

La filariose lymphatique dans le Pacifique Sud peut-elle être éradiquée ?

Nous sommes en 1823. Le roi Pomare II est mort depuis deux ans. Son fils Pomare III, qui lui succède, n'a pas encore quatre ans. René-Primevère Lesson, zoologue de l'expédition (1822 à 1825) du français Duperrey écrit :

"Le 8 [mai 1823], dans la matinée, de grandes pirogues doubles sortirent de la crique de Papaoa [aujourd'hui Arue], en se dirigeant vers La Coquille. [...] Bientôt, le convoi royal se trouva bord à bord de notre corvette, et lorsque Pomare III eut été monté sur le pont par sa nourrice, qu'escortaient Pomare-Vahine, régente, et Terra-Vahine ou Teremoemoe, reine mère, une salve de six coups de canon salua les gouvernants d'O-taiti. [...]"

Hitoti, gouverneur de Pomare III, ne put suivre le roi à bord de La Coquille, et dut rester assis sur une natte, dans le fond de la pirogue double qu'il montait. Ce personnage était atteint d'un de ces hydrosarcoèles énormes, qui pèsent considérablement, et qui affligent un bon nombre d'insulaires."

La filariose dans le monde.

La filariose lymphatique (aussi appelée filariose de Bancroft), est une maladie parasitaire, essentiellement due au ver *Wuchereria bancrofti*, transmis par un moustique. Elle ne sévit que dans le monde tropical (fig. 1). Les chiffres font frémir : plus de 80 pays sont concernés, un milliard de personnes sont exposées à la maladie, 120 millions ont déjà été infestées, et parmi elles, 40 millions souffrent de lésions invalidantes et déformantes. Dans ses manifestations extrêmes en effet, la filariose provoque un grossissement spectaculaire d'un ou plusieurs membres, des organes génitaux ou des seins. Un tiers des personnes atteintes vit en Inde, un autre tiers en Afrique. Le troisième tiers se répartit entre les Amériques, l'Asie du Sud, et les îles du Pacifique. Le pourcentage de malades filariens (prévalence de la maladie) dans les pays touchés continue de s'accroître.

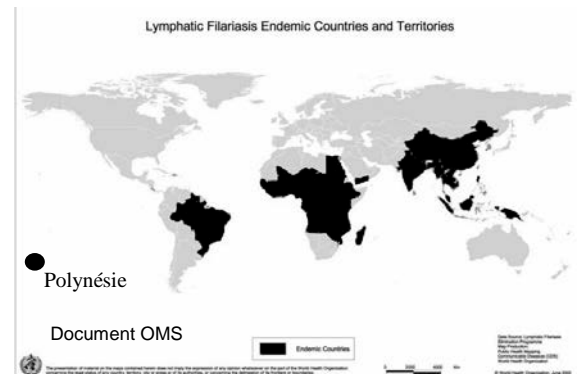


Fig. 1 : Les zones touchées par la filariose

Comprendre le cycle de reproduction du parasite (fig. 2)

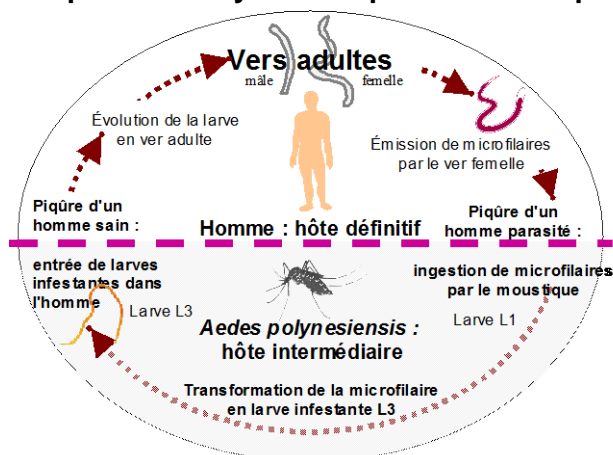


Fig. 2 : Cycle parasitaire de *Wuchereria bancrofti*

Pour pouvoir porter ses œufs à maturité, la femelle moustique doit prendre un repas sanguin. Quand un moustique vecteur (en Polynésie, il s'agit d'*Aedes polynesiensis*, espèce diurne) pique un Homme microfilariémique, il ingère des microfilaries circulant dans le sang. En environ deux semaines, les microfilaries subissent, à l'intérieur du moustique, deux mues qui les amènent au stade larvaire L3, appelé Larve infestante. Cette larve ne peut plus évoluer dans le moustique. Elle est appelée à mourir, sauf si elle peut pénétrer dans l'hôte définitif : l'Homme. Au cours d'un nouveau repas sanguin sur un Homme, le moustique femelle va déposer les larves infestantes qui vont entrer dans l'organisme par le trou de piqûre. Rapidement, les larves gagnent les ganglions lymphatiques où elles grandissent jusqu'à atteindre la taille d'un petit spaghetti (jusqu'à 15 cm pour la femelle). Adultes, les filaires mâles et femelles s'accouplent, et les femelles donnent naissance à des millions de microfilaries qui gagnent la circulation sanguine, prêtes à être prélevées par un moustique vecteur.

Précisions :

- C'est chez l'Homme que la larve peut se différencier et évoluer en adulte reproducteur. L'Homme est l'**Hôte définitif**.
- Le moustique n'abrite que des formes larvaires : il est l'**hôte intermédiaire**. Pour la larve de filaire, le moustique est l'hôte obligatoire et spécifique.

La lutte anti-filarienne en Polynésie française : une bataille commencée il y a plus de 50 ans...

En Polynésie française, la filariose est une maladie connue depuis longtemps. Dans le milieu du vingtième siècle, un mécène américain, William Robinson, s'est attaqué à cette maladie.

Lors d'un nouveau séjour à Tahiti, après la seconde guerre mondiale, William Robinson retrouve des amis qu'il n'avait pas vus depuis plus de 10 ans. Ils portent à leurs bras et jambes de terribles déformations causées par la maladie endémique de l'archipel : la filariose (fig. 3). William Robinson a entendu parler d'un nouveau médicament mis au point dans son pays, les Etats-Unis, pour lutter contre ce genre de maladie: c'est l'Hetrazan. Evidemment, cela coûte cher. Il engage sa fortune (et celle de quelques amis) et réussit à mobiliser quelques sommités scientifiques. En 1947, le professeur John F. Kessel, assisté de quelques collègues de l'université de Californie, propose un projet de recherche sur la filariose. Le Service de Santé du Territoire est bien sûr impliqué. Le Dr Mille, de l'Institut Pasteur, effectue en 1948 une première enquête pour mesurer l'ampleur de la filariose à Tahiti.

Les résultats sont plus qu'alarmants : 82 % des foyers sont concernés par la filariose (au moins une



Fig. 3 : Eléphantiasis de la jambe.

personne dans la famille), 36% de la population est porteuse de microfilaries dans le sang, 8 % de la population est handicapée par un éléphantiasis (fig. 3) !

Le 15 novembre 1949, la création de l'Institut de Recherches Médicales des Etablissements Français de l'Océanie est officiellement annoncée au Journal Officiel local. Le *fare mariri* (Maison de la filariose) est né. Sa mission : lutter et faire reculer ce fléau qui ronge la Polynésie.

L'Hetrazan, plus connu en France sous le nom de Notézine, fait ses preuves. Dès les premières campagnes de distribution, la plupart des porteurs traités sont débarrassés de leurs microfilaries. Et en plus, ce médicament "miracle" tue également les vers intestinaux. L'enthousiasme est général. La Polynésie nourrit l'espoir de se débarrasser un jour de cette maladie.

La lutte contre la filariose va durer des années. Les équipes de l'Institut Malardé sillonnent la Polynésie, maison après maison, pour prélever une goutte de sang au bout du doigt (afin de compter les microfilaries) et faire prendre de la Notézine à chaque membre du foyer. En 1951, le pourcentage de porteurs de microfilaries a déjà diminué de moitié. Mais le travail des *taote mariri* n'est pas simple. Tous les habitants ne collaborent pas comme ils le souhaiteraient. Quelques uns refusent de prendre leur Notézine. Parmi eux, on trouve les gros porteurs de microfilaries. La Notézine, en tuant leurs nombreuses microfilaries, leur donne des poussées de fièvre épuisantes. Ce sont pourtant ces porteurs qui constituent le principal réservoir de microfilaries.

Le recul de l'endémie continue néanmoins. Les chiffres sont globalement rassurants (fig. 4).

En 1980, la lutte contre la filariose change de forme. C'est la fin des *taote mariri*. Plus tard, devant une amorce de recrudescence de la maladie, une nouvelle stratégie de lutte communautaire est mise en place. Deux fois par an, une grande campagne de distribution de Notézine est menée auprès de la population polynésienne. L'objectif : interrompre la transmission des microfilaries aux moustiques. Plus de microfilaries, plus de transmission au moustique. Plus de transmission au moustique : plus de filariose.

Aujourd'hui, la nouvelle stratégie associe le Zentel à la Notézine.

Par cette approche de traitement communautaire, l'OMS espère éliminer la filariose lymphatique du Pacifique Sud d'ici l'année 2010.

La filariose lymphatique : une maladie aux formes diverses.

Pour des raisons encore inconnues, elle s'exprime de façon différente chez les malades.

- Absence de signe clinique.
Lors d'un contrôle routinier, on découvre des microfilaries dans le sang des patients qui ne présentent pourtant aucun signe évocateur de filariose. S'ils ont des microfilaries, c'est qu'ils portent des filaires adultes dans leur corps.
- Manifestations lymphatiques aiguës.
Ces symptômes fébriles, accompagnés d'inflammation de vaisseaux lymphatiques (lymphangite) ou même de ganglions (adénite) peuvent se répéter de façon imprévisible pendant plusieurs années. A Tahiti, ces crises fébriles ont donné leur nom à la maladie : le *mariri*.
- Lymphangites aiguës répétées.
Les crises d'inflammation des vaisseaux lymphatiques des membres apparaissent de plus en plus régulièrement. Souvent accompagnées de fièvre, elles sont à l'origine d'œdèmes dont la régression est de plus en plus lente.
- Lymphœdème et éléphantiasis.
La persistance d'un lymphœdème après les crises de lymphangite aiguës marque le passage à la chronicité. Le membre reste enflé en permanence. Des micro-organismes peuvent surinfecter la peau, aggravant encore le tableau de dermatosclérose qui donne au membre un aspect de patte d'éléphant, d'où le nom évocateur de cette forme extrêmement invalidante : l'éléphantiasis (fig. 5).



Fig. 5 : Eléphantiasis d'un membre et du scrotum, et lymphoedème du bras.

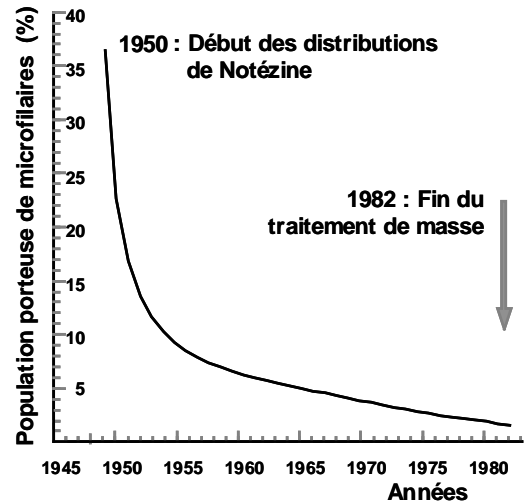


Fig. 4 : Evolution de la prévalence filarienne en 35 ans de traitement communautaire.

Un diagnostic en constante amélioration.

Pourquoi diagnostiquer la filariose ? Pour le patient d'une part, pour pouvoir réagir vite et lui administrer les remèdes qui empêcheront l'évolution de la maladie. D'autre part, les outils de diagnostic doivent aussi servir à déterminer si une région est indemne ou pas de filariose. En cas de stratégie de lutte, il faut aussi pouvoir dire si l'endémie recule, stagne, ou s'étend.

Le diagnostic clinique est insuffisant : la plupart des filariens ne présentent pas de symptômes. La présence du parasite doit donc être recherchée par des méthodes biologiques. Compte tenu du cycle du parasite, cette recherche peut être faite chez l'Homme, ou chez le moustique.

A/ Diagnostiquer la filariose chez l'Homme

La recherche de la microfilarémie.

C'est le diagnostic de certitude. La présence de microfilaries dans le sang implique celle de vers adultes dans le corps. Quand la maladie était bien ancrée, l'examen au microscope d'une seule goutte de sang suffisait à voir les microfilaries, tant elles étaient nombreuses dans l'organisme (fig. 6). Plus tard, les faibles microfilarémies ont pu être détectées grâce à des techniques dites d'hémoconcentration. Ces techniques, plus fiables, sont aussi plus lourdes puisqu'elles imposent de faire une prise de sang (sur anticoagulant) et un examen en laboratoire.

Mais tous les filariens ne sont pas microfilarémiques.

La sérologie.

Comme tout corps vivant étranger à l'organisme, les filaires provoquent la fabrication par l'organisme de protéines destinées à lutter contre l'envahisseur : les anticorps. La recherche de ces anticorps dans le sérum des patients (sérologie) permet de confirmer un contact avec des larves infestantes. Mais elle ne permet pas de conclure à une infection active par le parasite.

Appliqué à toute une population, ce test reste cependant un excellent reflet de la circulation du parasite dans la communauté.

Définition : De façon générale, les molécules provoquant une réaction immunitaire de l'organisme dans lequel elles sont introduites sont appelées des **antigènes**. Ce sont les antigènes qui provoquent l'apparition des **anticorps**.

La recherche d'antigènes filariens dans le sang donne de bons résultats. C'est de plus la seule technique permettant de détecter la présence de vers adultes. Les kits commercialisés utilisent des anticorps marqués fixés sur une bandelette de papier. Ces anticorps se fixent très spécifiquement à certains antigènes libérés dans l'organisme par *Wuchereria bancrofti*. La mise en contact d'une bandelette avec un sérum de filarien révèle une réaction positive en quelques minutes. Cette technique de diagnostic, facilement utilisable sur le terrain, est aujourd'hui la plus couramment utilisée.



Fig. 6 : Microfilaires dans le sang, après coloration. (x200)

B/ Mettre en évidence le parasite chez le moustique

Un diagnostic entomologique pour surveiller l'endémie.

La surveillance d'une zone endémique de la filariose nécessite le prélèvement sanguin de plusieurs milliers de personnes. Une alternative pourrait être l'utilisation des méthodes de détection du parasite dans l'hôte intermédiaire *Aedes polynesiensis*.

L'étude du cycle du parasite montre en effet que le ver doit impérativement passer chez le moustique puis chez l'Homme pour se développer et se reproduire. Depuis une vingtaine d'années, les entomologistes (spécialistes des insectes) ont mis au point des techniques standardisées de capture (un technicien, immobile, capture les moustiques qui tentent de le piquer) et d'analyse de moustiques (par dissection sous loupe binoculaire – fig. 7).

Cette technique, très précise, apporte plusieurs renseignements. Le taux d'infestation (pourcentage de moustiques contenant au moins une larve de parasite, tous stades confondus), et le taux d'infestivité (pourcentage de moustiques contenant au moins une larve infestante L3) permettent, quand ils sont calculés régulièrement sur les milliers de moustiques capturés plusieurs fois par an, de surveiller l'évolution de l'endémie.

Toutefois, la dissection, longue et fastidieuse, ne peut être réalisée que sur des moustiques récemment capturés.

Comment améliorer le rendement des techniques entomologiques ? C'est la biologie moléculaire qui apportera la solution.



Fig. 7 : Recherche de larves par dissection des moustiques

L'électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose.

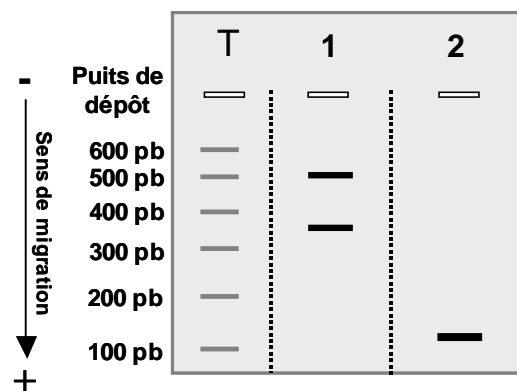


Fig. 8 : Exemple d'électrophorèse sur gel d'agarose.

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet de séparer des molécules d'ADN en fonction de leur taille, exprimée en nombre de paires de bases (pb).

Les molécules d'ADN sont chargées négativement. Soumises à un champ électrique, elles migrent vers le pôle + (cathode). C'est l'électrophorèse.

Le gel d'agarose contient des grosses molécules qui agissent comme les mailles d'un filet, freinant les ADN de plus grande taille. Les petites molécules migrent alors plus vite que les plus grosses.

Sur le gel, on creuse plusieurs puits côte à côte pour déposer plusieurs échantillons. Dans un puits témoin (T), on dépose un mélange de plusieurs ADN de taille connue: ce sont les "marqueurs de taille". A la fin de la migration et après coloration, on peut, grâce à ces marqueurs, estimer la taille des ADN contenus dans les échantillons analysés. Ici, les ADN marqueurs de taille sont des séquences de 100 à 600 pb, l'échantillon 1 contient 2 ADN, de 350 et 500 pb, et l'échantillon 2 un seul ADN d'environ 120 pb..

La PCR-moustique : une méthode simple, rapide et spécifique.

Chaque organisme vivant contient de l'ADN (ou ARN, pour certains virus). Chaque espèce contient dans son génome des séquences d'ADN qui lui sont propres, qu'on ne retrouve dans aucune autre espèce.

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est une technique de laboratoire qui permet de reproduire en très grande quantité (plusieurs centaines de millions de fois) une portion choisie d'un brin d'ADN. Les extrémités de ce segment précis d'ADN sont déterminées grâce à l'utilisation de deux **amorces**, courtes séquences d'ADN synthétisées à cet effet. C'est une enzyme, la *Taq Polymérase*, qui est ensuite chargée de construire les nouveaux brins d'ADN, strictement identiques à la portion choisie. L'ADN amplifié est visualisé par une électrophorèse sur gel d'agarose.

Dans les années 90, à l'Institut Malardé, des chercheurs découvrent une séquence très spécifique de *W. bancrofti*. Ils synthétisent les deux amorces (NV1 et NV2) qui permettront d'amplifier (multiplier), par PCR, cette séquence d'ADN parasitaire, longue de 188 paires de bases.

Il devient alors possible de détecter le parasite dans les moustiques, par la mise en évidence de cet ADN très spécifique.

Les moustiques capturés sont séchés, répartis par lots (pour la Polynésie, les lots sont de 20 ou 30 moustiques), et envoyés au laboratoire où ils sont conservés jusqu'à utilisation.

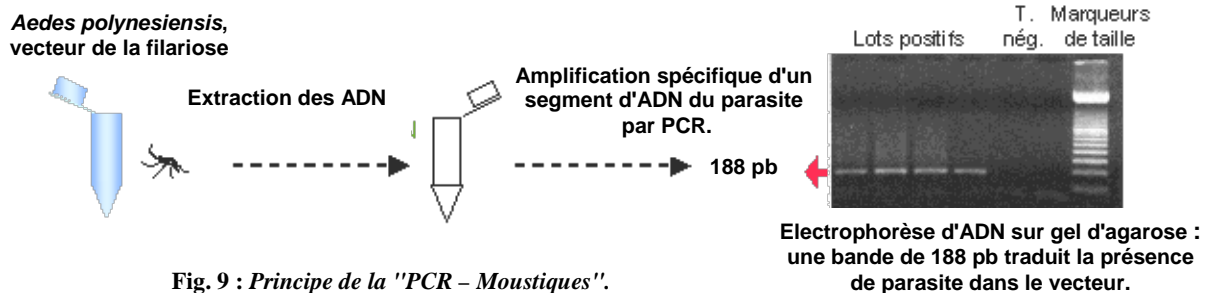


Fig. 9 : Principe de la "PCR - Moustiques".

Après broyage des moustiques, les ADN sont séparés des autres constituants cellulaires. A ce stade, l'extrait contient les ADN purifiés provenant des moustiques, des larves de *Wuchereria bancrofti* (si au moins un moustique est parasité), mais aussi peut-être d'autres organismes (bactéries, autre parasite etc.).

Après une PCR utilisant les amorces NV1 et NV2, une électrophorèse sur gel d'agarose permet de repérer la présence ou non de la portion spécifique (188 bp) d'ADN filarien.

Mais très vite, les chercheurs ont remarqué que l'efficacité de la PCR variait d'un échantillon à l'autre.

En fait, certains moustiques contiennent des inhibiteurs de la *Taq* polymérase. En empêchant la PCR, ces inhibiteurs sont à l'origine de réactions faussement négatives.

A l'Institut Malardé, les chercheurs imaginent alors d'inclure dans la réaction un contrôle interne.

Un contrôle interne pour éviter les réactions faussement négatives.

Le principe du contrôle interne est simple et très ingénieux. Un segment d'ADN, de 222 pb, ayant les mêmes extrémités que le segment spécifique à *W. bancrofti*, est construit au laboratoire. Ajouté en petite quantité dans le tube de la réaction, ce contrôle interne est donc également reconnu par les amorces NV1 et NV2 et amplifié par la réaction. Si les moustiques contiennent des inhibiteurs de la PCR, la réaction sera bloquée. Aucun ADN ne pourra être multiplié, pas même le contrôle interne.

Grâce à l'utilisation du contrôle interne, le résultat de la "PCR-moustique" est donc désormais fiable, et très précis. Un programme informatique permet, en fonction du nombre de lots testés, en fonction du nombre de lots de moustiques positifs, du nombre de moustiques par lot etc., de calculer le pourcentage de moustiques infectés dans la zone étudiée. Les recherches continuent pour standardiser cette technique prometteuse.

Une prochaine étape dans la surveillance de l'endémie filarienne consistera à n'utiliser que cette technique.

En conclusion.

La filariose est une maladie très ancienne en Polynésie. Elle fut longtemps considérée comme une fatalité, et même parfois soupçonnée par nos anciens d'être une maladie héréditaire.

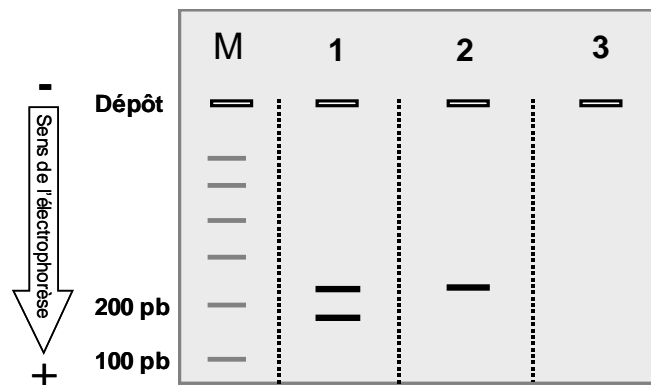
Aujourd'hui, grâce aux travaux de recherches, qui proposent de nouveaux outils de lutte et de surveillance, un nouvel espoir apparaît : celui d'éliminer la filariose de notre région.

Presque tous les ingrédients du succès sont réunis : les autorités politiques ont donné leur accord, les financements sont prévus, les équipes de traitement communautaire sont facilement mobilisables.

La réussite du programme d'élimination de la filariose ne dépendra finalement que de la population elle-même. Il est en effet essentiel que chacun, dans un esprit civique, prenne les traitements (Notézine + Zentel) distribués lors des journées "Filariose".

QUESTIONS

1. Pourquoi, selon vous, la filariose lymphatique ne sévit-elle que dans les régions tropicales ?
2. Analysez et interprétez l'évolution de la prévalence filarienne en Polynésie de 1950 à 1980.
3. En vous référant au cycle de la filaire, proposez des moyens de lutte contre la filariose.
4. Pour une surveillance entomologique, tout commence par la capture des moustiques. Selon vous, quelles recommandations faut-il faire aux captureurs pour obtenir les résultats les plus fiables ?
5. Pour la PCR, selon quels critères la taille des lots de moustiques est-elle déterminée ? Expliquez vos réponses.
6. Quels sont les avantages et inconvénients de la "PCR-moustiques" et de dissection des moustiques ?
7. La PCR-moustique pourrait-elle se substituer totalement aux techniques immunologiques ?
8. Voici un résultat de PCR utilisant un contrôle interne pratiquée sur trois lots différents de moustiques. Interprétez les résultats de cette électrophorèse.



9. Peut-on devenir filarien par transfusion d'un sang d'un donneur microfilarémique ? Expliquez votre réponse.

* * * * *



"En 1948, 8% de la population est handicapée par un éléphantiasis..."

Projets de questions et éléments de réponses attendus

Pourquoi, selon vous, la filariose lymphatique ne sévit-elle que dans les régions tropicales ?
A cause de la bio-écologie des moustiques vecteurs

Analysez et interprétez l'évolution de la prévalence filarienne en Polynésie de 1950 à 1980.

Analyse :

- Une chute brutale en début de programme
- Une tendance à l'asymptote

Interprétation :

- Les refus
- Les gens absents, ou qui travaillent toujours quand les agents passent ...

Les fluctuations :

En vous référant au cycle de la filaire, proposez des moyens de lutte contre la filariose.

Côté Homme :

- Prise de Notézine (ivermectine, Zentel...) pour casser la transmission des microfilaries aux moustiques.

Côté Moustiques :

- Lutte contre les gîtes larvaires
- Protection contre la piqûre du moustique
- Création d'un *A. polynesiensis* sans compétence vectorielle (projets *Wolbachia*)

Pour une surveillance entomologique, tout commence par la capture des moustiques. Selon vous, quelles recommandations faut-il faire aux captureurs pour obtenir les résultats les plus fiables ?

On veut surveiller une maladie qui touche l'Homme, qui est due à la transmission d'une larve diurne par un moustique spécifique.

Les principales recommandations sont donc :

- éviter les répellents
- Capturer près des maisons
- Capturer de jour
- Capturer le moustique vecteur (*A. polynesiensis*)
- Habillement (short et torse nu)
- Vérifier que le captureur n'est pas porteur de microfilaries.
- Surveiller (traiter) le captureur après l'opération (si les moustiques sont très infestés)

Pour la PCR, selon quels critères la taille des lots de moustiques est-elle déterminée ? Expliquez vos réponses.

Plus il y a de moustique, plus les quantité d'inhibiteurs sont importantes.

Dans les zones peu positives, on peut mettre plus de moustiques.

Dépend aussi de la sensibilité de la PCR

On travaille en dessous de la sensibilité de la réaction. Dans les zones de faible endémie, on aimerait diminuer le nombre de réaction en augmentant le nombre moustiques par lots (la PCR peut repérer 1 larve dans un lot de 100 moustiques)

Quels sont les avantages et inconvénients de la "PCR-moustiques" et de dissection des moustiques ?

Avantages PCR :

- Très spécifique de *W. bancrofti* (les entomo peuvent confondre les larves avec celles d'autres filaires, notamment *D. immitis*, filaire cardiovasculaire du chien.
- Traitement par mot (au lieu de disséquer les moustiques l'un après l'autre)

- Très sensible : La PCR permet de repérer 1 larve dans un lot de 100 moustiques ! La sensibilité ne varie pas, alors que l'entomologiste au microscope a une vigilance qui diminue après quelques dizaines de dissections.
- Adaptable dans les petites structures de laboratoire.

Avantages dissection :

- Possibilité de distinguer les différentes formes de larves (de microfilarie jusqu'à L3) trouvées dans les moustiques.
- En zone de forte endémie, quelques dissection de moustiques permet de conclure à la forte circulation du parasite.

La PCR-moustique pourrait-elle se substituer totalement aux techniques immunologiques ?

Il sera toujours nécessaire d'assurer (et d'améliorer) le diagnostic individuel pour le traitement des patients atteints de filariose lymphatique

Voici un résultat de PCR utilisant un contrôle interne pratiquée sur trois lots différents de moustiques. Interprétez les résultats de cette électrophorèse.

Tube N° 1 : La réaction est positive. Le standard interne est amplifié et apparaît à l'électrophorèse. Les moustiques n'ont donc pas libéré d'inhibiteurs de la PCR. La bande de 188 bp signe la présence de W.b. dans la réaction.

Tube N° 2 : La réaction est Négative. La bande de 188 bp, correspondant à l'ADN recherché de W. b., est absente. En revanche, la bande de 222 bp est présente, prouvant l'absence d'inhibiteurs dans la réaction.

Tube N° 3 : Le standard interne, pourtant ajouté à la réaction, n'a pas été amplifié. Le tube contient donc des inhibiteurs de la PCR. L'absence de bande à 188 bp ne permet pas de conclure. Ce résultat est ininterprétable.

Peut-on devenir filarien par transfusion d'un sang d'un donneur microfilarémique ? Expliquez votre réponse.

NON. Outre les précautions prises dans les centres de transfusion, le cycle montre clairement que la microfilarie doit **OBLIGATOIREMENT** passer chez le moustique pour pouvoir évoluer en larve infestante et devenir adulte après réintroduction dans l'organisme humain. Une contamination directe par une microfilarie est donc impossible.