

## La vaccination contre le paludisme

### État actuel et perspectives

Pierre AMBROISE-THOMAS

Laboratoire de Parasitologie et Pathologie Exotique, Faculté de Médecine de Grenoble

Dans la recherche d'une vaccination active contre le Paludisme, plusieurs progrès techniques importants ont été enregistrés au cours de ces dernières années. D'une façon paradoxale, c'est cependant sur le plan psychologique et non pas technique que s'est produite l'évolution la plus considérable. En effet, il y a seulement 10 ans, aucun paludologue et aucun immunologiste n'aurait osé parler de perspective de vaccination contre le paludisme humain et encore moins entreprendre des recherches dans ce domaine. Cet objectif paraissait inaccessible pour des raisons aussi bien théoriques que pratiques. D'un point de vue dogmatique, on considérait en effet que puisque le Paludisme humain n'entraîne pas d'immunité naturelle totalement protectrice, il était illusoire d'espérer qu'une telle protection puisse être fournie par une immunisation artificielle. Apparemment logique, ce raisonnement était pourtant en contradiction avec l'exemple constitué par d'autres maladies transmissibles. C'est ainsi que le tétanos n'entraîne aucune immunité naturelle et que pourtant la vaccination contre cette affection est l'une des plus efficaces qui soit. Par ailleurs, sur un plan pratique, toute tentative de vaccination contre le paludisme humain paraissait à l'avance vouée à l'échec, compte tenu de l'impossibilité de produire les quantités de parasites nécessaires à la préparation des antigènes.

Actuellement, la mise au point d'un vaccin contre le paludisme humain est l'un des objectifs prioritaires du Programme Spécial de l'Organisation Mondiale de

la Santé pour la lutte contre les maladies tropicales. Dans plusieurs pays, différents laboratoires ont totalement ou largement orienté leurs recherches vers ce domaine. Des résultats nombreux ont déjà été acquis. Nous envisagerons les principaux de ces résultats pour chacun des trois types de vaccinations réalisées puis nous tenterons de dégager la synthèse des perspectives d'avenir à court ou à moyen terme mais aussi des difficultés qui restent à surmonter.

### LES DIFFÉRENTS TYPES DE VACCINATIONS ET LEURS PRINCIPAUX RÉSULTATS

Sur le cycle évolutif des *Plasmodium*, il existe trois points d'impact possibles à une vaccination. Les gamètes, les sporozoïtes et les formes sanguines avec, plus particulièrement, les mérozoïtes.

#### 1. Vaccination contre les gamètes

Dans son principe même, il s'agit d'une vaccination éminemment philanthropique. En effet, le sujet vacciné ne peut attendre directement aucun effet bénéfique de cette opération qui, en revanche, empêche la transmission du paludisme à d'autres sujets.

Jusqu'ici, les essais n'ont été réalisés qu'avec des modèles animaux : *Plasmodium gallinaceum* et, plus

récemment, *Plasmodium knowlesi* (Gwadz, 1976 ; Carter et Chen, 1976 ; Gwadz, Carter et Green, 1979). L'inoculation de gamètes traités par le formol ou soumis à des irradiations ne protège pas contre l'infestation par des sporozoïtes et n'empêche pas le développement de formes sanguines asexuées. En revanche, les gamètes produits ne sont pas fertilisants chez le moustique. Cette immunité est liée à la présence d'IgG normalement ingérées par le moustique lors du repas de sang. Si les gamètes sont mis en suspension dans du plasma normal, ils peuvent recouvrer leurs possibilités actuelles de fécondation.

Récemment, des études ont été réalisées pour *P. gallinaceum* avec la technique des hybridomes. Il a pu ainsi être produits deux anticorps monoclonaux qui, séparément, ne provoquent qu'une agglutination stellaire des gamètes mâles mais qui exercent une action synergique et entraînent alors une agglutination des gamètes qui se disposent en lignes et perdent leur pouvoir de fertilisation.

Jusqu'ici, aucun essai n'a été réalisé avec des *Plasmodium* humains. Il faut par ailleurs souligner que les voies d'immunisation varient totalement suivant le modèle expérimental utilisé : injection intra-veineuse pour *P. gallinaceum* et, au contraire, injection intra-musculaire en adjuvant complet de Freund (ACF) pour *P. knowlesi*.

## 2. Immunisation contre les sporozoïtes

Il s'agit d'une vaccination réellement prophylactique puisqu'elle provoque la destruction des sporozoïtes mais, en revanche, est absolument sans effet sur le développement des parasites endo- ou exo-érythrocytaires. Il est donc essentiel que cette vaccination soit à 100 % efficace puisqu'un seul sporozoïte peut provoquer un paludisme pernicieux. Il s'agit par ailleurs du seul type de vaccination qui ait été avec succès utilisé chez l'homme (volontaires).

Des résultats peu convaincants ont été obtenus par inoculation de sporozoïtes vivants (infection expérimentale rapidement traitée et guérie) ou tués par les U.V., une destruction mécanique ou le formol. En revanche, des expériences très démonstratives ont été effectuées avec des sporozoïtes irradiés. Les principaux travaux ont été réalisés par le groupe de Nussenzweig à New York. L'immunisation est effectuée par voie intra-veineuse avec inoculations répétées à 3 ou 4 reprises de  $10^5$  à  $5 \times 10^4$  sporozoïtes irradiés par 8 krad. L'immunité obtenue dure environ deux mois et entraîne au moins 90 % de protection. Elle est parallèle aux titres observés en Immuno-fluorescence sur des sporozoïtes (Beaudoin *et coll.*, 1977) et elle

peut être également suivie *in vitro* par le test de neutralisation des sporozoïtes et par la réaction de précipitation circum-sporozoïtaire. Cette immunisation est strictement spécifique du stade évolutif. Elle confère une protection étendue à plusieurs espèces (l'immunisation par les sporozoïtes de *P. berghei* protège contre *P. vinckei* *P. chabaudi*). En fait, cette protection étendue n'est peut-être pas valable dans tous les cas et pour les *Plasmodium* humains, l'immunité semble être strictement spécifique d'espèce (Clyde, 1975). Le mécanisme mis en cause paraît correspondre à la production d'anticorps circulants liés à un développement de formes parasitaires. La protection n'est en effet obtenue que par l'injection intra-veineuse de sporozoïtes vivants mais atténués. Cette immunité est thymodépendante et n'est pas modifiée par la splénectomie (Spitalny, 1976).

L'étude des antigènes sporozoïtaires est particulièrement avancée. En effet, pour *P. berghei*, Nussenzweig *et coll.* ont réalisé un marquage par l'iode radioactif de sporozoïtes entiers, les parasites étant ensuite éclatés par passage à la presse de French et les extraits soumis à une électrophorèse en gel de dodécylsulfate de sodium-polyacrylamide (SDS-Page). Après coloration par le bleu de Coomassie, on réalise une auto-radiographie qui révèle la présence d'un nombre finalement limité de composants antigéniques (moins de 10) dont le plus important a un poids moléculaire de 44 000 (Pb 44). Cette fraction est spécifiquement précipitée par tous les immuns sérums anti-sporozoïtes de *P. berghei*. Elle a permis l'obtention d'anticorps monoclonaux par la technique des hybridomes. A l'aide d'une lignée continue (3D 11) il a pu être préparé *in vitro* des anticorps dont le pouvoir protecteur a été prouvé, ce qui constitue la première réalisation de ce type en matière de paludisme.

Pour le paludisme des singes, des résultats d'abord inconstants ont été obtenus avec le modèle *P. cynomolgi bastianellii*-*Macaca mulatta* (Collins, Contacos, 1972 ; Ward, Hayes, 1972). En revanche, le modèle *P. knowlesi*-*Macaca mulatta* a conduit, lui, à des immunisations très démonstratives (Gwadz *et coll.*, 1979). Les vaccinations sont réalisées par injection intra-veineuse de sporozoïtes isolés et irradiés à 30 krad. Il faut inoculer 7 à 14 doses vaccinales pendant une période de 7 à 11 mois avec un total de 3 à 400 millions de sporozoïtes. Il en résulte une protection efficace et qui est parallèle aux titres en immuno-fluorescence sur antigènes sporozoïtaires, aux résultats de la réaction de neutralisation des sporozoïtes et à ceux du test de précipitation circum-sporozoïtaire. Par ailleurs, les antigènes des sporozoïtes de *P. knowlesi* ont été étudiés par les mêmes méthodes d'auto-radiographie après marquage à l'iode radioactif et électropho-

rèse sur SDS-Page. Le principal antigène sporozoïtique de surface a un poids moléculaire de 100 000 daltons et paraît strictement spécifique.

Enfin, la vaccination contre les sporozoïtes a été réalisée chez différents volontaires. Les premières expériences sont celles de Rieckmann *et coll.*, 1974 et de Clyde *et coll.*, 1973 et 1974). Elles ont été réalisées par piqûre (3 à 500 par sujet) de moustiques infestés et irradiés par 12 à 15 krads. Pour *P. falciparum*, l'immunité a été constatée pendant environ 3 mois dans la proportion de 2 sujets sur 5. Avec *P. vivax*, l'immunité semble, elle, durer 3 à 6 mois. Par la suite, (Bray, 1976) des résultats plus décevants ont été observés chez des enfants en Gambie. L'immunisation par des sporozoïtes irradiés par 20 krads n'a en effet pas provoqué d'immunité de protection face à des infections naturelles. En revanche, les expériences très récentes de Rieckmann *et coll.*, 1979, chez 3 volontaires, ont, elles, abouti à des protections réellement efficaces. L'immunisation a été conduite à partir de la souche éthiopienne Taménie de *P. falciparum* avec 6 à 8 expositions aux piqûres d'un total de 440 à 987 moustiques infestés puis irradiés par 12 krads. La protection observée concerne aussi bien la souche homologe (sensible à la chloroquine) que des souches hétérologues (souche vietnamienne résistante à la chloroquine).

### 3. Vaccination contre les formes sanguines

#### a. IMMUNISATION PAR INFECTIONS ACTIVES CONTRÔLÉES

Un certain degré de protection a été observé par des infections actives et contrôlées par notamment la chloroquine (*P. berghei* chez la souris, Yoeli, 1974 ; *P. falciparum* chez *Aotus trivirgatus*, Voller et Richards, 1970).

#### b. PARASITES IRRADIÉS

Les érythrocytes parasités et irradiés ont été largement utilisés comme immunogènes expérimentaux. Chez la souris, l'injection d'érythrocytes infestés par *P. berghei* et irradiés par 18 à 20 krads provoque une certaine immunité (Corradetti, 1966 ; Sadun, 1967). De même, chez *Aotus trivirgatus* (Douroucouli) 3 injections de  $2 \times 10^8$  cellules parasitées et irradiées provoquent une légère diminution de la réceptivité à des infestations ultérieures (Sadun *et coll.*, 1969). Des résultats analogues ont été observés pour le modèle *P. knowlesi-Macaca mulatta* (Corradetti, 1972).

### c. SCHIZONTES ENDO-ÉRYTHROCYTAIRES EN ADJUVANTS

L'injection de schizontes de *P. knowlesi* en adjuvant complet de Freund (ACF) protège environ 50 % des singes Rhésus contre une épreuve ultérieure par le variant homologue. Les survivants ainsi immunisés ne présentent qu'une parasitémie brève et spontanément limitée mais qui ne s'étend pas aux variants antigéniquement hétérologues. En outre, on peut observer chez ces survivants une anémie importante provoquée par l'injection de débris érythrocytaires (anémie par auto-anticorps), mais, d'une façon générale, le principal inconvénient de la vaccination par les schizontes concerne le manque d'efficacité sur les variants hétérologues.

L'analyse antigénique de schizontes endo-érythrocytaires a été réalisée pour *P. knowlesi*. Il a été isolé 25 fractions différentes dont 12 sont retrouvées sur la membrane d'érythrocytes parasités. Deux de ces fractions, d'un poids moléculaire de 65 000 et 90 000 daltons paraissent inter-spécifiques puisqu'elles sont précipitées aussi bien par des sérums homologues que par les sérums de malades spontanément infestés par *P. falciparum*.

### d. MÉROZOÏTES EN ADJUVANTS

C'est actuellement l'un des modes d'immunisation qui paraît le plus prometteur car il n'est pas limité par l'existence de variants antigéniques, les mérozoïtes libres paraissant au contraire particulièrement sensibles à l'action des anticorps.

Les parasites doivent être injectés par voie intramusculaire, en présence d'adjuvant, généralement l'adjuvant complet de Freund.

Pour le modèle *P. knowlesi-Macaca mulatta*, plusieurs travaux ont été réalisés, notamment par Mitchell *et coll.*, 1973 ; Richards, Cohen, 1977. La protection concerne aussi bien les variants antigéniques homologues que les autres. Après cette immunisation, une infestation par des sporozoïtes provoque un développement normal des formes exo-érythrocytaires mais la parasitémie reste très faible ou même nulle (Richards *et coll.*, 1977).

Pour le paludisme à *P. falciparum* de singes *Aotus trivirgatus*, Reese *et coll.*, 1978, ont réalisé des vaccinations à partir de mérozoïtes obtenus en cultures *in vitro*.  $5 \times 10^8$  mérozoïtes soigneusement débarrassés de tout débris érythrocytaire sont injectés par voie intra-musculaire à 3 reprises, en présence d'adjuvant de Freund incomplet associé à un dipeptide synthétique, le Muramyl dipeptide ou MDP. La protection a

été observée contre une infection réalisée après 3 semaines, mais n'a concerné qu'un singe sur 3 en raison probablement des quantités insuffisantes d'antigènes utilisés pour l'immunisation. Par la suite, des résultats analogues ont été obtenus par Siddiqui *et coll.* (1979) avec une protection chez tous les animaux immunisés mais, malheureusement, un survivant parmi les animaux témoins (réceptivité inégale des *Douroucoulis* en fonction du caryotype). Dans l'étude de Mitchell, Richards *et coll.*, 1977, la vaccination a été réalisée par 3 injections, à 20 jours d'intervalle, de  $10^8$  à  $10^9$  mérozoïtes de *P. falciparum* en adjuvant complet de Freund. L'immunité observée concernait aussi bien la souche vaccinante (souche Gambie) que des souches hétérologues (originaires du Nigeria ou d'Ouganda) mais n'avait aucun effet vis-à-vis de *P. knowlesi*.

Par immuno-électrophorèse bi-dimensionnelle, les sérums de singes vaccinés contre des mérozoïtes de *P. knowlesi* ont permis d'identifier 11 fractions antigéniques différentes dans des érythrocytes parasités. Deux de ces antigènes varient quantitativement suivant le stade évolutif du parasite et semblent donc spécifiques de ces stades. Une autre fraction paraît, elle, spécifique de l'espèce.

## DIFFICULTÉS ACTUELLES ET PERSPECTIVES D'AVENIR

En quelques années, la vaccination contre le paludisme a donc connu d'indiscutables progrès. Cependant, plusieurs et importantes difficultés demeurent. Elles concernent essentiellement les sources d'antigènes, les modèles expérimentaux utilisables, les voies d'administration et les stimulants non spécifiques de l'immunité, enfin, les effets immuno-pathologiques ou iatrogènes.

### a. Sources d'antigènes

Pour une très large part, les progrès récents de la vaccination contre le paludisme sont liés à la possibilité de cultiver *in vitro* *P. falciparum* à la suite notamment des travaux de Trager et Jensen. Cependant, le rendement de ces cultures demeure faible et, au moins avec les systèmes expérimentaux les plus simples, des manipulations quotidiennes sont indispensables. En outre, *P. falciparum* ne se développe que dans des hématies humaines et il s'ensuit une possibilité de contamination des extraits antigéniques par

des fractions d'origine érythrocytaire. Un risque supplémentaire était représenté jadis par l'addition d'un sérum humain au milieu de culture. Il est désormais possible d'éviter ce risque par l'utilisation de certains sérums animaux. Malgré cela, le rendement des cultures *in vitro* est manifestement trop faible pour que ces cultures puissent un jour constituer une source suffisante d'antigènes parasitaires. Dans ces conditions, on tend à s'orienter de plus en plus vers la production d'anticorps spécifiques monoclonaux obtenus par la méthode des hybridomes. Grâce à ces anticorps, il serait ensuite possible d'isoler des immunogènes réellement spécifiques dont la production pourrait être envisagée par les techniques de recombinaisons génétiques bactériennes.

### b. Modèles expérimentaux

Quelle que soit la qualité des antigènes plasmodiaux que nous pourrions préparer, il restera indispensable de les expérimenter chez des animaux réceptifs. L'espèce de choix est représentée par les *Aotus trivirgatus* (*Douroucoulis*), singes de petite taille, originaires d'Amérique latine. Malheureusement, l'obtention de ces singes devient de plus en plus difficile et dans de larges zones l'espèce semble en voie de disparition ou est en tout cas très menacée. Il importe donc absolument de prévoir l'élevage et la reproduction de ces animaux dont seuls certains caryotypes sont régulièrement réceptifs à *P. falciparum*. D'une façon générale, c'est *Aotus trivirgatus grisemembra*, originaire de Colombie qui est le plus facilement parasité. En fait, il existe au moins 9 caryotypes différents pour ces singes et seuls 2 caryotypes (II et III) assurent une possibilité d'infestation dans 100 % des cas. Cet aspect est fondamental si l'on considère que certaines expériences récentes ont vu une partie de leur valeur diminuée par la survie d'animaux témoins non immunisés et dont l'infestation aurait dû être normalement mortelle.

### c. Voies d'administration et adjuvants

Pour l'immunisation anti-sporozoïtique, la voie intra-veineuse est impérativement nécessaire dans les modèles expérimentaux. Pour des raisons évidentes, elle ne saurait être concevable dans une éventuelle application en médecine humaine. La même impossibilité concerne évidemment les injections intra-musculaires avec adjuvant complet de Freund pour l'immunisation contre les mérozoïtes. Il est donc essentiel de pouvoir utiliser de nouvelles fractions immunogènes actives par voie sous-cutanée ou intradermique et,

parallèlement, de disposer de nouveaux stimulants non spécifiques de l'immunité, aussi actifs que l'adjuvant complet de Freund mais ne présentant pas les mêmes effets secondaires. Ces adjuvants devront être capables non seulement d'aider à l'induction initiale de l'immunité mais également et surtout d'en accroître la durée qui, actuellement, ne dépasse pas quelques semaines ou quelques mois.

#### d. Effets immunopathologiques ou iatrogènes

Il s'agit-là, à terme, d'un des aspects les plus préoccupants de la vaccination contre le paludisme. En effet, on ignore quels seront les effets indésirables ou néfastes de cette vaccination chez des sujets vivants en zone d'endémie, constamment infestés et réinfestés et qui sont le plus souvent porteurs d'autres affections. En fonction de nos connaissances actuelles, certains effets immuno-pathologiques sont à craindre, notamment en matière de glomérulo-néphrite ou de syndrome néphrotique, voire d'anémie par auto-anticorps. Cependant, des effets plus indirects peuvent être également redoutés comme, par exemple, une action immuno-dépressive ou un rôle déclenchant dans certaines infections (lymphome de Burkitt) ou aggravant pour d'autres maladies (rougeole). Indépendamment de tous les contrôles habituellement prévus pour toute nouvelle vaccination, une prudence particulière s'impose donc indiscutablement en matière de paludisme.

De cette revue d'ensemble, inévitablement incomplète, on retiendra d'abord que la vaccination contre

le paludisme qui constituait jadis un rêve apparemment inaccessible représente aujourd'hui un objectif parfaitement envisageable. Les résultats acquis justifient un optimisme raisonné. Les difficultés encore présentes rendent, elles, indispensable une très large prudence.

Que la vaccination anti-palustre soit un jour réalisable n'est actuellement pas douteux. A l'inverse, il est absolument impossible d'évaluer le temps encore nécessaire à la mise au point de ce vaccin. L'enjeu est en effet trop considérable, aussi bien sur le plan médical, humain, que du point de vue scientifique, économique ou même politique pour que certains résultats ne demeurent pas inévitablement non publiés. Disposer dans ces conditions d'une information complète et exacte est évidemment très difficile car cette information peut être entachée d'erreurs par défaut (secret entourant certaines expériences) ou par excès (« bluff » ou optimisme exagéré).

Sans doute plusieurs années seront-elles encore indispensables à la mise au point d'un vaccin contre le paludisme à moins que n'intervienne une de ces accélérations brutales dont a parfois bénéficié dans le passé la recherche médicale.

#### BIBLIOGRAPHIE

Les principales bibliographies récentes seront trouvées dans :

- COHEN (S.) et MITCHELL (G. H.), 1978. — Prospects for immunisation against Malaria. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 80 : 97-137.  
O.M.S., 1979. — L'immunologie du paludisme. *Bull. Org. mond. Santé*, 57, suppl., n° 1, 290 p.

### Spécificité des antigènes plasmodiaux thermolabiles

P. DRUILHE  
G. MÉNARD  
M. GENTILINI

Département de Parasitologie et Médecine Tropicale  
Pitié Salpêtrière, 47 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris

Parmi les très nombreux antigènes constituant les parasites, on a identifié parfois des antigènes spécifiques de genre et plus rarement des antigènes spécifiques d'espèce parasitaire.

Dans le cas du paludisme, la pratique en routine depuis 4 ans d'une technique de précipitation, l'immuno-diffusion ou électrosynérèse (E.S.), avec un extrait de *P. falciparum*, nous conduit à penser que l'un