

Profil des cytokines associées à la protection contre les accès palustres au cours de la grossesse en zone hypo-endémique au Sénégal

Profile of cytokines associated with protection against malaria episodes during pregnancy in hypo-endemic area in Senegal

M. Ndiaye · J.L. Ndiaye · R. Tine · K. Sylla · B. Faye · I. Diouf · D. Sow · A.C. Lo · A. Abiola · Y. Dieng · O. Gaye

Reçu le 15 novembre 2013 ; accepté le 11 mars 2014
© Société de pathologie exotique et Springer-Verlag France 2014

Résumé Dans les zones d'endémie palustre comme le Sénégal, le traitement préventif intermittent (TPI) a été adopté pour prévenir le paludisme chez la femme enceinte. Cependant, l'impact du TPI sur le développement de l'immunité n'est pas encore bien documenté. Nous avons mené une étude prospective sur 100 femmes enceintes sous TPI venues en consultation prénatale à la maternité de l'hôpital Roi-Baudouin de Guédiawaye au Sénégal de septembre à décembre 2008. Un prélèvement de sang a été réalisé à l'inclusion et à l'accouchement pour déterminer la prévalence palustre et la production des cytokines IL10, IL12, TNF α et IFN γ par ELISA. Parmi les 100 femmes incluses, 17 % étaient positives au TDR à l'inclusion, dont une seule confirmée par microscopie. A l'inclusion, la production moyenne d'IL10 était légèrement plus élevée chez les femmes négatives (8 UA) comparée aux femmes positives par TDR (7 UA) $p=0,069$. Cependant, à l'accouchement, la tendance s'est inversée avec une moyenne de production d'IL10 plus élevée chez les femmes positives (6,8 UA) comparée aux femmes négatives (5 UA) ($p=0,014$). D'une manière générale le taux des cytokines inflammatoires; IL12 ; IFN γ et TNF α a augmenté entre l'inclusion et l'accouchement. A l'inclusion une faible production d'IL12 était notée aussi bien chez les femmes avec TDR positif (0,42 UA) que chez les femmes avec TDR négatif (0,15 UA). Une diminution de la production d'IFN γ et du TNF α a été entre l'inclusion et l'accouchement aussi bien chez les femmes positives que chez les négatives. Les cytokines IL12 et IFN γ sembleraient être impliquées dans le développement de l'immunité antipalustre pendant la grossesse.

Mots clés Cytokines · Immunité · Paludisme · Femme enceinte · *P. falciparum* · Accouchement · IPT · Hôpital · Guédiawaye · Sénégal · Afrique intertropicale

Abstract Background: Malarial infection in non immune pregnant women is a major risk factor for pregnancy failure. However in malaria endemic areas, intermittent preventive treatment (IPTp) have been adopted to prevent malaria in pregnancy women since 2003 in Senegal. The impact of IPT on the development of immunity is not very well documented. We conducted a prospective study at the Roi-Baudouin maternity hospital of Guediawaye in Senegal to assess IL10, IL12, TNF α and IFN γ cytokines production in pregnant women under IPTp. Cytokines were analyzed in 82 sera at inclusion and delivery. *P. falciparum* HRP2 antigen was detected in 17% of women included by rapid diagnostic test (RDT). At inclusion the mean of IL10 response was higher in *P. falciparum* negative women (8 UA) compare to RDT-positive women (7 UA) $p=0.069$ while in delivery the opposite was found $p=0.014$. Low production of inflammatory cytokines IL12, IFN γ and TNF α was noted in both groups. Between inclusion and delivery, a significant increase of IL-10 production was noted while a decrease of IFN γ and TNF α cytokine was noted. Thus, IL12 and IFN γ responses may synergistically associate as malaria immune response during pregnancy.

Keywords Cytokines · Immunity · Malaria · Pregnant women · *P. falciparum* · Delivery · IPT · Hospital · Guediawaye · Senegal · Sub-Saharan Africa

Introduction

Près de 40 % de la population mondiale vit dans une zone à risque d'infection palustre. Selon le Rapport de 2011 sur le paludisme dans le monde, 216 millions de cas de paludisme

M. Ndiaye (✉) · J.L. Ndiaye · R. Tine · K. Sylla · B. Faye · I. Diouf · D. Sow · A.C. Lo · A. Abiola · Y. Dieng · O. Gaye
Université Cheikh Anta Diop, Faculté de médecine et d'odontologie, Service de parasitologie-mycologie, Sénégal
e-mail : magou22000@yahoo.fr

ont causé 655 000 décès enregistrés en 2010, soit une diminution de la mortalité de 25 % au niveau mondial par rapport à 2000 et de 33 % dans la région africaine de l'OMS [1].

En Afrique, la plupart des cas et des décès surviennent chez les femmes enceintes et les enfants. Malgré les nombreuses stratégies d'intervention mises en place, la mortalité et la morbidité dues au paludisme restent toujours élevées, surtout chez les nourrissons, les jeunes enfants et les femmes enceintes [7].

Au Sénégal, la morbidité palustre a beaucoup diminué entre 2006 (33,57 %) et 2009 (3,07 %), toutefois elle est de 2,63 % chez la femme enceinte [15]. Cette diminution peut être due à la mise en place de plusieurs stratégies de contrôle de cette pathologie. Parmi ces stratégies, le traitement préventif intermittent (TPI) utilisant la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) occupe une place importante. Plusieurs études ont montré que le TPI permettrait de réduire considérablement le risque de développer une infection palustre [4,10,13]. Dans les régions endémiques, une cure de SP en prise directe observée pendant les deuxième et troisième trimestres de grossesse protège les femmes enceintes contre les épisodes palustres, l'anémie et les décès [8]. Au Sénégal, le TPI a été mis en œuvre chez la femme enceinte depuis juin 2004 (Rapport PNLP) et son efficacité a été démontrée dans plusieurs études [16]. Toutefois, l'impact de cette stratégie sur le développement de l'immunité antipalustre chez la femme enceinte n'est pas encore bien documenté. Des auteurs ont montré que l'acquisition d'une immunité protectrice chez les multigestes vivant en zone d'endémie pouvait être retardée chez des femmes sous TPI [18]. Une récente étude menée au Sénégal a montré des résultats similaires [6]. D'autre part, le profil des cytokines et du rapport Th1/Th2 joue un rôle important dans la protection contre certaines maladies parasitaires. En effet, la sécrétion des cytokines inflammatoires (Th1) comme l'IFN γ par les cellules Natural Killer (NK) serait essentielle pour le contrôle des infections parasitaires telles que la toxoplasmose, la trypanosomose, la leishmaniose et le paludisme [11]. Au cours de la grossesse la production de cytokines Th2 serait favorisée pour l'acceptation de l'allogreffe fœtal [12]. L'impaludation pendant la grossesse représente ainsi une situation complexe au cours de laquelle l'organisme devrait assurer le maintien et le développement du fœtus mais également la lutte contre l'infection. Il se dessine un nouveau profil dans lequel certaines cytokines Th1 comme l'interféron gamma (IFN γ) permettrait de lutter contre les infections parasitaires [14] pendant que l'interleukine10 (IL10) empêcherait le rejet du fœtus en inhibant l'action des cellules NK [9]. Des études ont montré une production importante de cytokines chez les femmes enceintes qui les protégeraient contre la survenue des symptômes associés au paludisme malgré la présence de parasites dans leur sang [2,20]. De même au Ghana les résultats d'une étude ont montré une augmentation des taux sériques IL10 et

de G-CSF chez les femmes enceintes présentant un paludisme asymptomatique comparativement à des femmes enceintes non infectées [21]. Il a été démontré que la protection contre le paludisme chez la femme enceinte serait associée à une forte production d'IFN γ par les cellules mononucléées du placenta [23]. C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude, qui avait pour objectif de déterminer le profil des cytokines l'IFN γ , le Tumor Necrosis Factor (TNF), l'IL12 et l'IL10, dont les niveaux d'expression auraient une influence sur la survenue et l'évolution des accès palustres chez des femmes enceintes sous TPI au Sénégal.

Méthodes

Zone d'étude

L'étude s'est déroulée dans le Centre hospitalier Roi Baudouin de Guédiawaye situé à 15 km environ au nord-est de Dakar. Le département de Guédiawaye est une banlieue dakaroise en pleine expansion démographique avec une population estimée à plus d'un million d'habitants. Ce site présente des dépressions naturelles (les « niayes ») qui représentent des collections d'eaux permanentes qui sont de potentiels gîtes larvaires. La transmission est saisonnière, avec un pic de transmission allant de septembre à novembre. Le principal vecteur est *Anopheles arabiensis* et *P. falciparum* est l'espèce plasmodiale la plus répandue avec 98 % des cas [19].

Population et type d'étude

Il s'agit d'une étude longitudinale portant sur des femmes enceintes venues en consultation prénatale (CPN) au centre hospitalier de Roi Baudouin de septembre 2008 à décembre 2008. Ont participé à l'étude les femmes enceintes résidant dans la zone d'étude, ayant reçu une dose de SP au deuxième et troisième trimestre de leur grossesse au cours de leur CPN conformément aux directives du Programme national de lutte contre le paludisme (PNLP) du Sénégal. Un consentement libre et éclairé est signé par toutes les femmes incluses avant leur participation à l'étude.

Déroulement de l'étude : les prélèvements sanguins

A l'inclusion qui correspond à la première visite prénatale, un questionnaire a été administré pour chaque femme pour déterminer l'âge et la provenance. Un prélèvement de 5 ml de sang au niveau du pli du coude sur tube héparine a aussi été systématiquement réalisé. Un test de diagnostic rapide (TDR) et une goutte épaisse ont été réalisés pour le diagnostic du paludisme. Le résultat de chaque TDR réalisé était confirmé par la goutte épaisse correspondante. Toute femme positive à *P. falciparum* avait reçu un traitement

antipaludique selon les recommandations du PNLP. Les prélèvements de sang ont été centrifugés à 300 g/mn pendant 20 mn, les plasmas collectés dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml, puis conservés à -20°C.

Dosage des cytokines par ELISA

Les cytokines : IL10, IL12, TNF α et IFN γ ont été dosées par *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)* à l'aide de Kits invitrogen™ suivant les recommandations du fabricant. Une série de sérums standards a été utilisée pour valider le test. Sommairement, les standards étaient reconstitués avec 200 μ l du tampon de dilution, puis 50 μ l de chaque standard étaient déposés dans les puits de la plaque ELISA. Les plasmas étaient dilués à 1/1000 et 100 μ l de chaque dilution étaient déposés dans des plaques de 96 puits préalablement sensibilisées par des anticorps spécifiques des cytokines. Après une série de trois lavages, un second anticorps couplé au HRP2 a été ajouté dans chaque puits de la plaque. Du substrat TMB a été ajouté aux puits après une seconde série de lavages. Enfin la réaction a été arrêtée par addition d'acide sulfurique (H₂SO₄) dilué (0,5mol/l). Les densités optiques ont été déterminées par le lecteur ELISA SUNRISE(TECAN) en utilisant un filtre de 450 nm contre une référence de 620 nm.

Analyse des données

La densité optique de chaque sujet était obtenue en enlevant de la moyenne des duplicatas, la moyenne des puits sans antigène. Le résultat a été ensuite converti en unité arbitraire (UA) selon la formule : UA de l'échantillon = $[(\ln DO \text{ échantillon}) - \ln (DO \text{ du témoin négatif}) / \ln (DO \text{ du témoin positif}) - \ln (DO \text{ du négatif})] \times 100$.

Les données ont été saisies sur Excel® et l'analyse a été faite avec le logiciel STATA IC12TM. Les variables quantitatives étaient décrites en termes de moyenne et écart-type. Des comparaisons intergroupes ont été effectuées en utilisant le test Anova ou Mann-Whitney en fonction des conditions d'application. Les variables qualitatives ont été décrites en termes d'effectif et de pourcentage. Les tableaux de contingence ont été analysés en utilisant le Chi2 de Pearson.

Les sujets dont les résultats (en UA) étaient supérieurs à ceux de la moyenne des témoins négatifs plus 2 fois l'écart-type ont été considérés comme producteurs de cytokines.

Résultats

Caractéristiques générales de la population

Parmi les 100 femmes incluses dans l'étude, 18 ont été perdues de vue. Les cytokines ont été déterminées chez 82 femmes à l'inclusion et à l'accouchement.

L'âge moyen des femmes était de 26,86 \pm 6,15 avec des extrêmes de 18 et 44 ans. Le nombre de grossesses par femme était de 1 à 11 avec une moyenne de 2,96. Les primigestes représentaient de 29,7 % de la population d'étude, tandis que les grandes multigestes (gestité supérieure ou égale à 4) ont représenté 32,7 %. Cependant, les informations cliniques relatives aux femmes n'étaient pas à notre disposition.

Parmi les 82 femmes incluses, 20,7 % (17/82) étaient positives au TDR à l'inclusion, dont une seule confirmée par microscopie. A l'accouchement toutes les femmes étaient négatives à *P. falciparum* aussi bien par le TDR qu'à l'examen microscopique. Durant toute l'étude, aucune femme n'a été infectée entre l'inclusion et l'accouchement.

Production d'IL10

L'IL10 a été détecté aussi bien à l'inclusion qu'à l'accouchement chez toutes les 82 femmes avec cependant une légère diminution à l'accouchement. A l'inclusion, la production moyenne d'IL10 était légèrement plus élevée chez les femmes négatives (8 UA) comparée aux femmes positives par TDR (7 UA) avec une différence statistiquement non significative ($p=0,069$). Cependant, à l'accouchement, la tendance s'est inversée avec une moyenne de production d'IL10 plus élevée chez les femmes positives (6,8 UA) comparée aux femmes négatives (5 UA) ($p=0,014$) (Fig. 1).

En termes de proportion de femmes produisant des cytokines, à l'inclusion comme à l'accouchement toutes les femmes (100 %) avaient produit de l'IL10 (Fig. 2).

Production des cytokines inflammatoires

D'une manière générale le taux des cytokines inflammatoires; IL12 ; IFN γ et TNF α a augmenté entre l'inclusion et l'accouchement.

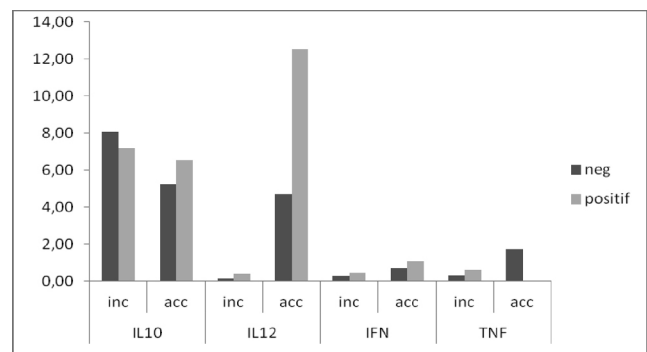


Fig. 1 Moyennes de production (exprimées en UA) des cytokines IL10 ; IL12 ; TNF α et IFN γ à l'inclusion et à l'accouchement chez les femmes avec TDR négatif (n=65) et TDR positif (n=17) / *Production averages (in UA) of IL10, IL12, TNF α and IFN γ cytokines, at inclusion and delivery in RDT-negative (n=65) and RDT-positive women*

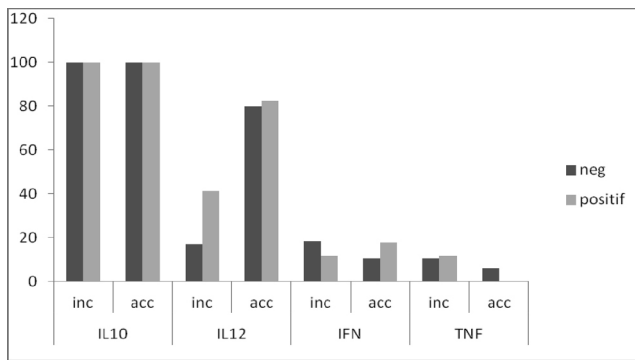


Fig. 2 Pourcentages de femmes enceintes productrices de cytokines IL10 ; IL12 ; TNF α et IFN γ à l'inclusion et à l'accouchement chez les femmes avec TDR négatif (n=65) et TDR positif (n=17) / Percentage of pregnant women producing IL10, IL12, TNF α and IFN γ cytokines, at inclusion and delivery in RDT-negative (n=65) and RDT-positive (n=17) women

Production d'IL12

A l'inclusion, en termes de moyenne de production d'IL12 entre femmes TDR positif (0,42 UA) et TDR négatif (0,15 UA), une faible production était notée (Fig. 1). Qualitativement, le pourcentage de sujets produisant de l'IL12 à l'inclusion était plus élevé (41,2 %) chez les femmes positives que chez les femmes négatives (16,9 %) ($p=0,053$) (Fig. 2).

Entre l'inclusion et l'accouchement une augmentation significative ($p<10^{-4}$) du pourcentage de femmes produisant de l'IL12 était notée aussi bien chez les femmes TDR positifs (de 41 % à 82 %) que chez les femmes TDR négatifs (17 % à 80 %) (Fig. 2)

Production d'IFN γ et de TNF α

D'une manière générale, une faible production d'IFN γ et de TNF α était notée au cours de notre étude avec de légères variations entre l'inclusion et l'accouchement.

Le pourcentage de femmes produisant de l'IFN γ était de 17,1 % à l'inclusion contre 12,2 % à l'accouchement chez les femmes enceintes positives par TDR à l'inclusion. Cette même tendance à la diminution était également notée au niveau de la production de TNF α entre l'inclusion (11 %) et l'accouchement (4,9 %) chez les femmes avec un TDR négatif (Fig. 2)

Chez les femmes avec TDR positif, la proportion de sujets produisant du TNF α qui était de 11 % à l'inclusion s'était annulée à l'accouchement.

Discussion

L'objectif de ce travail était de déterminer le profil des cytokines associées à la protection contre les accès palustres chez

des femmes enceintes dans une zone hypo-endémique au Sénégal. Pour atteindre notre objectif, un certain nombre de cytokines étaient dosées en tenant compte du statut des femmes enceintes soumises au TPI.

Durant toute l'étude, une seule goutte épaisse était positive (1 %) à l'examen microscopique et 17 femmes positives (17 %) par détection de l'antigène *Histidin Rich Protein 2* (HRP2) à l'inclusion. Cette différence entre les prévalences palustres par microscopie et par TDR serait due soit à la présence d'une parasitémie sub-microscopique (inférieur 40 p/ μ l) soit au fait que cette glycoprotéine spécifique de l'espèce *P. falciparum* et produite par tous les stades érythrocytaires asexués du parasite (HRP2) pouvait persister dans le sang périphérique plus de 15 jours après la disparition des parasites. La faible prévalence du paludisme notée au cours de notre étude (1 % par microscopie et 17 % par TDR) pouvait être due à une couverture en TPIg de plus de 80 % dans notre zone d'étude alors que la moyenne nationale était de 42 % (données EDS). A cela s'ajoute également la couverture universelle en moustiquaires imprégnées d'insecticides. Cependant, dans les pays endémiques comme le Gabon et le Cameroun des prévalences élevées ont été notées 57 % et 82,4 % respectivement [15,17]. Dans ces pays endémiques, le niveau de transmission du paludisme est extrêmement élevé ce qui pourrait expliquer le nombre important d'infections notées.

Du point de vue immunologique, au cours de notre étude, à l'inclusion comme à l'accouchement, l'IL10 était retrouvé dans le plasma de toutes les femmes. Cette cytokine anti-inflammatoire semble jouer un rôle très important au cours de la grossesse. En effet la balance des cytokines serait en faveur de l'IL10 pour l'acceptation de la semi-allogreffe fœtale [5]. Cependant, une réduction de la production des cytokines inflammatoires a également été notée. Il a été démontré qu'au cours d'une infection palustre la réponse Th1 devient prépondérante pour l'élimination du parasite. Toutefois la production d'IL10 reste élevée pour limiter ou contrecarrer les effets délétères des cytokines pro-inflammatoires.

D'une manière générale, la proportion plus élevée de sujets infectés asymptomatiques (TDR positifs) produisant l'IL12 montre l'importance de cette cytokine pro-inflammatoire dans le contrôle de l'infection palustre. En effet certaines composantes parasitaires libérées dans le sang au cours du cycle de *P. falciparum* sont susceptibles de stimuler les cellules dendritiques à produire des cytokines inflammatoires [22]. L'étude de l'effet de ces composantes sur la production de ces cytokines a montré que les doses de ligands requises pour stimuler la production d'IL12 étaient significativement plus faibles que pour le TNF α et l'IL6 [23]. Ainsi, lorsque la charge et/ou les composantes parasitaires dans le sang sont faibles (ce qui semble être le cas pour des infections asymptomatiques), l'expression de l'IL12 devenait prépondérante par rapport aux autres cytokines

inflammatoires. Au cours de notre étude, les sujets infectés asymptomatiques (TDR positifs) produisaient plus d'IL12. Cependant, le faible pourcentage de production des cytokines inflammatoires chez ces sujets s'expliquerait par les faibles charges parasitaires n'atteignant pas un niveau susceptible de stimuler la production d'IFN γ et de TNF α . De plus, la balance des cytokines serait en faveur d'une plus grande production d'IL10 au détriment de TNF α pour le bon déroulement de la grossesse. En effet, ces deux cytokines ont des rôles antagonistes et la modification de leur balance en faveur du TNF α pourrait entraîner des complications sur la grossesse [3], et un retard de croissance intra-utérine [17]. Le maintien de l'infection à une parasitémie indécélable par microscopie (inférieure 20/ul) serait probablement dû à l'effet conjugué de l'immunité et du TPI associé aux stratégies de prévention mise en place.

Dans notre étude, la mesure des cytokines dans le plasma des femmes enceintes ne tenait pas compte de leur cinétique de production. Pour mieux comprendre la production de ces cytokines et des anticorps en réponse à l'infection, il serait intéressant de réaliser des cultures in vitro de cellules mononucléées stimulées par des globules rouges parasités. Ainsi, le dosage des anticorps, des cytokines et la détermination de la lymphoprolifération permettraient de mieux comprendre le développement de l'immunité au cours d'une infection palustre chez la femme enceinte.

Considérations d'ordre éthique

Avant le début de l'étude, le protocole a été soumis et approuvé par le Comité national d'éthique pour la Recherche en Santé du Sénégal.

Contribution des auteurs

MN a conçu l'étude, collecté les données et mené les analyses immunologiques. JL a supervisé l'étude et corrigé le document. Roger Tine a participé à l'analyse statistique et à la collecte des données. Khadime Sylla, Aminata Lo, Annie Abiola et Ibrahim Diouf ont participé à la collecte des données. Babacar Faye, Yémou Dieng et Oumar Gaye ont lu et corrigé le document. Tous les auteurs ont contribué à la rédaction, lecture et conception finale du document.

Remerciements Les auteurs adressent leurs sincères remerciements à tout le personnel du service de gynéco-obstétrique de l'hôpital Roi Baudouin de Guédiaway ainsi qu'à toutes les femmes qui ont participé à cette étude. Les auteurs remercient sincèrement toutes les personnes qui ont participé à cette étude.

Conflit d'intérêt : les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt.

Références

1. Afrique/Paludisme : drames sanitaires, nouveaux horizons, nouveaux espoirs (2012) Paix et Développement
2. Bouyou-Akotet MK, Ionete-Collard DE, Mabika-Manfoumbi M, et al (2003) Prevalence of Plasmodium falciparum infection in pregnant women in Gabon. *Malar J* 2:18
3. Brogin Moreli J, Cirino Ruocco AM, Vernini JM, et al (2012) Interleukin 10 and tumor necrosis factor-alpha in pregnancy: aspects of interest in clinical obstetrics. *ISRN Obstet Gynecol* 2012:230742
4. Consortium Safety Panel (CSP) Report (2009)
5. Denney JM, Nelson EL, Wadhwa PD, et al (2011) Longitudinal modulation of immune system cytokine profile during pregnancy. *Cytokine* 53(2):170–7
6. Diouf I, Tine RC, Ndiaye JL, et al (2011) Influence du traitement présomptif intermittent par la sulfadoxine-pyriméthamine sur l'acquisition d'anticorps anti-*VAR2CSA* chez la femme enceinte vivant en zone hypoendémique au Sénégal. *Bull Soc Pathol Exot* 104(4):277–83 [<http://www.pathexo.fr/documents/articles-bull/131490277.pdf>]
7. Etard JF, Le Hesran JY, Diallo A, et al (2004) Childhood mortality and probable causes of death using verbal autopsy in Niakhar, Senegal, 1989-2000. *Int J Epidemiol* 33(6):1286–92
8. Geerligts PD, Brabin BJ, Eggelte TA (2003) Analysis of the effects of malaria chemoprophylaxis in children on haematological responses, morbidity and mortality. *Bull World Health Organ* 81(3):205–16
9. Hadinedoushan H, Mirahmadian M, Aflatonian A (2007) Increased natural killer cell cytotoxicity and IL-2 production in recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 58(5):409–14
10. Kobbe R, Kreuzberg C, Adjei S, et al (2007) A randomized controlled trial of extended intermittent preventive antimalarial treatment in infants. *Clin Infect Dis* 45(1):16–25
11. Korbel DS, Finney OC, Riley EM (2004) Natural killer cells and innate immunity to protozoan pathogens. *Int J Parasitol* 34(13-14):1517–28
12. Liu F, Guo J, Tian T, et al (2011) Placental trophoblasts shifted Th1/Th2 balance toward Th2 and inhibited Th17 immunity at fetomaternal interface. *APMIS* 119(9):597–604
13. Mockenhaupt FP, Reither K, Zanger P, et al (2007) Intermittent preventive treatment in infants as a means of malaria control: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in northern Ghana. *Antimicrob Agents Chemother* 51(9):3273–81
14. Moore JM, Nahlen BL, Misore A, et al (1999) Immunity to placental malaria. I. Elevated production of interferon-gamma by placental blood mononuclear cells is associated with protection in an area with high transmission of malaria. *J Infect Dis* 179(5):1218–25
15. PNL (2009) Rapport d'activités
16. PNL/MOH (2003) Atelier national de consensus sur la politique de traitement antipaludique au Sénégal
17. Rogerson SJ, Brown HC, Pollina E, et al (2003) Placental tumor necrosis factor alpha but not gamma interferon is associated with placental malaria and low birth weight in Malawian women. *Infect Immun* 71(1):267–70
18. Staalsøe T, Shulman CE, Dorman EK, et al (2004) Intermittent preventive sulfadoxine-pyrimethamine treatment of primigravidae reduces levels of plasma immunoglobulin G, which protects against pregnancy-associated Plasmodium falciparum malaria. *Infect Immun* 72(9):5027–30
19. Trape JF, Lefebvre-Zante E, Legros F, et al (1992) Vector density gradients and the epidemiology of urban malaria in Dakar, Senegal. *Am J Trop Med Hyg* 47(2):181–9

20. Walker-Abbey A, Djokam RR, Eno A, et al (2005) Malaria in pregnant Cameroonian women: the effect of age and gravidity on submicroscopic and mixed-species infections and multiple parasite genotypes. *Am J Trop Med Hyg* 72(3):229–35
21. Wilson NO, Bythwood T, Solomon W, Jolet al (2010) Elevated levels of IL-10 and G-CSF associated with asymptomatic malaria in pregnant women. *Infect Dis Obstet Gynecol* pii:317430
22. Wu X, Gowda NM, Gowda DC (2011) *Plasmodium falciparum*: differential merozoite dose requirements for maximal production of various inflammatory cytokines. *Exp Parasitol* 127(1):202–7
23. Wu X, Gowda NM, Kumar S, Gowda DC (2010) Protein-DNA complex is the exclusive malaria parasite component that activates dendritic cells and triggers innate immune responses. *J Immunol* 184(8):4338–48