de 60% de jeunes ayant moins de 16 ans [81].

1.2.6.2 Climat et paludisme au Bénin

Avec son climat de type tropical, chaud et humide, le Sud du Bénin connaît deux saisons pluvieuses et deux saisons sèches qui favorisent la transmission du paludisme sur 8 mois avec 58 piqûres d’anophèles par homme et par an [9,82]. Le taux d’incidence du paludisme est de 118 pour 1 000 habitants. Cette incidence est nettement plus élevée chez les enfants de moins d’un an chez qui elle atteint 459 pour mille (1000) et 218 pour mille (1000) chez ceux de 1 à 4 ans. Le paludisme constitue la première cause de consultation, 37% chez les adultes et 41 % chez les enfants de moins de cinq ans. Au Bénin le paludisme est l’une des principales causes d’hospitalisation soit 29 %, et de 3% de taux décès chez les enfants de moins de cinq ans. Le neuropaludisme a une incidence estimée à 35,6 % chez les enfants de moins d’un an et de 18,9 % chez les enfants de moins de 5 ans. C’est une maladie endémo épidémique qui constitue un grave problème de santé publique dont les couches les plus vulnérables sont au premier plan les enfants âgés de moins de cinq ans et ensuite les femmes enceintes. Les enfants paient donc une lourde tribu face à cette maladie. [83,12]. Cela s’explique par le fait que les enfants de moins de cinq ans n’ont pas une immunité acquise et décèdent rapidement par le paludisme grave.

1.2.6.3 Vecteurs impliqués dans la transmission du paludisme au Bénin

Anopheles gambiae sensu stricto et *Anopheles melas* sont les deux vecteurs qui coexistent toute l'année avec des variations très prononcées, *Anopheles melas* en saison sèche et *Anopheles gambiae* en saison pluvieuse [8]. Le principal vecteur et le plus résistant aux insecticides est *Anopheles gambiae* (98%) [65]. Sa densité varie selon le degré d'urbanisation des villes et quartiers. Dans l'Atlantique- Littoral et plus précisément à Cotonou le nombre moyen annuel de piqûre est égale à 1179 au centre ville, 3666 dans les quartiers périphériques et 3363 en zones intermédiaires [9]. L'indice sporozoïtique (IS) moyen est de 1,7 %. Au centre ville, la transmission est saisonnière et dure 3 mois pendant lesquels 33 piqûres infestées sont reçues par homme. L'IS maximum observé est de 12 % avec un taux quotidien d'inoculation de 1,02. En ceinture autour de la ville, la transmission est saisonnière et dure 8 mois pendant lesquels 58 piqûres d'anophèles infectées sont reçues par homme.

1.2.7 Diagnostic du paludisme

1.2.7.1 Examen clinique

La période d'incubation, délai entre l'infection et l'apparition des manifestations cliniques, dure en moyenne 12 jours. Cette période peut varier entre 9 jours et 12 mois selon les espèces. La phase hépatique est souvent asymptomatique. Les signes cliniques sont liés à la phase de schizogonie érythrocytaire. Les manifestations cliniques dépendent de l'espèce plasmodiale en cause, de l'immunité de l'hôte, de la parasitémie et de divers autres facteurs peu ou mal connus. Les divers critères de diagnostic clinique sont résumés dans le tableau II.

Tableau II : critères de diagnostic du paludisme grave ou compliqué

Prostration : extrême faiblesse ou, chez l'enfant : « impossibilité de tenir assis pour un enfant en âge de le faire, ou de boire pour un enfant trop jeune pour tenir debout »
Trouble de la conscience : Score de Glasgow modifié < 10 chez l'adulte et chez l'enfant de moins de 5ans ; Score de Blantyre < 3 chez le petit enfant
Détresse respiratoire : définition clinique
OEdème pulmonaire : définition radiologique
Convulsions répétées : ≥ 2 par 24 h, malgré le traitement de l'hyperthermie
Collapsus circulatoire : PAS < 80 mmHg chez l'adulte en présence de signes périphériques, d'insuffisance circulatoire ; PAS < 50 mm Hg chez l'enfant
Saignement anormal : définition clinique
Ictère : définition clinique ou bilirubine totale > 50 μ mol/l
Hémoglobinurie macroscopique : urines rouges foncées ou noires
Anémie profonde : Hémoglobine < 7 g/dl chez l'adulte ou hématocrite < 20 % Hémoglobine < 5 g/dl chez l'enfant ou hématocrite < 15 %
Hypoglycémie : Glycémie < 2,2 mmol /l
Acidose : pH < 7,35 ou bicarbonates < 15 mmol/l
Hyperlactatémie : lactate plasmatiques > 5 mmol/l
Hyperparasitémie : notamment > 40 % chez le non immun
Insuffisance rénale : créatinémie > 265 μ mol/l après réhydratation ou diurèse < 400 ml/24 h chez l'adulte (< 12 ml/kg/24 h chez l'enfant)

WHO, 2000 [84]

1.2.7.2 Examen sanguin au microscope

Le diagnostic de certitude du paludisme repose sur deux techniques : le frottis sanguin et la goutte épaisse. Le frottis sanguin est une technique simple qui permet de faire le diagnostic de l'espèce plasmodiale tandis que la goutte épaisse est une méthode de concentration qui permet la mise en évidence du parasite même dans les cas de parasitémie très faible. Ces techniques de référence nécessitent de disposer de matériel adéquat (microscope, électricité, lames et produits pour la coloration). Leur fiabilité est dépendante de la parasitémie du sujet infecté, de la qualité de la coloration de la lame, ainsi que de l'expérience et de l'attention du microbiologiste qui les effectue [44].

1.2.7.3 Tests de diagnostic rapide : TDR

De nombreux tests sont disponibles sur le marché et les comparer les uns aux autres est délicat. La majeure partie d'entre eux repose sur la reconnaissance de l'Histidine-Riche Protéine II (HRP2).

- Un seul détecte une enzyme spécifique des parasites vivants, le *Plasmodium* Lactate DesHydrogenase (pLDH) ; il s'agit du test OptiMAL[®] [85].
- Le ParaSight[™]-F est l'un des premiers tests appliqués au diagnostic instantané du paludisme ; son principe repose sur la détection d'une protéine spécifique du *Plasmodium*, l'Histidine-Riche Protéine II (HRP-2) [86,87]
- deux de ces tests dépistent à la fois *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax* : l'ICT Malaria *P.f/P.v* et OptiMAL[®]. Une variante de l'ICT (Binax NOW[®]) détecte l'aldolase.

Les autres tests ne mettent en évidence que *Plasmodium falciparum*. Tous les tests ont une bonne spécificité, mais leurs sensibilités varient. Une étude [88] a comparé in vitro dix tests pour la détection de *Plasmodium falciparum*. Les meilleures sensibilités ont été obtenues pour ICT Malaria Pf, ICT Malaria Pf/P, KAT Malaria Rapid test et DetermineMalaria. OptiMAL[®] et AccutCheck Rapid Malaria Test étaient les moins performants. Les sensibilités sont globalement médiocres surtout pour des parasitémies faibles (500 parasites / μ L). OptiMAL[®] semble meilleur à ICT pour la détection de *Plasmodium vivax*. Les sensibilités de détection des parasites varient selon les tests (Tableau : IV) et dépendent aussi des populations dans lesquelles les tests ont été évalués. Mais d'autres paramètres autres que la sensibilité doivent être pris en compte pour que le test soit adapté à chaque situation particulière : conditions de stockage (température, volume) et durée de vie du test (date de péremption), coût, nombre d'étapes et de manipulations, volume sanguin nécessaire pour la réalisation, lecture directe ou non, facilité de détection du signal visuel, réaction croisée (notamment en cas de facteur rhumatoïde). Par ailleurs, les tests détectant des parasites vivants (comme OptiMAL[®]) doivent permettre de réduire le nombre de faux positifs, situation courante en zone d'endémie [44].

1.2.7.4 Méthodes de biologie moléculaire au laboratoire

Les tests de diagnostic rapide par PCR sont des techniques d'amplification génomique du *Plasmodium*. Elles sont de plus en plus utilisées dans le domaine de la recherche. Plusieurs variantes de ces techniques ont été développées dans le but d'augmenter la sensibilité de la réaction ; il s'agit de *nested* ou *heminested* PCR, PCR avec marquage à la digoxigénine

(PCR- DIG), PCR en temps réel (real-time PCR), multiplex PCR6 Ligase de détection [89,90].

La cible de l'amplification est habituellement tout ou une partie de la petite sous-unité de l'ARN ribosomiale (SSUrRNA). Les avantages de ces techniques sont : la spécificité de l'ordre de 100% et la sensibilité supérieure à 90%. Les méthodes de diagnostic par PCR, requièrent la technicité et beaucoup de temps. Leurs modalités sont très variables d'un laboratoire à l'autre et toutes ne détectent pas d'autres espèces plasmodiales autre que *Plasmodium falciparum*.

Par ailleurs, un certain nombre de patients présentent des inhibiteurs de la PCR et sont d'évaluation difficile. Le risque de mutation de la cible d'ADN, pouvant occasionner de faux négatifs de l'examen est à craindre.

1.2.7.5 Diagnostic immunologique

La sérologie n'est d'aucun apport pour le diagnostic d'urgence de l'accès palustre. La présence d'anticorps signe un contact préalable avec le parasite. [91]. Les indications de la sérologie sont :

- le diagnostic rétrospectif d'un accès palustre traité sans confirmation biologique,
- le diagnostic d'un paludisme viscéral évolutif,
- les enquêtes épidémiologiques,
- le contrôle des donneurs de sang à risque selon l'interrogatoire dans les pays non endémiques du paludisme. La méthode sérologique de référence est l'Immuno Fluorescence Indirecte (IFI). Cette méthode implique la formation d'un complexe Ag-Ac conjugué à un Ac anti-Immunoglobuline IgG humaine marqué à la fluorescéine détectable en microscopie à fluorescence. L'inconvénient majeur de cette technique est qu'elle n'est pas automatisable et nécessite un personnel qualifié.

La seconde technique utilisée est appelée Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). C'est une technique immunoenzymatique qui permet la détection d'un Ac spécifique d'un Ag ou d'un Ag par un Ac spécifique. Son principe est basé sur la révélation par chimioluminescence de la réaction Ag-Ac par l'intermédiaire d'une réaction enzymatique du substrat avec un Ac anti-IgG humain couplé à la peroxydase. Elle est parfaitement automatisable, ce qui permet de tester plusieurs échantillons à la fois.

1.2.7.6 Limite des techniques de diagnostic du paludisme dans la qualification des poches de sang

- Les techniques traditionnelles de microscopie (frottis et goutte épaisse) ont l'avantage d'être simples de réalisation à un coût faible, et de faire le diagnostic d'espèce. Elles sont cependant peu efficaces du fait de la faible parasitémie observée chez les donneurs de sang. Elles sont peu reproductibles car leur fiabilité varie selon la compétence du lecteur. Elles ne détectent que les parasites du sang périphérique. Elles sont faussement négatives dans les cas de séquestrations des parasites dans les capillaires profonds. L'examen microscopique est long et inapte au dépistage sanguin dans les centres de transfusion sanguine. Quoiqu'il en soit, le seuil de détection parasitaire des deux techniques conjointes est de l'ordre de 500 plasmodiums par microlitre soit une parasitémie de 0,01% [44].

- Les techniques rapides de dépistage, détectent pour la plupart des anticorps, et ne peuvent pas s'appliquer en zone d'endémie comme critères de sélection, car toutes les personnes qui vivent dans ces zones ont été en contact avec le parasite. [92]. Pour le dépistage de masse, des techniques basées sur la méthodologie ELISA sont commercialisées [93,94].

- Pour une détection individuelle, les tests immunochromatographiques ou tests de diagnostic rapide (TDR) sont bien connus [95]. Les TDR qui détectent l'antigène (pLDH) sont efficaces mais méritent d'être améliorés pour être généralisées. Ils ne peuvent pas être utilisés dans les dépistages de masse dans les centres de transfusion sanguine.

- Les techniques de biologie moléculaire de détection de l'ADN du parasite sont sensibles (0,01 parasite / μ L), mais restent très coûteuses et nécessitent des faisabilités spécifiques et des moyens financiers rarement trouvés en Afrique ni même en zone non endémique. Elles sont également inadéquates pour des dépistages de masse. La détection d'antigènes circulants de *Plasmodium* par une technique de type ELISA serait le meilleur choix et les nouveaux outils sont maintenant commercialement disponibles.

1.2.8 Médicaments antipaludiques

1.2.8.1 Les schizonticides

Ce groupe comprend les dérivés quinoléiques et les dérivés de l'artémisinine. Les dérivés quinoléiques comprennent les amino-4-quinoléines (chloroquine, Amodiaquine) et les amino-alcools (méfloquine, halofantrine, luméfantrine). Ces molécules interfèrent avec la digestion de l'hémoglobine dans la vacuole nutritive en inhibant la formation de l'hémozoïne. Les dérivés de l'artémisinine (artésunate, artéméther, etc..) représentent une nouvelle classe d'antipaludiques de type peroxyde. Ils interfèrent aussi dans la digestion de l'hémoglobine, par libération de radicaux libres, toxiques pour le parasite. Les dérivés de l'artémisinine ont aussi une action gamétocytocide, empêchant ainsi la pérennisation de l'espèce plasmodiale.

1.2.8.2 Les inhibiteurs des acides nucléiques ou antimétaboliques

Ils bloquent la division du noyau de l'hématozoaire. Ce groupe comprend les antifolates, les naphthoquinones et les antibiotiques.

Les antifolates sont répartis en deux familles : les antifoliques (sulfamides, dont la sulfadoxine et sulfone) et les antifoliniques (proguanil et pyriméthamine). Ils agissent au niveau de la voie de synthèse des folates, qui sont essentiels à la biosynthèse des acides nucléiques du parasite. Les antifoliques inhibent la dihydroptéroate synthétase (DHPS) qui produit l'acide folique. Les antifoliniques inhibent la dihydrofolate réductase (DHFR), qui produit l'acide folinique.

Les naphthoquinones dont l'atovaquone, sont de puissants inhibiteurs des fonctions mitochondriales en bloquant la chaîne de transfert d'électrons au niveau de son enzyme-clé, la Dihydroorotate déshydrogénase. L'atovaquone a peu d'impact thérapeutique lorsqu'elle est utilisée seule. En combinaison avec le proguanil, une intéressante synergie d'action s'observe grâce à une inhibition séquentielle de la synthèse des pyrimidines.

Les antibiotiques : les tétracyclines (doxycycline), les macrolides (érythromycine, Clindamycine...etc.) peuvent inhiber certaines fonctions de synthèse protéique au niveau de l'apicoplaste.

1.2.8.3 Les associations d'antipaludiques

Les nouveaux antipaludiques qui ont fait l'objet de développements récents sont tous associés, au moins en bithérapie. Certaines associations sont fixes : l'atovaquone-proguanil, l'artéméther-luméfántrine et la chlorproguanil-dapsone. D'autres combinaisons sont libres et associent toujours un dérivé de l'artémisinine (artésunate-méfloquine, artésunate-amodiaquine, artéméther-proguanil et artésunate-sulfadoxine-pyriméthamine).

En prophylaxie, chez les voyageurs non immuns, les associations chloroquine-proguanil (Savarine®) et atovaquone-proguanil (Malarone®) sont recommandées selon les zones de chloroquino-résistance.

1.2.9 La chimiorésistance du *Plasmodium*

La résistance aux antipaludiques dans le monde est un phénomène qui s'aggrave depuis 40 ans selon plusieurs dimensions :

- extension géographique, à partir de l'Amérique du Sud et du Sud-est asiatique,
- augmentation continue des pourcentages de souches résistantes,
- augmentation du niveau de résistance des souches,
- poly-chimiorésistance.

La véritable menace en terme de santé publique est apparue au début des années 1960 avec la résistance à la chloroquine, antipaludique le plus utilisé et le moins onéreux [96]. Cette résistance, qui avait épargné l'Afrique pendant 20 ans a fait son apparition au début des années 80, et s'est ensuite répandue rapidement. Face à cette situation, il a fallu recourir à d'autres antipaludiques (association sulfadoxine-pyriméthamine et méfloquine). De nos jours, l'arsenal thérapeutique pour lutter contre le paludisme repose sur l'utilisation des dérivés de l'artémisinine en association, ou la quinine, pour les traitements curatifs et la chloroquine-proguanil, la méfloquine ou l'atovaquone-proguanil, pour la chimioprophylaxie chez les femmes enceintes et les voyageurs non immuns.

1.2.9.1 Les origines de la résistance

L'usage massif des antipaludiques entraînent une émergence de la chimiorésistance soit par la sélection d'individus résistants, soit par induction de mutations génétiques [97]. L'identification des déterminants génotypiques de la résistance a permis de comprendre que la résistance à la chloroquine est due à des mutations marqueurs microsatellites proche de *pfCRT* sur le chromosome 7 du *Plasmodium*. Parmi les haplotypes chloroquino-résistants qui ont émergé au fil du temps, seuls quatre ont été identifiées. Ces haplotypes sont originaires de Papouasie, d'Amérique du sud et d'Asie. Certaines données suggèrent deux origines supplémentaires qui sont le Cambodge et des Philippines [98,99]. La résistance à la chloroquine (CQ) en Afrique résulte de la conquête de 90 % de zones impaludés par un mutant ayant émergé en Indochine dans les années 1950 [100]. L'origine de la résistance à la sulfadoxine –pyriméthamine (SP) a été supposée multiple. Les études récentes ont confirmé cette hypothèse pour les doubles, triples mutants *pfDHFR-TS* 108, 51,59. La résistance à la sulfadoxine – pyriméthamine en Afrique résulte d'une migration intercontinentale de parasites originaires d'Asie [101].

1.2.9.2 L'étude de la chimiorésistance

Quatre approches méthodologiques sont utilisées pour analyser le phénomène de la chimiorésistance : le test de l'efficacité thérapeutique demeure la méthode de base pour déceler la résistance du Plasmodium aux antipaludiques ; le test *in vitro* nécessite un minimum de formation de l'utilisateur et un équipement onéreux pour les laboratoires du Sud ; le dosage de médicament dans le sang permet de juger si un échec thérapeutique ou prophylactique a bien lieu en présence d'un taux

plasmatique adéquat d'antipaludique [102] ; la biologie moléculaire représente la quatrième approche technique importante car elle permet d'analyser le gène impliqué dans la résistance [103]. Dans le cadre de ce travail, le centre de recherche *Medical Research Council* (MCR) en Gambie a utilisé la PCR (Polymerase Chain Reaction) pour étudier la nature sauvage ou mutante des isolats de *Plasmodium* récoltés chez des donneurs de sang au Sud du Bénin. La technique permet d'amplifier à l'aide d'amorces spécifiques et en présence d'une polymérase, un fragment d'ADN plasmodiale d'un gène impliqué dans le mécanisme d'action d'un antipaludique puis d'en étudier soit par digestion enzymatique ou soit par séquençage ses caractéristiques.

1.2.9.3 Les gènes de résistances

Les gènes de résistance aux antifoliques (sulfadoxine) et les antifoliniques (pyriméthamine, cycloguanil) sont bien établis, clonés et séquencés chez *P. falciparum*. Ce sont les gènes codant pour la DHPS et la DHFR. La DHFR est le produit d'expression d'un gène situé sur le chromosome 4 du génome plasmodiale [104]. Il a été démontré dans ce cas que le codon 108 est la clé de la résistance aux antifoliniques car il est toujours muté en premier lieu [105]. Quant à la DHPS, c'est une enzyme dont le gène est situé sur le chromosome 8 et contient deux introns [106]. Le gène *pfprt* responsable de la résistance à la chloroquine, est situé sur le chromosome 7 du *P. falciparum* et son expression donne une protéine localisée dans la membrane de la vacuole digestive et joue un rôle de transport transmembranaire [107,108]. De plus l'étude de la relation entre les mutations sur le gène *pfmdr-1*, situé sur le chromosome 5 et la résistance de *Plasmodium falciparum* aux amino- alcool s'est révélée positive [109].

1.2.9.4 Les mécanismes de la résistance

La résistance à un antipaludique est définie comme la capacité des parasites à se multiplier et à survivre malgré l'administration et l'absorption d'un principe actif à dose égale ou supérieure à celle usuellement recommandée. Un échec thérapeutique n'est donc lié à une résistance parasitaire qu'après vérification des dosages plasmatiques des principes actifs du médicament en cause.

1.2.9.4.1 La résistance aux anti- métabolites

Le mécanisme de la résistance aux anti-métabolites repose sur les mutations ponctuelles au niveau des gènes codant les protéines cibles. Ces mutations diminuent les interactions enzyme/ligand qui sont généralement des inhibiteurs compétitifs. Elles agissent en modifiant la conformation des protéines enzymatiques. Ainsi, la résistance aux antifoliniques et aux antifoliques est déterminée par des mutations de gènes impliqués dans la synthèse des folates du parasite. Les mutations ponctuelles au niveau du gène codant la dihydroptéroate synthétase sont responsables de la résistance à la sulfadoxine et aux sulfones [110].

1.2.9.4.2 La résistance aux lysosomotropes

Les premières études sur la résistance du Plasmodium à la chloroquine ont montré qu'elle était réversible sous l'action de modulateurs des pompes membranaires comme le vérapamil. Cette résistance est en effet liée à un défaut d'accumulation de la chloroquine dans la vacuole digestive ; ce constat supporte l'hypothèse de l'implication d'un transporteur spécifique de la chloroquine dans la vacuole [111].

1.2.9.4.3 Résistance du *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques au Bénin

Les espèces de *Plasmodium* les plus transmises au Bénin sont : *Plasmodium falciparum* (97,1%) et *Plasmodium malariae* 2,% [112]. Le centre National Français de surveillance de la Chimiosensibilité a classé le Bénin dans le groupe III (*P. falciparum* très chimiorésistant voire polychimiorésistant [113,114].

1.2.10 Lutte et mesures préventives contre le paludisme

La lutte antipaludique nécessite une approche intégrée comprenant la prévention, la lutte antivectorielle et le traitement par des antipaludiques efficaces tels que les combinaisons thérapeutiques à base de dérivées d'artémisinine (CTA) en première intention des accès simples [91].

1.2.10.1 Les organismes de lutte contre le paludisme

Des programmes de prévention et du traitement du paludisme sont utilisés avec des objectifs précis.

- **Roll Back Malaria**, implanté par l'OMS et l'UNICEF dans certains pays impaludés, a pour rôle de diminuer de moitié le nombre de décès liés au paludisme d'ici 2010. Il contribue à l'accessibilité des populations aux moustiquaires imprégnées à des coûts réduits, au dépistage et au traitement.

- **Sanofi-Synthelabo**, et **Impact Malaria** sont engagés dans la recherche et le développement de nouveaux médicaments. Pour ce programme, la prise en charge du paludisme repose sur un bon diagnostic, la prévention et le traitement. - **Malaria Research and Reference Reagent Resource Center** (MR4), met à la disposition des laboratoires de recherche notamment ceux des zones d'endémie palustre, une banque de matériel (Souches de parasites, moustiquaires, anticorps, matériel génétique) et des réactifs.

- **Malaria Vaccine Initiative** (MVI), a pour objectif de favoriser la collaboration des structures gouvernementales, industrielles et académiques en se focalisant sur la recherche et le développement de vaccin antipaludiques.

- Le séquençage du génome nucléaire de la souche de *Plasmodium falciparum* 3D7, qui commencé en 1996 s'est achevé en 2002. Le matériel génomique nucléaire est organisé en 14 chromosomes. La composition du génome couvre 80,6% d'Adénine/Thymine (A/T) et comporte 23,3Mb [115], avec une répartition de 5595 gènes qui codent pour un total de 5420 protéines. L'intégration de ces données ont permis entre autre de développer de nouvelles techniques de diagnostic utilisant les protéines et antigènes recombinants spécifiques de *Plasmodium*.

1.2.10.2 Lutte contre les vecteurs

Il s'agit de limiter la population et la dynamique de reproduction des vecteurs. Les mesures d'assainissement consistent à supprimer les eaux stagnantes, et le désherbage des alentours des habitations. L'épandage d'insecticides anti-larvaires, l'utilisation des prédateurs d'anophèles de même que la dispersion des mâles stériles sont des moyens efficaces.

La mise en place de traitement préventif intermittent des femmes enceintes, a encouragé la prévention et la lutte anti-vectorielle par la distribution de moustiquaires imprégnées d'insecticides à effets rémanents à l'intérieur des habitations pour tuer les moustiques au repos.

1.2.10.3 Le vaccin contre le paludisme

Les expériences de Guerra et al. 2008 [116] ont semé dans les esprits l'espoir de trouver un vaccin contre le paludisme. Ces chercheurs ont transféré avec succès le sérum de singes chroniquement malades aux singes naïfs qui ont survécu après une injection de doses léthales de *Plasmodium* [117]. Des expériences *in vitro*, ont montré que des anticorps monoclonaux spécifiques aux antigènes du parasite, ou des anticorps de sérum provenant des singes immunisés, peuvent inhiber la pénétration des mérozoïtes dans les hématies.

Par ailleurs, plusieurs antigènes ont été caractérisés et étudiés activement pour leur inclusion dans un vaccin antipaludique. Il s'agit de : « Synthétique *Plasmodium falciparum* 66KD peptide (Spf66); Major merozoite Surface proteine (MSP-1) ; Apical Membrane antigene (AMA-1) ; les protéines de rhoptries (organelles de sécrétion du parasite) ; Ring-infected Erythrocyte Surface Antigen [118,119]. Trois essais ont l'objet de recherche

- vaccin synthétiques (vaccin recombinant) ;
- vaccin à base de sporozoïtes (protéine de surface ou Circum Sporozoïte (CS)) ;
- vaccin contre les gamétocytes.

L'essai de PATAROYO en Colombie sur des volontaires non immun a donné un résultat de 33% d'efficacité [120].

1.2.10.4 Un premier vaccin contre le paludisme ?

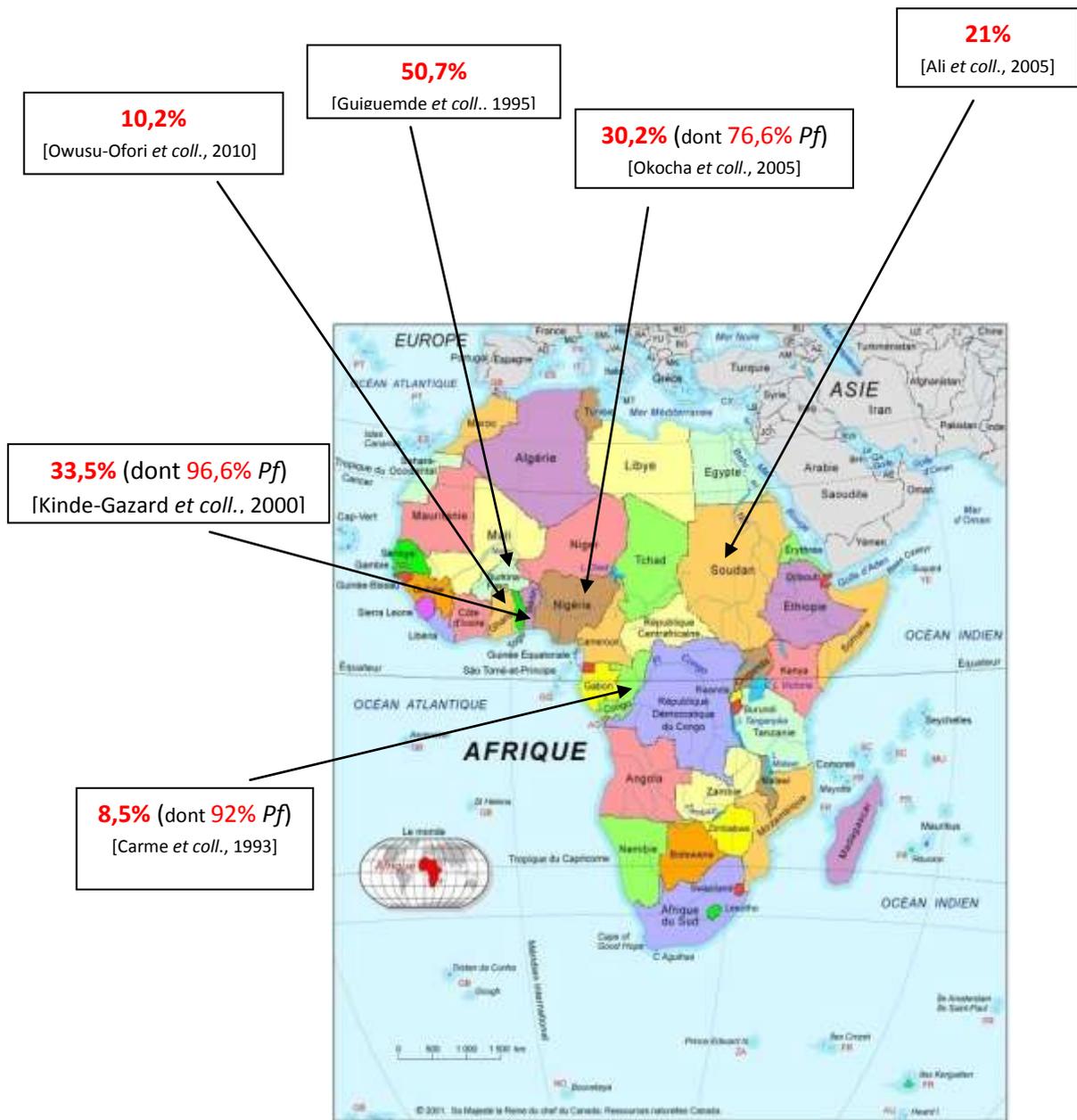
Dans un point d'information en 2012, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a rappelé que la complexité du *Plasmodium* rendait très difficile l'élaboration d'un vaccin contre le paludisme. Actuellement 27 essais de candidats vaccins sont recensés de part le monde. La plus npart était au stade d'expérimentation. L'objectif des chercheurs est de trouver un vaccin pour une protection de 75 % de la population exposée au paludisme. La perspective de commercialiser, d'ici à la fin 2015, un premier vaccin contre le paludisme (RTS,S/AS01) a été publiée par le laboratoire britannique GlaxoSmithKline (GSK), mais les experts ont demandé de garder la prudence. Le groupe

pharmaceutique britannique (GSK) a annoncé qu'il allait solliciter un premier feu vert scientifique auprès de l'Agence Européenne du Médicament (EMA) pour un vaccin antipaludique. Il s'agit du candidat vaccin RTS,S/AS01 le vaccin le plus avancé au cours des essais clinique. Administré chez 15 000 nourrissons âgés de 5 à 17 mois qui vivent en Afrique Sub-saharienne, RST,S/AS01 réduirait de 46 % le risque de développer un accès palustre et de 35,5 % celui de contracter une forme sévère de la maladie. La disponibilité d'un vaccin suffisamment protecteur serait une arme précieuse face au paludisme.

1.3 Paludisme transfusionnel

Le paludisme transfusionnel est transmis par l'intermédiaire d'une transfusion sanguine. *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium malariae* sont le plus souvent mis en cause. C'est en 1911 qu'a été décrit pour la première fois un cas de paludisme post-transfusionnel aux Etas-Unis, au cours d'une transfusion de bras à bras [121]. L'agent responsable s'avérait être du *P. vivax*. Dans ce cas, la période d'incubation est courte car il n'existe pas de stade pré-érythrocytaire se déroulant avant l'envahissement des globules rouges. La période pré-érythrocytaire varie de 12 jours pour *P. falciparum* et de 3 à 4 semaines pour *P. vivax*. Le parasite peut entraîner une infection sévère selon l'état du receveur. Cette infection est particulièrement sévère si elle a lieu au cours de la grossesse ou chez un immunodéprimé, un splénectomisé, et chez les enfants en général. Les signes observés sont les mêmes que dans le cas d'une infection classique. L'infection sévère ou accès pernecieux est parfois fatale si l'espèce incriminée est *P. falciparum* [122]. La sévérité de l'infection peut s'expliquer d'une part, parce que le diagnostic est souvent tardif car non suspecté d'emblée, d'autre part parce qu'elle complique habituellement une pathologie sous jacente sérieuse ayant nécessité la transfusion [123].

En Afrique-subsaharienne le risque de la transmission du *Plasmodium* par la transfusion est un fait réel mais souvent négligé et ce sont les femmes enceintes et les enfants moins de cinq ans qui en font les frais. Très peu de données sont disponibles sur l'évaluation de ce risque qui se limite à la recherche de *Plasmodium* dans les poches de sang par la microscopie. De 1980 à 2009, des études faites sur le continent africain (Figure 12) ont rapporté des taux de prévalence allant de 8,5 % au Congo à 30,2 % au Nigeria [124].



Owusu-Ofori et coll., 2010

(%) Proportion des poches de Sang infecté par le *Plasmodium*

Figure 12 : Taux de prévalence de poches de sang infecté observé dans certains pays en Afrique

1.3.1 Problématique du paludisme transfusionnel

Malgré les efforts du Ministère de la Santé du Bénin à travers sa politique de lutte contre le paludisme soutenue par une volonté politique et un partenariat agissant, beaucoup de défis restent à relever dont le risque de Transmission du Paludisme par la Transfusion (TPT). Depuis 1994, le Bénin a lancé un programme National de Lutte contre le paludisme [125] intégré aux soins de santé primaire mais il n'existe ni étude ni de données disponibles en ce qui concerne le déficit annuel de croissance imputable au paludisme encore moins sur le paludisme transfusionnel. Une étude transversale réalisée en saison pluvieuse à Cotonou chez 355 donneurs bénévoles de sang, a permis de dépister 119 donneurs de sang hébergeant des trophozoïtes soit 33,5% des cas [126]. Au Nigeria le taux du risque de transmission du paludisme par le sang est de 32, 2 % [130].

Dans les pays où la pathologie n'est pas endémique, on a assisté depuis une dizaine d'années à une incidence croissante du paludisme d'importation qui s'est stabilisé depuis 2011[128]. Ce phénomène est étroitement lié à l'augmentation des déplacements intercontinentaux avec une forte proportion de voyageurs se rendant en zones d'endémie palustre. Cette incidence croissante a donc entraîné une augmentation de la proportion de donneurs de sang ayant potentiellement été en contact avec le parasite et par conséquent justifié la mise en place de moyens de prévention au niveau des centres de transfusion sanguine pour assurer un maximum de sécurité transfusionnelle. Cette prévention du paludisme transfusionnel n'est pratiquée que dans les pays européens par la recherche des anticorps anti-*Plasmodium* chez les donneurs de sang et sur la base des questionnaires. La plupart de ces pays classent les donneurs risquant d'avoir le *Plasmodium* en deux groupes : ils distinguent les donneurs ayant vécu dans une zone endémique de paludisme pendant cinq ans et ceux qui sont nés et ont résidé dans les zones non endémiques mais qui ont voyagé en zones endémiques. La première catégorie de donneurs est refusée pendant les trois ans qui suivent leur dernier séjour en zone endémique ; d'autres pays les rejettent définitivement. Certains pays acceptent ces donneurs après une période de 4 mois pouvant aller jusqu' à trois ans à condition que leur test soit négatif. Les personnes provenant de zones non endémiques, mais qui ont séjourné en zone de paludisme sont refusés pendant 4 à 12 mois. D'autres pays comme l'Australie, refusent ces donneurs pendant 3 ans ou définitivement s'ils ont résidé plus de 6 mois en zone d'endémie [127,128]. En Afrique subsaharienne, la transfusion sanguine est une voie potentielle de transmission du *Plasmodium*, mais il n'existe encore aucun consensus sur les mesures à prendre pour prévenir le paludisme post-transfusionnel en zones d'endémie palustre [129,19].

PARTIE II
MATERIEL ET METHODES

2.1 Cadre de travail

Cette étude de type transversal et descriptif, a été conduite dans trois Centres Départementaux de Transfusion Sanguine (CDTS) au Bénin: Atlantique-Littoral, Ouémé-Plateau et Mono-Couffo. Les analyses biologiques des échantillons été effectuées au laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire (LBBM) à Cotonou et à l'Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale de Strasbourg.

2.2 Matériel

2.2.1 Matériel de laboratoire

Dans le cadre de ce travail nous avons utilisé du matériel de prélèvement de sang (tubes EDTA), des lames porte-objet, des lamelles, des colorants (May Grünwald Giemsa), des bacs de coloration des microscopes, pour la réalisation et la lecture des étalements de sang et des gouttes épaisses. Les plaques ELISA (*Pf* MSP1, *Pf* AMA1, *Pm* MSP1, *Po* MSP1, et les Kits pLDH) ont été fournis par le *Projet malaria : diagnostic transfusionnel de l'IPPT*. Les équipements utilisés sont : un réfrigérateur (Liebherr, Germany), une étuve (37°C) congélateur -20 °C (Premium, UK), congélateur -80°C (New Brunswick Scientifique, The Netherlands), hotte à flux laminaire, centrifugeuse (Beckman Coulter, USA). les plaques de lyse de 96 puits, les plaques en polypropylène (Maxisorp®, Nunc) de 96 puits pour les ELISA.

2.2.1.1 Réactifs

Les réactifs suivants ont été utilisés : Tampon phosphate Salin (PBS, Sigma), PBST, Tween 20, anticorps anti -IgG humaine couplé à la HRP, TétraméthylBenzidine (TMB plus®, Kemantec), solution d'H₂SO₄ à 0,2M, l'albumine de sérum bovin (BSA, BDH Lab, UK). Tout le matériel et réactifs de PCR sont fournis par *Medical Research Council (MCR)* de la Gambie

2.2.2 Matériel biologique

2.2.2.1 Culture des parasites

Les stades asexués intraérythrocytaires de la souche 3D7 de *P. falciparum* sont entretenus en cultures continues à 37°C sur tapis de globules rouges humains (groupe O+, collectés par l'Etablissement Français du Sang, EFS de Strasbourg) [133]. Les souches sont cultivées à 5% d'hématocrite en milieu de culture (MCM, pH 7,4) composé de Roswell Park Memorial Institut medium (RPMI)1640 contenant 25 mM de L-Glutamine, 10 mM d'Hepes (Gibco, Invitrogen, Cergy Pontoise, France), 1µg/ml hypoxanthine, 0,11 mg/ml Na pyruvate, 0,02 mg/ml gentamicine le tout supplémenté avec 10 % (v/v) de BSA (Perbio Science, Brebière, France). Les parasites sont incubés en jarres à bougie à 37°C. Des changements de milieu et vérifications de la parasitémie quotidienne par frottis colorés au May Grünwald-Giemsa (MGG) ainsi sont indispensables. Des dilutions bihebdomadaires à 1 % d'hématocrite des cultures, assurent le bon développement des parasites. La durée d'un cycle intraérythrocytaire est d'environ 48 heures.

2.2.2.2 Préparation d'antigène total natif de *Plasmodium falciparum*

La souche 3D7 de *P. falciparum* en culture continue a été concentrée pour avoir une parasitémie de 10 à 15% déterminée sur frottis sanguin par microscopie. Les formes matures de *P.falciparum* ont été séparées par flottation sur plasmagel (Plasmion® (Fresenius Kabi, Sèvres, France) comme décrit par [134]. La partie flottante contenant les formes de schizontes a été récoltée et l'antigène brut extrait tel que décrit par Santos Coelho [135].

❖ Principe

Les globules rouges infectés par des parasites matures (schizontes) ont été centrifugés à 1500g pendant 10 min. Après lavages dans un tampon phosphate salin (0,01 mol /L à pH 7,2), les cellules ont été lysées avec 0,04% de saponine (Merck, Darmstadt, FR, Allemagne) dans du PBS pendant 20 min à température ambiante. Après centrifugation à 3000 g pendant 15 min à 4° C et lavages en PBS, le culot a été solubilisé dans 2% Zwittergent ® (Calbiochem, La Jolla, CA) [136]. Après centrifugation à 14 000 g pendant 30 min à 4 ° C, le surnageant a été recueilli, dialysé contre du tampon PBS et stocké en aliquote à -80° C.

2.2.2.3 Préparation de pLDH recombinant (rpLDH)

Un gène synthétique (Genscript, NJ, USA) codant pour la protéine pLDH de *P.falciparum* a été inséré dans un vecteur commercial d'expression pMAL-c2X, pMAL-p2X *polylinker* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Ce vecteur contient également le gène de résistance à l'ampicilline, un gène codant pour le *maltose Binding protéine* (MBP) un partenaire de fusion de la protéine. La protéine a été exprimée dans *Escherichia coli*. La sélection des colonies a été faite par le système blanc/bleu des colonies transformées.

❖ Production et extraction de la protéine

A partir des colonies blanches, un *stater* a été préparé puis mise en culture. Après induction de la synthèse de la protéine par IPTG, la culture a été centrifugée et le culot bactérien a été lysé. L'extraction protéique a été faite par sonication et la protéine a été purifiée par chromatographie d'affinité sur résine d'amylose. Cette protéine purifiée a servi pour la préparation des plaques ELISA.

2.2.2.4 Protéines recombinantes mise à notre disposition par le laboratoire IPPTS

Nous avons testé des protéines recombinantes *Pf* MSP1 composé de 373 acides aminés, *Pf* AMA1 composé de 448 acides aminés, *Pm* MSP1 composé de 350 acides aminés et *Po* MSP1 composé de 356 acides aminés. Elles étaient en cours de production depuis trois ans avant notre arrivée dans le laboratoire de recherche de l'IPPT de Strasbourg. Une technique ELISA anticorps maison a été mise au point dans le cadre de la diminution du risque du paludisme transfusionnel en zone non endémique [123]. L'un des objectifs de ce projet était de remplacer l'antigène natif par des protéines recombinantes : *Pf* MSP1, *Pf* AMA1, *Pm* MSP1 et *Po* MSP1 et leur évaluation en zone endémique du paludisme. Le projet a un caractère semi-confidentiel. Notre contribution a consisté à évaluer par la technique ELISA, l'antigénicité de ces marqueurs moléculaires pour étudier la séroprévalence du paludisme chez les donneurs de sang au sud du Bénin.

2.2.3 Matériel humain

2.2.3.1 Sélection des donneurs au Bénin

Les donneurs ont été retenus selon les critères de la sélection médicale : absence de fièvre, absence de signes cliniques évidents de maladie évolutive, avoir au moins un poids supérieur à 52 kg, l'âge devait être compris entre 18 ans et 60 ans, voire 65 ans pour les anciens donneurs réguliers ; la date du dernier don devait remonter à quatre mois chez les femmes et trois mois chez les hommes. Nous avons introduit en plus un questionnaire systématique qui nous donnait par individu, les noms, prénoms âge, sexe, domicile, téléphone et des questions relatives au paludisme : antécédents de paludisme, épisodes survenus dans l'année et confirmés ou non par un agent de santé, expressions cliniques, date et traitement du dernier épisode, les mesures de prévention antipaludiques utilisées. Un consentement éclairé est enfin signé par chaque participant pour marquer son accord pour l'étude.

❖ Prélèvement des échantillons

Au total, 2515 donneurs bénévoles de sang générés par le hasard ont été prélevés sur une période de 10 mois répartie en grande saison des pluies (GSP) aux mois de Mai-Juin-Juillet ; petite saison sèche (PSS) aux mois d'Août à Septembre ; petite saison des pluies (PSP) aux mois d'Octobre à Novembre et grande saison sèche (GSS) aux mois de Décembre-Janvier-Février. Sur chaque don de sang, 7 millilitres de sang étaient prélevés dans des tubes EDTA ; 1ml de ce prélèvement a été transvasé dans un tube eppendorf. Les 6 ml restants ont été centrifugés à 4°C et 500 microlitres (µL) de plasma fut recueilli dans un autre tube eppendorf. Les tubes eppendorf (sang total 1ml et plasma 500 µL) étaient conservés à -20°C et convoyés sous carboglace au laboratoire de l'Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale de Strasbourg pour recherche d'anticorps et d'antigène pLDH de Plasmodium.

2.2.3.2 Sélection des échantillons pour le calcul de la sensibilité de l'ELISA pLDH.

Les sérums de deux cent soixante six (266) paludéens de retour de zone d'endémie palustre et référés par l'Hôpital de Strasbourg ont été utilisés. Sur la base des résultats microscopiques, 239 parmi eux sont positifs pour *P.falciparum*, 19 pour *P.ovale*, six pour *P. malariae*. Deux ont une infection mixte (*P.ovale* avec *P.falciparum*).

2.2.3.3 Sélection des échantillons pour le calcul de la spécificité de l'ELISA-pLDH.

Deux catégories de sérums de donneurs de sang de l'Etablissement Français du sang d'Alsace (EFS Alsace) ont été recueillies sur la base de questionnaire médical. Le premier groupe comprend des " donneurs à risque " de transmettre le paludisme (n = 1771) c'est à dire des donneurs qui avaient voyagé dans une région d'endémie palustre les quatre derniers mois. Le second groupe est constitué de "donneurs non à risque" (n =1781) de transmettre le paludisme car ils n'ont pas voyagé dans une Zone d'endémie palustre les trois dernières années.

2.3 Méthodes

2.3.1 Examen microscopique : goutte épaisse/ frottis

Une goutte épaisse (GE) et un étalement mince ont été réalisés sur lame et colorés au May-Grünwald Giemsa (MGG). Chaque lame a fait l'objet d'une lecture microscopique à la recherche du Plasmodium et l'établissement de la densité parasitaire sur la GE. L'identification de l'espèce plasmodiale a été réalisée sur l'étalement mince. La lecture microscopique a été réalisée par deux techniciens de laboratoire puis par un troisième en cas de doute. Le comptage des parasites a été fait sur la base de 500 parasites pour 1000 leucocytes comptés. La lecture a été arrêtée après avoir compté 500 parasites même si le chiffre de 1000 leucocytes n'a pas été atteint. La densité parasitaire (DP) a été exprimée en nombre de parasites par μl de sang selon la formule $DP = \frac{Y \cdot 8000}{X}$; (8000 = nombre de leucocytes par microlitre de sang chez un adulte normal ; Y= nombre de parasites comptés ; X= nombre de leucocytes comptés).

2.3.2 Examen sérologique : Elisa-Malaria Antibody Test

Le dépistage des anticorps a été effectué par la technique Elisa-Malaria Antibody Test. C'est un test sérologique de type Elisa de spécificité et de sensibilité analytique très forte soit respectivement 96,7% et 93,1% pour la recherche des anticorps anti-*Plasmodium* de type IgG et IgM [123]. L'antigène utilisé est un extrait total de culture de *Plasmodium falciparum* souche 3D7. En raison d'une communauté antigénique existant, les anticorps des autres espèces plasmodiales pouvaient être détectés.

❖ Mode opératoire :

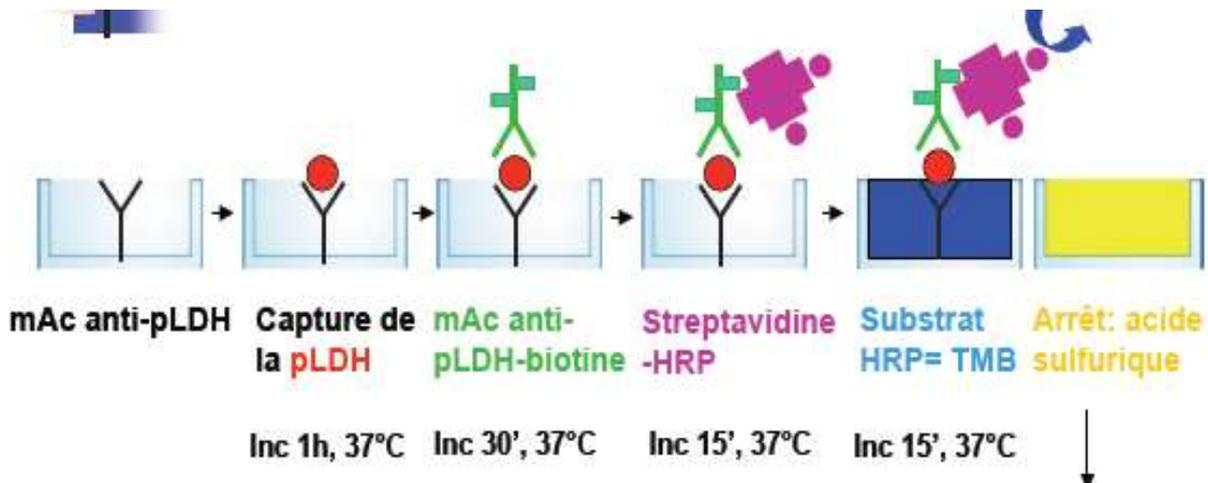
Deux cents μL d'extrait antigénique de *Plasmodium* souche 3D7 à 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ont été incubés une nuit (adsorption par liaison électrostatique dans une plaque de 96 puits en polypropylène Maxisorp®, Nunc) dans du tampon PBS. Après 3 lavages avec du tampon PBST à 0,05%, les sites non spécifiques ont été saturés par 300 μL de PBST 0,05% + BSA 1%. Le tout a été placé à 37°C pendant 1 heure. Une dilution de 1/5 (25 μL de plasma ont été dilués dans 125 μL de tampon de dilution (PBST 0,05%) dans chaque puits de la microplaque. La plaque a été incubée 1 heure à 37°C à l'étuve. Après trois lavages avec 300 μL du tampon PBST 0,05% pour éliminer l'excédant d'anticorps, 100 μL d'anticorps secondaire anti-IgG humaine couplé à la HRP diluée au 1/40 000ème dans du tampon de dilution ont été distribués dans chaque puits. La plaque a été incubée à 37°C pendant 60 minutes. Après trois lavages avec du PBST 0,05%, 100 μL de TétraméthylBenzidine (TMB plus®, Kementec), solution chromogène contenant le substrat de l'enzyme et le peroxyde d'hydrogène, ont été ajoutés dans chaque puits et incubés pendant 30 minutes à 37°C et à l'abri de la lumière. La réaction a été ensuite stoppée par 50 μL d' H_2SO_4 à 0,2M (solution d'arrêt). La lecture de la plaque a été faite par spectrophotométrie à 450 nm contre 650 nm. Des contrôles positifs et négatifs ont été également testés. La détermination du cut-off (seuil de positivité) a permis l'interprétation des résultats. La validation du test exige que la densité optique (DO) du contrôle positif soit supérieure à 0,500 et celle du contrôle négatif inférieure à 0,200. La valeur seuil (cut-off) a été calculée en multipliant par quatre la valeur moyenne des DO des contrôles négatifs. L'Index anticorps (Index Ac) de chaque échantillon a été obtenu en divisant la valeur de la DO de cet échantillon par celle de la valeur seuil (Cut-off). L'échantillon est positif si son Index Ac est supérieur ou égal à 1,0 ; Un échantillon est douteux lorsque son Index Ac est compris entre 0,8 et 1. Un Index Ac inférieur ou égal à 0,8 est considéré comme échantillon négatif.

2.3.3 **Dépistage de l'antigène pLDH par «apDia n.v.» Elisa-Malaria Antigène Test**

La pLDH est une enzyme de la voie glycolytique sécrétée par les différentes espèces de *Plasmodium* mais possédant des isomères spécifiques à chaque espèce [51]. L'enzyme pLDH disparaît dans les 24 heures qui suivent un traitement antipaludéen efficace [131]. L'antigène pLDH est donc considéré comme un marqueur précis de la présence de *Plasmodium* dans le sang et de ce fait peu être utilisé pour les examens de dépistage du paludisme chez les donneurs de sang surtout dans les pays endémiques de paludisme. Le test est également utilisable en remplacement de la méthode isotopique pour la détermination de la Chimiosensibilité *in vitro* de *P.falciparum*. Dans le cadre de ce travail, la recherche de l'antigène pLDH a été effectuée par la technique Elisa-Malaria Antigène Test de type sandwich (apDia n.v. Hertoginstraat 82, 2300 Turnhout, Belgium) qui détecte par immunocapture à base d'anticorps monoclonaux anti-pLDH, la pLDH de toutes les espèces plasmodiales.

❖ **Principe de la technique ELISA-pLDH**

Les puits de microtitration sont revêtus d'un anticorps monoclonal anti-pLDH pan-spécifique de toutes les espèces plasmodiales. Les échantillons sont ensuite pipetés dans les puits pour se lier à l'anticorps immobilisé. Après un lavage destiné à éliminer le matériel non lié, la pLDH est révélée par addition d'un anticorps monoclonal biotinylé anti-pLDH également pan-spécifique [132]. Après élimination de l'excédent d'anticorps biotinylé on ajoute la streptavidine-peroxydase (figure 13). Après un lavage final, l'activité de la peroxydase est révélée par ajout de la solution de substrat à base de 3,3', 5,5' TétraméthylBenzidine (TMB) et de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). L'intensité de la coloration est mesurée à 450 nm après acidification. Elle est directement proportionnelle à la concentration de pLDH dans les échantillons dosés.



Breman et coll., 2001 [132].

Figure 13 : Principe ELISA-Malaria Antigène Test

➤ Mode opératoire

Le test est réalisé selon les recommandations du fabricant de la manière suivante : distribuer 100µL de tampon de lyse dans chaque puits de la microplaque. Ajouter 50µL de contrôle positif dans un puits et 50µL de contrôle négatif dans trois puits. Ajouter 50 µL de sang total dans les puits restants. Incuber la plaque à l'étuve à 37°C pendant 60 minutes. Laver 5 fois les puits avec 350 µL de tampon de lavage. Distribuer dans tous les puits 100 µL de conjugué et incuber la plaque à 37°C pendant 30 minutes. Après cinq lavages avec du PBST 0,05%, 100 µl de TétraméthylBenzidine (TMB plus®, Kementec), solution chromogène contenant le substrat de l'enzyme et le peroxyde d'hydrogène, sont ajoutés dans chaque puits et incubés pendant 15 minutes à 37°C et à l'abri de la lumière. La réaction est ensuite stoppée par ajout de 50 µl d'H₂SO₄ à 0,2M (solution d'arrêt). La lecture de la plaque se fait par spectrophotométrie à 450 nm contre 650 nm. Les résultats du test ont été interprétés comme suit : les densités optiques (DO) des témoins négatifs devaient être inférieures à 0,100 et supérieures à 0,500 pour le contrôle positif. La valeur seuil (cut-off) a été calculée en multipliant par trois la valeur moyenne des DO des témoins négatifs. L'index antigène (Index Ag) de chaque échantillon a été obtenu en divisant la valeur de la DO de cet échantillon par celle de la valeur seuil (cut-off). L'échantillon est positif si son index Ag est supérieur ou égal à 1,0 et indiquait que cet échantillon contenait des parasites viables. Un échantillon était considéré négatif si son Index Ag était inférieure ou égale à 0,8 et indiquait qu'il y avait absence de parasites viables dans le sang ou qu'il y avait absence de multiplication de *Plasmodium* liée à une prise d'antipaludéen. Un échantillon était considéré douteux si son Index Ag était comprise entre 0,8 et 1,0.

2.3.4 Evaluation des protéines recombinantes par ELISA

Deux types d'ELISA ont été utilisés. Un ELISA à base d'antigène Natif (NatELISA) et un ELISA à base de protéines recombinantes (RecELISA)

➤ Principe de l'ELISA

Deux cents μL de protéines recombinantes à 5 $\mu\text{g/ml}$ ont été incubés durant une nuit (adsorption par liaison électrostatique dans une plaque de 96 puits en polypropylène Maxisorp®, Nunc) dans du tampon PBS. Après 5 lavages avec du tampon PBST à 0,05%, les sites non spécifiques ont été saturés par 300 μL de PBST 0,05% + BSA 1%. Le tout a été placé à 37°C pendant 1 heure. La plaque a été lavée 3 fois à nouveau avec du PBST 0,05%. 10 μL de sérum dilué au 1/21^{ème} dans du tampon de dilution (PBST 0,05% + BSA 1%) ont été déposés dans chaque puits de la microplaque. La plaque a été incubée 1 heure à 37°C. Après trois lavages avec du tampon PBST 0,05% pour éliminer l'excédent d'anticorps, 100 μL d'anticorps secondaire anti-IgG humain couplé à la HRP diluée au 1/40 000^{ème} dans du tampon de dilution ont été distribués dans chaque puits. La plaque est incubée à 37°C pendant 1 heure. Après trois lavages avec du PBST 0,05%, 100 μL de TétraméthylBenzidine (TMB plus®, Kementec), solution chromogène contenant le substrat de l'enzyme et le peroxyde d'hydrogène, sont ajoutés dans chaque puits et incubés pendant 15 mn à 37°C et à l'abri de la lumière. La réaction est ensuite stoppée par ajout de 50 μL d' H_2SO_4 à 0,2M (solution d'arrêt). La lecture de la plaque se fait par spectrophotométrie à 450 nm contre 650 nm. Des contrôles positifs et négatifs sont également testés. La détermination du Cutoff (seuil de positivité) permet l'interprétation des résultats. Le calcul de l'index permet de discriminer un échantillon positif d'un négatif.

cut-off = moyenne de 3 sérums négatifs x 3.

Index = DO sérum / Cut-off

Index > 1 = positif

Index < 0,8 = négatif

0,8 < Index < 1 = douteux

2.3.5 Recherche de mutations génétiques chez les souches de *Plasmodium* isolées

Les recherches dans le domaine de la résistance de *P. falciparum* aux antipaludéens en monothérapie chez les donneurs de sang béninois ont été peu documentées. Cependant les mutations des gènes Pfmdr-1 et Pfcrt comme causes déterminantes de la résistance du parasite vis-à-vis des amino-4-Quinoléines [135] et des gènes Pfdhfr et Pfdhps pour la sulfadoxine-pyriméthamine ont été bien établies. Pour les mécanismes d'action en partie élucidés, on a trouvé la présence de mutations ponctuelles au niveau du gène de la protéine cible (gène pfdhfr pour la pyriméthamine) et des amplifications géniques modifiant l'expression des protéines cibles (gène Pfdhps pour la sulfadoxine). Des modifications de transporteurs parasitaires qui rendent difficile l'accès du principe actif à la cible (gène pfcrt et Pfmdr1 pour la chloroquine) ont été aussi évoquées. C'est dans ce contexte que nous avons essayé d'identifier les mutations génétiques des souches de *P. falciparum* retrouvées chez les donneurs de sang au sud du Bénin. La détermination du profil génétique des isolats de *P. falciparum* par digestion enzymatique ou RFLP-PCR a été réalisée en collaboration avec le centre de recherche Medical Research Council (MCR) en Gambie.

2.3.6 Analyse statistique des données

Les données étaient analysées par le test de chi-carré et de Kruskal Wallis en utilisant les logiciels « Sigma plot statistical analysis software 2001 (Systat Software, Inc. San Jose, CA, USA) et Epi Info version 3.5.1). Les résultats étaient exprimés sous forme de moyenne \pm écart-type. Les variations étaient jugées significatives à $p < 0,05$ avec un intervalle de confiance (IC) = 95%.

PARTIE III
RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 RESULTATS

3.1.1 Données sociodémographiques

3.1.1.1 Répartition des donneurs enquêtés par saison

Deux mille cinq cent quinze (2515) donneurs ont été inclus durant une période de 10 mois allant de Mai 2009 à Février 2010 répartie en quatre saisons (Figure 14a) : période de grandes saisons des pluies (GSP), de petite saison sèche (PSS), de petite saison des pluies (PSP) et de grande saison sèche (GSS). Le nombre des donneurs prélevés par saison est de : 590/2515 (23,5%, IC 95%: 21,8 – 25,2%) en GSP ; 410/2515 (16,3%, IC 95%: 14,9 - 17,8%) en PSS ; 630/2515 (25,0%, IC 95%: 24,4 – 26,8%) en PSP, et en fin 885/2515 (35,2%, ICI 95%: 33,3 – 37,1%) en GSS.

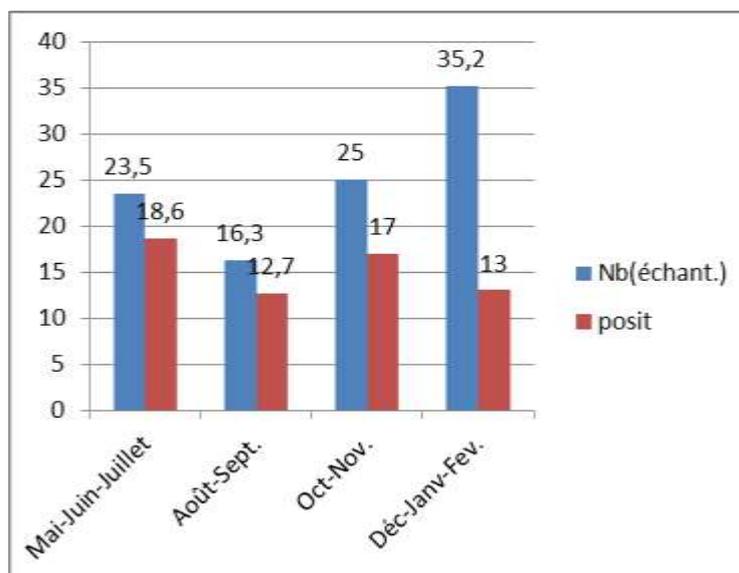


Figure 14a : Distribution des donneurs (Nb = Nombre d'échantillon) et prévalence (posit = positif) du paludisme asymptomatique par saison selon la microscopie au sud du Bénin.

3.1.1.2 Répartition des donneurs selon l'âge et le sexe

Nos données ont été recueillies sur la base d'une fiche d'enquête (annexe1). La répartition des donneurs selon l'âge et le sexe montre que ce sont les jeunes de 25 à 40 ans qui sont les plus représentés (54,83 %). L'âge médian est de 31 ± 9 ans. Les donneurs de sexe masculin sont plus nombreux que ceux de sexe féminin soit respectivement, 2027/2515 (80,60%, CI 95% 79,0-82,1%)

d'hommes contre 488 femmes, 488/2515 (19.40%, CI 95%: 17.9-21.0%) (Tableau III). Les hommes sont également les plus parasités soit 12,43 %. (Tableau IV) P < 0,05. Le tableau V nous renseigne que la température corporelle de la plupart des donneurs parasités (80 %) est comprise entre 37°C et 37,5°C.

Tableau III: Répartition des donneurs selon le sexe et l'âge

SEXE	Masculin	%	Féminin	%	Total
AGE					
[18-25[441		157		598
[25-40 [1146		233		1379 (54,83 %)
[40-50[311		67		378
≥ 50	129		31		160
TOTAL	2027	(80,60)	488	(19,40)	2515

Tableau IV : Répartition des donneurs parasités en fonction du sexe

PLASMODIES	Recherche positive	%
SEXE		
Masculin	252	12,43 %
Féminin	43	8,81%

3.1.1.3 Les antécédents de paludisme rapportés par les donneurs

La majorité des donneurs, 1521 soit 60,47 % [(1521/2515)(60,47%, IC 95%: 57,4 - 61.2%)] ont signalé avoir souffert d'épisodes de paludisme dans l'année. L'expression clinique prédominante de ces antécédents de paludisme a été représentée par un accès simple rapporté par 1387 donneurs soit 55,1 % [1387/2515 (55.1%, IC 95%: 53.2 - 57.1%)] de cas et 51 donneurs soit 2,0% [51/ 2515 (2.0%, CI 95%: 1.5-2.7%)] ont déclaré un accès grave ayant nécessité une hospitalisation. Quarante trois (83) donneurs (3,3 %, IC 95 % : 2,7 – 4,1) ont fait les deux accès palustres. Neuf cent onze (911) donneurs soit 36,22% ont rapporté n'avoir pas fait un accès palustre au cours de l'année et 83 donneurs (3,33 %) ne se souvenaient pas en avoir fait. Sur les 1521 qui ont fait un accès de paludisme, un traitement antipaludéen a été administré chez 509/1521 (33,46 %) dans un centre de santé et 1012/1521 (66,53 %) ont été traités en ambulatoire.

3.1.1.4 Mesures de préventions utilisées par les donneurs

La plupart des donneurs n'ont pas fait de la chimioprophylaxie mais ont pris des médicaments ou des tisanes à titre curatifs lorsqu'ils ont senti des signes du paludisme. Soixante et un virgule un pour cent (61,11 %) 1537/2515 des donneurs ont l'habitude de se traiter avec la quinine (22,5 %) 567/2515, CTA (20,3 %) 510/2515, tisane (13,4 %) 336/2515 et Fansidar® (4,9 %) 124/2515.

La prévention par moustiquaire imprégnée a été une pratique courante chez les donneurs enquêtés et 1983 donneurs soit 78,84% d'entre eux ont déclaré dormir sous moustiquaire sous moustiquaire.

3.1.2 Prévalence du paludisme asymptomatique selon les résultats de la goutte épaisse (GE) et de l'étalement mince.

Le taux de portage asymptomatique du *Plasmodium* était de 295/2515 (11,72 %, IC 95 %: 10,5 – 13,1 %). Trois espèces de *Plasmodium* ont été diagnostiquées : *Plasmodium falciparum* 95,0 %, *Plasmodium malariae* 5,0 % et *Plasmodium ovale* 0,34 % (Tableau VI). L'espèce *P. falciparum* a été retrouvée chez tous les donneurs (295) positifs à la GE. 15/195 soit 5,10 % donneurs avaient des infections mixtes dans une proportion de : (*P. falciparum*, *P. malariae*) 14/295 soit 5,0 % et (*P. falciparum*, *P. ovale*) 1/295 soit 0,34% (Tableau V). La densité parasitaire de *P. falciparum* est très faible et variable chez les donneurs $P < 0,05$. Quarante trois virgule soixante sept pour cent (80,67 %) 238/295 des donneurs ont une parasitémie comprise entre 7 et 100 parasites par microlitre de sang et 0,3 % ont une densité supérieure à 5000 p/μL (Tableau VII).

Tableau V : Récapitulatif des résultats GE/frottis sanguin

Période de prélèvement	Nb donneurs positifs/Nb donneurs (N =2515)	Taux de Positivité (%)	Prévalence des espèces (N= 295) P < 0,05
GSP (Mai-Juin-Juillet)	67/590	11,4	<i>P.falciparum</i> (64/67) 95,52% <i>*P.malariae</i> (3/67) 4,47%
PSS (Août-Septembre)	48/410	11,7	<i>P.falciparum</i> (45/48) 93,75% <i>*P.malariae</i> (3/48) 6,25%
PSP (Octobre-Novembre)	100/630	16,0	<i>P.falciparum</i> (96/100) 96,0% <i>*P.malariae</i> (3/100) 3,0% <i>*P.ovale</i> (1/100) 1,0%
GSS (Décembre-Janvier-Février)	80/885	9,0	<i>P.falciparum</i> (75/79) 93,75% <i>*P.malariae</i> (5/80) 6,25%
TOTAL	295/2515	11,72	<i>P.falciparum</i> (280/295) 95,0% <i>*P.malariae</i> (14/295) 5,0% <i>*P.ovale</i> (1/295) 0,34% Infections mixtes (15/295) 5,10%

*Infections mixtes

Tableau VI : Variation de la parasitémie chez les 295 donneurs positifs en Goutte épaisse

Parasites / μ L	Fréquence	Pourcentage (%)
7 - 100	238	80,67
101 - 500	47	15,93
5001 - 5000	9	3,05
> 5000	1	0,3
Total	295	100

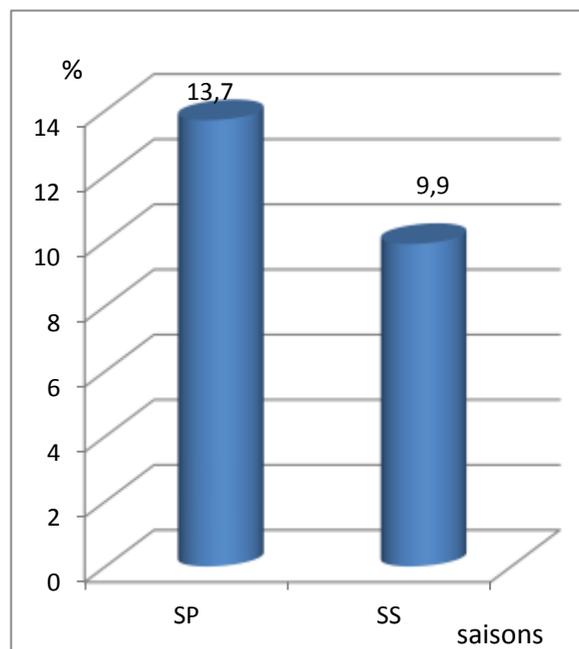
P < 0,05

Tableau VII : Espèces plasmodiales identifiées

Espèces	Nombre donneurs infectés	Pourcentage
<i>P. falciparum</i>	280	95
<i>P. malariae</i>	14	5
<i>P. ovale</i>	1	0,34
Total	295	100

3.1.2.1 Variation de la transmission des espèces plasmodiales selon les saisons

Pendant la saison des pluies (SP) c'est à dire GSP+PSP, pour un total de 1220 donneurs testés en GE, 167 sont porteurs de Plasmodium soit une prévalence de 167/1220 (13,7 %), tandis qu'en saison sèche (SS = PSS+GSS) 128 tests sont positifs sur 1295 réalisés, soit un taux de 9,9 % (Figure 14b). Cette transmission de *Plasmodium* varie selon les espèces et reste constante pour l'espèce *falciparum* durant toutes les saisons tandis que la fréquence de *P. malariae* s'observe surtout pendant la grande saison sèche $P < 0,05$ (Tableau V).



$P < 0,05$

Figure 14b: Prévalence du paludisme asymptomatique selon la microscopie pendant la saison pluvieuse (SP) et la saison sèche (SS) chez les donneurs de sang au sud du Bénin

3.1.3 Prévalence des anticorps et de l'antigène pLDH du Plasmodium

La recherche des anticorps anti-*Plasmodium* par la technique ELISA anticorps chez 2515 donneurs a révélé un taux de positivité (index Ac ≥ 1) très élevé avec une prévalence de 74,0 % [1861/2515(74,0 %, IC 95 %: 72,3 - 75,7 %)]. L'équivoque (index Ac entre 0,8 et 1) portait sur 327/2515 échantillons, soit une prévalence de 13 %. Trois cent vingt et sept (327) donneurs avaient leurs résultats négatifs (index Ac $< 0,8$) soit une prévalence de 13,0 % [(13,0%, IC 95%: 11,7 -14,4 %)]. Les taux d'anticorps observés par saison se répartissaient comme suit : 76,9 % pour les mois de Mai – Juin - Juillet; 70,2 pour les mois d'Août à Septembre; 58,6 % pour les mois d'octobre - Novembre et 84,7 % pour les mois de Décembre à Février. Nous avons constaté une variation significative du taux d'anticorps par rapport aux saisons chez les donneurs de sang au sud du Bénin ($X^2 = 152,52$ df = 6, $P < 0,001$). La présence de l'antigène pLDH a été retrouvée chez 965 donneurs sur les 2515 échantillons testés avec la technique de « apDia Antigen ELISA » représentant une prévalence de 38,36% [(965/2515) IC 95 %: 36.5 - 40.3%). Un résultat douteux a été observé chez 81 donneurs de sang soit environ 4,2 %. Les taux d'antigène observés par saisons sont : 142/590(24,1 %) pour les mois de Mai–Juin-Juillet ; 206/410 (50,2 %) pour les mois d'Août à Septembre; 323/630 (51,3 %) pour les mois d'octobre - Novembre et 294/885 (33,2 %) pour les mois de Décembre à Février. Il y a une différence statistiquement significative dans la distribution des taux d'antigène chez les donneurs au sud du Bénin ($X^2 = 368,57$ df = 6, $P < 0,05$) (Tableau VIII). Sur un total de 2515 donneurs testés par les deux techniques, 1861 résultats sont positifs en anticorps et 965 le sont également en antigène. La proportion de présence à la fois d'anticorps et d'antigène dans les échantillons était de 744/965(77,1 %) et aucune différence statistique n'a été observée entre la présence d'anticorps et présence d'antigène ($X^2 = 8,77$ df = 4, $P = 0,06$) (Tableau IX).

Tableau VIII: Taux de positivité par saison de l'ELISA pLDH et ELISA anticorps dans la détection de *Plasmodium* chez les donneurs de sang.

		SAISONS				
		GSP	PSS	PSP	GSS	
ELISA	POSIT	142	206	323	294	965
pLDH		(24,1%)	(50,2%)	(51,3%)	(33,2%)	(38,4%)
ELISA	POSIT	454	288	369	750	1861
antibody test		(76,9%)	(70,2%)	(58,6%)	(84,7%)	(74,0%)

Tableau IX: Etude comparative des résultats de l'ELISA pLDH et l'ELISA anticorps dans le dépistage du paludisme asymptomatique chez les donneurs de sang

		ELISA pLDH			
		Positif	Douteux	Négatif	TOTAL
ELISA	Positif	744	440	677	1861
Anticorps	Douteux	109	93	125	327
	Négatif	112	87	128	327
	TOTAL	965	620	930	2515

Chi-square = 8.7746, df = 4, P = 0,0670.

Sur un total de 2515 donneurs testés, 295 sont positifs à la goutte épaisse contre 965 à l'ELISA pLDH ce qui correspond respectivement à une sensibilité clinique de 11,72 % (295/2515) (IC 95 %: 10,5 – 13,1 %) et de 38,40 % (965/2515) (IC 95 %: 36,5 – 40,3 %) chez les donneurs de sang pour la goutte épaisse et l'ELISA pLDH . Dans la même série, 2220 tests sont révélés négatifs à la goutte épaisse tandis qu'on observe 930 négatifs à l'ELISA pLDH ce qui correspond respectivement à une spécificité clinique de 88,27 % (2220/2515) (IC 95 %: 87,0 – 89,5 %) et 37,0 % (930/2515) (IC 95 %: 35,1 – 38,9 %) pour la goutte épaisse et l'ELISA pLDH. Il existe statistiquement une différence significative entre les résultats de la goutte épaisse et de l'ELISA pLDH ($X^2 = 261,70$, $df = 2$, $P < 0,05$) Tableau Xa. Le taux de positivité en pLDH confirmé par la goutte épaisse est de 231/965 (23,93). Le seul échantillon positif en goutte épaisse mais négatif en ELISA pLDH soit 1/930 (0,1 %) est une infection mixte à prédominance *Plasmodium malariae*. La présence concomitante d'anticorps et de parasites a été observée dans une proportion de 230/1861(12,4 %) tandis que le taux de positivité en parasites sans présence d'anticorps était de 230/295 (78,0 %) Tableau Xb.

Tableau Xa: Résultats comparatifs de la goutte épaisse et de l'ELISA pLDH dans le diagnostic du paludisme asymptomatique chez les donneurs de sang au sud du Bénin

		ELISA pLDH			
		Positif	Douteux	Négatif	TOTAL
Microscopie	Positif	231	63	1	295
	Négatif	734	557	929	2220
	TOTAL	965	620	930	2515

Chi-square = 261,7080, $df = 2$, $P = 0,0001$.

Tableau Xb: Résultats comparatifs de la goutte épaisse et de l'ELISA anticorps dans le diagnostic du paludisme asymptomatique chez les donneurs de sang au sud du Bénin

		Ac pos	Ac ng	Total
Ag pos.		209	41	250
Ag ng.		11	5*	16
Total		220	46	266

		ELISA Anticorps			
		Positif	Douteux	Négatif	TOTAL
Microscopie	Positif	230	34	31	295
	Négatif	1631	293	296	2220
	TOTAL	1861	327	327	2515

Chi-square = 2.8704, df = 2, P = 0,2381.

3.1.4 Performance diagnostique comparée des trois techniques : microscopie, ELISA-pLDH et ELISA-anticorps

En prenant la microscopie comme technique de référence nous constatons que l'ELISA-pLDH donne assez de faux négatifs pendant la grande saison des pluies et la petite saison des pluies. Les résultats de l'ELISA-pLDH sont concordants avec ceux de la microscopie pendant la petite saison sèche et la grande saison sèche. Le taux d'anticorps est très élevé pendant la grande saison des pluies et la grande saison sèche (Figure 15). Il y a une différence significative $P > 0,05$ entre le taux d'anticorps et celui de l'antigène pLDH pendant la grande saison des pluies et la petite saison de pluies. Cependant cette microscopie n'est pas indiquée en zone d'endémie palustre

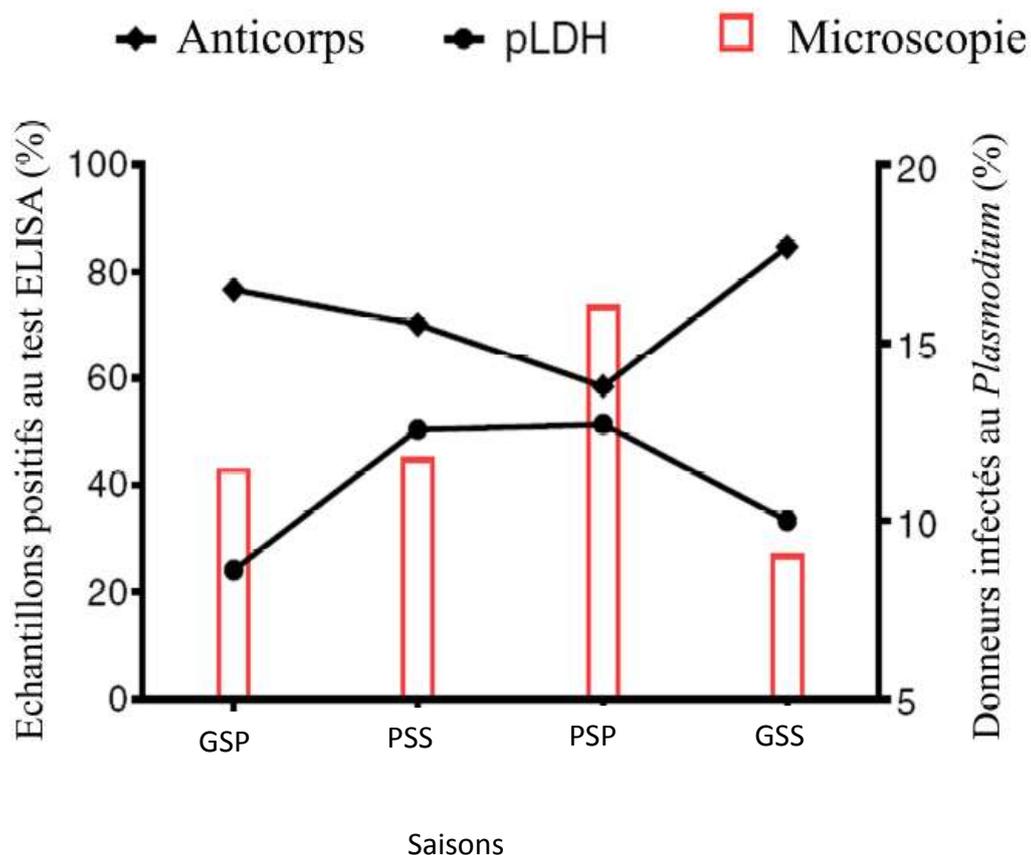


Figure 15: Prévalence comparée du paludisme asymptomatique chez les donneurs de sang béninois (n= 2515) selon les résultats de la microscopie, de ELISA-pLDH et ELISA-anticorps, durant les 4 saisons : Mai à Juillet 590/2515 (GSP), Août à Septembre 409/2515 (PSS), d’Octobre à Novembre 630/2515 (PSP) et de Décembre à Février 886/2515 (GSS).

3.1.5 Calcul de la Sensibilité (Se) et de la Spécificité (Sp) de l’ELISA-pLDH

Sur 266 malades de paludisme confirmés par la microscopie, l’ELISA-pLDH a détecté 250 cas soit une sensibilité de 94%, les résultats douteux sont considérés comme positifs pour le calcul. Neuf (9) cas infectés par *P.falciparum* sont négatifs dont 5 ont été traités avant l’examen du sang.

Les 4 restants n'ont fourni aucune information. Sept (7) cas de *P. ovale* n'ont pas été diagnostiqués positifs, ce qui serait certainement dû à la limite de l'anticorps monoclonal à détecter certaines souches de *P. ovale*.

◆ **Résultats comparés d'ELISA-pLDH(Ag) et ELISA-Anticorps(Ac)**

L'ELISA-anticorps est positifs chez 220 patients (Tableau XI). Les deux tests combinés ont révélé 261 cas positifs et sont négatifs chez 5 patients infectés par *P.falciparum* qui ont certainement pris d'antipaludique et 4 infectés par *P. ovale* (Tableau XII). La Spécificité par rapport au risque de la transmission du paludisme chez les "donneurs à risque" et les "non à risque" était respectivement de 99,6 et 99,5 %, avec une spécificité globale de 99,57 %. La valeur prédictive positive (VPP) et la valeur prédictive négative (VPN) de l'ELISA-pLDH, étaient respectivement de 94,3 % et 99,5 %.

Tableau XI : Résultats comparés d'ELISA-pLDH(Ag) et ELISA-Anticorps(Ac) dans une population de 266 paludéens confirmés par la microscopie (n= 266)

	Ac pos	Ac ng	Total
Ag pos.	209	41	250
Ag ng.	11	5*	16
Total	220	46	266

* 1 cas de *P. falciparum* et 4 cas de *P. ovale* traités avant le diagnostic parasitologique

3.1.5.1 Déteçtabilité de l'ELISA pLDH

Le seuil de détection des parasites par la microscopie et l'ELISA pLDH est calculé en utilisant une gamme de globules rouges infectés (iRBCs) et de pLDH recombinante (rpLDH). La parasitémie a été calculée sur des dilutions située entre 24,676 iRBCs/ μ L et 0,0005 iRBCs/ μ L (valeur extrapolée). L'établissement d'une droite de régression linéaire a permis d'identifier un coefficient de corrélation de 0,977. La limite de détection était de 1 parasite/ μ L pour ELISA pLDH, ce qui correspond à 0,08 ng/ml de rpLDH. Le seuil de détection avec la courbe standard utilisant rpLDH était de 0,125 ng/ml, la courbe étant linéaire jusqu'à 2,5 ng/ml (Figure 16 et tableau XIII).

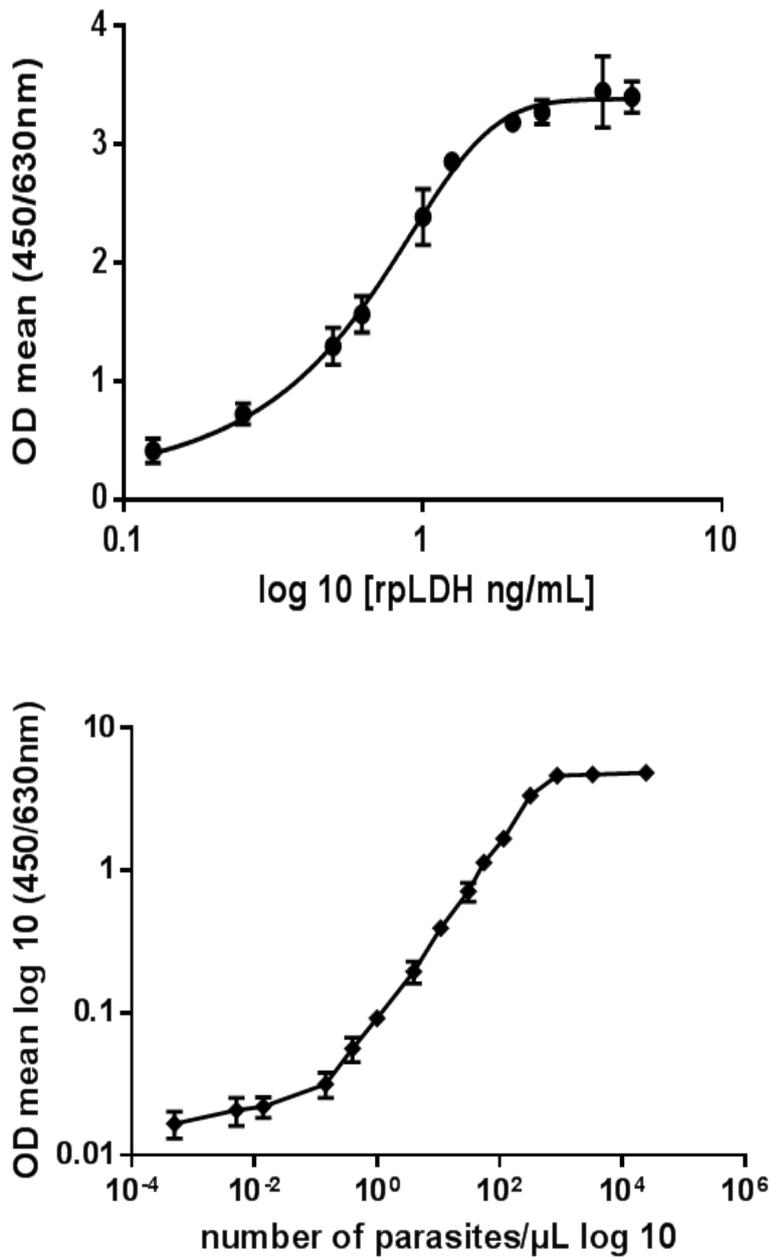


Figure 16 : Détectabilité de pLDH de *P.falciparum* et de pLDH recombinant

Courbe standard pour une série de 10 tests pour rpLDH et de 15 essais pour hématies infectées par *P.falciparum* (P.f iRBCs). La détectabilité était de 2,5 ng/mL pour rpLDH et de 1 parasite par microlitre pour iRBCs.

Tableau XII : Déteçtabilité de ELISA-pLDH évaluée avec rpLDH et des globules rouges infectés par *P.falciparum* (*Pf* iRBCs)

A

rpLDH ng/mL	INDEX	SD
0	0,335	0,071
0,125	1,465	0,365
0,25	2,650	0,312
0,50	4,595	0,553
0,625	5,550	0,550
1	8,464	0,830
1,25	10,129	0,149
2	11,299	0,145
2,50	11,607	0,358
4	12,11	1,067
5	12,057	0,461

B

PARASITE/ μ L	INDEX	SD
0	0,194	0,061
0,0005	0,165	0,036
0,0051	0,205	0,045
0,0141	0,217	0,036
0,1455	0,312	0,064
0,4	0,556	0,110
1	0,908	0,100
4	1,922	0,335
11	3,886	0,310
31	7,017	1,073
56	11,227	1,000
117	16,523	1,609
319	33,032	3,073
872	45,664	2,435
3,298	46,396	2,353
24,676	47,630	2,444

3.1.6 Evaluation des protéines recombinantes

Les tests ELISA (l'ELISA-Ac avec Ag natif de *P.falciparum* NatELISA et ELISA-Ac avec des protéines recombinantes RecELISA) ont été réalisés sur 1358 donneurs (290 positifs et 1068 négatifs) générés par le hasard. Les résultats de l'ELISA-Ac avec Ag natif ont donné une séroprévalence de 1161/1358 (85,49 %) contre 1343/1358 (98,89 %) pour ELISA-Ac avec des protéines recombinantes. Mille cent cinquante et huit (1158) échantillons sont positifs à la fois aux deux ELISA (Tableau XIII) soit une séroprévalence de 85,27 % observée dans la population des donneurs de sang au Sud du Bénin.

La capacité de détection des espèces plasmodiales par la microscopie et ELISA-pLDH sont presque identiques soit respectivement 274 et 273 cas diagnostiqués $P > 0,05$. La détection d'anticorps spécifique à chaque espèce de *Plasmodium* (Tableau XIV) montre la suprématie des recombinants *PfMSP1+AMA1* (ELISA-Ac Rec. *PfMSP1+AMA1*) soit un pourcentage de 268/290 (92,41 %) contre 247/290 (85,17 %) pour l'antigène total (ELISA-Ac (Ag tot. *Pf*) $P < 0,05$.

Le taux de séroprévalence du paludisme à base de marqueurs recombinants et de l'antigène native chez les donneurs de sang au sud du Bénin, montre que les marqueurs Rec. *PfMSP1+AMA1* sont les plus immunogènes avec un taux de positivité de 94,6 % (Figure 17). Le sérodiagnostic comparé du paludisme selon ELISA-antigène total et ELISA à base de marqueurs moléculaires durant les 4 saisons montre un pic d'anticorps anti pLDH en SRS et traduit ainsi une saison de forte transmission du paludisme. Par contre, les taux d'anticorps contre les espèces *P. ovale* et *P. malariae* atteignent leur maximum en GSS. (Figure 18). Le taux de prévalence des anticorps anti-plasmodium varie avec une différence significative pendant les saisons $P < 0,05$. [164].

Tableau XIII : Résultats comparés de l'ELISA-Ac (Ag natif de *P.falciparum*) et ELISA à base des marqueurs recombinants (rec. *Pf+Pm+Po*) chez les donneurs de sang béninois (n = 1358)

	rec. ELISA positif total	rec. ELISA négatif total	Total
Ag natif <i>Pf</i> ELISA pos	1158	3	1161
Ag natif <i>Pf</i> ELISA neg	1185	12	1197
Total	1343	15	1358

Tableau XIV : Répartitions de la prévalence des trois espèces et associations d'espèces plasmodiales chez les donneurs de sang béninois, selon le marqueur moléculaire et la technique utilisée (n = 290 positifs divisés en 274 *P. f.*, 1 *P. f.* + *P. o* et 15 *P. f.* + *P. m.*) et des donneurs négatifs (n = 1068) identifiés par microscopie.

Techniques Espèces	Microscopie	ELISA- pLDH	ELISA-Ac (Ag tot. <i>Pf</i>)	ELISA-Ac (Rec. <i>Pf</i> MSP1+A MA1)	ELISA-Ac (Rec. <i>Po</i> MSP1)	ELISA-Ac (Rec. <i>Pm</i>) MSP1	ELISA-Ac (Rec. <i>Sp</i>)
<i>P.falciparum</i>	274	273	247	268	186	219	273
<i>P. ovale</i> + <i>P.f</i>	1	1	0	1	0	0	1
<i>P. malariae</i> + <i>P.f</i>	15	15	12	15	11	12	15
Négatif	1068	708	902	1001	595	703	1054
Total	1358	997	1161	1285	792	934	1343

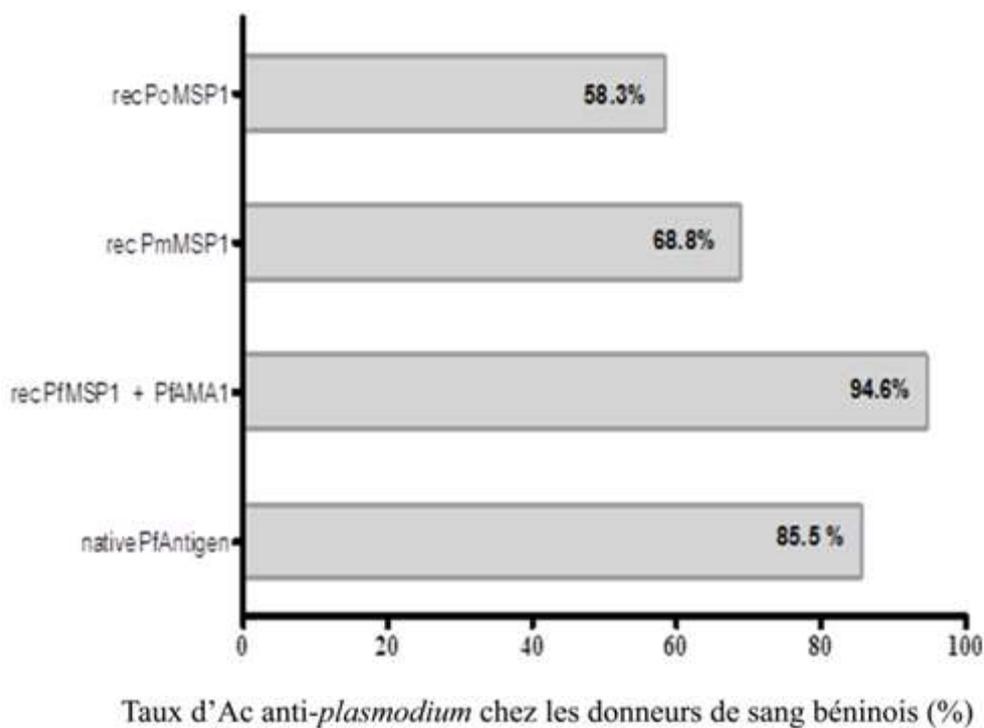


Figure 17: Taux de séroprévalence du paludisme à base de marqueurs recombinants et de l'antigène natif chez les donneurs de sang au sud du Bénin.

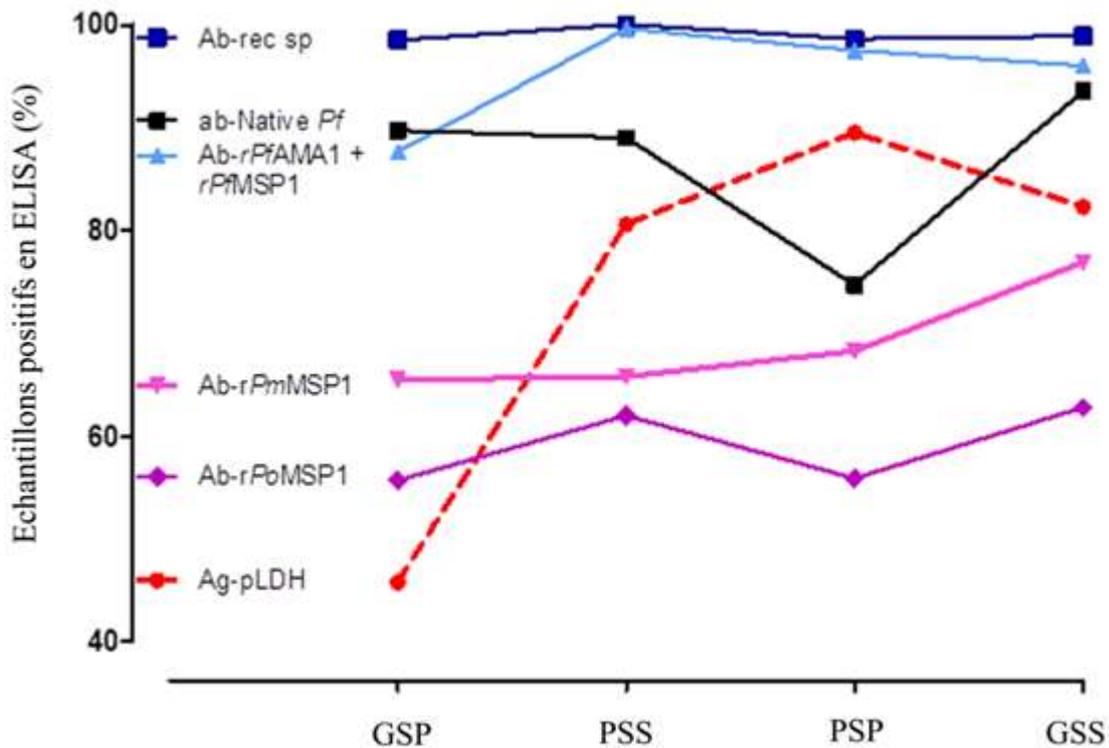


Figure 18: Evolution saisonnière de la séroprévalence à base de NatELISA et RecELISA

(rPfMSP1+ rPfAMA1, rPoMSP1 et rPmMSP1) chez les donneurs de sang au Sud du Bénin.

LRS (Long raining season), SDS (Short dry season), SRS (Short raining season), LDS (Long dry season)

3.1.7 Prévalence des mutations associées à la résistance de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine et à la sulfadoxine-pyriméthamine

La fréquence des mutations des gènes associés à la résistance du *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques et les combinaisons de ces différentes mutations ont été déterminées. Les médicaments usuels concernés sont la chloroquine, la pyriméthamine et la sulfadoxine. Le profil génétique de 98 isolats de *Plasmodium* retrouvés chez 98 donneurs positifs à la microscopie (généré par le hasard), a été réalisé. Les gènes *pfprt* et *pfmdr1* (associés à la résistance à la chloroquine) ont montré respectivement 70,41% (95 % CI : 61,21-79,60) de mutations pour le codon 76 *Pfprt* et 57,14% (95 % CI : 47,17-67,12) pour le codon 86 *Pfmdr1*. Le taux de mutations observées pour le

codon 108 du gène Pfdhfr associé à la résistance à la pyriméthamine et de 74,49% (95 % CI : 65,71-83,27). Pour le gène Pfdhps associé à la résistance à la sulfadoxine, 83,67 % (95 % CI : 76,23-91,12) de mutations ont été observées pour le codon 437 (Tableau XV). Le taux de triples mutations Pfdhfr-51/59/108 observée a été de 34,69 %.

Tableau XV : Prévalence des mutations associées à la résistance de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine, pyriméthamine et sulfadoxine (n= 98)

	Gène locus	Nombre	Mutation (%)
Chloroquine	Pfcrt-76	69	70,41
	Pfmdr 1-86	56	57,14
	Pfcrt/Pfmdr1	45	45,92
Pyriméthamine	Pfdhfr- 51	59	60,20
	Pfdhfr-59	68	69,39
	Pfdhfr-108	73	74,49
	Pfdhfr-51/59/108	34	34,69
Sulfadoxine	Pfdhps-437	82	83,67
	Pfdhps-540	0	0
	Pfdhps-437/540	0	0

DISCUSSION

Notre étude a porté sur 2515 donneurs de sang prélevés dans les CDTS au sud du Bénin (Atlantique-Littoral, Ouémé-Plateau et Mono-Couffo). Ces six départements présentent un climat de type équatorial humide à deux saisons pluvieuses et deux saisons sèches. Selon les résultats des trois techniques utilisées, la transmission du paludisme se fait de façon permanente avec une recrudescence pendant les saisons des pluies [10]. Les espèces les plus transmises sont *Plasmodium falciparum* (97,10%) et *Plasmodium malariae* 2,00% d'après [8,138]. Ces résultats sont proches des nôtres, soit 95 % pour *Plasmodium falciparum*, et 5 % pour *Plasmodium malariae*. La prévalence globale de portage asymptomatique du *Plasmodium* dans notre étude est de 11,72% en microscopie. Nos résultats sont largement supérieurs à ceux rapportés par Erhabor au Nigéria (10,32 %) [139], Owusu-Ofori au Ghana (10,2 %) [124] mais différents de Carme au Congo (8,5 %)[140] et Ali au Soudan (21 %) [141] qui ont rapporté respectivement des taux de prévalence de 10,2% ; 10,20% ; 8,5% et 21 % ; Une étude réalisée au Bénin en début de grande saison de pluies, a rapporté un taux de prévalence de 33,5% [126]. Ce résultat est proche du taux de 23,36 % que nous avons obtenu lorsque nous prenons uniquement en compte les résultats de cette étude pendant cette même période de début des saisons des pluies. D'autres auteurs ont rapporté des taux de prévalence beaucoup plus élevés : Guiguemde et collègue au Burkina Faso [142] ; Okocha et collègue au Nigéria [130]; Epidi et et collègue au Nigéria [143] ont trouvé respectivement des taux de prévalence de 50,7% ; 55% ; et 51,5%. L'étude a montré que les hommes étaient plus parasités comparativement aux femmes (12,43 % vs 8,81 % $P < 0,05$). Une étude menée par Bonilla en 1993 en Colombie [144], a également montré que les hommes étaient plus parasités que les femmes soit respectivement 59 % contre 41 % $P < 0,05$. Cependant dans une publication en 1994, Vlassoff et collègue ont observé plus de femmes ghanéennes infectées que les hommes ghanéens [145].

P. falciparum a été identifié dans tous les 295 échantillons positifs dont 5,0 % d'infections mixtes (*P. falciparum* ; *P. malariae*). Uneke et collègue ont observé la même situation au Sud-est du Nigéria en 2006 avec 2,3 % d'infections mixtes [146].

Nous avons utilisé dans cette étude un Kit commercial Elisa *Plasmodium* LDH pour la recherche de l'antigène pLDH de *Plasmodium*. La technique a montré des valeurs intrinsèques de performance très remarquables (VPP = 94,3 % et VPN= 99,5 %). Elle a montré une capacité de détection de 1 parasite par μL qui est l'un des seuils de parasitémie les plus faibles observés en Elisa. Ce seuil de détection est meilleur à celui des TDR qui est de 50 parasites par μL [147]. En Elisa HRP2 le seuil est à peu près de 11,7 parasites par μL avec une concentration de 6 ng/ml de

recombinant PfHRP2 [148]. Cette Elisa pLDH a été positive dans une proportion de 38,40 %. Le pourcentage de résultats douteux est d'environ 4.2%. Nos résultats de détection de l'antigène pLDH diffèrent de ceux trouvés par Diop *et al* au Sénégal qui ont rapporté 0,53% de taux de détection de pLDH et 2,23% de cas douteux [19]. La technique n'a pas pu diagnostiquer des cas d'infection à *P. ovale* ce qui serait dû à l'incapacité de l'anticorps monoclonal à identifier certaines souches de *P. ovale* [149].

La recherche d'anticorps de *Plasmodium* avant transfusion est systématique en zones non endémiques de paludisme et inutile en zones où sévit le paludisme. Cependant, nous avons évalué la séroprévalence du paludisme dans le cadre de cette étude chez les donneurs de sang béninois car aucune des techniques actuellement disponibles ne distinguent correctement les autres espèces plasmodiales (*P. ovale*, *P. malariae*). La séroprévalence (présence d'anticorps anti-*Plasmodium*) confirmée par la technique ELISA-Ac avec l'antigène natif était de 74 % toutes espèces confondues. L'équivoque portait sur 327 échantillons soit 13%. Cette séroprévalence est proche de celle trouvée par Diop *et al.* (2009) au Sénégal. En utilisant des protéines recombinantes (ELISA-Ac Rec. PfMSP1+AMA1, rec PmMSP1, rec PoMSP1) nous avons observé une surprenante séroprévalence élevée (58 %, 68,8 % et 94,6 %) respectivement pour rPoMSP1, rPmMSP1 et Rec. PfMSP1+AMA1. Devant une telle sérologie nous pouvons répondre par l'affirmative à une importante question posée par Drakeley et Cook en 2006 nous citons « La sérologie est-elle utile pendant la phase d'élimination ou de pré-élimination du paludisme [150]?

Nos travaux ont montré que le risque de transmission de *Plasmodium* par la transfusion sanguine existe au Bénin car les hématozoaires de *Plasmodium malariae* 5 % et *P. ovale* 0,34% identifiés au cours de notre étude, peuvent persister trois ans et plus chez les receveurs avant de provoquer le paludisme selon des auteurs [122,139]. Le risque le plus évident est aussi dû à la survie du *Plasmodium* à une température comprise entre 2 et 6°C au sein de l'hématie infectée, pendant des jours voir des semaines [7, 68,151]. Cela soutient l'idée de certains auteurs qui ont déjà préconisé l'introduction d'un dépistage du *Plasmodium* sur les dons de sang en Afrique, [19,152] surtout que le diagnostic d'accès palustre post-transfusionnel n'est pas aisé et est souvent difficile à élucider [153]. Nous rapportons ici un cas de paludisme post-transfusionnel chez un garçon de 14 ans à Madagascar.

L'influence des différentes saisons sur la transmission du paludisme chez les donneurs de sang béninois montrait que la transmission était quasi constante durant toutes les saisons de l'année pour *Plasmodium falciparum* tandis que *Plasmodium malariae* est surtout transmis en début de saison pluvieuse et petite saison pluvieuse $P < 0,05$. La densité parasitaire variait de 7 à 100 parasites par μL . Même si la gravité du paludisme transfusionnel n'est pas nécessairement liée à la densité

parasitaire, les densités obtenues lors de cette étude devraient être prises au sérieux puisqu' une parasitémie de 100 parasites par microlitre, considérée comme faible, représente chez un receveur transfusé avec 500 ml de sang, un inoculum d'environ 50 000 000 parasites souvent pathogènes chez l'homme. L'automédication était pratiquée par les donneurs dans une proportion de 4,81%. La parasitémie était significativement plus forte ($p < 0.05$) chez les donneurs qui pratiquaient l'automédication comparée à ceux qui ne pratiquaient pas.

Dans le cadre de la sécurisation des transfusions sanguines, l'Elisa *Plasmodium* LDH est un excellent outil de qualification des poches de sang en Zone d'endémie palustre. Il serait alors possible d'exiger des poches de sang exemptes de *Plasmodium* pour le nouveau-né surtout de faible poids, les malades immunodéprimés et les femmes enceintes candidats à la transfusion sanguine.

Les antigènes recombinants ont été utilisés pour évaluer la séroprévalence chez les donneurs de sang béninois. Les résultats observés à partir de la figure 17, montre que l'utilisation de l'antigène *Pf* Natif total a sous estimé la séroprévalence. Cependant cette séroprévalence reflète l'exposition de la population des donneurs au paludisme [162]. Cette exposition varie de saison en saison et d'année en année. La séroprévalence pourra jouer un grand rôle en épidémiologie d'élimination ou de pré-élimination du paludisme après la découverte d'un vaccin contre le paludisme [150,164].

Les résultats de génotypage des gènes ont montré une fréquence élevée de mutation au sein de notre population d'étude sept ans après le changement de politique de prise en charge du paludisme au Bénin. La fréquence des mutations des codons des gènes impliqués dans la résistance de *P.falciparum* est de 70,41 % de mutation Thr-76 et 57,14 % de mutation Tyr-86 pour respectivement les gènes *Pfcr1* et *Pfmdr 1*. Nous n'avons pas observé sur les isolats des donneurs béninois de mutation de codon 540 du gène *dhps*. Ces mêmes observations ont été faites par Basco et Mayor sur des isolats des camerounais [154] et mozambicains [155]. En effet, la fréquence des gènes de résistance à la CQ diffère d'un pays à un autre en Afrique [156,154]. Ainsi, Tinto *et collègue* ont trouvé un taux beaucoup plus bas (24%) chez les burkinabé [157]. Le nombre d'isolats mutants à *dhfr* est plus élevé que ceux de la *dhps*. Le taux de triple mutation *Pfdhfr*-51/59/108 observé dans cette étude était beaucoup plus faible que celui de Moussiliou et al en 2013 qui ont trouvé au taux de 80 % [161].

Ces résultats montrent que ces donneurs béninois sont des réservoirs de souches résistantes de *P. falciparum* et seraient par conséquent de sources de risque de TPT. Ces observations supportent aussi le retrait des médicaments incriminés. Il est donc nécessaire de veiller au respect et à la bonne utilisation des antipaludiques autorisés par le PNLPA afin de réduire la propagation de la résistance.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION

La transmission du paludisme chez les donneurs de sang est très importante en saison pluvieuse. Les poches de sang infecté de *Plasmodium* peuvent transmettre le paludisme aux receveurs. C'est un problème négligé mais qui revient à l'avant-garde selon les récentes discussions faites par Allain en 2010 [158]. La microscopie et les techniques de dépistage d'anticorps ne sont pas adaptées au dépistage de masse dans les centres de transfusion sanguine des zones endémiques du paludisme. Sur la base des résultats de cette étude, la détection de l'antigène pLDH de *Plasmodium* par ELISA pourrait être un outil intéressant pour la qualification des poches de sang en vue d'assurer la sécurité transfusionnelle vis-à-vis du paludisme en zone d'endémie palustre. L'un des avantages du test est que les faux positifs sont exceptionnels contrairement à des tests à base de HRP2 (Protéine riche en histidine) qui peuvent donner de faux positifs deux semaines après la disparition des parasites. HRP2 peut être absent dans certain cas de paludisme. La détection de l'antigène pLDH est très efficace lorsque le parasite est présent [52]. Quelques écueils ont été observés au cours de l'étude : le test n'a pas réussi à détecter certain cas d'infection par *P.ovale* ; de même, si les donneurs ont fait de l'automédication avant le don de sang, l'infection palustre est souvent masquée et l'Elisa pLDH est faussement négative. En somme, le dépistage systématique de *P. falciparum* dans les dons de sang permettrait d'éviter de transfuser du sang infecté et d'accroître la sécurité transfusionnelle pour les bénéficiaires fragiles comme les enfants surtout prématurés, les femmes enceintes et les malades immunodéprimés. Le principal problème reste la possibilité de rejeter des dons positifs en *Plasmodium* en termes de disponibilité de sang dans les zones endémiques où les besoins de transfusion sont en augmentation. Cependant, ce dépistage de poches de sang infecté jouerait également un rôle dans les traitements inutiles chez les receveurs de sang et contribuerait à réduire la résistance du *Plasmodium*. De nos jours, les tests moléculaires de génotypage et d'étude de résistances du *Plasmodium* offrent certes une opportunité d'efficacité thérapeutique et de surveillance de la chimiorésistance de *P. falciparum* [159,160]. Malheureusement, ces tests ne peuvent se faire actuellement qu'en partenariat avec les laboratoires du Nord ou ceux de la sous région qui en ont les moyens.

PERSPECTIVES

Dans le cadre d'une détection combinée d'antigène et d'anticorps de *Plasmodium* pour la prévention du paludisme transfusionnel, le développement d'une technique immunoenzymatique combinant des anticorps monoclonaux antiLDH et anti protéines recombinantes "*Test Combo*" sera envisagé. L'évaluation multicentrique d'une telle technique comme outil de dépistage de paludisme chez les donneurs de sang dans les centres de transfusion de trois pays endémiques du paludisme peut être expérimentée. Le coût d'un tel projet ne peut se réaliser qu'en collaboration avec un laboratoire industriel avec un contrat de confidentialité

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] OMS : Organisation mondiale de la santé : **Synthèse. Rapport sur le Paludisme dans le Monde.** *World Malaria* 2009.
- [2] Guerra CA, Gikandi PW, Tatem AJ, Noor AM, Smith DL, Hay SI, Snow RW: **The Limits and Intensity of *Plasmodium falciparum* Transmission: Implications for Malaria Control and Elimination Worldwide.** *PLoS Medicine* 2008, **5**:e38.
- [3] OMS : **Le test de diagnostic rapide du paludisme peut-il aider dans la prise en charge des corps chauds en brousse ?** 4^e *Journée médicale du PHANS* 2007.
- [4] OMS: **Techniques de culture applicable aux stades érythrocytaires des parasites du paludisme :** *Bull. Org. Mond.Santé* 1973, **48**:355-372.
- [5] OMS : **La recrudescence du paludisme en Afrique subsaharienne.** *World Malaria Report* 2008.
- [6] Haider M, Arishi Al, Ibrahim S, Hifzi Al, Yousif Ishag: **Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* Malaria in an extremely premature infant.** *Annals of Saudi Medicine* 1999, 19.
- [7] Candolfi E: **[Transfusion-transmitted malaria, preventive measures] (in French).** *Transfus Clin Biol* 2005, **12**:107-113.
- [8] Akogbeto M: **[Entomological study on the malaria transmission in coastal and lagoon areas: the case of a village built on a brackish lake] (in French).** *Ann Soc Belg Med Trop* 1995, **75**:219-227.
- [9] Akogbeto M, Mondiano D, Bosman A: **Malaria transmission in the lagoon area of Cotonou, Benin.** *Parasitologia* 1992, **34**: 147-154.
- [10] Yadouleton AW, Asidi A, Djouaka RF, Braïma J, Agossou CD, Akogbeto MC: **Development of vegetable farming: a cause of the emergence of insecticide resistance in populations of *Anopheles gambiae* in urban areas of Benin.** *Malar J* 2009, **8**:103

[11] **PNLP/MS: Integreted communication plan for strengthening the fight against malaria in Benin:** Cotonou 2006.

[12] Akogbéto MC, Padonou GG, Gbénou D, Irish S, Yadouleton AW : **Bendiocarb, a potential alternative against pyrethroid resistant Anopheles gambiae in Benin, West Africa.** *Malar J* 2010, **9**: 204.

[13] Awad AS, Abdul M, Rasheed AI, Nasser Ibrahim AI, Moayad AI Onaizi, Saeed AI Kahtani, Louis Dubois : **Malaria Screening of Blood Donors in Saudi Arabia.** *Annals of Saudi Medicine* 2002, **22**:329-332.

[14] Reesink HW: **European strategies against the parasite transfusion risk. (Risque parasitaire, quelles stratégies en Europe?)**
Transfus Clin Biol 2005, **12**:1-4.

[15] Garraud O, Assal A, Pelletier B, Danic B, Kerleguer A, David B, Joussemet M, de Micco P: **Overview of revised measures to prevent malaria transmission by blood transfusion in France.** *Vox Sang* 2008, **95**:226-231.

[16] Tagny CT, Owusu-Ofori S, Mbanya D, Deneys V: **The blood donor in sub-Saharan Africa: a review.** *Transfus Med* 2010, **20**:1-10.

[17] Segbéna AY: **Situation actuelle et perspective de la transfusion sanguine au Togo.** *Transfus clin Biol* 2009, **16**:460-3

[18] Diarra A, Kouriba B, Baby M, Murphy E, Lefrère JJ: **HIV, HCV, HBV and syphilis rate of positive donations among blood donations in Mali: lower rates among volunteer blood donors.** *Transfus Clin Biol* 2009, **16**: 444-447.

[19] Diop S, Ndiaye M, Seck M, Chevalier B, Jambou R, Sarr A, Dieye TN, Toure AO, Thiam D, Diakhate L: **[Prevention of transfusion transmitted malaria in endemic area] (in French).** *Transfus Clin Biol* 2009, **16**:454-459.

- [20] Khim N, Siv S, Kim S, Mueller T, Fleischmann E, Singh B, Divis PCS, Steenkeste N, Duval L, Bouchier C, Menard S: ***Plasmodium Knowlesi* infection in Humans Cambodia 2007- 2010**. *Emerg Infect Dis* 2011, **17**:1900-1902.
- [21] Singh B, Sung LK, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, Thomas A, Conway DJ: **A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings**. *The Lancet* 2004, **363**: 1017-1024.
- [22] Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Ratnam S, Rahman HA, Conway DJ, Singh B. ***Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening**. *Clin Infect Dis* 2008, **46**:165-71.
- [23] Adl SM, Simpson AG, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, McCourt RM, Mendoza L, Moestrup O, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW, Taylor MF: **The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists**. *J Eukaryot Microbiol* 2005, **52**:399-451.
- [24] Levine ND, Corliss JO, Cox FE, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, Leedale GF, Loeblich AR, Lom J, Lynn D, Merinfeld EG, Page FC, Poljansky G, Sprague V, Vavra J, Wallace FG: **A newly revised classification of the protozoa**. *J Protozool* 1980, **27**:37-58.
- [25] Cavalier-Smith T: **Only six kingdoms of life**. *Proc Biol Sci* 2004, **271**:1251-1262.
- [26] Simpson AG, Roger AJ: **the real 'kingdoms' of eukaryotes**. *Curr Biol* 2004, **14**: 693-696.
- [27] Billker O, Miller AJ, Sinden RE: **Determination of mosquito bloodmeal pH in situ by ionselective microelectrode measurement: implications for the regulation of malarial gametogenesis** *Parasitology* 2000, **120**:547-551.
- [28] Miller LH, Dror IB, Marsh K, Doumbo OK: The pathogenic basis of malaria. *Nature* 2002, **415**:673-679.

- [29] Greenwood B: Anti-malarial drugs and the prevention of malaria in the population of malaria endemic areas *Malar J* 2010, **9**:52.
- [30] Picot s, Olliaro P, de Monbrison F, Bienvenu AL, Price RN, Ringwald P : **A systematic review and meta-analysis of evidence for correlation between molecular markers of parasite resistance and treatment outcome in falciparum malaria.** *Malar J* 2009, **8**:89.
- [31] Duraisingh MT, Cowman AF: **contribution of the pfmdr1 gene to antimalarial drug resistance.** *Acta Trop* 2005, **94**:181-190.
- [32] Marfurt J, Müller I, Sie A, Oa O, Reeder JC, Smith TA: **the usefulness of twenty-four molecular markers in predicting treatment outcome with combination therapy of amodiaquine plus sulphadoxine-pyrimethamine against falciparum malaria in Papua New Guinea.** *Malar j* 2008, **7**:61
- [33] Gardner MJ Feagin JE, Moore DJ, Rangachari K, Williamson DH, Wilson RJ: **Sequence and organization of large subunit rRNA genes from the extrachromosomal 35 kb circular DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*.** *Nucleic Acids Re* 1993 **21**:1067-1071.
- [34] Gardner MJ, Feagin JE, Moore DJ, Spencer DF, Gray MW, Williamson DH, Wilson RJ: **Organisation and expression of small subunit ribosomal RNA genes encoded by a 35-kilobase circular DNA in *Plasmodium falciparum*.** *Mol Biochem Parasitol* 1991a, **48**:77-88.
- [35] Gardner MJ, Williamson DH, Wilson RJ: **A circular DNA in malaria parasites encodes an RNA polymerase like that of prokaryotes and chloroplasts.** *Mol Biochem Parasitol* 1991b, **44**:115-123.
- [36] Wilson RJ, Denn PW, Preiser PR, Rangachari K, Roberts K, Roy AW, Strath AM, Moore DJ, Moore PW, Williamson DH: **Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*.** *J Mol Biol* 1996, **261**:155-172.
- [37] Bisanz C, Bastien O, Grando D, Jouhet J, Marechal E, Cesbron-Delauw MF: **Toxoplasma gondii acyl-lipid metabolism: de novo synthesis from apicoplast-generated fatty acids versus scavenging of host cell precursors.** *Biochem J* 2006a, **394**:197-205.

- [38] Waller RF, Fadden Mc, **The apicoplast: a review of the derived plastid of apicomplexan parasites.** *Curr Issues Mol Biol* 2005, **7**:57-79.
- [39] Dhermy D, Schrevel J, Lecomte MC: **Spectrin-based skeleton in red blood cells and malaria.** *Curr Opin Hematol* 2007, **14**:198-202.
- [40] Ralph SA, van Dooren GG, Waller R, Crawford MJ, Fraunholz MJ, Foth BJ, Tonkin CJ, Roos DS, McFadden GI: **Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast.** *Nat Rev Microbiol* 2004, **2**:203-216.
- [41] Haldar K, Mohandas N, Samuel BU, Harrison T, Hiller NL, Akompong T, Cheresh P: **Protein and lipid trafficking induced in erythrocytes infected by malaria parasites.** *Cellular Microbiology* 2002, **4**:383-395.
- [42] Cooke BM, Lingelbach K, Bannister LH, Tilley L: **Protein trafficking in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells.** *Trends Parasitol* 2004, **20**:581-589.
- [43] Makler MT, Piper RC, Milhous WK: **Lactate Dehydrogenase and the Diagnosis of Malaria.** *Parasitology Today* 1998, **14**:376-377.
- [44] Minodier P : **Dépistage du paludisme : tests rapides. (Malaria diagnosis : rapid detection tests).** *Journal de Pédiatrie et de Puériculture* 2005, **18**:386-388.
- [45] Beadle C, Long GW, McELroy PD, Maret SM, Oloo AJ, Hoffman SL: **Diagnosis of malaria by detection of Plasmodium falciparum HRP-2 antigen with a rapid dipstick antigen-capture assay.** *Lancet* 343: 564-568.
- [46] Howard RJ, Uni S, Aikawa M, Aley SB, Leech JH, Lew AM, Wellems TE, Renner J, Taylor DW: **Secretion of a malarial Histidine rich protein (pf HRP II) from *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes.** *J Cell Biol* 1986, **103**: 1269-77
- [47] Parra ME, Evans CB, Taylor DW: **Identification of *Plasmodium falciparum* Histidine-rich protein-2 in the plasma of humans with malaria.** *J. Clin. Microbiol* 1991, **29**:1629-1634

- [48] Bouchaud O, Houzé s, Longuet C, Di Piazza, Ruggieri C, Sécardin Y, Coulaud JP, Le Bras J: **Use of the PARASIGHT®-F Diagnostic Test for imported malaria in a travel clinic.** *Am. J. Trop. Med Hyg* 2000, **63**:76-79.
- [49] Moody A, Cooke HA, Gabbett E, Chiodini P: **performance of the OptiMAL malaria antigen capture dipstick for malaria diagnosis and treatment monitoring at the Hospital for Tropical Diseases, London:** *Br. J. Haematol* 2000, **109**:891-894
- [50] Murray CK, Bell D, Gasser RA, Wongsricha C: **Rapid diagnostic testing for malaria.** *Trop Med Int Health* 2003, **8**:876-883.
- [51] Harani MS, Beg MA, Khaleeq L, Adil SN, Kakepoto GN, Khurshid M: **Role of ICT malaria immunochromatographic test for rapid diagnosis of malaria.** *J Pak Med Assoc* 2006, **56**:167-171.
- [52] Makler MT, Ries JM, Williams JA, Bancroft JE, Piper RC, Gibbins BL, Hinrichs DJ: **Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity.** *Am. J Trop Med Hyg* 1993, **48**:739-741
- [53] Houzé S, Dicko BM, Le Bras J, Deloron P, Faucher JF: **PfHRP2 and PfLDH antigen detection for monitoring the efficacy of artemisinin-based combination therapy (ACT) in the treatment of uncomplicated falciparum malaria.** *Malar J* 2009, **8**:211.
- [54] Makler MT, Hinrichs DJ: **Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia.** *Am J Trop Med Hyg* 1993, **48**:205-210.
- [55] Knapps B, Hundt E, Kupper HA: ***Plasmodium falciparum* aldolase gen structure and localization.** *Mol Biochem Parasitol* 1990, **144**:1497-503.
- [56] Srivastava IK, Schmidt M, Certa U, Dobeli H, Perrin LH: **Specificity and inhibitory activity of antibodies to *Plasmodiu falciparum* aldolase.** *J Immunol* **144**: 1497-503.
- [57] Angov E, Aufiero BM, Turgeon AM, Van Handenhove M, Ockenhouse CF, Kester KE, Walsh DS, McBride JS, Dubois MC, Cohen J, Haynes JD, Eckels KH, Heppner DG, Ballou WR, Diggs CL,

Lyon JA: **Development and pre clinical analysis of a *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Proteine 1(42) malaria vaccine** *Mol Biochem Parasitol* 2003, **128**:195-204.

[58] Chitarra V, Holm I, Graham AB, Pêtres S, Longacre S: The crystal structure of C- terminal merozoite surface proteine 1 at 1.8 A resolution, a highly protective malaria vaccine candidate. *Mol Cell*, 1999 **3**:457-64.

[59] Healer J, Triglia T, Hodder AN, Gemmill AW, Cowman A: **Functional analysis of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 utilizing interspies domains.** *Infect Imm* 2005, **73**:2444-51

[60] Dutta S, Haynes JD, Barbosa A, Ware LA, Snavely JD, Moch JK, Thomas AW, Lanar DE: **Mode of action of invasion inhibitory antibodies directed against apical membrane antigen 1 of *Plasmodium falciparum*.** *Infect Immu* 2005, **73**: 2116-22

[61] Ebers GM, Stern L: **Facsimile with a partial translation.** *Papyrus Ebers*1875.

[62] Laveran A : **Nature parasitaire des accidents de l'impaludisme. Description d'un nouveau parasite trouvé dans le sang des malades atteints de fièvre palustre.** *J-B. Baillière et fils* 1881, *Paris*.

[63] Ross R: **On some peculiar pigmented cells found in two mosquitoes fed on malarial blood.** *Br Med J* 1897, **2**:1786-1788.

[64] OMS: **Entomologie du paludisme et contrôle des vecteurs : *Trans. Du paludisme*** 2003, **3**:7-8

[65] Yadouleton AW, Padonou G, Asidi A, Moirou N, Bio-Banganna S, Corbel V, N'guessan R, Gbenou D, Yacoubou I, Gazard K, Akogbeto M: **Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin.** *Malarial journal* 2010, **9**:83

[66] OMS : Organisation Mondiale de la Santé, *rapport 2011 sur le paludisme dans le monde.* **Paludisme : la mortalité baisse mais les progrès restent fragiles ;** 2011

[67] Mackinon MJ, Read AF: **Virulence in malaria: an evolutionary viewpoint.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2004, **359**:965-86.

- [68] Sazama K: **Prevention of transfusion-transmitted malaria: is it time to revisit the standards?** *Transfusion* 1991, **31**:786-788.
- [69] Alfred S, Gubb MD: **Accidental transference of the malaria Parasite in the course of Transfusion.** *Br Med J.* 1919, **2**:74-75.
- [70] Hermann B, STBIN MD: **Transmission of malaria by Transfusion: report of a case with Two acute Developments of the disease when blood from the same donor was used.** *Ana J Dischild* 1932, **44**:1048-1054.
- [71] Decourt P: **Récidive du paludisme à neuf ans de distance ; transfusion du sang : Transmission du paludisme au donneur ; danger des transfusions de sang aux colonies.** *Revue Med. Hyg. Trop.* 1931, **23**:32-37.
- [72] Jankelson IR: **Transmission of malaria through injection of whole blood.** *Jama* 1931, **97**:177.
- [73] Hoque MM, Islam MA, Begum HA, Rahman M, Rahman SM, Al Mamun MA: **Prevalence of malaria parasite among blood donors in selected hospitals of Dhaka city.** *J Dhaka Med Coll* 2008, **17**:94-97.
- [74] Puy H, Kochert F, Pautard B, Lorriaux C, Chandrenier J, Orpila J: **Auto immune hemolytic anaemia during *plasmodium falciparum* malaria in child with sickle cell disease.** *Med et maladies infectueuses* 1992, **22**: 746-748.
- [75] Semple JW, Freedman J: **Platelets and innate immunity.** *Cellular and Molecular Life Sciences* 2009, **67**: 499-511.
- [76] Dorin D, Doerig C : **Protein-kinases contrôlant la prolifération cellulaire chez *Plasmodium* : cibles moléculaires pour de nouveaux anti-paludiques ?** *Parasitol Biol* 2002, **50** : 223-6.
- [77] Mercereau-Puijalon O : **La lutte contre le paludisme à l'heure post-génomique.** *Med. Trop* 2003, **63**: 241-244.

- [78] Sangaré A, Sanogo I, Ebongo E, Meite M, Kple-Faget P, Sawadogo S, Segliena A, Ambofo V, Ohoun J, Assale G: **Contribution to the study of relationships between sickle cell disease and malaria.** *Journal Médecine d'Afrique Noire* 1990, **37**:268-273.
- [79] Flori L, Delahaye NF, Iraqi FA, Hernandez -Valladares M, Fumoux F, Rihet P: **TNF as a malaria candidate gene: polymorphism-screening and family-based association analysis of mild malaria attack and parasitemia in Burkina Faso.** *Gen Immun* 2005, **6**:472.
- [80] Falchi A, Giovani L, Vacca L, Latini V, Vona G, Varesi L: **B-globin gene cluster Haplotypes associated with B-thallossemia on Corsica Island.** *American Journal of Hematology* 2005, **78**:27-32.
- [81] *INSAE*: Enquête Démographique de Santé, **2009**.
- [82] Wang ST, Langelier C, Smith TA, Vounatsou P, Akogbeto M, Tanner M: **Rapid Urban Malaria Appraisal (RUMA) IV: Epidemiological of urban malaria in Cotonou (Benin).** *Malarial journal* 2006, **5**:45
- [83] Ministère de la Santé (Ed): In *Annuaire des statistiques sanitaires année 2006*
- [84] WHO: **Expert Committee on Malaria. Technical Report Series**, 2000 No. 892. *Geneva*
- [85] Palmer CJ, Lindo JF, Klaskala WI, Quesada JA, Kaminsky R, Baum MK, Ager AL. **Evaluation of the OptiMAL test for rapid diagnosis of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria.** *J. Clin. Microbiol* 1998, **36**:203-206.
- [86] Mharakurwa S, Shiff CJ: **Post treatment sensitivity studies with the parasight ®. Test for malaria diagnosis in Zimbabwe.** *Acta Tropica* 1997, **66**:61-67.
- [87] Cruciani M, Nardi S, Malena M, Bosco O, Serpelloni G, Mengoli C: **Systematic review of the accuracy of the parasight-F test in the diagnosis of *plasmodium falciparum*.** *Med Sci Monit* 2004, **10**:81-8.

- [88] Craig MH, Bredekamp BL, Williams CR, Rossouw EJ, Kelly VJ, Kleinschmidt I, Martineau A, Henry GF: **Field and laboratory comparative evaluation of the ten rapid malaria diagnostic tests.** *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2002, **96**:258-265.
- [89] Bharti AR, Letendre SL, Patra KP, Vinetz JM: **Malaria diagnosis by a Polymerase Chain Reaction based assay using a pooling strategy.** *Am J Trop Med Hyg* 2009, **81**:754-757.
- [90] Ndao M, Bandyayera E, Kokoskin E, Gyorkos TW, MacLean JD, Ward BJ: **Comparison of blood smear, antigen detection, and nested-PCR methods for screening refugees from regions where malaria is endemic after a malaria outbreak in Quebec Canada.** *J clin Microbiol* 2004, **42**:2694-2700.
- [91] OMS: **Evaluation of rapid diagnostic tests: malaria** 2006
- [92] David PJ, Dijk V, Gillet P, Vlieghe E, Cnops L, Van Esbroeck M, Jacob J: **Evaluation of the Palutop +4 Malaria rapid diagnostic test in a non-endemic setting** 2009, **8**:293.
- [93] Kaddouri H, Nakach S, Houzé S, Mentré F, Le Bras J: **Assessment of the drug susceptibility of *Plasmodium falciparum* clinical isolates from Africa by using a plasmodium lactate dehydrogenase immunodetection assay and an inhibitory maximum effect model for precise measurement of the 50-percent inhibitory concentration.** *Antimicrob Agents Chem other* 2006, **50**:3343-9.
- [94] Cowman AF, Berry D, Baum J: **The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood.** *Cell. JCB* 2012, **198**:961-971.
- [95] Tjitra E, Suprianto S, Dyer M, Currie BJ, Anstey NM: **Field evaluation of the ICT Malaria P.f/P.v Immunochromatographic Test for Detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in patients with a Presumptive Clinical Diagnosis of Malaria in Eastern Indonesia.** *Journal of Clinical Microbiology* 1999, **37**: 2412-2417.
- [96] Verdrager J: **Epidemiology of emergence and spread of drug-resistant falciparum malaria in Southeast Asia.** *Southeast Asian J trop Med Public health* 1986, **17**: 111-118

- [97] Hasting M, Watkins WM, Wite NJ: **The evolution of drug resistant malaria: the role of drug elimination health life.** *Philosophical transaction of the Royal Society of London Ser B* 2002, **357**:505-519.
- [98] Lim P: **Pfprt polymorphism and chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* strains isolated in Cambodia.** *Antimicrob Agents Chemother* 2003, **47**:87-94.
- [99] Chen N, Kyle DE, Pasay C, Fower EV, Baker J, Peters JM, Cheng Q: **Pfprt allelic types with two novel amino acid mutations in chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* isolates from the Philippines.** *Antimicrob Agents chemother* 2003, **47**:3500-3505.
- [100] Wootton JC, Feng X, Ferdig MT, Cooper RA, Mu J, Baruch DI, Magille AJ, Su XZ: **Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in Pf.** *Nature* 2002, **418**: 320-323.
- [101] Roper C, Pearce R, Nair S, Sharp B, Nosten F, Anderson TJ: **Intercontinental spread of pyrimethamine resistant malaria.** *Sciences* 2004, 305-1124.
- [102] Aryey F, Randrianarivelojosia M, Duchemin JB, Rakotondramarina D, Oledi A, Robert V, et al. : **Mapping of *Plasmodium falciparum* Pfprt K76T mutation: a useful strategy for controlling chloroquine resistance in Madagascar.** *J infect Dis* 2002, **185**:710-712.
- [103] WHO: **Report of the workshop on mechanisms to bring to scale the implementation of community-based interventions in the fight against malaria** 2002, Lomé.
- [104] Wu Y, Kirkman LA, Wellem TE: **Transformation of *Plasmodium falciparum* malaria parasites by homologous integration of plasmids that confer resistance to pyrimethamine.** *Proc Natl Acad US* 1996, **93**:1130-1134.
- [105] Plowe CV, Cortese JF, Djimdé A, Nwanyanwu OC, Watkins WM, Winstanley PA, Estrada-Franco JG, Mollinedo RE, Avila JC, Cespedes JL, Carter D, Doumbo OK: **Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase and epidemiologic patterns of sulfadoxine-pyrimethamine use and resistance.** *J infect Dis* 1997, 176:1590-1596.
- [106] Triglia T, Cowman AF: **Primary structure and expression of the dihydropteroate synthetase gene of *Plasmodium falciparum*.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, **91**:7149-7153.

- [107] Fidock DA, Nomura T, Talley AR: **Mutation in the *Plasmodium falciparum* digestive Vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance.** *Mol Cell* 2000, **6**:861-871.
- [108] Zhang K, Rathod PK: **Divergent regulation of dihydrofolate reductase between malaria parasite and human host.** *Science* 2002, **296**:545-547.
- [109] Lopes D, Rungsihirunrat K, Noqueira F, Seugorn A, Pedro GJ, Edo Rosário V, Cravo P: **Molecular characterization of drug-resistance *Plasmodium falciparum* from Thailand.** *Malarial Journal* 2002, **1**:12.
- [110] Triglia T, Cowman AF: **The mechanism of resistance to sulfa drugs in *Plasmodium falciparum*.** *Drug Resist Update* 1999, **2**:15-19.
- [111] Bray PG, Ridley RG, Ward SA: **Access to hematin: the basis of chloroquine resistance.** *Mol pharmacol* 1998, **54**:170-179.
- [112] Corbel V, N'Guessan R, Brengues C, Chandre F, Djogbénou L, Martin T, Akogbéto M, Hougard JM, Rowland M: **Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa.** *Acta Trop.* 2007, **101**:207-216.
- [113] Le bras J, Hatin I, Bouree P, Coco-cianci O, Garin JP, Rey M, Chamot G, Roue R: **Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Benin.** *The Lancet* 1986, **328**: 1043-1044.
- [114] Mouchet J, Carnevale P, Coosemans M, Fontenille D, Ravaonjanahary C, Richard A, Robert V: **Type of malaria in Africa.** *Cahiers santé* 1993, **3**:220-238.
- [115] Kooij TW, Janse CJ, Waters AP: ***Plasmodium* post-genomics: better the bug you know?** *Nat. Rev Microbiol* 2006, **4**:344-357.
- [116] Guerra CA, Gilandi PW, Tatem AJ, Noor AM, Smith DL, Hay SI, Snow RW : **The Limit and Intensity of *Plasmodium falciparum* Transmission : Implication for Malaria control and Elimination Worldwide.** *PLoS Medicine* 2008, **5**: 2-38.

- [117] López MC, Silva Y, Thomas MC, Garcia A, Faus MJ, Alonso P, Martinez F, Del Real G, Alonso C : **Characterization of SPf(66)n: A chimeric molecule used as a malaria vaccine.** *Vaccine* 1994, **12**:585-91.
- [118] Anders RF, Crewther PE, Edwards S, Marjetts M, Matthew ML, Pollock B, Bye D: **Immunisation with recombinant AMA-1 protects mice against infection with plasmodium chabaudi.** *Vaccine* 1998, **16**: 240-247.
- [119] Deans JA, Knight AM, Jean WC, Waters AP, Cohen S, Mitchell GH: **Vaccination Trials in rhesus monkeys with a minor, invariant Plasmodium knowlesi 66 KD merozoite antigen.** *Parasite immunol* 1988, **10**:535-552.
- [120] Pérignon JL, Druilhe P: Vaccins antipaludiques : **l'heure des paris raisonnables serait-elle venue ?** *Med Th* 2000, **6**:301-3019.
- [121] Woolsey: **Transfusion for pernicious anaemia: two cases.** *Ann Surg* 1991, **53**:132-135.
- [122] Kitchen AD, Chiodini PL: **Malaria and blood transfusion.** *Vox Sang* 2006, **90**:77-84
- [123] Doderer C, Heschung A, Guntz P, Cazenave JP, Hansmann Y, Senegas A, Pfaff AW, Abelrahman T, Candolfi E: **A new ELISA kit which uses a combination of *P. falciparum* extract and recombinant *P. vivax* antigens as an alternative to IFAT for detection of malaria antibodies.** *Malar J* 2007, **6**:19.
- [124] Owusu-Ofori AK, Parry C, Bates I: **Transfusion-transmitted malaria in countries where malaria is endemic: a review of the literature from sub-Saharan Africa.** *Clin Infect Dis* 2010, **51**:1192-1198.
- [125] Ministère de la Santé (Ed): In *Annuaire des statistiques sanitaires année 2007*
- [126] Kinde G, Oke J, Gnahoui I, Massougboji A: **[The risk of malaria transmission by blood transfusion at Cotonou, Benin].** *Sante* 2000, **10**:389-392.
- [127] Reesink HW: **European strategies against the parasite transfusion risk. (Risque parasitaire, quelles stratégies en Europe?)**

Transfus Clin Biol 2005, **12**:1-4.

[128] De Pina JJ, Garnotel E, Hance P, Vedy S, Rogier C, Morillon M : **Diagnostic du paludisme d'importation en France. (Diagnosis of imported malaria in France).** *Science Direct* 2007, **37**:710-715.

[129] OMS : **Sécurité du sang: Stratégie de la région de l'Afrique. Bureau régional de l'Afrique ;** *Brazzaville* 2002, *AFR/RC51/9 Rév. 1.*

[130] Okocha EC, Ibeh CC, Ele PU, Ibeh NC: **The prevalence of malaria parasitaemia in blood donors in a Nigerian teaching hospital.** *J Vector Borne Dis* 2005, **42**:21-24.

[131] Oduola AM, Omitowoju GO, Sowunmi A, Makler MT, Falade CO, Kyle DE, Fehintola FA, Ogundahunsi OA, Piper RC, Schuster BG, Milhous WK: ***Plasmodium falciparum*: evaluation of lactate dehydrogenase in monitoring therapeutic responses to standard antimalarial drugs in Nigeria.** *Exp Parasitol* 1997, **87**:283-289.

[132] Breman JG: **The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants and estimates of the malaria burden.** *Am J Trop Med Hyg* 2001, **64**:1-11.

[133] Trager W, Jensen JB: **Human malaria parasites in continuous culture.** *Science* 1976, **193**:673-675.

[134] Le Lievre J, Berry A, Benoît-Vicol F: **An alternative method for *Plasmodium* culture synchronization.** *Exp Parasitol* 2005, **109**:195-197.

[135] Perraut R, Guillotte M, Drame I, Diouf B, Molez JF, Tall A, Trape JF, Mercereau-Puijalon O, Spiegel A, Garraud O : Evaluation of anti-*Plasmodium falciparum* antibodies in Senegalese adults using different types of crud extracts from various strains of parasite. *Microbes Infect* 2002, **4**: 31-35.

[136] Seed CR, Cheng A, Davis TM, Bolton WW, Keller AJ, Kitchen A, Cobain TJ: The efficacy of malaria antibody enzyme immuno-assay for establishing the reinstatement status of blood donors potentially exposed to malaria. *Vox sang* 2005, **88**: 98-106.

[137] Cortese JF, Caraballo A, Contreras CE, Plowe CV: **Origin and dissemination of *Plasmodium falciparum* drug-resistance mutations in South America.** *Journal of infectious diseases* 2002, **186**:999-1006.

- [138] Carnevale P, Mouchet J: **[Vector control and malaria control] (in French)**. *Med Trop* 1990, **50**:391-398.
- [139] Erhabor O, Ok O, Awah I, Uko KE, Charles AT: **The prevalence of Plasmodia parasitaemia among donors in the Niger delta of Nigeria**. *Trop Doct* 2007, **37**:32-34.
- [140] Carme B, Kenmogne D, Copin N, Mbtsi A: **[Plasmodium prevalence and parasitic burden in blood donors of Brazzaville, Congo] (in French)**. *Ann Soc Belg Med Trop* 1993, **73**:179-187.
- [141] Ali MS, Kadaru AA, Mustafa MS: screening blood donors for malaria in Sudan. *Ethiopian J health Dev* 2004, **18**:70-74
- [142] Guiguemde T, Sanou M, Ouedraogo J, Coulibaly N, Ghary A, Coulibaly S: **Le paludisme et la transfusion: une étude portant sur les donneurs de la banque de sang de l'hôpital de Bobo-Dioulasso (burkina Fasso)**. *Malaria Infect Dis Afr* 1995, **2**:9.
- [143] Epidi TT, Nwani CD, Ugorji NP: **Prevalence of malaria in blood donors in Abakaliki Metropolis, Nigeria**. *Sci Res Essays* 2008, **3**:162-164.
- [144] Bonilla E, Rodriguez A: **Determining malaria effects in rural Colombia**. *Soc Sci Med* 1993, **37**:1109-1114.
- [145] Vlassoff C, Bonilla E: **Gender-related differences in the impact of tropical diseases on women: what do we know?** *J Biosoc Sci* 1994, **26**:37-53.
- [146] Uneke CJ, Ogbu O, Nwojiji V: **Potential risk of induced malaria by blood transfusion in South-eastern Nigeria**. *McGill J Med* 2006, **9**:8-13.
- [147] Wilson ML: **Malaria rapid diagnostic tests**. *Clin Infect Dis* 2012, **54**:1637-1641.
- [148] Kifude CM, Rajasekariah HG, Sullivan DJ Jr, Stewart VA, Angov E, Martin SK, Diggs CL, Waitumbi JN: **Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2 in blood, plasma, and serum**. *Clin Vaccine Immunol* 2008, **15**:1012-1018.
- [149] Calderaro A, Piccolo G, Perandin F, Gorrini C, Peruzzi S, Zuelli C, Ricci L, Manca N, Dettori G, Chezzi C, Snounou G: **Genetic polymorphisms influence Plasmodium ovale PCR detection accuracy**. *J Clin Microbiol* 2007, **45**:1624-1627.

- [150] Drakeley C, Sutherland C, Boussema JT, Sauerwein RW, Targett GA: **The epidemiology of *Plasmodium falciparum* gametocytes: weapons of mass dispersion.** *Trends Parasitol* 2006, **22**:424-430.
- [151] Chattopadhyay R, Majam VF, Kumar S: **Survival of *Plasmodium falciparum* in human blood during refrigeration.** *Transfusion* 2011, **51**:630-635.
- [152] Tayou TC, Diarra A, Yaya R, Hakizimana M, Nguessan A, Mbensa G et al. **Le centre de transfusion, le donneur de sang et le sang donné dans les pays d'Afrique francophone.** *Transfus clin Biol* 2009, **16** : 431-8
- [153] Rakoto AO, Rasamindrakotroka A, Herisoa FR, Andriambelo V : **Paludisme post-transfusionnel en zone d'endémie palustre, Antananarivo (Madagascar) Août 2011.**
- [154] Basco LK: **Molecular epidemiology in Cameroun XIII. In vivo drug assays and molecular surveillance of chloroquine and proguanil resistance.** *Am J Trop Med Hyg* 2002, **64**:383-387
- [155] Mayor AG, Gomez OX, Aponte JJ, Casimiro S, Mabunda s, Dgedge M, Brreto A, Alonso PL: **Prévalence of the K76T mutation in the putative *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (pfcrt) gene and its relation to chloroquine resistance in Mozambique.** *J Infect Dis* 2001, **183**:1413-1416.
- [156] Basco KL, Ringwald P: **Analysis of the key pfcrt point mutation and in vitro and in vivo response to chloroquine in Yahounde, Cameroun.** *J Infect Dis* 2001, **183**:1828-1831.
- [157] Tinto H, Ouedraogo JB, Coulibaly SO, Traore B, T.R.G: **Le microtest isotopique simplifié: une méthode pour l'étude de la Chimiorésistance in vitro de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques.** *Cahier Santé* 2000, **10**:353-356
- [158] Allain JP: **Malaria and transfusion: a neglected subject coming back to the forefront.** *Clin Infect Dis* 2010, **51**:1199-1200.
- [159] OMS : **Surveillance de la résistance aux antipaludiques.** *Rapport d'une consultation de l'OMS Genève, Suisse* 2001, 3-5.

[160] Trape JF: **The public health impact of chloroquine resistance in Africa.** *Am J Trop Med Hyg* 2001, **64**:12-17.

[161] Moussiliou A, Sissinto-Savi De Tove Y, Doritchamou J, Adrian JF L, Massougbodji A, Alifrangis M, Deloron P, Ndam NT: **High rates of parasite recrudescence following intermittent preventive treatment with sulphadoxine-pyrimethamine during pregnancy in Benin.** *Malar J* 2013, **12**:195-204.

[162] Drakeley CJ, Corran PH, Coleman PG, Tongren JE, McDonald SL, Carneiro I, Malima R, Lusigu J, Manjurano A, Nkya WM, Lemnge MM, Cox J, Reyburn H, Riley EM **Estimating medium-and long-term trends in malaria transmission by using serological markers of malaria exposure.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102**: 5108-5013.

[163] Atchade PS, Doderer-Lang C, Chabi N, Perrotey S, Abdelrahman T, Akpovi CD, Ludovic A, Bigot A, Sanni A, Candolfi E. **Is a *Plasmodium* Lactate dehydrogenase (pLDH) enzyme-linked immunosorbent (ELISA)-based assay a valid tool for detecting risky malaria blood donation in Africa?** *Malar J* 2013, **12**:279

[164] Agnandji ST, Lell b, Soulanoudjingar SS, Fernandes JF, Abossolo BP, Conzelmann C, Methogo BG, Doucka Y, Flamen A, Mordmüller B, Issifou S, Kremsner PG, Sacarlal J, Aide P, Lanasa M, Aponte JJ, Nhamuave A, Quelhas D, Bassat Q, Mandjate S, Macete E, Alonso P, Abdulla S, Salim N, Juma O, Shomari M, Shubis K, Machera F, Hamad AS, Minja R, Mtoro A, Sykes A, Ahmed S, Urassa AM, Ali AM, Mwangoka G, Tanner M, Tinto H, D'Alessandro U, Sorgho H, Valea I, Tahita MC, Kaboré W, Ouédraogo S, Sandrine Y, Guiguemdé RT, Ouédraogo JB, Hamel MJ, Kariuki S, Odero C, Oneko M, Otieno K, Awino N, Omoto J, Williamson J, Muturi-Kioi V, Laserson KF, Slutsker L, Otieno W, Otieno L, Nekoye O, Gondi S, Otieno A, Ogutu B, Wasuna R, Owira V, Jones D, Onyango AA, Njuguna P, Chilengi R, Akoo P, Kerubo C, Gitaka J, Maingi C, Lang T, Olotu A, Tsofa B, Bejon P, Peshu N, Marsh K, Owusu-Agyei S, Asante KP, Osei-Kwakye K, Boahen O, Ayamba S, Kayan K, Owusu-Ofori R, Dosoo D, Asante I, Adjei G, Adjei G, Chandramohan D, Greenwood B, Lusingu J, Gesase S, Malabeja A, Abdul O, Kilavo H, Mahende C, Liheluka E, Lemnge M, Theander T, Drakeley C, Ansong D, Agbenyega T, Adjei S, Boateng HO, Rettig T, Bawa J, Sylverken J, Sambian D, Agyekum A, Owusu L, Martinson F, Hoffman I, Mvalo T, Kamthunzi P, Nkomo R, Msika A, Jumbe A, Chome N, Nyakuipa D, Chintedza J, Ballou WR, Bruls M, Cohen J, Guerra Y, Jongert E, Lapierre D, Leach A, Lievens M, Ofori-Anyinam O, Vekemans J, Carter T, Leboulleux D, Loucq C, Radford A, Savarese B, Schellenberg D, Sillman M, Vansadia P **First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children.** *N Engl J Med* 2011, **365**:1863-1875.

ANNEXE 1

Is a *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH) enzyme-linked immunosorbent (ELISA)-based assay a valid tool for detecting risky malaria blood donations in Africa?

Pascal S Atchade^{1,2†}, Cécile Doderer-Lang^{1†}, Nicodème Chabi², Sylvie Perrotey¹, Tamer Abdelrahman³, Casimir D Akpovi², Ludovic Anani⁴, André Bigot⁴, Ambaliou Sanni^{2†} and Ermanno Candolfi^{1*†}

- * Corresponding author: Ermanno Candolfi candolfi@unistra.fr
- † Equal contributors

Author Affiliations

¹ Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale (IPPTS) - Fédération de Médecine Translationnelle, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

² Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Université d'Abomey Calavi, 04 BP 0320 Cotonou, Bénin

³ Public Health Wales Microbiology, Public Health Wales NHS Trust, Cardiff, UK

⁴ Agence Nationale pour la Transfusion Sanguine (Ministère de la Santé), 01 B.P. 511 Cotonou, Bénin

For all author emails, please [log on](#).

Malaria Journal 2013, **12**:279 doi:10.1186/1475-2875-12-279

The electronic version of this article is the complete one and can be found online at:
<http://www.malariajournal.com/content/12/1/279>

Received: 21 March 2013

Accepted: 6 July 2013

Published: 8 August 2013

© 2013 Atchade et al.; licensee BioMed Central Ltd.

RESEARCH

Open Access

Is a *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH) enzyme-linked immunosorbent (ELISA)-based assay a valid tool for detecting risky malaria blood donations in Africa?

Pascal S Atchade^{1,2†}, Cécile Doderer-Lang^{1†}, Nicodème Chabi², Sylvie Perrotey¹, Tamer Abdelrahman³, Casimir D Akpovi², Ludovic Anani⁴, André Bigot⁴, Ambaliou Sanni^{2†} and Ermanno Candolfi^{1*†}

Abstract

Background: Malaria is a leading cause of mortality in southern Benin. The main causative agent, *Plasmodium falciparum*, poses a threat on critical transfusions in pregnant women and children. This study's objective was to compare the performance of different malaria screening methods in blood donors in southern Benin, a malaria-endemic country.

Methods: Blood from 2,515 voluntary blood donors in Benin was collected over a period of 10 months in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes, which were then classified according to extraction time: long rainy season, short dry season, short rainy season, and long dry season. Microscopic examination was used to count parasites. Parasite density (PD) was expressed as the number of parasites per μL of blood. Pan *Plasmodium* pLDH detection was assessed by an ELISA-malaria antigen test. Using crude soluble *P. falciparum* antigens, an ELISA-malaria antibody test detected anti-*Plasmodium* antibodies.

Results: Among the 2,515 blood donors (2,025 males and 488 females) screened, the rate of asymptomatic *Plasmodium* carriage was 295/2,515 (11.72%, 95% CI: 10.5-13.1%). Males had a higher infection rate (12.4%) than did females (8.8%). Parasite density was very low: between seven and 100 parasites per μL of blood was reported in 80% of donors with parasitaemia. Three *Plasmodium* species were diagnosed: *P. falciparum* in 280/295 patients (95.0%), *Plasmodium malariae* in 14/295 (5.0%), and *Plasmodium ovale* in 1/295 (0.34%). Malaria prevalence in donors was higher during the rainy seasons (13.7%) compared with the dry seasons (9.9%). The use of a highly sensitive assay enabled pan *Plasmodium* pLDH detection in 966/2,515 (38.4%, 95% CI: 36.5%-40.3%). Malaria antibody prevalence was 1,859/2,515 (73.9%, 95% CI: 72.16-75.6%). Donors' antigenaemia and antibody levels varied significantly ($P < 0.05$) over the course of the four seasons. The highest antigenaemia rate 323/630 (51.3%), was observed during the short rainy season, while the highest antibody prevalence, 751/886 (84.7%), was recorded during the long dry season.

Conclusion: Blood donations infected with *Plasmodium* can transmit malaria to donation recipients. Malaria diagnostic methods are currently available, but the feasibility criteria for mass screening in endemic areas become preponderant. Detection of the pLDH antigen seems to be an adequate screening tool in endemic areas, for this antigen indicates parasite presence. Routine screening of all donated blood would prevent infected blood donations and reduce *P. falciparum* transmission in critical patients, such as children and pregnant women. This tool would also decrease medical prophylaxis in donation recipients and contribute to lower *Plasmodium* resistance.

Keywords: Malaria, Transfusion, *Plasmodium falciparum*, pLDH, Antibodies

* Correspondence: candolfi@unistra.fr

†Equal contributors

¹Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale (IPPTS) - Fédération de Médecine Translationnelle, Université de Strasbourg, Strasbourg, France
Full list of author information is available at the end of the article



Background

Transfusion-induced malaria was first reported in 1911 [1], and it is well-established that all five human malaria parasites (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, and *Plasmodium knowlesi*) may be transmitted via blood transfusion [2]. Blood is mainly used in the emergency management of patients with life-threatening anaemia accompanied by severe malaria and malnutrition [3]. Blood transmission of malaria is a potentially serious complication that poses a continuous risk for blood banks, as the recipient's malaria diagnosis is not expected, and is thus often missed [3,4]. As malaria parasites can survive in red blood cells at refrigerator temperature (2-4°C) for days or weeks [5], this would require the exclusion of all blood donors with a potential risk [6,7]. Transfusion-transmitted malaria (TTM) is an important public health problem that affects most parts of the world. Over the past decade, TTM has been reported in low endemic countries, such as France [8], Brazil [9], the USA [10], and the UK [11]. The situation is more alarming in highly endemic areas, such as sub-Saharan Africa, where *Plasmodium* prevalence among blood donors may reach record levels of 51.50% [12,13] using a technique less sensitive than microscopy [14].

In Benin, as in other tropical developing countries, the high demand for blood donations due to increased road accidents, pregnancy-related haemorrhages and child anaemia enhances the risk of TTM. Benin's humid tropical climate, which has two rainy and two dry seasons, favours malaria transmission over the course of eight months, with 58 infectious mosquito bites per man per year [15]. The most effective malaria vector, *Anopheles gambiae*, is the most widespread and difficult to control [16]. The majority of malaria-related deaths in Benin is caused by the lethal *P. falciparum*. In Benin, 37% of adult health facility visits and 41% of those by children under five years old are malaria-related. Malaria is the leading disease affecting communities, with pregnant women and children under five years old being the most vulnerable. The incidence of uncomplicated and severe malaria was 139 per 1,000 inhabitants in 2006 [17]. Self-medication for malaria prevention is likely to complicate these figures: although widespread in Benin, it has never been objectively assessed. TTM is not considered a priority in malaria-endemic countries, but malaria prevalence is nonetheless decreasing thanks to the Roll Back Malaria programme [18]. The significant risk of *Plasmodium* transfusion is expected to increase over the next few years in unprotected patients, such as pregnant women or children. Blood transfusion is the third transmission path of *Plasmodium*, and there is still no consensus on TTM preventative measures to be taken in tropical settings [19]. Malaria symptoms may be subtle or non-existent in many blood donors carrying

Plasmodium [7], so screening questionnaires have limitations [20]. Moreover, routine malaria diagnosis is made by microscopic visualization of parasites on thick and thin smears, but this method is inadequate for examining a large volume of samples [14,20]. Nevertheless, microscopy is still commonly used in studies investigating malaria prevalence in blood donors [13,21-23]. The use of malaria antibody detection, as in non-endemic countries, is inadequate due the frequent high seroprevalence in endemic countries. As previously suggested, malaria antigen detection may be a feasible solution [7,19]. Therefore, this study's objective was to assess the performance of a commercially available pLDH antigen detection ELISA-based assay compared to microscopy in 2,515 voluntary blood donors who were asymptomatic for malaria. Malaria antibody prevalence was also assessed.

Methods

Study sites and ethical consideration

Benin is characterized by tropical rainforest vegetation, Sudanese climate type with an annual rainfall of about 1,600 mm, and an atmospheric temperature of 32°C. There are four distinct seasons: two rainy and two dry. This descriptive, transversal study was conducted in Benin over ten consecutive months in six departments, which grouped into three pairs of Departmental Blood Transfusion Centres (DBTC): Atlantique-Littoral, Oueme-Plateau, and Mono-Couffo. They serve as referral centres for south Benin blood transfusion services. This study was approved by the Direction of Benin National Blood Transfusion Agency and the Research Ethics Committee of the Republic of Benin. Approval was granted under the following conditions: donor anonymity must be maintained, good laboratory practice quality control must be ensured, and every finding must be treated with utmost confidentiality and used only for this research purpose. Biological analyses of the samples were performed in the biochemistry and molecular biology laboratory in Cotonou (Benin) and the Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale de Strasbourg (IPPTS) (France).

Study population

Individuals considered healthy who visited the three DBTCs for blood donation between May 2009 and March 2010 were considered eligible for the study. A total of 2,515 donors and regular voluntary blood donors were enrolled over a period of ten months, which was divided into a long rainy season (LRS) from May to July, a short dry season (SDS) from August to September, a short rainy season (SRS) from October to November, and a long dry season (LDS) from December to March. Donors were selected according to medical screening criteria: no fever, no clinical evidence of progressive disease, weight above 50 kg, age between 18 and 60 years

old, or 65 years old for regular donors. Last blood donation had to have occurred within the previous four months for women and three months for men. A more systematic questionnaire was introduced providing the full name, age, sex, address, and telephone of each individual. Malaria-related questions were also included: date and confirmation via clinical manifestation of malaria episodes that occurred during the year, subsequent treatment and prevention measures taken against malaria. Each study participant signed an informed consent. Overall, 7 mL of blood were collected in EDTA tubes, with 1 mL transferred into a microtube and the remaining 6 mL centrifuged at 4°C, plasma being collected into a new microtube. The tubes were stored at -20°C and transported to the IPPTS laboratory in solid carbon dioxide for antibody and pLDH antigen detection.

Parasitological examination

A thick and a thin smear were performed on slides for each Benin blood donor. The thick film was dehaemoglobinized using distilled water at pH 7.2, and then thick and thin blood films were stained using a May-Grünwald-Giemsa (MGG) stain. The microscopic reading and parasite density calculation were performed by two laboratory technicians, and in the case of uncertainty, also by a third one. Parasite count was made on the basis of 500 parasites per 1,000 leukocytes. The reading was stopped after 500 parasites were counted, even though the 1,000 figures of leukocytes were not reached. Parasite density (PD) was expressed as the number of parasites per μL of blood.

pLDH antigen detection

pLDH is a glycolytic pathway enzyme secreted by the different *Plasmodium* species, but it possesses species-specific isomers [24]. The pLDH enzyme disappears within 24 hours of effective malaria treatment [25]. Therefore, the pLDH antigen is considered a specific marker for the presence of viable *Plasmodium* in blood, and is used for screening in malaria-endemic countries. The pLDH antigen detection was performed by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), notably an ELISA-malaria antigen test (apDianv, Belgium) that detects pLDH via immunocapture. The apDia Antigen ELISA is an *in vitro* diagnostic immunoassay (IVD) for the qualitative determination of *Plasmodium* spp. LDH in blood samples. The apDia Malaria antigen test can be used in order to detect the malaria pLDH antigen of any of the four species in blood samples. The test was performed according to manufacturer recommendations: pour 100 μL of ready-to-use lysing buffer into each well; add 50 μL of reconstituted positive control to one well and 50 μL of negative control to triplicate well; add 50 μL of homogenized fresh whole blood sample into

corresponding well; incubate for 60 min at 37°C under continuous gentle shaking conditions; drain the wells via aspiration, and fill them completely with 350 μL of washing solution; allow the wells to soak for 1 min before washing again five times; pour 100 μL of conjugate 1 solution into each well, and incubate the plate for 30 min at 37°C; wash the wells five times and pour 100 μL of conjugate 2 into each well. Incubate the plate for 15 min then wash the wells five times and pour 100 μL of chromogenic solution into each well; incubate the plate for 15 min at 37°C; add 50 μL of stopping solution to all wells and read absorbance of each well at 450 nm with reference wavelength of 620 nm within 15 min. Test results were interpreted as follows: the optical densities of positive control (ODpos) must be >0.500 and the average OD of negative control (ODneg) <0.100 . The ODneg was used to calculate the cut-off by multiplying its average value by three. The antigen index (Ag Index) of each sample was calculated by dividing the OD value of the sample by the cut-off value. A sample was considered positive if the Ag Index was ≥ 1.0 , indicating that the sample contained viable parasites. A sample was considered negative if the Ag Index was ≤ 0.8 , indicating that there were no viable parasites in the blood, or that there was no *Plasmodium* multiplication because of anti-malarial drug intake. A sample was considered inconclusive if the Ag Index was between 0.8 and 1.

Measurement of sensitivity, specificity and detectability of the ELISA-based pLDH detection assay

Samples from malaria patients for sensitivity calculation

The whole blood biobank collected from 266 malaria patients who had returned from endemic countries, positively diagnosed and referred by Strasbourg University hospital was tested. Among them, 239 were positive for *P. falciparum*, 19 for *P. ovale*, six for *P. malariae*, and two exhibited a mixed infection (*P. ovale* and *P. falciparum*). This panel was used to assess the sensitivity of the ELISA antigen detection test compared to microscopy.

Samples from blood donors for specificity calculation

Blood donor samples were collected at the French Etablissement Français du Sang d'Alsace (EFS Alsace). Based on a medical questionnaire, donors were classified as "malaria-risk blood donors" ($n=1,771$) if they had travelled to an endemic area in the previous four months, or "not-exposed-to-malaria blood donors" ($n=1,781$) if they had not travelled to an endemic area in the previous three years.

Cultured parasites

The 3D7 strain of *P. falciparum* was maintained *in vitro* using an adapted candle jar method for continuous culture [26]. Parasites were cultured in normal O-positive

red blood cells (RBCs) from healthy donors (EFS Alsace) and malaria culture medium (MCM, pH 7.4) composed of Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640 supplemented with 2 mM L-glutamine, 10 mM Hepes (Gibco, Invitrogen, Cergy Pontoise, France), 1 µg/ml hypoxanthine, 0.11 mg/ml Na pyruvate, 0.02 mg/ml gentamycin, and 10% (V/V) alpha calf serum (Perbio Science, Brebières, France). The culture was diluted at a parasitaemia and haematocrit of 1%, and the medium was changed every 48 hours.

Determination of parasite detectability threshold using microscopy and pLDH Elisa test

Culture with 65% ring-stage parasites and 35% schizonts was used. Infected RBCs from the continuous culture at 1% parasitaemia determined on thin blood film by microscopy were serially diluted in uninfected RBCs by incubation with low agitation at 37°C. Dilution ranged from 20,000 infected RBCs (iRBCs)/µl to 0.1 iRBCs/µl. For microscopy examination, thin blood films were made from each dilution after careful suspension, while thick blood films were made for the lower parasitaemia. Three slides were prepared for each dilution and read by two microscopists in a blind manner. Parasitaemia was determined by counting fields with 100 RBCs, and the total level was expressed in µL of blood corresponding of 5.106 RBCs/µL. A linear regression curve based on mean parasitaemia levels was established in order to determine the parasitaemia, and a standard curve was generated using recombinant pLDH to assess the correlation between parasitaemia and pLDH concentration.

Recombinant pLDH

A synthetic gene (Genscript, NJ, USA) encoding for *P. falciparum* pLDH protein was inserted in the expression vector pMAL C2X (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) containing the maltose binding protein (MBP) fusion partner sequence. The protein was expressed in *Escherichia coli* and purified by affinity chromatography on amylose resin. The protein was used to generate the standard curve.

Antibodies detection

Antibody screening was performed using a homemade ELISA-antibody test. The serological ELISA test was derived from a commercial assay exhibiting high specificity and analytical sensitivity, namely 96.7 and 93.1%, respectively [27]. The test was based on binding of anti-*Plasmodium* antibodies present in serum or plasma samples to antigens immobilized on 96-well plates, with the antigen being an extract of *in vitro* *P. falciparum* culture (3D7 strain). Due to antigenic community, antibodies to other *Plasmodium* species may be detected. The diluent solution containing PBS and Tween 0.1%,

(125 µL) was poured into each well, followed by 25 µL of test plasma. On the same plate, 25 µL positive control and negative control were poured in single and triplicate wells, respectively. The plate incubated for 60 min at 37°C before being washed five times. One hundred µL of horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-human IgG polyclonal antibodies (Sigma-Aldrich, St Quentin, France) were added to each well, and the plate incubated for a further 30 min at 37°C. The wells were washed five times, and 100 µL of TMB plus substrate solution (tetramethylbenzidine) (Kem-en-tec, Denmark) were added to each well. The plate was covered and incubated in the dark for 15 min at 37°C. Finally, 50 µL of 0.5 M sulphuric acid was added to each well, and absorbance was read within 15 min at 450 nm, with a reference wave-length of 620 nm. Test validation required that the positive OD be >0.500 and the negative OD ≥ 0.200. The cut-off value was calculated by multiplying the negative control wells' average OD by four. The antibody (Ab) index of each sample was calculated by dividing its OD value by the cut-off value. The sample was considered positive if the Ab index was >1.0, equivocal if the Ab index was between 0.8 and 1.0, and negative if the Ab index was ≤ 0.8. The test was not able to distinguish between antibodies directed to either *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, or *P. ovale*.

Data analysis

The data was analysed by the chi-squared, Bartlett's chi-squared, and Kruskal-Wallis tests using Sigma Plot 2001 software (Sigma Plot 2001 Statistical Analysis Software, San Jose, CA, USA) and Epi Info version 3.5.1. The results were expressed as mean ± standard deviation. Statistical significance was reached if $P < 0.05$, with a 95% confidence interval (CI).

Results

pLDH ELISA performance

Sensitivity

Among the 266 malaria patients, the antigen detection test was able to detect 250 cases while missing 16, resulting in a sensitivity of 94%, with borderline results included as positive in the calculations. Nine cases of *P. falciparum* were missed, five of them were treated for malaria before the blood examination and the four remaining patients did not provide any information's regarding a previous treatment. Seven cases of *P. ovale* were also missed may be due to the fact that the monoclonal antibodies for pLDH fail to detect some *P. ovale* strains. However this point was not explored in our study and not discussed. The antibody detection test was able to detect only 220 cases (Table 1). Moreover, the combined tests detected 261 positive cases and missed only five, namely a *P. falciparum*-infected patient with prior anti-malarial treatment, and four *P. ovale*-infected patients

Table 1 pLDH ELISA and Malaria antibody ELISA results in a population of microscopically confirmed malaria patients (n= 266)

Species	Microscopy	pLDH ELISA	Antibody ELISA
<i>P. falciparum</i>	239/266 (89.9%)	230/239	199/239
<i>P. ovale</i>	19/266 (7.1%)	12/19	14/19
<i>P. malariae</i>	6/266 (2.25%)	6/6	5/6
Mixed infection ¹	2/266 (0.75%)	2/2	2/2
Total		250/266 (94%)	220/266 (82.7%)

¹Mixed infections are *P. ovale* with *P. falciparum*.

(Table 2). Specificity for malaria-risk blood donors and not-exposed-to-malaria blood donors was 99.6 and 99.5%, respectively, with an overall specificity of 99.57%. The pLDH assay's positive and negative predictive values were 94.3% and 99.5%, respectively.

Detectability

The parasite detection threshold for microscopy and pLDH Elisa test was calculated using a range of infected iRBCs and recombinant pLDH. The calculated parasitaemia in diluted iRBCs ranged from 24,676 iRBCs/ μ L to 0.0005 iRBCs/ μ L (extrapolated value), with a linear regression line and 0.977 correlation coefficient. The detection limit was 1 parasite/ μ L for the pLDH ELISA, which corresponds to 0.08 ng/ml of recombinant pLDH. The detection threshold with the standard curve using the recombinant pLDH was 0.125 ng/mL, the curve being linear up to 2.5 ng/mL (Figure 1) (Table 3).

pLDH assay evaluation in a population of Benin blood donors

Characteristics of the blood donor population

Blood samples from 2,515 donors were collected over a ten-month period covering four seasons: LRS, SDS, SRS, and LDS. The samples were distributed as follows: 590/2,515 (23.5%) in LRS, 409/2,515 (16.3%) in SDS, 630/2,515 (25.0%) in SRS and 886/2,515 (35.2%) (Table 4). The donors enrolled in this study were young, with a median age of 31 \pm 9 years. Their age distribution showed that young people between 25 and 40 years were the most represented, with 1,379/2,515 (54.8%). Sex

Table 2 Comparison of pLDH ELISA (Ag) and antibody ELISA (Ab) detection in a population of microscopically confirmed malaria patients (n= 266)

	Ab Pos	Ab Neg	Total
Ag pos	209	41	250
Ag neg	11	5*	16
TOTAL	220	46	266

*One case of *P. falciparum* infection treated prior to the parasitological diagnosis and four *P. ovale* cases.

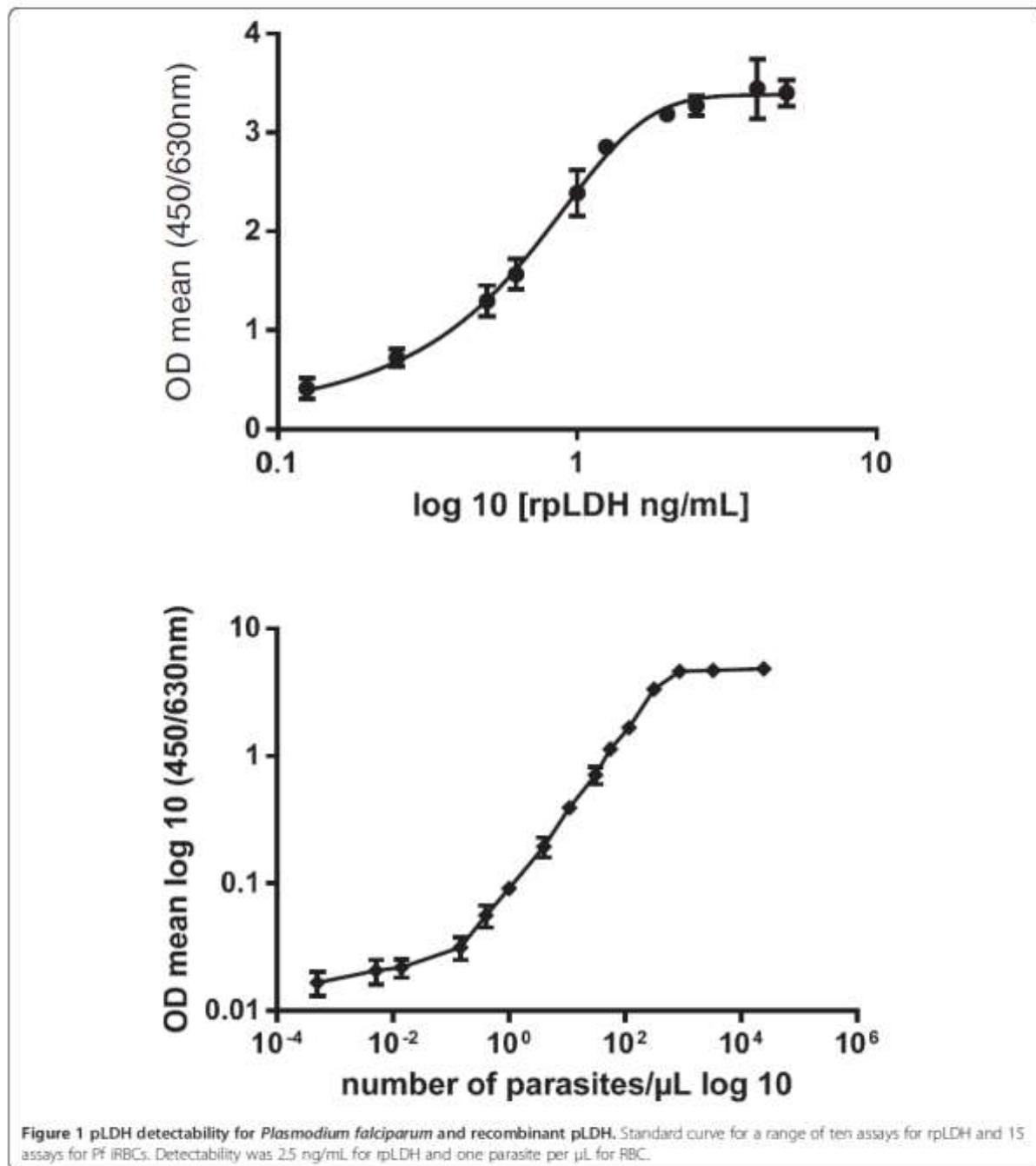
distribution exhibited a strong male predominance with 2,027/2,515 (80.60%) men versus 488/2,515 (19.40%, 95% CI: 17.9-21.0%) women. Among the donors, 1,989/2,515 slept under a mosquito net (79.1%, 95% CI: 77.4-80.6%). The majority of donors, namely 1,521/2,515 (60.47%, 95% CI: 57.4-61.2%), reported having had episodes of malaria, and the predominant clinical prior malaria expression was a single suspected access in 1,387/2,515 (55.1%, 95% CI: 53.2-57.1%), whereas 51 donors (2.0%, 95% CI: 1.5-2.7%) reported a severe attack requiring hospitalization in the last year. In total, 83 donors (3.3%, 95% CI: 2.7-4.1) had both single and severe malaria attacks, whereas 994 donors (39.52%) reported having no malaria attack during the preceding year. Among the 1,521 donors with suspected malaria episodes, anti-malarial treatment was administered to 509 (33.46%) in health facilities during the last malaria attack, whereas 1,012/1,521 (66.53%) were treated as outpatients. Most blood donors did not receive chemoprophylaxis but performed a sort of prevention when they experienced "signs of malaria". Self-prevention against malaria was undertaken by 1,537/2,515 donors (61.11%) who took anti-malarial drugs or herbal tea, whereas 978/2,515 (38.88%) did not undertake any prevention. The drugs used were quinine 567/2,515 (22.5%, 95% CI: 20.9-24.2%), artemisinin-based combination 510/2,515 (20.3%, 95% CI: 18.7-21.9%), herbal teas 336/2,515 (13.4%, 95% CI: 12.1-14.8%), and Fansidar[®] 124/2,515 (4.9%, 95% CI: 4.1-5.9%).

Microscopic prevalence of *Plasmodium*

Among the 2,515 blood donors, the rate of asymptomatic *Plasmodium* carriage measured by microscopy was 295/2,515 (11.72%, 95% CI: 10.5-13.1%). Three *Plasmodium* species were detected: *P. falciparum* was identified in all infection cases, *P. malariae* in 14 mixed infection cases (5.1%), and *P. ovale* in one mixed infection case (0.34%) (Table 4). The study findings revealed a higher percentage of infection among males 252/295 (85.42%) compared to females 43/295 (14.6%). Microscopic prevalence varied according to seasons: *P. falciparum* and *P. malariae* detection was constant during all seasons (Table 4), whereas *P. falciparum* density was very low and highly variable. Among the 295 positive donors, 238 (80.67%) exhibited a parasite density between seven and 100 parasites per microliter (p/ μ L), with 0.3% exhibiting a density >5,000 p/ μ L (Table 5).

Malaria antibodies prevalence

Plasmodium antibody detection by ELISA in 2,515 donors showed a high positivity rate with a prevalence of 73.9% (1,859/2,515) (95% CI: 72.1-75.6%). Equivocal results were found in 13.1% of samples (329/2,515), and there were no detectable antibodies in 327 donors (13.0%, 95% CI: 11.7-14.4%) (Table 6B). Antibody prevalence



differed significantly according to the season ($P < 0.05$) (Table 7 and Figure 2).

pLDH prevalence in Benin blood donors

pLDH antigen was found in 38.4% of blood donors (966/2,515) (95% CI: 36.5-40.3%), with equivocal results ($n=622/2,515$, 24.7%) considered as positive for the

calculation. The prevalence of pLDH antigen confirmed by microscopy was 230/966 (23.8%). The only sample that was positive by microscopy but negative by pLDH detection was a *P. malariae* infection case, notably a malaria-antibody positive sample (Table 6A).

pLDH antigen prevalence varied significantly according to the season ($P < 0.05$) (Table 7 and Figure 2).

Table 3 Detectability of pLDH evaluated with a recombinant pLDH (A) and *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells (Pf iRBCs) (B)

A		
rpLDH ng/mL	Index	SD
0	0.335	0.071
0.125	1.465	0.365
0.25	2.650	0.312
0.5	4.595	0.553
0.625	5.550	0.550
1	8.464	0.830
1.25	10.129	0.149
2	11.299	0.145
2.5	11.607	0.358
4	12.11	1.067
5	12.057	0.461
B		
PARASITE/μL	Index	SD
0	0.194	0.061
0.0005	0.165	0.036
0.0051	0.205	0.045
0.0141	0.217	0.036
0.1455	0.312	0.064
0.4	0.556	0.110
1	0.908	0.100
4	1.922	0.335
11	3.886	0.310
31	7.017	1.073
56	11.227	1.000
117	16.523	1.609
319	33.032	3.073
872	45.664	2.435
3,298	46.396	2.353
24,676	47.630	2.444

Table 5 Variation of parasitaemia in the 295 positive donors by microscopy

P/μL	Frequency	Percent (%)
7-100	238	80.7
101-500	1	15.9
501-5,000	9	3.1
> 5,000	1	0.3
Total	295	

Interestingly enough, 25.1% of the blood donors with equivocal pLDH index were microscopically negative. However, a similar percentage was observed in microscopically positive blood donors, suggesting that the grey zone was correctly set up for pLDH (Table 8). The absence of antibodies in the blood of patients with detectable parasitaemia was noted in 30 cases (30/295; 10.2%), but 20 of them tested positive when using the pLDH ELISA. In 744/2,515 (29.6%) cases, both antibody and antigen were present in samples, and 199 samples were positive (n=112) or equivocal (n=87) for pLDH and negative for antibodies (Table 9).

Discussion

In this study, a commercialized pan *Plasmodium* LDH ELISA was shown to exhibit optimal performances as to both PPV and NPV. The assay was able to detect one parasite per μL, which is the lowest detectability reported in the scientific literature to date. This detection threshold is much lower than that of the already commercialized rapid test [28], which is estimated at 50 parasites/μL. An ELISA-based assay would theoretically lower that detectability. Indeed, another ELISA assay based on HRP2 detection was able to detect 11.7 parasites/μL, which is equivalent to 6 ng/ml of rPfHRP2 [29]. The authors of this study conducted in Kenya reported that the microscopic detection limit was three parasites/μL, with a lower reproducibility. The ELISA assay, which is able to detect *in vitro* lower amounts of *P. falciparum* and other species, would thus be an interesting tool to detect the presence of *Plasmodium* in a given blood

Table 4 Distribution of microscopically detected *Plasmodium* species in a population of 2,515 blood donors during the four seasons: long rainy season (LRS), short dry season (SDS), short rainy season (SRS), and long dry season (LDS)

Sampling period	Positive/donors (N =2515)	Positivity rate (%)	Prevalence species
			(N= 295)
LRS (May-June-July)	67/590	11.4	<i>P. falciparum</i> (64/67) 95.52%; * <i>P. malariae</i> (3/67) 4.47%; <i>P. ovale</i> (0) 0.0%
SDS (August -September)	48/409	11.7	<i>P. falciparum</i> (45/48) 93.75%; * <i>P. malariae</i> (3/48) 6.25%; <i>P. ovale</i> (0) 0.0%
SRS (October-November)	100/630	16.0	<i>P. falciparum</i> (96/100) 96.0%; * <i>P. malariae</i> (3/100) 3.0%; * <i>P. ovale</i> (1/100) 1.0%
LDS (December-January-February)	80/886	9.0	<i>P. falciparum</i> (75/79) 93.75%; * <i>P. malariae</i> (5/80) 6.25%; <i>P. ovale</i> (0) 0.00%
TOTAL	295/2,515	11.72	<i>P. falciparum</i> (280/295) 95.0%; * <i>P. malariae</i> (14/295) 5.0%; * <i>P. ovale</i> (1/295) 0.34% Mixed infection (15/295) 5.10%

*Mixed infection.

Table 6 Comparison of microscopy with pLDH ELISA (A) and antibody ELISA (B) in blood donors

A		pLDH ELISA			
		Positive	Equivocal	Negative	TOTAL
Microscopy	Positive	230	64	1	295
	Negative	736	558	926	2,220
	TOTAL	966	622	927	2,515
B		Antibody ELISA			
		Positive	Equivocal	Negative	TOTAL
Microscopy	Positive	231	34	30	295
	Negative	1,628	295	297	2,220
	TOTAL	1,859	329	327	2,515

donor population. However the reagent failed to detect seven cases of *P. ovale* out of 19 cases. This defect could be due to the incapability of the assay to detect the pLDH from some strains of *P. ovale* [30]. The use of a commercialized pan *Plasmodium* LDH ELISA was evaluated in a large blood donor population from southern Benin. The test results were compared to those obtained using microscopy and to those pertaining to malaria-antibody prevalence. The study aimed to determine whether pLDH detection was sensitive enough to identify low parasitaemia levels, which are frequently the case in asymptomatic malaria blood donors, and to assess the prevalence of positive pLDH blood donations in southern Benin.

This study enrolled 2,515 blood donors from six southern Benin departments, with similar malaria epidemiological features. These departments exhibit a wet tropical climate, with two rainy seasons and two dry seasons. In these regions, malaria transmission is permanent, with an increase during the rainy season [16]. The most transmitted species are *P. falciparum* (97.10%) and *P. malariae* (2.00%) [15,31]. The figures reported in the literature are similar to those found in this study, with a 95.0% prevalence of *P. falciparum* and 4.7% prevalence of *P. malariae*. The overall prevalence of asymptomatic *Plasmodium* carriage here was 11.72%. *Plasmodium falciparum* parasite density proved to be very low and highly variable. Two-third of these positive donors had a parasite density between seven and 100 parasites per μ L. Reported prevalence rates in Benin appear to be similar to those reported by some authors in neighbouring Nigeria, 10.2% [32], or in Ghana, 10.20%. [33]. In this

study, *P. falciparum* was identified in all infected cases, 5.0% of which were mixed *P. malariae* infections. These figures are in line with the reported presence of *P. falciparum* in all infected cases and the 2.3% rate of mixed infection in Nigeria [3]. However, these results differ from those of other authors who reported higher parasite prevalence rates, namely 50.7% in Burkina Faso [34], 55% in Nigeria [13,23], and 33.52% in Benin [4].

The study findings highlighted a higher infection rate in male blood donors compared to female ones (85.42 vs 14.6%). In a study conducted in Colombia [35], males were also found to be more infected with *Plasmodium* spp. than females, 59 and 41%, respectively. Nevertheless, in a 1994 publication by Vlassoff et al. [36], Ghanaian women were found to have higher infection rates than Ghanaian men.

According to the study, the risk of *Plasmodium* transmission through blood transfusion is accounted for by the persistence of malaria parasites in blood. Canonical knowledge indicates that *P. falciparum* may persist in blood for one year, *P. ovale* for three years, and *P. malariae* for even longer time periods before causing malaria [20,32]. Similarly, the fact that malarial parasites may survive in RBCs at refrigerator temperatures (2-6°C) for days or weeks leads to the original exclusion of all blood donors who could represent a potential risk in TTM [6,7]. This observation supports some authors' suggestions, namely to implement *Plasmodium* screening prior to blood donation in Africa [3,37].

In non-malaria-endemic area, the malaria antibody detection test will result in rejecting blood donation in case of positivity. However, in malaria-endemic countries, such as Benin, this tool is useless. Indeed, malaria antibody prevalence was 87% (74.0% positive and 13% equivocal) in the study's blood donor populations. This prevalence was similar to that reported for Senegal, with 65.33% being positive and 6.86% equivocal [19]. Therefore, this high antibody seroprevalence in blood donors invalidates the marker's use for detecting *Plasmodium*-infected blood donations. It is interesting to note that detectable *Plasmodium* parasites were found in blood donors but without antibodies, suggesting an acute infection.

In this study, 38.4% of the blood donors were tested positive for pLDH antigen, with a 4.2% rate of equivocal results. The pLDH antigen detection results differed from those found by Diop et al. in Senegal, who reported a detection rate of 0.53% for pLDH, with a 2.23% rate of

Table 7 Positivity rate of pLDH ELISA and antibody ELISA tests according to infecting donors by *Plasmodium* during the seasons, long rainy season (LRS), short dry season (SDS), short rainy season (SRS), and long dry season (LDS)

		Season				
		LRS	SDS	SRS	LDS	TOTAL
pLDH ELISA	POS	142 (24.1%)	206 (50.3%)	323 (51.3%)	295 (33.3%)	966 (38.4%)
Antibody ELISA	POS	453 (76.7%)	288 (70.1%)	368 (58.4%)	751 (84.7%)	1,859 (73.9%)

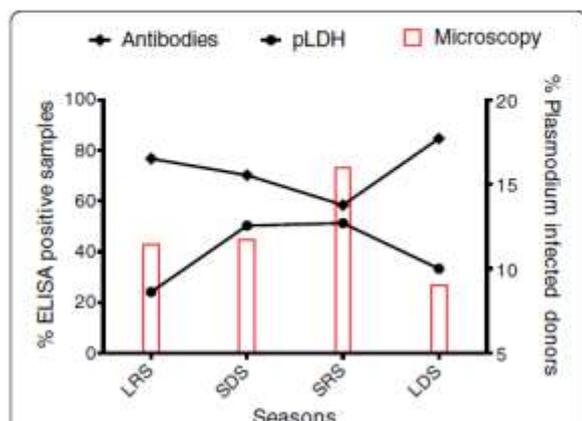


Figure 2 Prevalence rates were calculated for *Plasmodium* presence by microscopy and pLDH detection, and for malaria antibodies in a population of asymptomatic blood donors (n= 2,515) over a ten-month period, divided in long rainy season (LRS) from May to July 590/2,515, short dry season (SDS) from August to September 409/2,515, short rainy season (SRS) from October to November 100/630, and long dry season (LDS) from December to February 80/886.

doubtful cases [19]. However, the malaria epidemiology in Senegal is highly different from that in Benin. The low parasitaemia level may escape microscopic examination, while being dependent on the reader's skill. The pLDH ELISA exhibited a detectability threshold lower than that of the other methods, with the exception of PCR. This finding suggests that pLDH detection could be a valid tool for blood bank settings in order to identify blood donation with a detectable parasitic load of at least one parasite per μL .

The questionnaire's effectiveness helped to identify certain risk factors associated with pLDH antigen carriage, such as blood donations during high transmission periods. Based on the study results it was noticed that seasons influenced both microscopic and pLDH prevalence. Others factors likely impact these markers, such as the malaria prevention method used by blood donors, i.e. drugs, herbal teas, etc. The limits of selecting blood

Table 8 Distribution of pLDH ELISA in microscopically positive and negative blood donors

pLDH ELISA index	Positive donors		Negative donors	
	Frequency	Percent (%)	Frequency	Percent (%)
>20	45	15.3	2	0.01
10-20	24	8.1	2	0.01
1-10	161	54.6	737	33.2
0.7-0.99	64	21.7	558	25.1
Negative	1	0.3	921	41.5
TOTAL	295		2,220	

Table 9 Antibody ELISA and pLDH ELISA comparative results for Benin blood donors

Antibody ELISA		pLDH ELISA			Total
		Positive	Equivocal	Negative	
Positive	744	442	673	1,859	
Equivocal	110	94	126	329	
Negative	112	87	128	327	
TOTAL	966	622	927	2,515	

donors through medical questionnaires were highlighted by the study findings, as 38.4% positive donors for ELISA pLDH had met the selection criteria and gave their blood. It is, therefore, logical to propose implementation of *Plasmodium* screening in blood donation, which was not performed in Benin due to costs and lack of technique reliability, still keeping in mind that blood donors who report an undiagnosed and untreated febrile illness consistent with malaria should be deferred until asymptomatic and off the treatment. In a recent cost effectiveness analysis study, Rajab *et al* [38] concluded that pretransfusion screening would be less costly than the recommended artemisinin-based combination used for prophylaxis in blood recipients, especially children and pregnant women.

Conclusion

Malaria and transfusion is a "neglected subject coming back to the fore front", as recently discussed by Allain [39]. The microscopy and antibody detection techniques are not suited for mass screening in a blood transfusion centre in endemic areas. Based on this study results, the pLDH antigen detection ELISA for *Plasmodium* could be an interesting tool for blood donation qualification in order to ensure blood safety in malaria-endemic areas. One of the test's advantages is that false-positives are exceptional, unlike the HRP2 (histidine-rich-protein)-based tests, which can remain positive for two weeks after parasite clearance. HRP2 may also be absent in malaria infection cases. pLDH antigen ELISA detection in the blood is efficient when there is a parasite [40]. Some pitfalls were observed in the study. In some *P. ovale* infection cases the assay failed to detect them. Similarly, if the donors had taken self-treatment measures prior to blood donation, malaria infection was masked and pLDH detection failed. In conclusion, routine screening of all donated blood would prevent infected blood donation and increase the donation's safety for fragile recipients, such as children and pregnant women. It would also be instrumental in reducing unnecessary medical treatments in recipients and contribute to lower *Plasmodium* resistance. The main problem remains the feasibility of rejecting positive donations in term of blood availability in endemic area where blood transfusion needs are presently increasing.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

PSA, CDL, AS and EC designed the study, and performed the acquisition, the analysis and the interpretation of data. NWC, SP, TA, CDA, LA and AB were involved in the acquisition, the analysis and interpretation of data. All authors have given a final approval to the manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by the Project CONNECTUS on Transfusion malaria diagnosis. SP Atchade was supported by a grant of the Benin Government.

Author details

¹Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale (IPPTS) - Fédération de Médecine Translationnelle, Université de Strasbourg, Strasbourg, France. ²Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Université d'Abomey Calavi, 04 BP 0320 Cotonou, Bénin. ³Public Health Wales Microbiology, Public Health Wales NHS Trust, Cardiff, UK. ⁴Agence Nationale pour la Transfusion Sanguine (Ministère de la Santé), 01 BP. 511 Cotonou, Bénin.

Received: 21 March 2013 Accepted: 6 July 2013
Published: 8 August 2013

References

1. Woolsey: Transfusion for pernicious anaemia: two cases. *Ann Surg* 1991, **53**:132-135.
2. Wylie BR: Transfusion transmitted infection: viral and exotic diseases. *Anaesth Intensive Care* 1993, **21**:24-30.
3. Uneke CJ, Ogbu O, Nwojii V: Potential risk of induced malaria by blood transfusion in South-eastern Nigeria. *McGill J Med* 2006, **9**:8-13.
4. Kinde G, Oke J, Gnahoua I, Massougboji A: [The risk of malaria transmission by blood transfusion at Cotonou, Benin](in French). *Sante* 2000, **10**:389-392.
5. Chattopadhyay R, Majum V, Kumar S: Survival of *Plasmodium falciparum* in human blood during refrigeration. *Transfusion* 2011, **51**:630-635.
6. Szama K: Prevention of transfusion-transmitted malaria: is it time to revisit the standards? *Transfusion* 1991, **31**:786-788.
7. Candolfi E: [Transfusion-transmitted malaria, preventive measures](in French). *Transfus Clin Biol* 2005, **12**:107-113.
8. Garraud O, Assal A, Pelletier B, Danic B, Kerleguer A, David B, Joussemet M, de Micco P: Overview of revised measures to prevent malaria transmission by blood transfusion in France. *Vox Sang* 2008, **95**:226-231.
9. Kirchgatter K, Del Portillo HA: Clinical and molecular aspects of severe malaria. *An Acad Bras Cienc* 2005, **77**:455-475.
10. Reesink HW, Panzer S, Wendel S, Levi JE, Ullum H, Biblorn-Kullberg S, Selfried E, Schmidt M, Shinar E, Prati D, Berziani A, Ghosh S, Resland O, Jeansson S, Zhubert E, Piron M, Saulede S, Ekermo B, Eglin R, Kitchen A, Dodd RY, Leiby DA, Katz LM, Kleinman S: The use of malaria antibody tests in the prevention of transfusion-transmitted malaria. *Vox Sang* 2011, **98**:468-476.
11. Kitchen A, Mijovic A, Hewitt P: Transfusion-transmitted malaria: current donor selection guidelines are not sufficient. *Vox Sang* 2005, **88**:200-201.
12. Reesink HW: European strategies against the parasite transfusion risk. *Transfus Clin Biol* 2005, **12**:1-4.
13. Epioti TT, Nwari CD, Ugorji NP: Prevalence of malaria in blood donors in Abakaliki Metropolis, Nigeria. *Sci Res Essays* 2008, **3**:162-164.
14. Schindler HC, Montenegro L, Montenegro R, Carvalho AB, Abath FG, Jaureguiberg G: Development and optimization of polymerase chain reaction-based malaria diagnostic methods and their comparison with quantitative buffy coat assay. *Am J Trop Med Hyg* 2001, **65**:355-361.
15. Akogbeto M: [Entomological study on the malaria transmission in coastal and lagoon areas: the case of a village built on a brackish lake](in French). *Ann Soc Belg Med Trop* 1995, **75**:219-227.
16. Yadoleton AW, Asidi A, Djouaka RF, Braima J, Agossou CD, Akogbeto MC: Development of vegetable farming: a cause of the emergence of insecticide resistance in populations of *Anopheles gambiae* in urban areas of Benin. *Malar J* 2009, **8**:103.
17. Ministère de la Santé (Ed): *Annuaire des statistiques sanitaires année 2006*; 2006.
18. WHO: *World Malaria Report 2012*. Geneva: World Health Organization; 2012.
19. Diop S, Ndiaye M, Seck M, Chevalier B, Jambou R, Sarr A, Dieye TN, Toure AQ, Thiam D, Diakhate L: [Prevention of transfusion transmitted malaria in endemic area] (in French). *Transfus Clin Biol* 2009, **16**:454-459.
20. Kitchen AD, Chiodini PL: Malaria and blood transfusion. *Vox Sang* 2006, **90**:77-84.
21. Carme B, Kenmogne D, Copin N, Mbtsi A: [Plasmodium prevalence and parasitic burden in blood donors of Brazzaville, Congo](in French). *Ann Soc Belg Med Trop* 1993, **73**(3):179-187.
22. Achidi EA, Perlmann H, Bierzins K: Asymptomatic malaria parasitaemia and seroreactivities to *Plasmodium falciparum* antigens in blood donors from Ibadan, south-western Nigeria. *Ann Trop Med Parasitol* 1995, **89**:601-610.
23. Okocha EC, Ibeh CC, Ele PU, Ibeh NC: The prevalence of malaria parasitaemia in blood donors in a Nigerian teaching hospital. *J Vector Borne Dis* 2005, **42**:21-24.
24. Harani MS, Beg MA, Khaleeq L, Adil SN, Kalepoto GN, Khurshid M: Role of ICT malaria immunochromatographic test for rapid diagnosis of malaria. *J Pak Med Assoc* 2006, **56**:167-171.
25. Oduola AM, Omitowoju GO, Sowunmi A, Makler MT, Falade CO, Kyle DE, Fehintola FA, Ogundahunsi OA, Piper RC, Schuster BG, Milhou WK: *Plasmodium falciparum*: evaluation of lactate dehydrogenase in monitoring therapeutic responses to standard antimalarial drugs in Nigeria. *Exp Parasitol* 1997, **87**:283-289.
26. Trager W, Jensen JB: Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976, **193**:673-675.
27. Doderer C, Heschung A, Guntz P, Cazenave JP, Harsmann Y, Senegas A, Pfaff AW, Abdelrahman T, Candolfi E: A new ELISA kit which uses a combination of *P. falciparum* extract and recombinant *P. vivax* antigens as an alternative to iFAT for detection of malaria antibodies. *Malar J* 2007, **6**:19.
28. Wilson ML: Malaria rapid diagnostic tests. *Clin Infect Dis* 2012, **54**:1637-1641.
29. Kifude CM, Rajasekariah HG, Sullivan DJ Jr, Stewart VA, Angov E, Martin SK, Diggs CL, Waitumbi JN: Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 in blood, plasma, and serum. *Clin Vaccine Immunol* 2008, **15**:1012-1018.
30. Calderaro A, Piccolo G, Perandin F, Gomini C, Penuzzi S, Zueli C, Ricci L, Manca N, Dettori G, Chezzi C, Snounou G: Genetic polymorphisms influence *Plasmodium ovale* PCR detection accuracy. *J Clin Microbiol* 2007, **45**:1624-1627.
31. Carnevale P, Mouchet J: [Vector control and malaria control](in French). *Med Trop (Mars)* 1990, **50**:391-398.
32. Erhabor O, Ok O, Awah I, Uko KE, Charles AT: The prevalence of Plasmodia parasitaemia among donors in the Niger delta of Nigeria. *Trop Doct* 2007, **37**:32-34.
33. Owusu-Ofori AK, Parry C, Bates I: Transfusion-transmitted malaria in countries where malaria is endemic: a review of the literature from sub-Saharan Africa. *Clin Infect Dis* 2010, **51**:1192-1198.
34. Guiguemde T, Sanou M, Ouedraogo J, Coulibaly N, Ghary A, Coulibaly S: Le paludisme et la transfusion: une étude portant sur les donneurs de la banque de sang de l'hôpital de Bobo-Dioulasso (burkina Faso). *Malaria Infect Dis Afr* 1995, **2**:9.
35. Bonilla E, Rodriguez A: Determining malaria effects in rural Colombia. *Soc Sci Med* 1993, **37**:1109-1114.
36. Vassoff C, Bonilla E: Gender-related differences in the impact of tropical diseases on women: what do we know? *J Biosoc Sci* 1994, **26**:37-53.
37. Tagny CT, Owusu-Ofori S, Mbanya D, Deneys V: The blood donor in sub-Saharan Africa: a review. *Transfus Med* 2010, **20**:1-10.
38. Rajab JA, Walthaka PM, Orinda DA, Scott CS: Analysis of cost and effectiveness of pre-transfusion screening of donor blood and anti-malarial prophylaxis for recipients. *East Afr Med J* 2005, **82**:565-571.
39. Allain JP: Malaria and transfusion: a neglected subject coming back to the forefront. *Clin Infect Dis* 2010, **51**:1199-1200.
40. Makler MT, Hinrichs DJ: Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. *Am J Trop Med Hyg* 1993, **48**:205-210.

doi:10.1186/1475-2875-12-279

Cite this article as: Atchade et al.: Is a *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH) enzyme-linked immunosorbent (ELISA)-based assay a valid tool for detecting risky malaria blood donations in Africa? *Malaria Journal* 2013 **12**:279.

ANNEXE 2

The ears of the African elephant: unexpected high seroprevalence of *Plasmodium ovale* and *P. malariae* in Benin.

Cécile DODERER-LANG^{1*}, Pascal S. ATCHADE², Lydia MECKERT¹, Elodie HAAR¹, Denis FILISETTI¹, Ahmed ABOUBACAR¹, Nicodème W. CHABI², Casimir D. AKPOVI², Ludovic ANANI⁴, André BIGOT⁴, Ambaliou SANNI², and Ermanno CANDOLFI^{1*}

¹ Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale (IPPTS) - Fédération de médecine translationnelle - Université de Strasbourg, Strasbourg, France

² Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Université d'Abomey Calavi, 04 BP 0320 Cotonou, Bénin

³ Agence Nationale pour la Transfusion Sanguine (Ministère de la Santé), 01 B.P. 511 Cotonou, Bénin

RESEARCH

Open Access

The ears of the African elephant: unexpected high seroprevalence of *Plasmodium ovale* and *Plasmodium malariae* in healthy populations in Western Africa

Cécile Doderer-Lang^{1*}, Pascal S Atchade², Lydia Meckert¹, Elodie Haar¹, Sylvie Perrotey¹, Denis Filisetti¹, Ahmed Aboubacar¹, Alexander W Pfaff¹, Julie Brunet¹, Nicodème W Chabi², Casimir D Akpovi², Ludovic Anani³, André Bigot³, Ambaliou Sanni² and Ermanno Candolfi^{1*}

Abstract

Background: Malaria is a life-threatening pathology in Africa. *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* attract the most focus because of their high prevalence and mortality. Knowledge about the prevalence of the cryptic pathogens *Plasmodium ovale* and *Plasmodium malariae* is limited. Thanks to recombinant tools, their seroprevalence was measured for the first time, as well as the prevalence of mixed infections in a malaria-asymptomatic population in Benin, a malaria-endemic country.

Methods: A panel of 1,235 blood donations collected over ten months in Benin was used for validation of the recombinant tools. Recombinant *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* MSP1, and *P. falciparum* AMA1 were engineered and validated on a biobank with malaria-infected patients (N = 144) using a species-specific ELISA test (RecELISA). Results were compared to an ELISA using a native *P. falciparum* antigen (NatELISA).

Results: Among microscopically negative African blood donors, 85% (1,050/1,235) present antibodies directed to native *P. falciparum*, 94.4% (1,166/1,235) to rPfMSP1 and rPfAMA1, 56.8% (702/1,235) to rPoMSP1, 67.5% (834/1,235) to rPmMSP1 and 45.3% of the malaria seropositive population had antibodies recognizing the three species.

Conclusion: A high rate of antibodies against *P. ovale* and *P. malariae* was found in asymptomatic blood donors. The proportion of mixed infections involving three species was also unexpected. These data suggest that determining seroprevalence for these cryptic species is an appropriate tool to estimate their incidence, at the eve of upcoming anti-*P. falciparum* vaccination campaigns.

Keywords: *Plasmodium*, Seroprevalence, Recombinant protein, ELISA, Africa

Background

Malaria is one of the most life-threatening diseases in the world. In 2010, 219 million cases were reported globally [1], leading to 660,000 deaths, mostly of children under five years old. Five parasitic species cause human malaria (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, and *Plasmodium knowlesi*),

which are transmitted by the bite of infected *Anopheles* mosquitoes. Despite huge efforts to control the disease, resurgence has been observed in many countries due to climate instability, global warming, civil disturbances, drug resistance, and increasing travel between endemic and non-endemic areas [2].

Identifying the most affected countries' direct resources and validating control measures is essential to reducing malaria's incidence (target: 75% by 2015) [1]. Epidemiological surveillance seeks to assess malaria's prevalence over time and identify the species' geographical distribution.

* Correspondence: cecile.lang@unistra.fr; candolfi@unistra.fr
¹Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale Université de Strasbourg, 3, Rue Koeberlé, F-67000 Strasbourg, France
Full list of author information is available at the end of the article

Vaccines against *P. falciparum* and *P. vivax* are in progress [3]; not so for *P. malariae* and *P. ovale*, where prevalence has been insufficiently investigated. To further complicate matters, low levels of parasitaemia and mixed infections can affect diagnosis of *P. malariae* and *P. ovale*. Birkenmeyer *et al.* recently sequenced genes encoding major erythrocyte stage markers of *P. malariae* and *P. ovale*, demonstrating the feasibility of Merozoite Surface Protein 1 (MSP1) recombinant production [4] and use in ELISA to detect antibodies against *P. malariae* and *P. ovale* [5]. Proteins were selected according to their ability to elicit antibody production and chosen from among previously described vaccine candidates. MSP1 is one of the main surface proteins at the merozoite stage expressed in all *Plasmodium* species and plays a role in red blood cell (RBC) invasions [6]. *Plasmodium falciparum* AMA1 is a blood-stage antigen that aids in orienting the merozoite during invasion of RBC. Anti-AMA1 antibodies tend to be present in individuals who have acquired natural immunity [7].

Estimation of malaria prevalence is historically done by optical microscopy but a sensitivity of 50 parasites/ μ L is insufficient [8]. Further, highly trained staff is necessary, rendering this approach unsuitable for large-scale monitoring. Rapid diagnostic tests and PCR methods are also inappropriate for broad evaluation. ELISA antigen detection of *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH) has been documented as a valuable tool for assessing prevalence in a blood donor population [9]. However, detectability is limited to one parasite/ μ L and the assay is inappropriate for *P. malariae* and *P. ovale* identification. Furthermore, various factors influence the direct detection of parasites, among them parasite clearance due to acquired immunity, drug treatment, season variability and sporadic transmission in low-transmission areas. For this reason, seroprevalence measurement has been explored as an accurate tool for estimating transmission intensity and the potential effects of any measures used to control (and ultimately eliminate) malaria [10]. Indeed, antibodies against the four *Plasmodium* species appear within days or weeks of erythrocyte invasion, and can persist for months or years reflecting exposure to the parasites [11].

Immunofluorescence detection of malaria antibodies was until recently the gold standard [12], but is unsuitable for high-throughput screening. ELISA-based seroprevalence screening is a potentially useful epidemiological tool [13]. An immuno-enzymatic assay combining the crude *P. falciparum* antigen and recombinant *P. vivax* proteins was already developed, exhibiting high specificity and analytical sensitivity (96.7 and 93.1%, respectively) in the detection of *Plasmodium* antibodies [14]. However, this technique could not discriminate between the four species.

In this work, the identification and production of recombinant proteins from *P. falciparum*, *P. ovale* and *P. malariae* was reported to establish an ELISA test for the detection of *Plasmodium* species-specific antibodies. Immunoassay performances were first assessed in a population of *Plasmodium*-infected French travellers. For the first time, the distribution of the *P. malariae* and *P. ovale* in endemic malaria areas in Benin (Western Africa) was evaluated in a blood donor population.

Methods

Samples from *Plasmodium*-infected patients for sensitivity calculation

Malaria patients returning from endemic countries sera ($n=144$), diagnosed and referred at the Strasbourg University Hospital were used for the study. All patients reported fever and were microscopically diagnosed positive for *P. falciparum* ($n=106$), *P. malariae* ($n=12$), or *P. ovale* ($n=26$). All results were confirmed by PCR. Every patient was treated and the samples anonymized. This population was used to determine the recombinant ELISA assay's clinical sensitivity and positive predictive value.

Negative samples

Blood donor samples were collected at the Etablissement Français du Sang d'Alsace (EFS Alsace). Donors were classified as unexposed-to-malaria (192 samples) if their questionnaire responses indicated never having travelled to an endemic area. These samples were used to calculate the test's specificity and negative predictive value.

Samples from Beninese blood donors

Plasma and total blood samples from blood donors without apparent malaria symptoms ($n=1,235$) were collected over ten months (May 2009 to February 2010) in six Beninese departmental blood centres [9]. Each donor signed a consent form, and both the Direction of Benin National Blood Transfusion Agency and the Research Ethics Committee of the Republic of Benin validated the protocol. The collection period was divided into a long rainy season (LRS) from May to July ($n=387$), a short dry season (SDS) from August to September ($n=217$), a short rainy season (SRS) from October to November ($n=408$), and a long dry season (LDS) from December to February ($n=223$). Two expert biologists performed parasitic examinations on all samples via microscopy on a May-Grünwald-Giemsa-stained thin and thick film. Positivity for *Plasmodium* was detected microscopically in 290 donors, who were used to assess the performance of the recombinant proteins. ELISA tests using a native *P. falciparum* antigen and recombinant proteins from *P. falciparum*, *P. ovale* and *P. malariae* were used to assess seroprevalence in the Beninese samples. Five donors

gave their blood twice in two different seasons (LRS and SRS); they were kept due to the low number of repeat donors, since they were positive for malaria antibodies.

Recombinant proteins

Nucleotide constructs encoding 373 AA (amino acids) of *P. falciparum* MSP1 (Accession Number XP_001352170.1), 356 AA of *P. ovale* MSP1 (ACZ51239.1), and 350 AA of *P. malariae* MSP1 (ACZ51237.1) corresponding to the C-terminus region of the protein (42 kD) and a nucleotide construct encoding 448 AA of *P. falciparum* AMA1 (XP_001348015.1) were commercially synthesized with an *Escherichia coli* codon bias (Genscript, Piscataway, NJ, USA). Consensus sequences derived from the alignment of several strains for each species and each protein were used for the design of synthetic genes. All genes were inserted in an expression vector containing a Maltose binding protein fusion partner pMAL-c2X* (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA), produced in *E. coli* expression hosts and purified on amylose resin and DEAEsepharose* (GE healthcare, Uppsala, Sweden).

Plasmodium species DNA detection by PCR

Detection of *P. falciparum* based on the amplification of the STEVOR gene, a subtelomeric multiple copy gene, was performed according to Filisetti *et al.* [15]. The other infecting *Plasmodium* species were identified using a genus and species-specific nested PCR, in addition to a PCR tailored to a specific *P. ovale* subspecies (*P. ovale wallikeri*) [16].

ELISA using *Plasmodium falciparum* native antigen (NatELISA) and recombinant protein (RecELISA)

Antibody screening was performed using an in-house ELISA test derived from a commercial assay (DiaMed) [14]. Native *P. falciparum* antigen produced from *in vitro* culture (NatELISA) [17] or recombinant rMSP1 for *P. ovale*, *P. malariae*, *P. falciparum* and rP. *falciparum* AMA1 (RecELISA) were immobilized on 96-well plates overnight at 4°C in coating buffer and blocked for one hour with PBST (Phosphate Buffered Saline with Tween 0.05%) containing 1% BSA (bovine serum albumin) (Merck, Darmstadt, Germany). After washing with PBST, 200 µl of diluent buffer (PBST with BSA 0.1%) were dispensed into each well and 10 µl of serum were incubated for one hour at 37°C. On the same plate, 10 µl of positive controls specific for each species and negative controls in triplicate were added. After three washes with PBST, 100 µl of horseradish peroxidase labelled monoclonal rabbit anti human IgG (Sigma-Aldrich, St Quentin, France) were incubated for 30 min at 37°C. After three washes with PBST, 100 µl of TMB plus substrate solution (Tetramethylbenzidine) (Kem-en-tec, Denmark) were incubated for 15 min at 37°C and the reaction was stopped

with 50 µl of 0.5 M sulphuric acid. The absorbance was read within 30 min at 450 nm against 620 nm. Test validation required the positive OD to be >0.500 and the negative OD <0.200. The cut-off value was set at three-fold the negative control wells' average OD. The antibody (Ab) index of each sample was defined as ratio of its OD value and the cut-off value. The sample was considered positive if the Ab index was >0.7, and negative if the Ab index was ≤0.7.

All recombinant assays were performed on an EVOLIS Microplate System (Bio-Rad) at the Department of Microbiology of the Hôpitaux Universitaires de Strasbourg.

Statistical analysis

Statistical differences between *P. falciparum* native antigen ELISA (NatELISA) and recombinant ELISA (RecELISA) performances were analysed using Chi-squared and t-tests, as detailed in the Results section, below. Significant differences in antibody prevalence depending on the season, observed during follow-up, were assessed using the Chi-squared test. A p-value of less than 0.05 was considered significant. Correlation between antibody titre and ELISA index for the recombinant antigens was calculated using the Pearson correlation test. (GraphPad Prism 6.0 software, La Jolla, CA, USA).

Results

Performance of the RecELISAs

The assay was first evaluated on 144 plasma samples from malaria patients diagnosed using microscopy and confirmed by PCR. The RecELISA performed better than the NatELISA, which used a *P. falciparum* native antigen (Table 1). Recombinant proteins from other *Plasmodium* species presented a good sensitivity; only three of 26 *P. ovale* cases were missed, and every *P. malariae* infection was detected. The combined performance of the three RecELISAs (using recombinant proteins from three species) was superior to that of the NatELISA (Table 2). On the other hand, the RecELISA failed to detect nine positive cases, most of them also missed by the NatELISA (Table 3). Three of the nine missed infections were *P. ovale* cases, while six were *P. falciparum*. However, eight cases were detected exclusively by RecELISA. Four of those were *P. ovale* and one was *P. malariae*; the three others were *P. falciparum* infections. Overall specificity was 97.9%, calculated on 192 unexposed to malaria blood donors.

Antibody prevalence in Beninese blood donors

The recombinant antigens were used to evaluate species-specific antibody prevalence in a panel of Beninese blood donors. A population of blood donors with microscopically detectable *Plasmodium* infections was isolated from a previous study [9]. Anti-*P. falciparum*

Table 1 Evaluation of the performance of ELISA using species-specific recombinant *Plasmodium* proteins (RecELISA) in comparison to an ELISA using *P. falciparum* native antigen (NatELISA) in a population of malaria-infected travellers (n = 144); 106 *Plasmodium falciparum* patients; 26 *Plasmodium ovale* patients and 12 *Plasmodium malariae* patients

Species	Microscopy + PCR ^a positive	NatELISA pos	RecELISA rPfMSP1 + rPfAMA1 pos	RecELISA rPoMSP1 pos	RecELISA rPmMSP1 pos	RecELISA Total pos
<i>P. falciparum</i>	106/144	98/106 (92.5%)	100/106	ND	ND	135/144 ^c
<i>P. ovale</i>	26/144	20/26 (76.9%)	ND	23/26	ND	
<i>P. malariae</i>	12/144	11/12 (91.7%)	ND	ND	12/12	
Negative	ND ^b	5/192	3/192	3/192	3/192	4/192

For the calculation of specificity, blood donors not exposed to malaria (n = 192) were used exposed to malaria (n = 192) were used.

^aeach sample was confirmed by PCR.

^bND: not done. Blood donors not travelling in malaria-endemic countries were considered as negative (n = 192).

^cresults for the combined recombinant for the three species.

antibodies were detected in almost 90% (259/290) of the population with the NatELISA. Only two mixed infections (*P. malariae* and *P. falciparum*) were detected by microscopy, confirmed by PCR, and positive with all recombinant proteins (Table 4). Combining the data from the three assays (RecELISA Total) reveals that almost all of the investigated population had antibodies against *P. falciparum*, *P. ovale* and *P. malariae*, suggesting a non-negligible presence of co-infection (Table 4). In all blood donors, 85% (1,050/1,235) presented antibodies directed to native *P. falciparum* antigen, 94.4% (1,166/1,235) to *P. falciparum* recombinant rPfMSP1 and rPfAMA1, 56.8% (702/1,235) to the *P. ovale* recombinant rPoMSP1, and 67.5% (834/1,235) to the *P. malariae* recombinant rPmMSP1. By summing up all the patients bearing antibodies directed to recombinant proteins, the prevalence was 98.8% (1,220/1,235) (Figure 1). These results demonstrate that the exclusive use of a *P. falciparum* native antigen leads to an underestimation of the seroprevalence of *Plasmodium* infection (Table 5). The 173 donors positive under RecELISA and negative under NatELISA were divided into seven populations depending on the nature of the recombinant protein detected. Notably, almost 30% of that population was positive for *P. falciparum*, *P. ovale* and *P. malariae* (Table 6). In the RecELISA malaria antibodies-positive population (n = 1,220), 45.3% of the sera had antibodies recognizing recombinant proteins from all three species (Figure 2). According to this assay, 76.1% of the population were suspected to have an infection with at least two different species of *Plasmodium*.

Seroprevalence of antibodies directed to the three species throughout the four seasons of Benin's semi-equatorial climate (Figure 3) was investigated. Recognition of antibodies directed to *P. malariae* and *P. ovale* rose until the end of the LDS. Finally, summing up the data from the three species, the rate of antibodies was constant throughout the year (Figure 3). Combining the three species' recombinant proteins improved sensitivity by 10% over the use of recombinant proteins from *P. falciparum* alone. The prevalence of antibodies against the native *P. falciparum* antigen dropped significantly at the SRS, and then increased at the LDS. Distribution of positive samples according to ELISA index for *P. falciparum*, *P. malariae* and *P. ovale* recombinant antigens was also estimated and showed low rates for antibodies directed to *P. ovale* and *P. malariae* species and higher rates for antibodies directed to *P. falciparum* (Figure 4). No correlation between parasite density and antibody titre for NatELISA and RecELISA for the three species was observed.

Discussion

The antigenicity of these recombinant proteins was first evaluated in patients infected by *P. falciparum*, *P. ovale* and *P. malariae* in European settings. The analytical parameters (sensitivity, specificity, PPV, and NPV) using recombinant proteins were better than those of an ELISA using a native antigen from *P. falciparum*. In particular, the use of recombinant proteins from the *P. ovale* and *P. malariae* species largely enhanced detection rates for those infections. The efficacy of these new tools was optimized using synthetic genes integrating consensus sequences

Table 2 Recapitulative performances of the assay

Performances	NatELISA	RecELISA rPfMSP1 + rPfAMA1	RecELISA rPoMSP1	RecELISA rPmMSP1	RecELISA Total
Sensitivity	129/144 (89.6%)	100/106 (94.3%)	23/26 (88.5%)	12/12 (100%)	135/144 (93.8%)
Specificity	187/192 (97.4%)	189/192 (98.4%)	189/192 (98.4%)	189/192 (98.4%)	188/192 (97.9%)
PPV	96.3%	97.1%	88.5%	80%	97.1%
NPV	92.6%	96.9%	98.4%	100%	95.4%

Table 3 Performance of *Plasmodium falciparum* native antigen ELISA (NatELISA) versus three specific recombinant *Plasmodium* proteins ELISA (RecELISA Total)

	RecELISA Total Pos	RecELISA Total neg	Total
NatELISA pos	127	2	129
NatELISA neg	8	7	15
Total	135	9	144

Total comparative results for malaria-infected patients (n = 144) microscopically diagnosed in a non-endemic country.
 Positive RecELISA Total versus positive RecELISA: 135/144 versus 129/144;
 Chi-square test, p = 0.2008.

available in GenBank [4,5], covering gene polymorphisms between known strains of each species and optimized for expression in a prokaryotic system. The biobank used for validation of the reagent involved sera from patients specifically infected by one of the three species of pathogens. Specificity was high in all cases, reaching an overall level of 97.9%. In general, the use of various recombinant antigens resulted in better sensitivity without sacrificing specificity. However, this technology should be further improved, especially for *P. ovale*. The surface antigen MSP1 is highly polymorphic due to wide strain variability. This pitfall in the use of recombinant proteins leading to the presentation of limited epitopes to humoral response was previously highlighted [18]. A combined analysis of more sequences from *P. ovale* strains, now accessible on GenBank, might resolve this problem.

The RecELISA's strong performance allowed the study of Beninese blood donors. Recent studies using microscopic examination in southern Benin have demonstrated the presence of mixed infection at the following rates: 2% *P. ovale* and 3.1% *P. malariae*, associated or not to *P. falciparum*: 1.2% *P. falciparum/P. malariae*, 2.4% *P. falciparum/P. ovale* and 0.1% *P. falciparum/P. malariae/P. ovale* [19]. In this study, in a population of 1,235 healthy blood donors, microscopic examination revealed 21.2% *P. falciparum* and 0.15% *P. falciparum/P. malariae*. Similarly, in Burkina Faso, microscopy detected 72.5% *P. falciparum*, 13.2% *P. malariae* and 1.8% *P. ovale* in a population of 830 children between three and 15 years old, of which 18.8% were febrile [20]. Microscopy probably underestimates prevalence, especially for the cryptic species with low parasitaemia, *P. ovale*

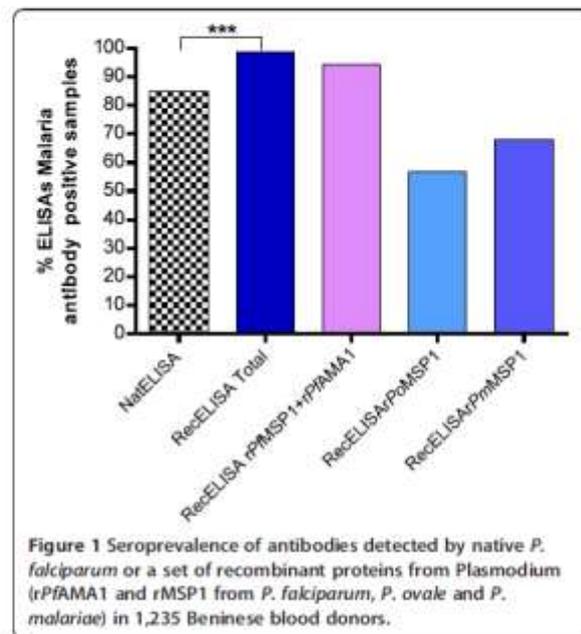


Figure 1 Seroprevalence of antibodies detected by native *P. falciparum* or a set of recombinant proteins from *Plasmodium* (rPfAMA1 and rMSP1 from *P. falciparum*, *P. ovale* and *P. malariae*) in 1,235 Beninese blood donors.

and *P. malariae*. This diagnostic tool has a detection threshold of five to 50 parasites/ μ L [8], while PCR reaches 0.001 p/ μ L [15]. A recent review [21] showed that the use of molecular methods such as PCR, facilitates greatly increased *P. malariae* and *P. ovale* detection sensitivity. Snounou *et al.*, using PCR, were able to detect in a microscopically negative Bissau-Guinean population, 23.3% *P. malariae* and 6.9% *P. ovale* [22] infection. However, submicroscopic and even sub-PCR infections do exist and can only be revealed with serology [11]. Therefore, delimiting transmission areas is essential [10]. Thus, seroprevalence reflects exposure, overcoming sampling bias associated with seasonal and year-to-year variation [11].

However, seroprevalence was exclusively tested using *P. falciparum* antigens, neglecting *P. ovale* and *P. malariae*. The use of recombinant proteins of *P. malariae* and *P. ovale* allowed revealing high prevalence of antibodies directed to these cryptic parasites. In Benin, an increased production of antibodies directed to *P. ovale* and *P. malariae* was observed until the LDS. This may be

Table 4 Evaluation of the seroprevalence of three *Plasmodium* species in blood donors from Benin by the three specific recombinant *Plasmodium* proteins ELISA (RecELISA) and *Plasmodium falciparum* native antigen ELISA (NatELISA) in a population of asymptomatic Benin blood donors with positive parasitaemia (n = 290): 288 *Plasmodium falciparum* and two mixed infection *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium malariae* identified by microscopy

Results of microscopical examination	NatELISA	RecELISA rPfMSP1 + rPfAMA1	RecELISA rPoMSP1	RecELISA rPmMSP1	RecELISA Total
288 <i>P. falciparum</i>	257/288 (89.2%)	282/288 (97.9%)	195/288 (67.7%)	229/288 (79.9%)	287/288 (99.6%)
2 <i>P. malariae</i> and <i>P. falciparum</i>	2/2 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)

Table 5 Comparative results of *Plasmodium falciparum* native antigen ELISA (NatELISA) and three specific recombinant *Plasmodium* proteins ELISA (RecELISA Total) for Beninese blood donors (n = 1,235)

	RecELISA Total Pos	RecELISA Total Neg	Total
NatELISA pos	1047	3	1050
NatELISA neg	173	12	185
Total	1220	15	1235

Positive RecELISA Total versus positive NatELISA: 1,220/1,235 versus 1,050/1,235; Chi-square test, p < 0.0001.

due to the delayed appearance of these species after the first infection, as has already been observed [23]. Using recombinant proteins from *P. falciparum* (MSP1 and AMA1), seroprevalence increased after the LRS and maintained high levels until the LDS, reflecting the long-lasting presence of IgG directed to rPfAMA1 and rPfMSP1 antigens. Similarly, the seroprevalence against *P. falciparum* recombinant proteins did not vary between wet and dry seasons in the Gambia [24]. Interestingly, a drop in the recognition of a native *P. falciparum* antigen was observed during the SRS. This may be due to a deficit of MSP1 and AMA1 in the native antigen, prepared from a synchronized culture in which an 80% schizont proportion shifted the recognition of the malarial antibodies towards the detection of older stages of *P. falciparum*. Another hypothesis is that the variation in antibody response is due to differences in antigen concentration and relative proportions of MSP1 in native and recombinant antigenic preparations.

This work shows that more than half of the studied population was in contact with other species of *Plasmodium* in addition to *P. falciparum*, and that 76% of the investigated healthy population were exposed to more than one species. These results indicate that the prevalence of non-falciparum species is much higher than previously estimated. The levels of antibodies directed to

Table 6 Distribution of species in the population negative for the *Plasmodium falciparum* native antigen ELISA (NatELISA) and positive for the three specific recombinant *Plasmodium* proteins ELISA (RecELISA Total)

Species	RecELISATotal pos	Percentage
<i>Pf</i>	65	37.6%
<i>Pm</i>	6	3.5%
<i>Po</i>	3	1.7%
<i>Po + Pf</i>	20	11.6%
<i>Po + Pm</i>	3	1.7%
<i>Pm + Pf</i>	28	16.2%
<i>Pf + Po + Pm</i>	48	27.7%
Total	173	

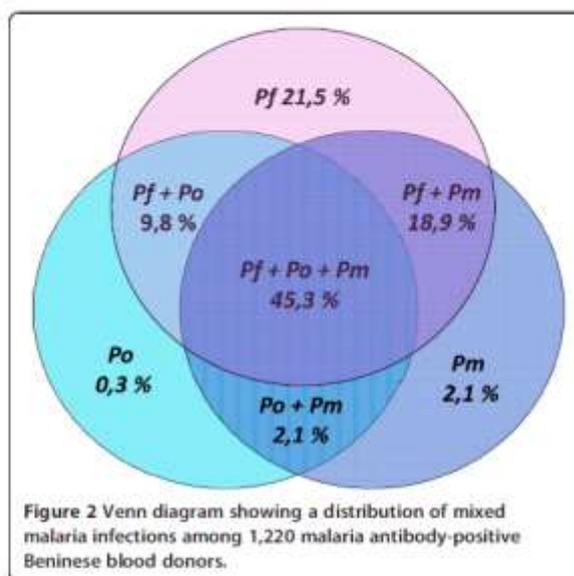


Figure 2 Venn diagram showing a distribution of mixed malaria infections among 1,220 malaria antibody-positive Beninese blood donors.

these two cryptic species is low, possibly due to their parasitaemia levels. On the contrary, high levels of antibodies against *P. falciparum* are observed, corresponding to high parasitaemia levels.

While *P. falciparum* infection remains the primary concern, the detection of *P. ovale* and *P. malariae* is still important. Although both cause mild infection, *P. malariae* can cause chronic nephritic syndrome, leading to adverse reactions during treatment and a high rate of mortality

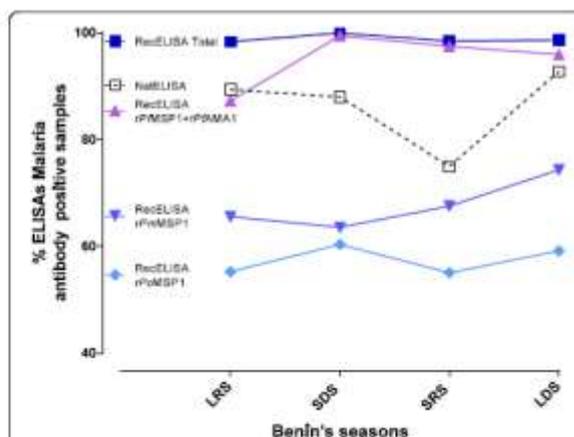
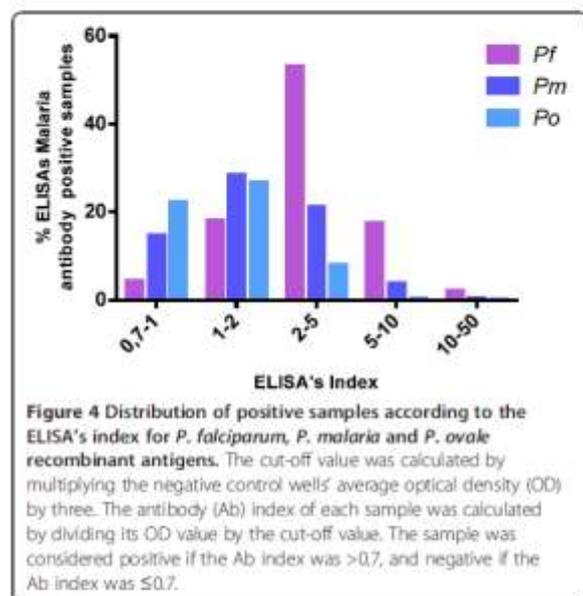


Figure 3 Seasonal evolution of seroprevalence for antibodies detected by native *P. falciparum* antigen and recombinant proteins rPfAMA1 + rPfMSP1, rPoMSP1, and rPmMSP1 in 1,235 malaria blood donors in Benin; LRS: long rainy season (May to July); SDS: short dry season (August to September); SRS: short rainy season (October to November); LDS: long dry season (December to March).



[25]. There is also a risk of recurrence decades after initial exposure, even when the infected population has left the endemic region [26]. Immune protection against *P. falciparum* is not fully effective against *P. malariae* [27]. Furthermore, *P. malariae* is more prevalent when transmission and infection rates of *P. falciparum* are lower, probably because of negative interactions with *P. falciparum*; similar interactions with *P. ovale* might exist [28]. Positive selection of anti-*P. falciparum* medication caused the prevalence of *P. malariae* to rise for four years in Burkina Faso. The authors predicted that in the absence of *P. falciparum* (ie, due to the effects of a vaccine directed against *P. falciparum*), *P. malariae* parasitaemia and gametocyte carriage could increase and maintain severe malaria infection [20].

Conclusion

Given the advent of vaccine campaigns against *P. falciparum*, other species must be monitored more closely as their presence will remain a serious health concern for exposed populations in endemic countries [29].

In conclusion, with the elimination of malaria back on the agendas of world agencies, it is necessary to monitor the effects of anti-malarial measures. In this work a standardized, sensitive and specific tool was developed that facilitates measuring and monitoring the transmission intensity of three *Plasmodium* species. Antibody prevalence for all species of *Plasmodium* will permit detection of residual infections and variations in malaria transmission. Of course, more complex combinations of recombinant *Plasmodium* proteins should be used in future

studies to avoid the disadvantages of antigenic polymorphism and variable individual responsiveness, especially for *P. ovale*. These kinds of recombinant tools could also be used to enhance blood transmission safety in non-endemic regions [30].

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

CDL, PA, AS, and EC designed the study, analysed the data and prepared the report; AS and EC coordinated the study; CDL and PA led the study in each site; LM produced the recombinant proteins; EH, SP, DF, AA, AWP, and JB processed the samples and collected the data in France; NWC, CDA and LA collected the data in Africa. All authors contributed to correcting the report. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We would like to thank technicians Rachel Huber and Sylvie Mattern from the Department of Microbiology at the Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, for technical expertise.

Author details

¹Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale Université de Strasbourg, 3, Rue Koeberlé, F67000 Strasbourg, France. ²Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Université d'Abomey Calavi, 04 BP 0320 Cotonou, Bénin. ³Agence Nationale pour la Transfusion Sanguine (Ministère de la Santé), 01 B.P. 511 Cotonou, Bénin.

Received: 21 March 2014 Accepted: 29 May 2014

Published: 18 June 2014

References

- WHO. *World Malaria Report 2012*. Geneva: World Health Organization; 2012.
- Greenwood BM, Bojang K, Whitty CJ, Targett GA. Malaria. *Lancet* 2005, **365**:1487-1498.
- Moorhy VS, Good ME, Hill AV. Malaria vaccine developments. *Lancet* 2004, **363**:150-156.
- Birkenmeyer L, Muerhoff AS, Dawson GJ, Desai SM. Isolation and characterization of the MSP1 genes from *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*. *Am J Trop Med Hyg* 2010, **82**:996-1003.
- Muerhoff AS, Birkenmeyer LG, Coffey R, Dille BJ, Barnwell JW, Collins WE, Sullivan JS, Dawson GJ, Desai SM. Detection of *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, and *P. malariae* merozoite surface protein 1-p19 antibodies in human malaria patients and experimentally infected nonhuman primates. *Clin Vaccine Immunol* 2010, **17**:1631-1638.
- Sachdeva S, Mohammed A, Dasaradhi PV, Crabb BS, Katyal A, Malhotra P, Chauhan VS. Immunogenicity and protective efficacy of *Escherichia coli* expressed *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1(42) using human compatible adjuvants. *Vaccine* 2006, **24**:2007-2016.
- Courtin D, Oesterholt M, Huismans H, Kusi K, Milet J, Bardiut C, Gaye O, Roelfen W, Remarque EJ, Sauerwein R, Garcia A, Luty A. The quantity and quality of African children's IgG responses to merozoite surface antigens reflect protection against *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS One* 2009, **4**:e7590.
- Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clin Microbiol Rev* 2002, **15**:66-78.
- Atchade PS, Doderer-Lang C, Chabi N, Perrotet S, Abdelrahman T, Akpovi CD, Anani L, Bigot A, Sanni A, Candolfi E. Is a *Plasmodium lactate dehydrogenase* (pLDH) enzyme-linked immunosorbent (ELISA)-based assay a valid tool for detecting risky malaria blood donations in Africa? *Malar J* 2013, **12**:279.
- Drakeley C, Cook J, Rollinson D, Hay SI. Potential contribution of sero-epidemiological analysis for monitoring malaria control and elimination: historical and current perspectives. *Adv Parasitol* 2009, **69**:299-352.
- Drakeley CJ, Corran PH, Coleman PG, Tongren JE, McDonald SL, Carneiro I, Malima R, Lusingu J, Marjano A, Njya WM, Lemnge MM, Cox J, Reyburn H, Riley EM. Estimating medium- and long-term trends in malaria transmission by using serological markers of malaria exposure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:5108-5113.

12. Druilhe P, Pradier O, Marc JP, Miltgen F, Mazier D, Parent G: Levels of antibodies to *Plasmodium falciparum* sporozoite surface antigens reflect malaria transmission rates and are persistent in the absence of reinfection. *Infect Immun* 1986, **53**:393-397.
13. Seed CR, Kitchen A, Davis TM: The current status and potential role of laboratory testing to prevent transfusion-transmitted malaria. *Transfus Med Rev* 2005, **19**:229-240.
14. Doderer C, Heschung A, Guntz P, Cazimave JP, Hansmann Y, Senegas A, Pfaff AW, Abelfahman T, Candolfi E: A new ELISA kit which uses a combination of *P. falciparum* extract and recombinant *P. vivax* antigens as an alternative to IFAT for detection of malaria antibodies. *Malar J* 2007, **6**:19.
15. Filisetti D, Bombard S, N'Guri C, Dahari R, Molet B, Abou-Bacar A, Hansmann Y, Christmann D, Candolfi E: Prospective assessment of a new polymerase chain reaction target (STEVOR) for imported *Plasmodium falciparum* malaria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002, **21**:679-681.
16. Calderaro A, Piccolo G, Perandin F, Gorrini C, Penuzzi S, Zuelli C, Ricci L, Manca N, Dettori G, Chezzi C, Snounou G: Genetic polymorphisms influence *Plasmodium ovale* PCR detection accuracy. *J Clin Microbiol* 2007, **45**:1624-1627.
17. Trager W, Jensen JB: Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976, **193**:673-675.
18. Taylor RR, Egan A, McGinniss D, Jepson A, Adair R, Drakely C, Riley E: Selective recognition of malaria antigens by human serum antibodies is not genetically determined but demonstrates some features of clonal imprinting. *Int Immunol* 1996, **8**:905-915.
19. Damien GB, Djerintin A, Rogier C, Corbel V, Bangana SB, Chandre F, Akogbeto M, Kinde-Gazard D, Massougbodji A, Herry MC: Malaria infection and disease in an area with pyrethroid-resistant vectors in southern Benin. *Malar J* 2010, **9**:380.
20. Gneme A, Guelbeogo WM, Biehle MM, Tiono AB, Diarra A, Kabre GB, Sagnon N, Vernick KD: *Plasmodium* species occurrence, temporal distribution and interaction in a child-aged population in rural Burkina Faso. *Malar J* 2013, **12**:57.
21. Mueller I, Zimmerman PA, Reeder JC: *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* "the bashful" malaria parasites. *Trends Parasitol* 2007, **23**:278-283.
22. Snounou G, Pinheiro L, Goncalves A, Fonseca L, Dias F, Brown KN, do Rosario VE: The importance of sensitive detection of malaria parasites in the human and insect hosts in epidemiological studies, as shown by the analysis of field samples from Guinea Bissau. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993, **87**:649-653.
23. Molnèaux L, Storey J, Cohen JE, Thomas A: A longitudinal study of human malaria in the West African Savanna in the absence of control measures: relationships between different *Plasmodium* species, in particular *P. falciparum* and *P. malariae*. *Am J Trop Med Hyg* 1980, **29**:725-737.
24. Odiro AR, Conway DJ, Schellenberg D, Satoguina J, Greenwood BM, Bojang KA: Seroepidemiological and parasitological evaluation of the heterogeneity of malaria infection in the Gambia. *Malar J* 2013, **12**:222.
25. Eiam-Ong S: Malarial nephropathy. *Semin Nephrol* 2003, **23**:21-33.
26. Siala E, Khalfoui M, Bouratbine A, Hamdi S, Hilli K, Aoun K: Relapse of *Plasmodium malariae* malaria 20 years after living in an endemic area (in French). *Presse Med* 2005, **34**:371-372.
27. Boudin C, Robert V, Verhave JP, Carnevale P, Ambroise-Thomas P: *Plasmodium falciparum* and *P. malariae* epidemiology in a West African village. *Bull World Health Organ* 1991, **69**:199-205.
28. Mason DP, McKenzie FE, Bossert WH: The blood-stage dynamics of mixed *Plasmodium malariae*-*Plasmodium falciparum* infections. *J Theor Biol* 1999, **198**:549-566.
29. Agnandji ST, Lell B, Soulanoudjingar SS, Fernandes JF, Abossolo BP, Conzelmann C, Methogo BG, Doukha Y, Flamen A, Mordmuller B, Issifou S, Kremsner PG, Sacarlal J, Aide P, Lanasa M, Aponte JJ, Nhamuave A, Quelhas D, Bassat Q, Mandjate S, Macete E, Alonso P, Abdulla S, Salim N, Juma O, Shorran M, Shubis K, Macheru F, Hamad AS, Minja R, et al: First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *N Engl J Med* 2011, **365**:1863-1875.
30. Reesink HW, Panzer S, Wendel S, Levi JE, Ullum H, Ekblom-Kullberg S, Seifried E, Schmidt M, Shinar E, Prati D, Berzolini A, Ghosh S, Flesland O, Jeansson S, Zhiburt E, Piron M, Sauleda S, Ekomo B, Eglin R, Kitchen A, Dodd RY, Leiby DA, Katz LM, Kleinman S: The use of malaria antibody tests in the prevention of transfusion-transmitted malaria. *Vox Sang* 2011, **98**:468-478.

doi:10.1186/1475-2875-13-240

Cite this article as: Doderer-Lang et al.: The ears of the African elephant: unexpected high seroprevalence of *Plasmodium ovale* and *Plasmodium malariae* in healthy populations in Western Africa. *Malaria Journal* 2014 **13**:240.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



ANNEXE 3

FICHE D'ENQUETE

Date de l'enquête : /__ / __ / __ / __ / __ / __ /

Lieu de l'enquête : A-L /__ / O-P /__ / M-C /__ /

Numéro de la fiche /__ / __ / __ / __ /

1- Caractéristiques du donneur

Nom et prénoms (Initiaux et N° de carte)..... /__ / __ / __ / __ /

Sexe /__ / __ / (M ou F)

Age /__ / __ / ans

Profession

Quartier de résidence, domicile.....

Numéro de téléphone.....

Nationalité /__ / (Béninoise = 1 Autres = 2)

Nombre de dons /__ / __ /

Numéro de poche de sang..... /__ / __ / __ / __ /

Avez-vous été transfusé cette année ? oui /__ / non /__ /

2 - Renseignements cliniques

Température...../ __/ __/, / __/ °C

Fièvre..... oui / __/ non / __/

Céphalées..... oui / __/ non / __/

Hépatomégalie.....oui / __/ non / __/

Splénomégalie..... oui / __/ non / __/

Muqueuse colorée..... oui / __/ non / __/

Fatigue.....oui / __/ non / __/

Vomissement.....oui / __/ non / __/

Anorexie..... oui / __/ non / __/

Autres signes.....oui / __/ non / __/ (préciser.....)

Tension artérielle..... / __/ / __/

Pouls...../ __/

3 - Renseignements sur l'histoire du paludisme du donneur

Dormez –vous sous moustiquaire ?..... oui /__/ non /__/

Vous pratiquez la chimioprophylaxie ?..... oui /__/ non /__/

Vous faites de la prévention ? oui /__/ non /__/

Avez-vous eu d'épisodes de paludisme cette année ? oui /__/ non /__/

(Si non arrêter de prendre les renseignements ; si oui continuer)

Accès simple..... oui /__/ non /__/

Accès grave..... oui /__/ non /__/

Avez-vous été traité ?..... oui /__/ non /__/

Si oui avec quel médicament ?.....

Le médicament a été prescrit par un médecin ou un agent de santé ?....oui /__/ non /__/

Si oui avec quel médicament ?.....

4 - Résultats hématologiques et sérologiques

Groupe sanguin-Rh...../ __/__/ __/__/

Taux d'hématocrite...../ __/

TPHA (Syphilis)Positif /__/ Négatif /__/

Hépatite B..... Positif /__/ Négatif /__/

Hépatite C..... Positif /__/ Négatif /__/

V IH-I.....Positif /__/ Négatif /__/

VIH-II.....Positif /__/ Négatif /__/

(Préciser la nature des techniques utilisées)

5 – Résultats Goutte épaisse et Frottis sanguin

GE : 1^{er} lecture Positive /__ / Négative /__ / ; 2^{em} lecture Positive /__ / Négative /__ /

3^{em} lecture Positive /__ / Négative /__ /

Si GE Positive préciser la DP /__//__//__//__//__//__ / parasites / μ L de sang.

Frottis : espèce diagnostiquée/__//__//__//__//__//__ / (*Pf* = 3 ; *Pm* = 4 ; *Po* =5 ; *Pv* =6)

6 – Résultats Nested PCR (Génotypage des gènes)

*Pf*ert..... Positif /__ / Négatif /__ /

*Pf*mdr1..... Positif /__ / Négatif /__ /

dhfr.....Positif /__ / Négatif /__ /.

Dhps.....Positif /__ / Négatif /__ /

7 – Résultats des ELISA

ELISA Ag *Pf* total Positif /__ / Négatif /__ / Douteux /__ /

ELISA pLDH...Positif /__ / Négatif /__ / Douteux /__ /

ELISA *Pf* MSP1 et *Pf* AMA1..... Positif /__ / Négatif /__ / Douteux /__ /

ELISA *Pm* MSP1..... Positif /__ / Négatif /__ / Douteux /__ /

ELISA *Po* MSP1..... Positif /__ / Négatif /__ / Douteux /__ /

ANNEXE 4

Participation au Congrès

Congrès SFP-SFMM-GPLF, Faculté de Médecine de Strasbourg-du 18 au 20 mai 2011.

PREVALENCE DU PALUDISME CHEZ LES DONNEURS DE SANG AU SUD DU BENIN P. ATCHADE^{a,*}, N. CHABI,^c L. ANNANI^b, A. BIGOT^b, C. LANG^a, A. SANNI^c et

E. CANDOLFI^a

^aInstitut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale Université de Strasbourg, 3, Rue Koeberlé, F-000Strasbourg;^b Centre National de Transfusion Sanguine, Ministère de la Santé, 02 B.P.050 Cotonou, Bénin; ^c Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Université d'Abomey Calavi, 04 BP 0320 Cotonou, Bénin

*Auteur correspondant: Pascal S. ATCHADE, atchadegb56@yahoo.fr

4^e Journées Scientifiques et Technologiques du 08 au 13 Décembre 2008 (Campus Universitaire d'Abomey-Calavi).

Formation Technologique et Professionnelle à l'EPAC : Contribution à l'édification d'un Bénin émergent



PREVALENCE DU PALUDISME CHEZ LES DONNEURS DE SANG AU SUD DU BENIN

P. ATCHADE*, N. CHABI*, L. ANNANP*, A. BIGOT*, C. LANG*, A. SANNI* et E. CANDOLF*



Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale Université de Strasbourg, 3, Rue Koeberlé, F-67081 Strasbourg Centre National de Transfusion Sanguine, Ministère de la Santé, 02 B.P.050 Cotonou, Bénin. † Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Université d'Abomey Calavi, 04 BP 0320 Cotonou, Bénin

*Auteur correspondant: Pascal S. ATCHADE, atchadegb56@yahoo.fr

INTRODUCTION ET OBJECTIF

Le paludisme est une cause majeure de décès en particulier chez les enfants de moins de 5ans et les femmes enceintes en Afrique subsaharienne. La transfusion sanguine représente une voie potentielle de transmission de *Plasmodium*, mais il n'existe encore aucun consensus sur les mesures à prendre pour prévenir le paludisme post-transfusionnel. Le but de ce travail est de déterminer la prévalence du paludisme asymptomatique chez les donneurs de sang au sud du Bénin par la technique classique GE/Frottis sanguin.

CONTEXTE

Avec son climat de type tropical, chaud et humide, le Sud du Bénin connaît deux saisons pluvieuses et deux saisons sèches qui favorisent la transmission du paludisme sur 8 mois avec 58 piqûres d'anophèle par homme et par an. Le taux d'incidence du paludisme est de 65,8 pour 1 000. Les deux principaux vecteurs sont : *Anopheles melas* (12%) et *Anopheles gambiae* (98%). Les espèces les plus transmises sont *Plasmodium falciparum* (97,1%) et *Plasmodium malariae* 2%. Le centre National Français de surveillance de la Chimiosensibilité a placé le Bénin dans le groupe III (*P. falciparum* très chimiorésistant voire polyrésistant).

En Afrique il n'existe encore aucun consensus sur les mesures à prendre pour prévenir le paludisme post-transfusionnel.

MATERIEL ET METHODES

Cette étude de type transversale, a été conduite dans le Centre National de Transfusion Sanguine de Cotonou (CNTS) qui constitue la référence en matière de transfusion sanguine. Il reçoit des donneurs des départements de l'Atlantique- Littoral, et des autres localités au sud du pays. Deux mille cinq cent quinze (2515) prélèvements ont été réalisés. Ces donneurs de sang ont été prélevés pendant 10 mois sur 5 périodes :

- début de la saison des pluies (mois de Mai) ;
- pendant la grande saison des pluies (mois de Juin-Juillet) et la petite saison des pluies (Octobre - Novembre) ;
- pendant la grande saison sèche (Décembre-Janvier-Février) et la petite saison sèche (Août-Septembre).

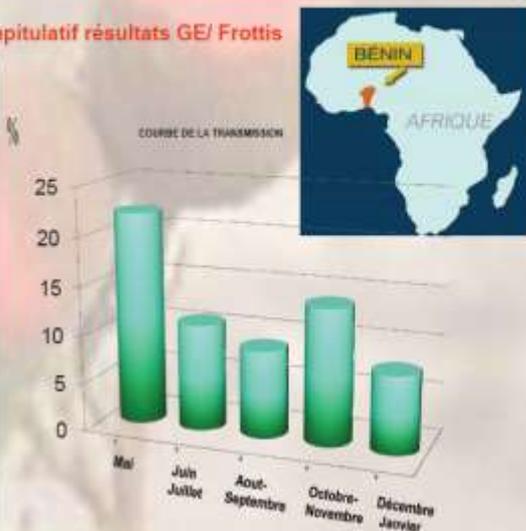
Une goutte épaisse et un étalement mince ont été réalisés et colorés au May-Grünwald Giemsa (MGG).

Chaque lame a fait l'objet d'une lecture microscopique à la recherche du *Plasmodium* avec identification de l'espèce plasmodiale de même que la densité parasitaire.



RESULTATS Tableau: recapitulatif résultats GE/ Frottis

Période de prélevement	Nombre de donneurs	Nombre de cas (%)	Prévalence des espèces plasmodiales (%)
Début saison des pluies (Mai)	307	21 (6,8)	<i>P. falciparum</i> 88 % <i>Plasmodium</i> 12 %
Grande saison des pluies (Juin-Juillet)	461	41 (8,9)	<i>P. falciparum</i> 98,28 % <i>P. malariae</i> 1,72 %
Petite saison des pluies (Octobre - Novembre)	830	300 (36,1)	<i>P. falciparum</i> 96,3 % <i>P. malariae</i> 34,34 % <i>P. ovale</i> 1,3 %
Grande saison sèche (Décembre-Janvier-Février)	881	83 (9,4)	<i>P. falciparum</i> 91,71 % <i>Plasmodium</i> 8,29 %
Petite saison sèche (Août-Septembre)	400	46 (11,5)	<i>P. falciparum</i> 91,73 % <i>P. malariae</i> 8,27 % <i>P. ovale</i> 0,00 %
TOTAL	2479	296 (11,9)	<i>P. falciparum</i> 96,85 % <i>P. malariae</i> 3,15 % <i>P. ovale</i> 0,00 %



La transmission est très importante en saison pluvieuse avec deux pics:
- début grande saison pluvieuse
- petite saison pluvieuse.

DISCUSSION

Nos résultats diffèrent de ceux trouvés par Gazard et al, (33,5%) il y a 11 ans. En effet 1537/2515 donneurs soit 61,11% ont déclaré qu'ils font de l'automédication en prenant des antipaludiques ou des tisanes dès qu'ils sentent des signes du paludisme. Ce comportement peut expliquer cette différence. Cependant, nos résultats sont proches de ceux trouvés par Owusu-Orfroi et al (10,2%) en 2010 au Ghana.

CONCLUSION

> Nos travaux ont montré que le risque de transmission du *Plasmodium* par la transfusion sanguine existe. Le taux de portage asymptomatique du *Plasmodium* est de 11,72%.

> Des hématozoaires de *Plasmodium malariae* et *P. ovale* identifiés au cours de cette étude peuvent persister trois ans chez les receveurs, ce qui témoigne de la réalité du paludisme post transfusionnel.

> Il est donc logique de proposer l'introduction d'un dépistage du *Plasmodium* sur les dons de sang en Afrique, selon une stratégie à étudier [Diop et al.,2009] car il n'existe actuellement aucune méthodologie parfaitement définie.