

ETUDE SEROLOGIQUE DU PALUDISME CHEZ LES INDIENS CUIVA DU VENEZUELA PAR LA METHODE D'ELECTROSYNERESE

Par P. DRUILHE,*
F. FONVAL**
et A. FRIBOURG-BLANC***

1. INTRODUCTION

Menant depuis décembre 1972 une enquête ethnologique¹ auprès des indiens Cuiva des savanes du Sud du Vénézuéla, il nous a paru nécessaire de compléter celle-ci par l'étude de différents paramètres biologiques. Comme le paludisme fait l'objet d'une lutte prophylactique dans l'ensemble du Vénézuéla, il nous a semblé intéressant d'en évaluer le niveau d'endémie dans cette population isolée.

Pour ce faire, nous avons utilisé une nouvelle technique sérologique de dépistage : l'électrosynérèse sur membrane d'acétate de cellulose. Cette dernière est bien adaptée à la séro-épidémiologie de masse puisqu'elle permet de traiter plusieurs centaines de sérums par jour.

2. PRÉSENTATION DE LA POPULATION ÉTUDIÉE

Entre mars et juin 1976, lorsque nous avons effectué les prélèvements, la population cuiva du Vénézuéla comptait 256 individus. La vie de ces indiens est essentiellement liée aux cours d'eau qui traversent les savanes où ils nomadisent. C'est en effet sur ces cours d'eau que les Cuiva se déplacent le plus fréquemment et c'est essentiellement de la faune et de la flore des galeries forestières de bord de fleuve et de lagune que dépend leur subsis-

* Laboratoire Central de Parasitologie (Pr. M. Gentilini), Hôpital de la Pitié, 75013 Paris.

** CNRS, 15 quai Anatole France, 75007 Paris.

*** Laboratoire d'Immunologie, 5bd du Montparnasse, 75006 Paris.

tance. C'est aujourd'hui encore le produit de la chasse de la pêche et de la cueillette qui constitue l'essentiel de leur diète, en dépit de l'introduction récente de quelques plantations de bananiers. Les Cuiva étaient il a une vingtaine d'années encore exclusivement nomades et leur sédentarisation progressive sur les rives du fleuve Capanaparo, où le gouvernement leur a donné une terre n'est due qu'à l'envahissement toujours plus important d'éleveurs dont les propriétés viennent chaque jour limiter le territoire de chasse des Cuiva. Ces indiens habitent donc à présent en trois endroits : les deux premiers San Esteban de Capanaparo et El Paso se trouvent à une heure de marche l'un de l'autre. Là, les Cuiva ont construits quelques "maisons" : simples toits en feuilles de palmier soutenus par des troncs d'arbres, où ils se regroupent par "maisonnées", c'est à dire par familles nucléaires ou étendues (qui peuvent compter de quatre à trente personnes). Le troisième groupe, qui compte environ 25 personnes, s'est installé dans une maison en dur qui faisait partie de la donation gouvernementale. Cette ferme se trouve à l'intérieur des terres à trois quarts d'heure de marche de San Esteban et à une demi heure de El Paso. Là, les Cuiva s'approvisionnent en eau à un puits. Il s'y trouve aussi une piste où peuvent cuiva est inondée pendant presque toute la saison des pluies qui dure 8 mois.

En dépit de cette sédentatisation, les Cuiva des trois groupes n'ont jamais cessé de nomadiser pour chercher leur nourriture. Leurs absences peuvent durer quelques jours, quelques semaines ou même, en saison des pluies, quelques mois, ce qui n'est pas fait pour faciliter la tâche de l'ethnologue qui ne peut suivre tous les groupes dans leurs déplacements.

3. MATERIEL ET METHODES

3.1. En raison des fréquents déplacements de la population étudiée, il ne nous a été possible d'examiner que les sérums de 101 individus âgés de 6 à 63 ans. Les 101 prélèvements analysés ont été maintenus à une température proche de + 4°C durant les cinq jours du transport entre le lieu de prélèvement et Paris. Le sérum a été ensuite décanté, puis congelé à — 20°C avant son utilisation.

3.2. Des frottis ont été pratiqués et la lecture, effectuée après coloration par le May-Grunwald-Giemsa.

Les immunoglobulines G, M et A ont été dosées par immuno-néphélométrie sur appareil Technicon à l'aide d'antisérums de la même marque ; les résultats en sont exprimés en pourcentages par rapport aux taux moyens normaux.

3.3. Le dépistage sérologique du paludisme fait le plus souvent appel à la technique d'immunofluorescence indirecte (IFI) qui est considérée comme de bonne valeur diagnostique lorsque l'on utilise un antigène homologue: *P. falciparum* surtout, *P. vivax* ou *P. malariae*. Ces antigènes sont d'obtention et de conservation difficiles : de plus l'IFI est une technique relativement lente à mettre en oeuvre ce qui restreint son intérêt en épidémiologie.

Les tests de précipitation ont été pratiqués initialement avec des antigènes extraits de schizontes placentaires (2) ce qui en limitait l'emploi. Nous avons montré qu'un antigène utilisable en précipitation pouvait être extrait des trophozoïtes jeunes présents dans le sang périphérique de sujets infectés par *P. falciparum* (3). L'application de cet antigène à un test d'immuno-électro-diffusion (IED), ou électro-synérèse (ES), en améliore la sensibilité et permet d'obtenir le résultat plus rapidement qu'en diffusion en gel d'agarose (4). Cette technique a été appliquée à près de 15 000 sérums depuis 2 ans ; la pratique conjointe de l'IFI a permis d'en vérifier la bonne sensibilité et spécificité.

Dans le cas présent l'ensemble de la manipulation des 101 sérums et la lecture des résultats ont été achevés en 3 heures 30 minutes par une seule personne.

Des membranes d'acetate de cellulose de 2,5 x 11 cm (cellogel, Sebia Sartorius...) sont placées sur un support dans une cuve de migration contenant un tampon tris-veronal 0,05 M, PH 9,2 ; les sérums sont ensuite déposés en gouttes de 15 µl sur les membranes, puis 15 µl d'antigène extrait de *P. falciparum* dilué à 100 µg/ml, sont déposés linéairement (figure 1) à 1,5 cm des dépôts sérums, côté cathodique. La migration s'effectue ensuite sous une différence de potentiel de 75 volts pendant 2 heures 30 minutes. Les membranes d'acetate de cellulose sont alors lavées pendant quelques minutes dans deux bains successifs de tampon puis colorées dans un bain de noir-amide à 5 % et décolorées pendant 10 minutes dans un mélange méthanol-acide acétique.

Le résultat est exprimé en nombre d'arcs de précipitation, sans tenir compte de leur densité.

4. RESULTATS

La présence en électrosynérèse d'anticorps anti-L (anticorps dirigés contre les antigènes L thermolabiles) est hautement spécifique de l'infection plasmodiale (4). Ces anticorps ont été identifiés en utilisant la méthode de

co-électrosynérèse, qui permet d'observer la continuité des précipités obtenus, entre le sérum à tester et un sérum témoin positif connu (Photo A).

Dans notre étude 98 individus sur 101 présentent ce précipité spécifique. Ce résultat montre que dans les régions où vivent les Cuiva le paludisme se transmet encore de façon extrêmement active. En effet, les anticorps anti-plasmodiaux persistent peu de temps, même en l'absence de traitement ; leur présence chez un individu témoigne d'une infection récente, c'est à dire datant de moins de 18 mois.

Outre l'anticorps anti-L, certains sérums étudiés présentent des précipités supplémentaires; ceux ci sont constitués d'anticorps dirigés contre les antigènes plasmodieux S, thermostables, décrits par Wilson et coll (2). La signification de la présence d'anticorps anti-S est mal connue. D'après les études que nous avons effectuées en Afrique intertropicale il apparaît qu'ils sont exceptionnellement retrouvés chez les individus de moins de 5 ans, et que leur fréquence augmente avec l'âge.

Le nombre de précipités obtenus dans les différentes tranches d'âge est présenté dans le tableau I. Un peu plus de la moitié des individus ne présente qu'un seul précipité de nature L., ce qui montre que le nombre de recontaminations par an est relativement faible et que la transmission du paludisme est sans doute saisonnière; ces résultats diffèrent de ceux que nous avons observés en Guyane Française chez des populations Oyampis et Wayana, où le nombre moyen d'arcs de précipitation anti-plasmodiaux était plus élevé (résultats non publiés). On constate par ailleurs que le nombre des précipités augmente avec l'âge des sujets ce qui confirme ce que nous avons observé dans d'autres régions, et tendrait à prouver que l'acquisition d'anticorps anti-S résulte de l'exposition répétée au paludisme, pendant de très nombreuses années.

Les résultats du dosage des immunoglobulines et leur corrélation avec l'électrosynérèse sont présentés dans le tableau II et les figures 2, 3 et 4. Bien que le taux moyen des IgG soit élevé, ce qui est habituel en zone malarieuse, cette valeur est relativement stable quelque soit le degré de positivité en électrosynérèse; il en va de même pour les IgA.

Les variations des taux de l'immunoglobuline M sont au contraire très démonstratives; chez les 3 sujets négatifs le taux moyen d'IgM est normal; il est augmenté de 50 % chez les individus présentant un arc en électrosynérèse et augmente ensuite régulièrement en fonction du nombre de précipités obtenus pour atteindre 3 fois la valeur normale chez les individus les plus positifs. Ces résultats concordent avec ceux que nous avons relevés chez 2400 individus vivant en zone de savane africaine; comme il y a une relation

positive entre l'âge des individus et le nombre de précipités, il semble que la production massive d'IgM soit la conséquence de stimuli antigéniques répétés. Il faut toutefois rappeler que parmi les IgM produites, peu ont une activité anti-plasmodiale, et qu'il s'agit d'un phénomène en grande partie non spécifique.

Ces résultats appellent quelques commentaires:

— Ils confirment l'intérêt de la sérologie par rapport à la recherche des parasites par examen microscopique, aucun plasmodium n'ayant été retrouvé chez les 101 individus testés par cette dernière méthode (mais les frottis ont été pratiqués en saison sèche), et indiquent que la lutte anti-paludique doit être poursuivie dans la région étudiée.

— Ils confirment également l'intérêt de la méthode d'électro-synérèse en séro-épidémiologie. Par rapport à la méthode classique d'immunofluorescence, celle-ci permet de déterminer beaucoup plus rapidement le niveau d'endémie et de guider ainsi l'action des équipes de lutte antipaludique. Il est, de plus possible que la présence d'anticorps anti-S présente une valeur pronostique

— D'après l'expérience que nous avons acquise de cette technique et qui porte sur plus de 15 000 sérums, il semble que l'anticorps anti-L soit spécifique de l'infection à *P. falciparum*. En conséquence il est vraisemblable que, à la différence d'autres zones du Vénézuéla où *P. vivax* est fréquemment rencontré (5), dans la région que nous avons étudiée, la totalité des accès soient dus à *P. falciparum*. Cette notion qui peut être évoquée sur des arguments sérologiques mériterait d'être vérifiée par une enquête parasitologique traditionnelle, par examen direct du sang, effectuée en saison humide.

L'existence de 3% de sérologies négatives est difficile à interpréter. Nous avons vérifié que ces individus étaient également négatifs en immunofluorescence, ce qui permet d'écartier une erreur du test d'électrosynérèse. Comme la population étudiée ne comporte aucun individu de moins de 6 ans, il ne peut s'agir de sujets neufs, c'est à dire n'ayant jamais été en contact avec le paludisme; il est possible que ces individus aient suivi correctement la chimioprophylaxie qui leur en a été proposée. En fait il est intéressant de remarquer que les 3 sujets sérologiquement négatifs appartiennent à une même famille dont la principale caractéristique est de vivre dans la seule habitation en dur existante, située à distance des autres toits. Ce type d'habitation se prête plus facilement à la désinsectisation qu'effectuent les équipes mobiles, par pulvérisation sur les murs de ciment.

Enfin il faut signaler, qu'après avoir réalisé nos tests sérologiques, nous avons appris que les mêmes sérums avaient également été testés en immuno-

fluorescence (antigène *P. falciparum*) par Lebras et coll. qui avaient trouvé 35% de positivité. Il existait donc 13% de divergence entre les 2 techniques. Les sérums litigieux ont alors été recontrôlés 2 fois en électrosynérèse et 3 fois en immunofluorescence (antigène *P. falciparum*) et ont été retrouvés positifs par les 2 techniques. Ce concours de circonstances prouve donc, à notre avis, la fiabilité de la méthode d'électrosynérèse et sa supériorité sur des techniques comme la fluorescence, sujette à variations selon le lot d'antigène utilisé et dont la lecture est moins objective.

5. RESUME

101 sérums, prélevés chez des Indiens Cuiva du Vénézuéla âgés de 6 à 53 ans, ont fait l'objet d'une mesure d'anticorps plasmodiaux par une nouvelle méthode d'électrosynérèse sur membrane d'acétate de cellulose. Des anticorps spécifiques ont été retrouvés chez 98 d'entre eux, ce qui montre que la transmission du paludisme est toujours très active dans la région où ils vivent. Le taux des immunoglobulines M augmente de façon parallèle au nombre de précipités obtenus en électrosynérèse et atteint trois fois la normale chez les plus positifs, tandis que le taux des IgA et des IgG varie peu.

nombre d'arcs âges	0	1 arc	2 arcs	3 arcs	≥ 4 arcs
6 - 9	1	3	2		
10 - 12	1	6			
13 - 15		4	1	2	
16 - 30	1	26	12	2	3
> 30		16	12	5	4
Total	3	55	27	9	7

Tableau I

Répartition de la population étudiée selon l'âge et le nombre de précipités observés et électrosynérèse. (1 arc = anticorps anti-L).

	IGM	IGA	IGG
0	118	72	185
1	156	118	190
2	205	151	190
3	279	133	206
4	296	121	193

Tableau II

Valeurs moyennes des immunoglobulines M, A et G selon le nombre d'arcs observés et électrosynérèse.

(Le taux d'immunoglobulines est exprimé en pourcentage par rapport à la normale)

Figure

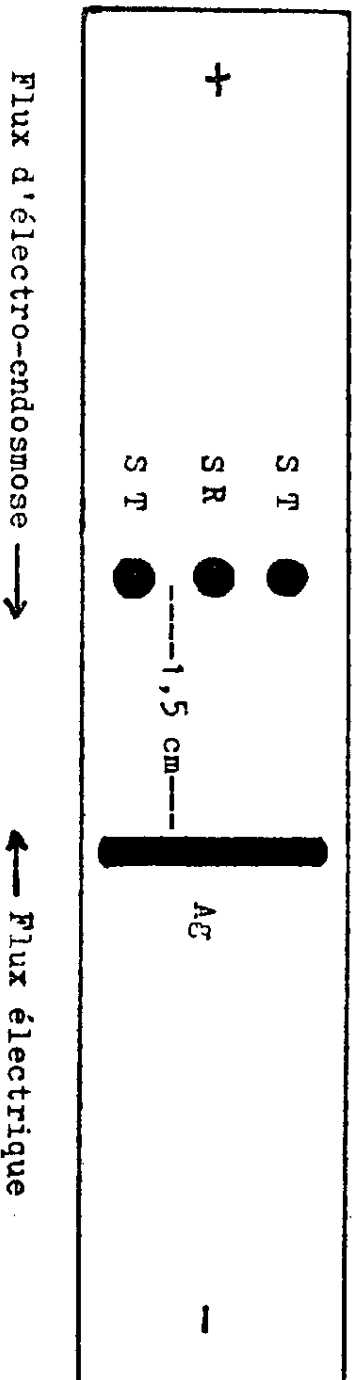


Schéma d'immunoelectrodifusion

ST : Sérum à tester (15 μ l)

SR : Sérum de référence (15 μ l)

AG : Extrait antigénique soluble (15 μ l)

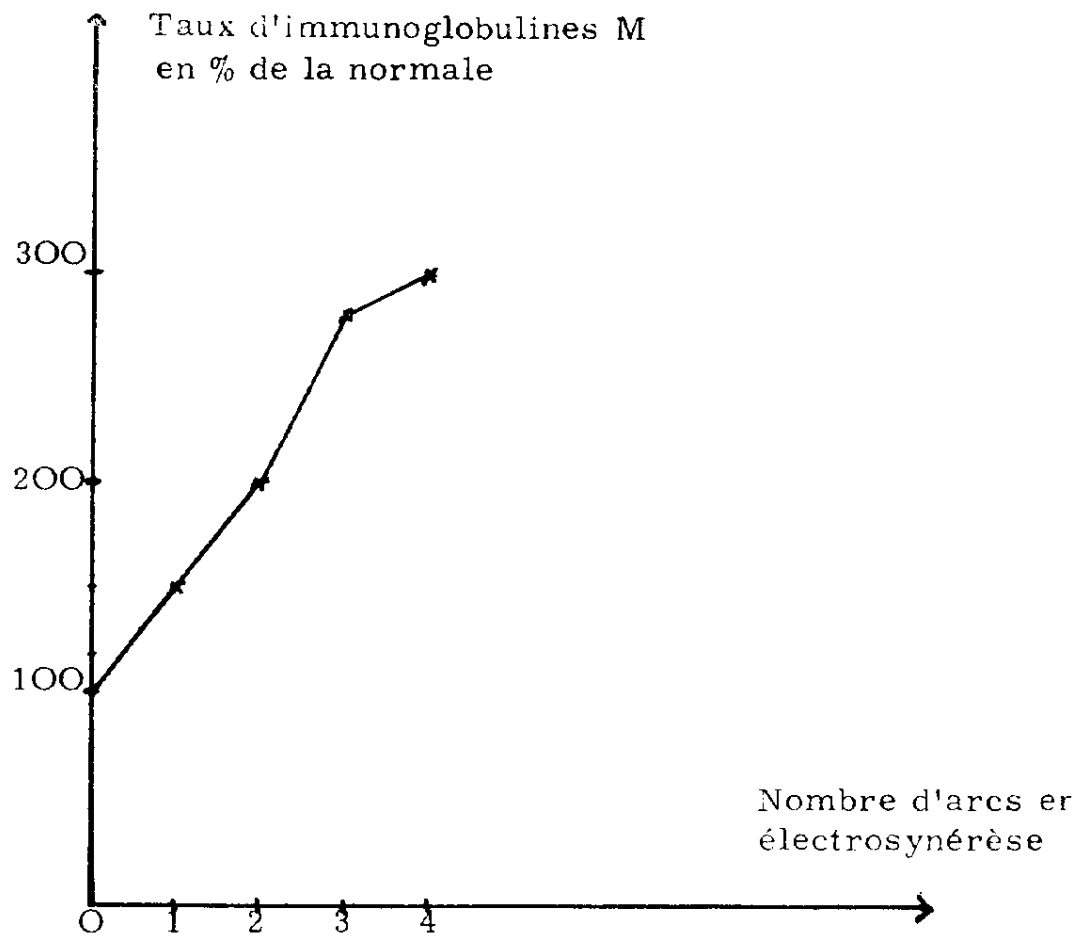


FIGURE 2

VARIATIONS DU TAUX DES IMMUNOGLOBULINES M EN FONCTION DU
NOMBRE DE PRECIPITES OBTENUS EN ELECTROSYNERESE.

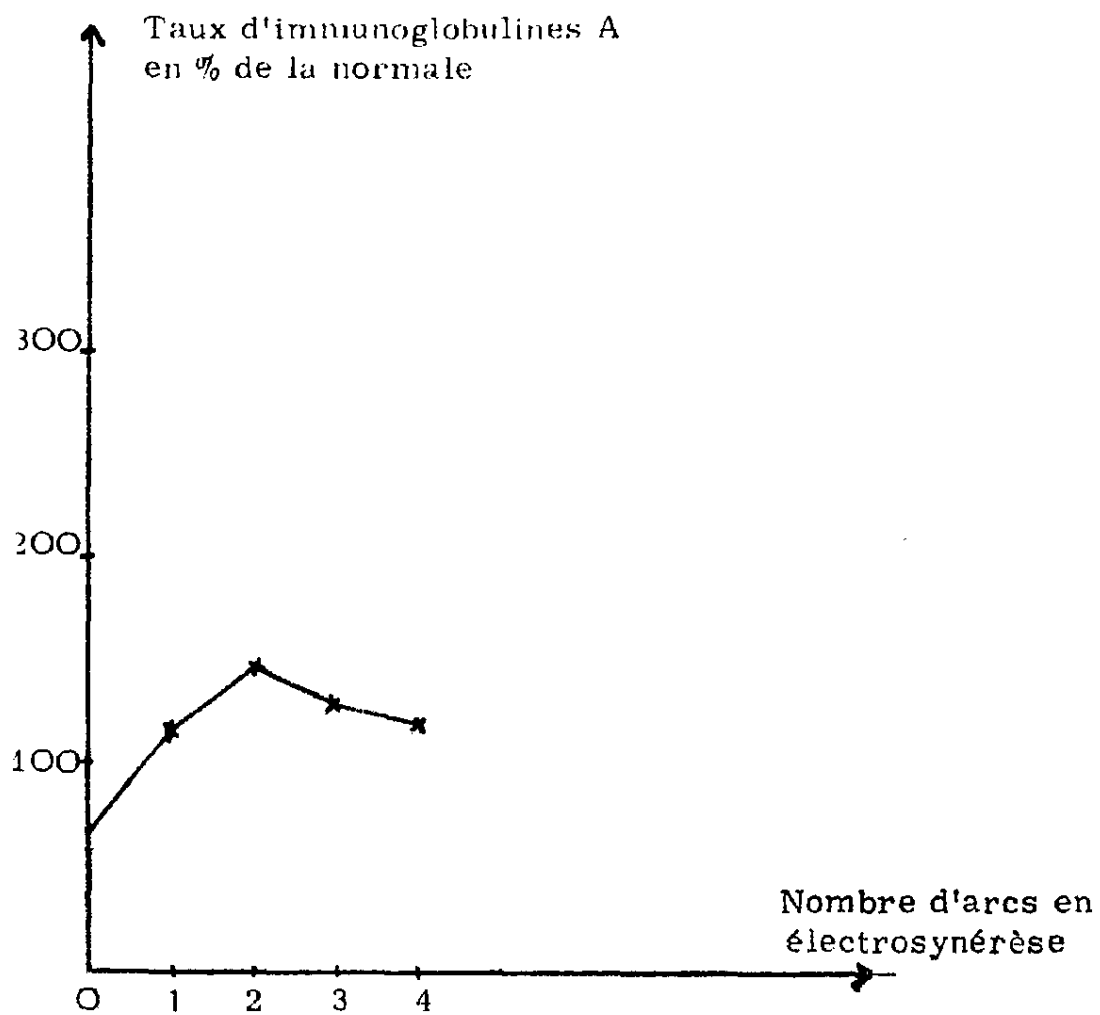


FIGURE 3

VARIATIONS DU TAUX DES IMMUNOGLOBULINES A EN FONCTION DU NOMBRE DE PRECIPITES OBTENUS EN ELECTROSYNERESE.

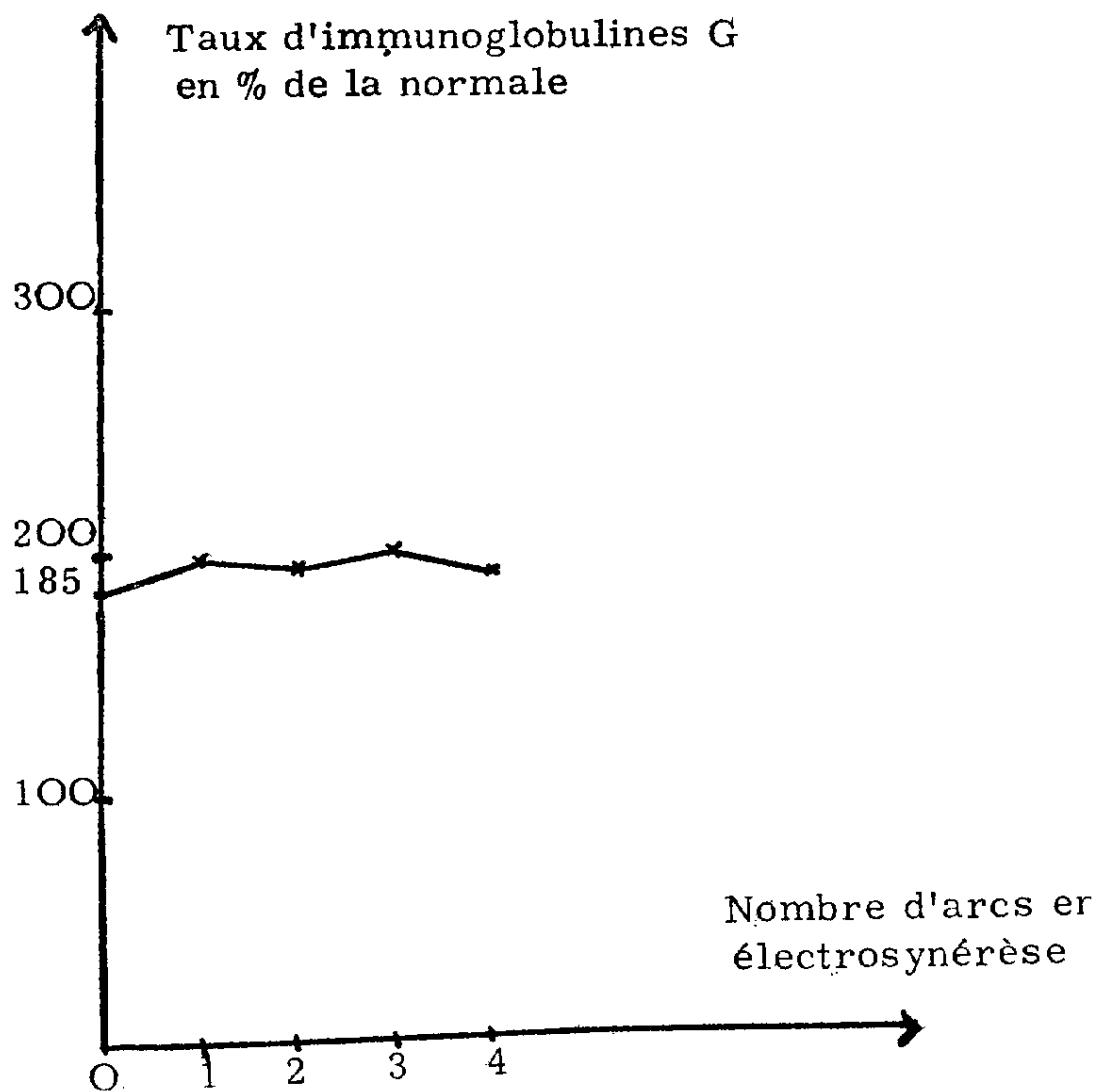


FIGURE 4

VARIATIONS DU TAUX DES IMMUNOGLOBULINES G EN FONCTION DU
NOMBRE DE PRECIPITES OBTENUS EN ELECTROSYNERESE.

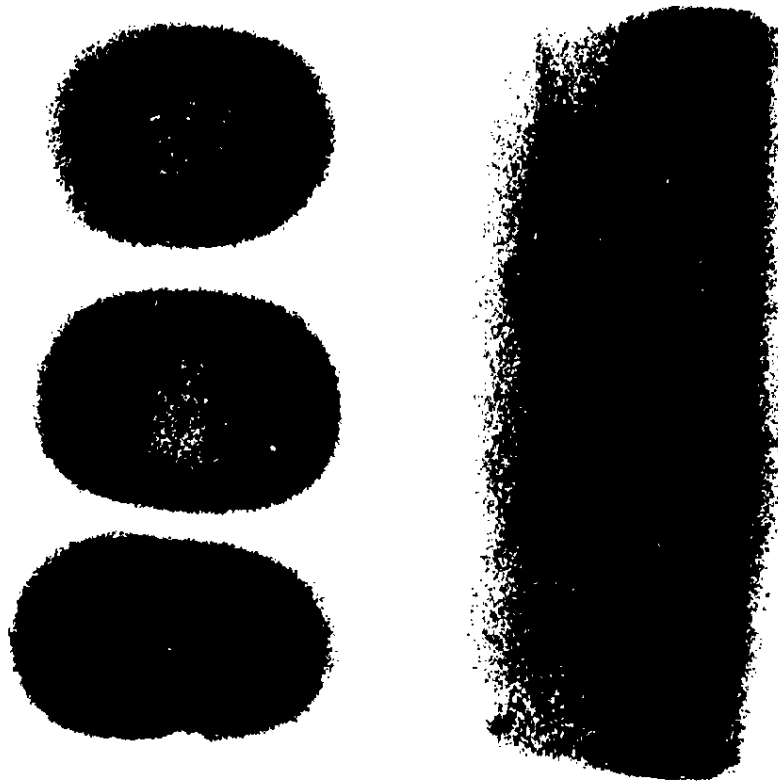


PHOTO A.

BIBLIOGRAPHIE

1. F. FONVAL. Les Cuiva du Venezuela. Thèse d'ethnologie - Paris 1975.
2. R. J. M. WILSON, I. A. MC GREGOR, P. HALL, K. WILLIAMS, R. BARTHOLOMEW. Antigens associated with Plasmodium falciparum infections in man. Lancet 1969, 201-205.
3. P. DRUILHE, L. MONJOUR. Sérodiagnostic du paludisme par immuno-précipitation. Valeur comparée des différentes techniques d'extraction des antigènes solubles. Sensibilité par rapport à l'immunofluorescence indirecte. C. R. Soc. Biol., 1975, 169, 1089-1095.
4. P. DRUILHE, L. MONJOUR, D. RICHARD-LENOBLE, M. GENTILINI. L'immuno-électrodiffusion sur membrane d'acétate de cellulose pour le diagnostic sérologique du paludisme humain. Path. Bio., 1978, 26, 3-4, 169-172.
5. O. M. S. Wkly epidem. Rec., 1977, 525, 45-52.