MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE.

UNIVERSITE DE BAMAKO

REPUBLIQUE DU MALI

Un Peuple Un But Une Foi

ANNEE UNIVERSITAIRE 2010-2011 **N° /...../**

TITRE

REPONSE HUMORALE AUX ANTIGENES CANDIDATS VACCINS DE PLASMODIUM FALCIPARUM CHEZ LES ADULTES MALIENS.

THESE

Présentée et soutenue publiquement le / /2011devant la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie

PAR

M. Ismaïla Coulibaly

Pour obtenir le grade de *Docteur en MEDECINE* (DIPLÔME D'ETAT).

JURY

Président : Pr. Sékou F TRAORE
Membres: Pr. Hamadoun SANGHO
: Pr :Amagana DOLO
Co-directeur : Dr. Mahamadou DIAKITE
Directrice de thèse: Pr. Anatole TOUNKARA

Dédicaces

Je dédie ce travail
Je dédie ce travail à:

Dieu le Tout Puissant le Clément et le Miséricordieux: Que soit loué ici Dieu pour m'avoir donné la durée de vie, le courage et la mentalité nécessaire à la réalisation de ce travail. J'implore ton pardon pour toutes mes fautes commises et formule ici les vœux que tu me donnes une longue vie et guides mes pas dans l'avenir.

A mon père, Bouraïma Coulibaly
Ton affection et ton soutien sans cesse ont fait de moi ce que je suis. Cher papa ce travail modeste qu'il soit, est le fruit de ta rigueur dans le travail de l'enseignement et de l'éducation que nous avons reçu de toi. Que le tout puissant t'accorde une longue vie, de santé et de bonheur.

A ma mère, Fanta Doumbia
Tu nous as toujours éduqués avec la rigueur d'une mère de famille exemplaire. Tu nous as soutenus avec ton amour maternel. Que **Dieu** le **Clément** t'accorde une bonne santé, longévité et bonheur.

A mes grands frères : Amadou, Sidi, Cheick, pour vos preuves de fraternité. Chacun de vous a contribué d'une manière ou d'une autre à ma réussite scolaire.

A toutes mes sœurs : Aminata, Nadié, Kadiatou, vous m'avez entouré de chaleur familiale, je ne saurais jamais vous remercier assez pour vos soutiens.

A la mémoire de mon tonton feu Cheick Oumar Coulibaly : Ton départ a laissé un grand vide dans notre cœur. Ton affection ne nous a jamais fait défaut. Ce modeste travail est l'occasion pour moi de te manifester ma gratitude. Dors en paix très cher tonton, et que Dieu t'accueille dans son paradis *Amen*!

A mon tonton Bakary Sékou Coulibaly pour votre soutien indéfectible. Vous avez répondu présent à chaque besoin. Recevez ici ma profonde gratitude et soyez rassurés de mon fidèle attachement.

A toutes mes tantes : Nènè Satourou Coulibaly, Kadiatou Coulibaly, Alimatou Coulibaly, Djénébou Mallé, Atikatou Coulibaly, Saguinatou Coulibaly, Mariam Coulibaly, Hindou Coulibaly. Vous m'aviez assisté avec respect et spontanéité, je vous en suis chaleureusement reconnaissant.

A tous mes tontons

A mes oncles

A tous mes cousins et à toutes mes cousines : Pour tous les efforts consentis ; recevez ici l'expression de toute ma reconnaissance, soyez rassurés de mon profond attachement.

A ma grand-mère Assetou Coulibaly

A mes grand mères feue Aminata Coulibaly, Fatoumata Coulibaly

Remerciements

Aux familles : Coulibaly, Sylla, Diarra, Singaré, Tamboura, Maïga, Mallé pour tous ceux que vous avez faits pour moi.

A toute la promotion Moussa HARAMA du numérus clausus sans exception.

Aux docteurs : Dramane DIARRA, Daouda DIALLO, Abdoulaye Zié SANGARE, Djeneba Bocar FOFANA, Brema COULIBALY, Madani M.S TALL. Vous n'aviez ménagé aucun effort pour la réussite de ce travail. Retrouvez ici notre profonde gratitude. Ce travail est le votre.

Aux docteurs : Saïbou DOUMBIA, Karim TRAORE, Seïdina A.S DIAKITE, Drissa KONATE, Mory DOUMBIA, Aminata FAMANTA, Sorry DIAWARA pour votre entière disponibilité, votre soutien, et votre sympathie. Ce travail est le vôtre. Je vous en suis sincèrement reconnaissant.

A mes cadets: Assétou DIARRA, François KAMATE, Oumou TRAORE.

A tous les membres du groupe M : Chaka Ousmane Coulibaly, Koké Tangara, Badji Ibrahim Cissé, Oumou Mahamane Traoré, Brahima Drissa Traoré, Zié Drissa Ouattara, Sadio Demba Sylla, Aboubacar Niaré.

A tous les personnels de la pharmacie Kidin-Tanou.

A tous les personnels de la pharmacie de l'hôpital NIANANKORO FOMBA de Ségou.

A Dr Hamadoun Guindo : Vous n'aviez ménagé aucun effort pur la réussite de ce travail. Retrouvez ici notre profonde gratitude. Ce travail est le vôtre.

A tous les membres du club des bons amis.

A tous les membres de l'Amicale des Etudiants en Pharmacie.

A tous les membres de l'AMERS et de REERS.

A tous mes amis : Abdourhamane Cissé, Abderrhamane Maïga, Cheick Traoré, Moussa Traoré, Abdoulaye Ongoïba, Emmanuel Berthé, Souleymane DIALLO, Cheick O COULIBALY.

A tous les éléments de la cabine téléphonique pour leur soutien constant.

Aux chefs des Villages, aux guides locaux, et aux populations de Kéniéroba, Bozokin et Fourda ;

Au personnel du Dispensaire de Kéniéroba ;

A toute l'équipe de l'unité Immuno-génomique et Hémoglobinopathie du MRTC /FMPOS ;

A toutes les unités de MRTC/FMPOS ;

Aux collaborateurs de LMVR /NIAID/NIH : Mes sincères remerciements vont aux Drs Carole LONG et Rick FAIRHURST du LMVR/NIAID/NIH pour leur franche collaboration dans cette étude. Je remercie également Mr Ababacar DIOUF et le Dr Miura KAZUTOYO pour leur aide dans l'analyse des échantillons.

A tous les enseignants et étudiants de la FMPOS.

Hommage aux membres du jury

A notre maître et président du jury

Professeur Sékou Fantamady TRAORE
Professeur de biologie cellulaire et d'entomologie médicale à la FMPOS,
Co-directeur du MRTC et Directeur du département d'entomologie et des maladies à transmission vectorielle,

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider ce jury malgré vos multiples occupations. Vos qualités humaines et surtout votre sens élevé de la responsabilité et de la rigueur dans le travail font de vous un maître respectable et admiré. Trouvez ici toute notre admiration ainsi que notre profond respect.

A notre maître et membre du jury

Professeur Hamadoun SANGHO
Maître de conférences Agrégé de Santé Publique à la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie,
Directeur général du centre de recherche d'études et de documentation pour la survie de l'enfant (CREDOS).

Cher maître, c'est un grand honneur que vous nous faites en acceptant de siéger à ce jury malgré vos multiples occupations. Homme de science et chercheur dévoué, votre discrétion et votre abord facile font de vous un maître exemplaire. Permettez nous de vous exprimer notre profonde gratitude et notre plus grand respect.

A notre maître et membre du jury

Professeur Amagana DOLO
Maître de conférences Agrégé de Parasitologie-Mycologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie.
Chef de D.E.R des Sciences Fondamentales à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie.

Vous avoir comme membre du Jury constitue pour nous un grand honneur. Vos critiques et vos suggestions ont largement contribué à renforcer la qualité de ce travail. Votre simplicité, votre disponibilité constante et votre dynamisme font de vous un maître admiré de tous. Soyer rassuré de notre reconnaissance et de notre profonde gratitude.

A notre maître et directeur de thèse
Pr Anatole TOUNKARA
Professeur titulaire d'immunologie à la FMPOS,
Directeur du programme NIH/NIAID/UB de recherche sur le SIDA et la Tuberculose (SEREFO),
Doyen de la FMPOS,

Permettez-moi de vous remercier, cher maître, pour ce grand honneur que vous nous avez fait en nous ayant accepté comme étudiant dans votre faculté. Vous êtes une bibliothèque précieuse pour nous. Que Dieu vous accorde bonne santé et longévité. AMEN.

A notre maître et co-directeur de thèse

Dr Mahamadou DIAKITE
Docteur en pharmacie,
DPhil en génomique humaine,
Maitre-assistant en immunologie-génétique,
Responsable du laboratoire Immunogénétique du Centre de Recherche et de Formation sur le Paludisme (MRTC),

Cher maître, les mots me manquent ici pour vous exprimer mes sentiments de reconnaissance. Votre humanisme, votre disponibilité, vos remarquables connaissances scientifiques, votre esprit de partage et votre simplicité m'ont toujours impressionnée. Vous avez été responsable de ce travail car vous avez pleinement participé à sa réalisation. Veuillez recevoir ici, l'expression de notre profonde gratitude et de notre indéfectible attachement.

Table des matières

Dédicaces 1
Remerciements 4
Hommage aux membres du jury 5
Table des matières 7
LISTE DES FIGURES 9
LISTE DES TABLEAUX 10
Abréviations 11
1. Introduction 13
2. Objectifs 15
2.1. Objectif général 15
2.2. Objectifs spécifiques 15
3. Généralités sur le paludisme 16
3.1. Epidémiologie du paludisme 16
3.2. Cycle biologique 18
3.2.1. Cycle Chez le moustique (Sporogonie) 19
3.2.2. Cycle chez l'homme (Schizogonie) 19
3.2.2.1. Cycle exo érythrocytaire 19
3.2.2.2. Cycle intra érythrocytaire 19
3.3. Physiopathologie du paludisme 21
3.3.1. Accès palustre simple 21
3.3.2. Accès palustres graves et compliqués [23] 21
3.3.2.1. La séquestration 22
3.3.2.2. Mécanisme immunologique 23
3.4. Difficultés de la prévention et du traitement 23
3.4.1. Quelques caractéristiques de l'immunité antipalustre 24
3.4.1.1. Immunité innée ou naturelle 24
3.4.1.2. Immunité adaptative ou acquise 25
3.4.2. Vaccins antipalustres 29
3.4.2.1. Antigènes candidats vaccins de *P. falciparum* 29
3.4.2.1.1. AMA1 (Apical Membran Protein) 29
3.4.2.1.2. MSP1 (Merozoite Surface Protein 1, protéine 1 de surface du mérozoïte) 32
3.4.2.1.3. EBA175 (Erythrocyte Binding Antigen 175) 33
3.4.2.1.4. MSP 2 (Merozoite Surface Protein 2, protéine 2 de surface du mérozoïte) 34
3.4.2.2. Candidats vaccins actuels antipalustres 35
4. Matériel et Méthodes 38
4.1. Cadre d'étude 38
4.1.1. Situation géographique, climat et végétation de Bancoumana 43

4.1.2. Infrastructures socio-sanitaires de Bancoumana 44
4.1.3. Activités socio-économiques et culturelles de Bancoumana 45
4.2. Type et Période d'étude 46
4.3. Critères d'inclusion et de non-inclusion 46
4.3.1. Critères d'inclusion 46
4.3.2. Critères de non inclusion 46
4.4. Population d'étude et Echantillonnage 46
4.5. Collecte, gestion et analyse des données 46
4.6. Variables mesurées 47
4.7. Déroulement pratique de l'étude: 47
4.8. Examens de laboratoires utilisés 47
4.8.1. Le prélèvement sanguin et la préparation des échantillons biologiques. 48
4.8.2. Test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 48
4.8.3. Test d'inhibition croissance de *P.f in vitro* 48
4.9. Considération éthique et déontologiques 48
4.9.1. Risques et effets secondaires potentiels 49
4.9.1.1. Effets secondaires des prélèvements sanguins 49
4.9.1.2. Risques contre bénéfices 49
4.9.2. Compensation 49
5. Résultats 50
5.1. Données sociodémographiques 50
5.2. Résultats analytiques 55
6. Commentaires et discussion 63
6.1. Au plan méthodologique 63
6.2. Au plan de la réponse humorale aux différents antigènes 64
6.3. Problèmes de non-réponse et d'hétérogénéité des antigènes 67
6.4. Limites de notre étude 69
7. Conclusion et Recommandations 70
7.1. Conclusion 70
7.2. Recommandations 71
8. Références bibliographiques 72
9. Annexes 86
9.1. Détermination du Taux d'hémoglobine 86
9.2. Détermination du Taux d'anticorps 87
9.3. Test d'inhibition de croissance 92

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Cycle biologique du *Plasmodium* 20
Figure 2: Schéma de l'Inhibition cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCI) 28
Figure 3: Localisation de AMA 1 (Antigènes de surface du *Plasmoduim* ; 30
Figure 4: Résumé des points de vue actuels de l'organisation cellulaire d'un mérozoïte de *Plasmodium falciparum*, basés sur les données de recherche des 40 dernières années [72] 30
Figure 5: Différents types de vaccins antipaludiques et leurs cibles. 35
Figure 6: Sites d'étude 42
Figure 7: Plan de masse des trois villages d'étude dans la commune rurale de Bancoumana 43
Figure 8: Description statistique de l'âge moyen des sujets selon les ethnies 52
Figure 9: Répartition des sujets en fonction de l'âge, de l'ethnie et du sexe 53
Figure 10: Evolution de la pluviométrie et de l'incidence du paludisme en 2008 et 2009 dans la zone d'étude 54
Figure 11: Distribution des taux d'anticorps anti-AMA1-3D7, anti-MSP1-42-3D7, anti-EBA175 et anti-MSP2-257 en fonction de l'âge 56
Figure 12: Répartition des taux d'anticorps selon l'ethnie (Malinké, Dogon, Peulh) 57
Figure 13: Corrélation entre le taux des anticorps dirigés contre les 4 antigènes étudiés..... 58
Figure 14: Corrélation entre le taux d'anti-AMA1-3D7 et le pourcentage d'inhibition de la croissance de *P. falciparun in-vitro.*..... 60
Figure 15: Corrélation entre le taux d'anti-MSP1-42-3D7 et le pourcentage d'inhibition de la croissance de *P. falciparum in-vitro.* 60
Figure 16: Corrélation entre le taux d'anti-EBA175 et le pourcentage d'inhibition de la croissance de *P. falciparum in-vitro*..... 61
Figure 17: Corrélation entre le taux d'anti-MSP2-257 et le pourcentage d'inhibition de la croissance de *P. falciparum in-vitro*..... 61
Figure 18: Analyseur et Microcuvette HemoCue 86

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Classification des niveaux d'endémicité de la transmission du paludisme [18] 18
Tableau II: Répartition des sujets selon le sexe 50
Tableau III: Répartition des sujets selon l'ethnie 50
Tableau IV: Répartition des sujets selon la classe d'âge 51
Tableau V: Répartition des sujets selon l'ethnie, le sexe et la classe d'âge 51
Tableau VI: Répartition de l'âge moyen dans les différents groupes ethniques 52
Tableau VII: Moyenne du taux des anticorps anti-AMA1-3D7, Anti-MSP1-42-3D7, Anti-EBA175, et Anti-MSP2-257 55
Tableau VIII: Répartition de la distribution des taux d'anticorps anti-AMA1-3D7, anti-MSP1-42-3D7, anti-EBA175 et anti-MSP2-257 en fonction de l'âge 55
Tableau IX: Répartition de la distribution des taux d'anticorps anti-AMA1-3D7, anti-MSP1-42-3D7, anti-EBA175 et anti-MSP2-257 en fonction des autres antigènes 59
Tableau X: Proportion des sujets n'ayant pas d'anticorps contre les différents antigènes. 62

Abréviations

Ag : antigène
OMS (WHO) : Organisation Mondiale de la Santé
AMA1 : Apical Membran Antigen 1
MSP1 : Merozoit Surface Protein 1
MSP2 : Merozoit Surface Protein 2
MSP3: Merozoit Surface Protein 3
EBA175: Erythrocyte Binding Antigen 175
KDa: Kilo Dalton
Hb : Hémoglobine
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
SIDA : Syndrome de l'immunodéficience acquise
CSP : Circum Sporozoit Protein
IL : Interleukine (exemple : IL-1)
TNF : Tumor Necrosis Factor (exemple : TNF_{α})
PfEMP : *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membran Protein
CR1 : Complement Receptor 1
CD : Cluster of Differenciation (exemples : CD35, CD36)
PECAM-1: Platlets Endothelial Cell Adhesing Molecular-1
Ig : Immunoglobuline (exemple : Immunoglobuline G, IgG)
PfHRP1: *Plasmodium falciparum* Histidin Rich Protein 1
KAHRP: Knob-Associted Histidin Rich Protein
RESA: Ring Erythrocyte Surface Antigen
EDM: Electro-Dense Material
VCAM-1: Vascular cell adhesing molecular 1
ICAM-1: Inter cellular adhesion molecular 1
CSA : Chondritin Sulfate A
NO : Oxyde nitrique
CTA : Combinaison thérapeutique à base d'artémisinine
TLR: Toll Like Receptor
NK: Natural Killer
IFN: Interferon
GIA: Growth inhibition assay
ADCC: Antibody dependant cellular cytotoxicity
ADCI: Antibody dependant cellular inhibition
CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
DBL: Duffy Binding-Like
EBL: Erythrocyte Binding-Like

DNA/MVA-ME-TRAP : Acide Desoxiribonucléide/ Modifié Virus Ankara Multi-Epitopique - Thrombospondin Relative Adhésive Protein
LSA-3: Liver Stage Antigen 3
GLURP: Glutamate Rich Protein
Pfs : antigène de gamétocyte de *P. falciparum*
ELISA: Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
RTS, S: Antigène fusionné avec la protéine S du virus de l'hépatite B
PCR: Polymerase Chain Reaction
Th1: T helper 1
FMPOS : Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie
NIAID: National de l'Institute of Allergy and Infectious Deseases
NIH: National Institutes of Health
MRTC: Malaria Research Training Center
G6PD: Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase
GIS: Geographic Information System
USA: United State of America
g: gramme
Std : standard

1. Introduction

Le paludisme provoqué par le *P. falciparum* est une cause majeure de mortalité et de morbidité dans le monde, en particulier chez les jeunes enfants. Après une exposition répétée, les individus développent une immunité efficace qui contrôle la parasitémie au niveau sanguin, ce qui réduit les symptômes cliniques et des complications potentiellement mortelles[1]. Les anticorps sont des médiateurs importants de l'immunité acquise contre le paludisme comme en témoignent les modèles expérimentaux animaux et, surtout, des études de transfert passif d'anticorps provenant d'adultes ayant acquis une immunité contre le paludisme, utilisés avec succès pour traiter les patients atteints de paludisme grave [2, 3]. Les anticorps dirigés contre les antigènes du mérozoïte sont considérés comme des anticorps protecteurs importants et semblent fonctionner *in-vivo* pour inhiber l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes. Ces anticorps jouent aussi un rôle important dans l'immuno-adhérence des mérozoïtes aux phagocytes et dans l'inhibition cellulaire dépendante des anticorps [4, 5]. Toutefois, il est difficile de savoir quels antigènes du mérozoïte sont des cibles importantes de l'immunité naturellement acquise.

Un certain nombre d'antigènes du mérozoïte ont été identifiés dans l'invasion érythrocytaire et certains ont été identifiés comme cibles des anticorps inhibant l'invasion du globule rouge chez l'homme ou intervenant dans l'inhibition cellulaire dépendant des anticorps *in-vitro* [6-8]. Les protéines de surface du mérozoïte (MSP) sont considérées comme étant impliquées dans la fixation initiale du mérozoïte à la surface des érythrocytes (par exemple, MSP-1) et l'antigène de la membrane apicale-1 (AMA-1) a été impliqué dans la réorientation apicale du mérozoïte avant l'invasion.

Deux familles de ligands d'invasion présents dans les organites apicaux, les antigènes érythrocytaires de liaison (par exemple, EBA175, EBA181, EBA140) et les homologues de *P. falciparum* de liaison aux réticulocytes sont également nécessaires pour l'invasion[9]. Il y a de nombreuses protéines de surface sans fonction connue, y compris MSP-2, MSP-3, MSP-4, et la protéine riche en glutamate (GLURP) [9]. Les polymorphismes génétiques existent dans la plupart de ces antigènes et certains peuvent être regroupés en grands types alléliques. Beaucoup de ces antigènes sont actuellement évalués ou développés en tant que candidats à l'inscription dans un vaccin contre le paludisme au stade érythrocytaire[10].

Il existe plusieurs critères qui peuvent être utilisés de manière objective pour la sélection des antigènes prévus pour le développement de vaccins [10]. Il s'agit notamment de la démonstration que les anticorps contre ces antigènes inhibent la croissance de *P.*

falciparum in-vitro, ou confèrent la protection dans des modèles animaux, et la démonstration que les anticorps acquis naturellement sont associés à la protection contre la maladie chez les populations vivant en zone d'endémie palustre. Par conséquent, de nombreuses études épidémiologiques ont étudié le rôle des antigènes de surface du mérozoïte en tant que cibles de l'immunité chez l'homme. Toutefois, les données épidémiologiques sur l'effet protecteur des anticorps anti-mérozoïtes acquis naturellement sont contradictoires. Il existe de nombreuses raisons possibles pour expliquer les incohérences observées dans la protection. Dans les zones d'endémie palustre, la vitesse à laquelle se développe l'immunité naturelle est dépendante de l'intensité et de la stabilité de l'exposition à *P. falciparum* et une immunité contre les formes graves qui se développe plus rapidement dans les zones de transmission plus élevée [1, 11]. Les différences dans l'acquisition de l'immunité peuvent influer sur les associations entre les réponses spécifiques et l'immunité protectrice. En outre, la prévalence des principaux types alléliques des antigènes spécifiques et l'acquisition subséquente de l'immunité spécifique d'allèle peuvent être différentes entre les populations ou entre les groupes ethniques.

Les allèles représentés dans des protéines recombinantes utilisées pour déterminer la réponse humorale varient selon les études, en plus de la préparation des antigènes utilisés dans les dosages immunologiques. Plus important encore, l'étude des patterns utilisés pour étudier les associations entre la réponse humorale lors des études sur le paludisme à *P. falciparum* et la prémunition varient considérablement. Le témoignage cité dans la littérature concernant le rôle protecteur des anticorps spécifiques d'antigène est souvent basé sur des données provenant des études transversales ou cas-témoins. L’examen de l'association de la réponse humorale avec les résultats parasitologiques (goutte épaisse) et cliniques (fièvre) déterminée à un instant donné, ou chez les personnes qui ont déjà développé la maladie, permettant l'établissement de la causalité est problématique. La meilleure évidence de la causalité dans les études d'observation est tirée des études de cohorte dans lesquelles une relation temporelle peut être établie entre l'exposition et les résultats parasito-cliniques.

L'objectif général de notre étude était de faire progresser notre compréhension de l'immunité naturellement acquise contre le paludisme et de contribuer au développement rationnel des vaccins.

2. Objectifs

2.1. Objectif général

Etudier la réponse humorale aux antigènes candidats vaccins de *P. falciparum* chez des adultes maliens de 18 à 60 ans vivant en zone d'endémie palustre.

2.2. Objectifs spécifiques

- Mesurer les taux des anticorps Anti-AMA1-3D7, Anti-MSP1-47-3D7, Anti-EBA175, Anti-MSP2-257 chez des adultes vivant en zone d'endémie palustre au Mali ;

- Evaluer la proportion de ces anticorps en fonction du sexe et l'âge chez les groupes ethniques Dogon, Malinké et Peulh vivant dans la zone d'étude ;

- Déterminer la corrélation entre les taux de ces anticorps et l'inhibition de la croissance de *P. falciparum in-vitro* chez ces mêmes adultes.

3. Généralités sur le paludisme

Le paludisme est une érythrocytopathie fébrile et hémolysante, causé par le développement et la multiplication d'abord dans le foie puis dans les globules rouges d'un hématozoaire du genre *Plasmodium*, transmis à l'homme par la piqûre infectante du moustique femelle du genre *Anopheles*.

Sur le plan taxonomique, le *Plasmodium* appartient au Phylum des *Apicomplexa*, à la classe des *Sporozoaires* et à l'ordre des *Eucoccidae*. Quatre espèces sont classiquement responsables du paludisme chez l'homme : *Plasmodium falciparum, Plasmodium malariae, Plasmodium ovale, Plasmodium vivax* . Mais *P. falciparum* est de loin la plus redoutable car elle provoque les cas sévères et compliqués de paludisme et est responsable des décès liés à cette maladie. Une cinquième espèce, *Plasmodium knowlesi* a été récemment décrit chez l'homme en Asie [12] posant ainsi l'existence d'une 5^{e} espèce de *Plasmodium* infectant naturellement l'homme [13]. L'agent vecteur responsable de la transmission du paludisme à l'homme appartient à l'ordre des diptères, à la famille des *Culicidae,* à la sous famille des *Anophelinae* et au genre *Anopheles* [14].

3.1. Epidémiologie du paludisme

L'Afrique subsaharienne est la région la plus touchée par le paludisme. La région afro-tropicale, qui ne compte que 8% de la population mondiale, supporte le plus lourd fardeau du paludisme avec 85 à 90% des cas (200 à 280 millions des cas dont 90% sont dus à *P. falciparum*). On y comptabilise environ 800 000 décès annuels[15].

Deux complexes de vecteurs sont les responsables majeurs de la transmission du paludisme en Afrique : *Anopheles gambiae* (*arabiensis, bwambae, gambiae, melas, merus* et *quadriannulatus*) et *Anopheles funestus* [14].

L'indice de *stabilité,* déterminé par Macdonald [16] caractérise l'enracinement du paludisme et permet de distinguer :

- **les zones de paludisme stable** où la forte transmission entraîne une prémunition. Celle-ci n'empêche pas les habitants d'être parasités mais limite les manifestations pathologiques aux classes d'âge les plus jeunes alors que les adultes sont peu touchés.
- **les zones de paludisme instable** où le caractère épisodique de la transmission ne permet pas le développement de la prémunition. La maladie sévit alors sous forme d'épidémie touchant toutes les classes d'âges.

L'Afrique australe, qui répond à ce faciès épidémiologique, est encore la région la plus touchée par l'infection par le virus VIH. La co-morbidité dans ces zones aggrave le poids

de la prise en charge avec un risque d'augmentation des formes graves de paludisme chez les adultes autochtones.

Au Mali, cinq modalités épidémiologiques de transmission du paludisme ont été décrits [17]:

- **La zone de transmission saisonnière longue de quatre à six mois au sud** qui correspond à la région soudano-guinéenne. Le paludisme y est holo-endémique avec un indice plasmodique supérieur à 75% de juin à novembre.
- **La zone de transmission saisonnière courte à quatre mois** dans les régions de la savane nord soudano-sahélienne ; le paludisme y est hyper-endémique avec un indice plasmodique variant entre 50 et 75%.
- **La zone sub-saharienne** au Nord où la transmission est sporadique voire **épidémique**, l'indice plasmodique est inférieur à 50%.
- **La zone du delta intérieur du fleuve Niger et les zones de retenue d'eau et de riziculture** (barrages) où la transmission est bimodale voire plurimodale en début de pluie, pendant la période de décrue et de la mise en eau des casiers rizicoles. Le paludisme est de type méso-endémique avec un indice plasmodique inférieur à 40%.
- **Le milieu urbain** en particulier celui de Bamako et de Mopti est impropre à l`impaludation (Pollution des gîtes, médicalisation intense, etc.). Le paludisme y est de type hypo-endémique avec un indice plasmodique inférieur à 10%.

Tableau I: Classification des niveaux d'endémicité de la transmission du paludisme [18]

Niveau d'endémicité	*Transmission*	*Indice plasmodique Chez les enfants de 2-9 ans (%)*	*Commentaires*
Paludisme hypoendémique	Faible: sub-périodique ou sporadique	Généralement ≤ 10	Les moustiques sont instables, généralement difficiles à détecter; des épidémies sérieuses peuvent survenir
Paludisme mésoendémique	Saisonnière, périodique suivant une bonne saison pluvieuse	11-50 en fonction du temps de surveillance	les moustiques fluctuent, détectables en fonction des saisons, une fenêtre saisonnière peut survenir; les habitants acquièrent une certaine immunité
Paludisme hyperendémique	Intense (saisonnière) chaque année	51-75	Fluctuation saisonnière des cas de paludisme; fréquentes séquelles sévères chez les jeunes enfants; une certaine immunité chez les adultes
Paludisme holoendémique	La transmission peut survenir à travers l'année avec des pics de transmission	> 75	On peut détecter les moustiques toute l'année avec des pics; des taux élevés d'anémie chez les très jeunes enfants et la prémunition chez les adultes

Pour pouvoir mieux comprendre les manifestations cliniques, la transmission, le développement de l'immunité ou les possibilités de prévention, penchons-nous sur le cycle biologique du parasite.

3.2. Cycle biologique

Le cycle du *Plasmodium* est un cycle complexe qui comprend un hôte intermédiaire (l'homme pour ce qui nous concerne), où il se trouve sous une forme haploïde et se multiplie de manière asexuée et un hôte définitif, l'anophèle femelle, chez qui se déroule la reproduction sexuée.

3.2.1. Cycle Chez le moustique (Sporogonie)

Lors d'un repas sanguin sur un individu infecté, l'anophèle femelle ingère des formes sexuées du *Plasmodium* ainsi que les gamétocytes mâles (micro gamétocytes) et femelles (macro gamétocytes). Ces derniers parviennent dans l'estomac du moustique et se transforment en gamètes. Le gamète mâle subit un processus d'ex flagellation à la suite duquel les gamètes femelles sont fécondés. Il en résulte un zygote appelé ookinète ; celui-ci s'implante sous la paroi stomacale en formant l'oocyste. Cette brève phase diploïde s'achève par une division méiotique suivie par plusieurs milliers de mitose qui conduit à la production de sporozoïtes. L'éclatement de l'oocyste libère des éléments mobiles et haploïdes dans l'hémolymphe. Les sporozoïtes gagnent préférentiellement les glandes salivaires du moustique d'où ils pourront être injectés avec la salive lors d'une piqûre infectante. Chez le moustique, l'ensemble de ce cycle se déroule entre 10 à 40 jours, suivant la température extérieure et l'espèce en cause.

3.2.2. Cycle chez l'homme (Schizogonie)

3.2.2.1. Cycle exo érythrocytaire

Au cours de la piqûre, l'anophèle femelle infecté injecte dans un capillaire des sporozoïtes. Les sporozoïtes transitent dans la circulation générale et, en quelques minutes, ils envahissent les hépatocytes grâce à une interaction spécifique entre la protéine majeure de surface du sporozoïte (CSP) et un récepteur spécifique situé sur la membrane plasmique de l'hépatocyte du côté de l'espace de Disse, espace directement en contact avec le sang circulant. Le sporozoïte entre alors dans une phase de réplication au sein de la vacuole parasitophore et de prolifération intracellulaire qui repousse en périphérie le noyau de la cellule. Il finit par constituer une masse multinucléée appelée schizonte (schizonte hépatocytaire) qui conduit à la libération de plusieurs dizaines de milliers de mérozoïtes dans la circulation sanguine .Cette phase de multiplication est asymptomatique et dure 8 à 15 jours selon les espèces.

3.2.2.2. Cycle intra érythrocytaire

C'est la seule phase symptomatique du cycle et est d'intensité variable selon le statu immunitaire de la personne infectée. Les mérozoïtes libérés lors de la rupture de l'hépatocyte vont débuter le cycle sanguin asexué de prolifération de *P. falciparum* en infectant les érythrocytes. Le mérozoïte pénètre grâce à un processus parasitaire actif et se différencie en anneau (trophozoïte jeune), puis en trophozoïte mature, stade à partir duquel une intense phase réplicative commence. Il donne alors naissance au schizonte (schizonte érythrocytaire), celui-ci après segmentation montre une forme caractéristique de rosace, puis libère 8 à 32 mérozoïtes qui rapidement réinfectent des érythrocytes sains. L'ensemble de ce cycle dure 48 heures chez *P. falciparum*.

L'apparition des gamétocytes se déroule en général à la deuxième semaine qui suit l'infection et ces formes peuvent persister plusieurs semaines après la guérison. A la suite

d'une nouvelle piqûre par un anophèle, les gamétocytes mâles et femelles (au dimorphisme sexuel marqué) sont ingérés avec le repas sanguin. Il est à noter que moins de 20% des piqûres de moustiques contenant des sporozoïtes dans leurs glandes salivaires sont responsables d'infections en zone endémique.

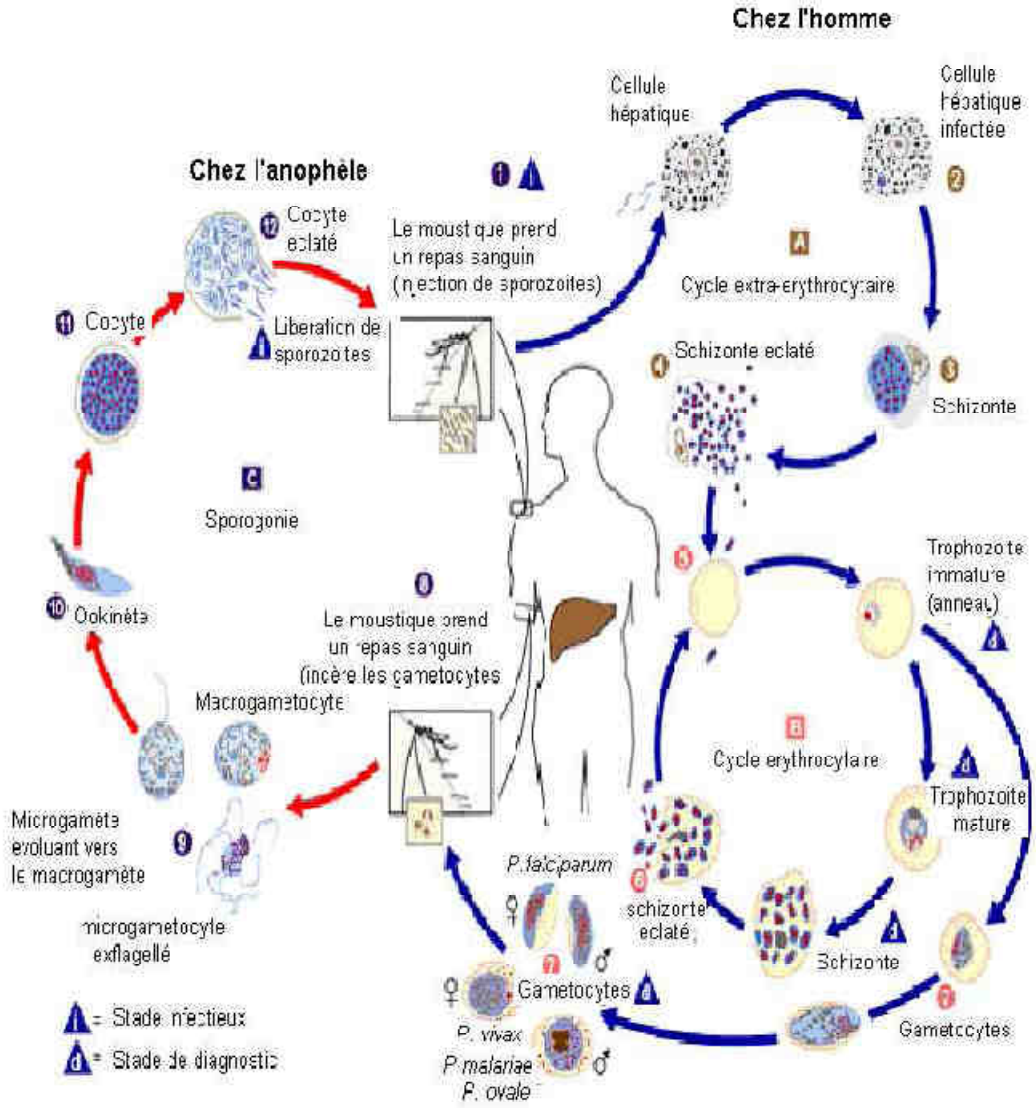


Figure 1: Cycle biologique du *Plasmodium*

Source: National Center for Infectious Diseases (CDC, www.cdc.gov), Atlanta, Georgia, Division of Parasitic Diseases (Department of Health and Human Services US)

3.3. Physiopathologie du paludisme

Le paludisme et ses complications sont la résultante d'une cascade d'évènements physiopathologiques, influencés à la fois par le parasite et les facteurs liés à l'hôte (y compris l'immunité et les facteurs de susceptibilité génétiques).

3.3.1. Accès palustre simple

Les symptômes du paludisme commencent à se prononcer à partir du stade intra-érythrocytaire du cycle de développement du parasite. La fièvre, lors de l'accès simple survient au moment de la lyse des hématies qui libère les mérozoïtes, l'hémozoïne (pigment malarique), et d'autres antigènes parasitaires. Pendant longtemps on a cru que le pigment malarique se comportait comme un pyrogène stimulant les centres hypothalamiques thermorégulateurs. Actuellement, il apparait que la fièvre n'est pas propre au parasite lui-même, mais est dûe à des cytokines libérées par les macrophages et les cellules endothéliales de l'hôte [19]**.** Toute une série de cytokines peuvent avoir un effet pyrogène, telles que l'IL-1, l'IL-6 et la lymphotoxine β ; mais c'est le TNF-α dont le lien avec la fièvre a été le mieux établi [20, 21]. Ces cytokines se comportent comme des pyrogènes endogènes en stimulant les centres thermorégulateurs hypothalamiques.

La fièvre n'apparaît que lorsque la parasitémie atteint un seuil critique, variable d'un sujet à l'autre et d'une souche de parasite à l'autre ; ce seuil est appelé seuil pyrogène. L'allure de la fièvre est variable. Au cours des accès de primo invasion, le cycle érythrocytaire est généralement non synchronisé ; la fièvre prend alors une allure continue ou irrégulière selon la parasitémie. Lorsque les cycles se synchronisent progressivement, la fièvre revêt alors son caractère de type de fièvre intermittente, tierce ou quarte [19]**.** Pendant l'infection, le système phagocytaire débarrasse l'organisme non seulement des pigments malariques mais aussi des débris érythrocytaires, ce qui provoque l'hépato-splénomégalie [22]**.**

3.3.2. Accès palustres graves et compliqués [23]

Seule l'espèce *P. falciparum* et dans certains cas *P. vivax* sont responsables du paludisme grave et compliqué. Ce paludisme grave s'observe chez les sujets non immuns (jeunes enfants, femmes enceintes, expatriés, sujets vivants en zone hypoendémique). Les concepts physiopathologiques du paludisme grave font intervenir deux phénomènes interdépendants :

- la séquestration des hématies parasitées,
- le phénomène immunologique

3.3.2.1. La séquestration

Elle aboutit à une obstruction du micro capillaire par les globules rouges. Trois mécanismes concourent à ce phénomène : l'auto-agglutination, la formation de rosettes « rosetting » et la cytoadhérence.

Le phénomène de l'auto- agglutination

L'auto-agglutination des hématies parasitées a été observée sur de nombreuses souches de *P. falciparum* étudiées en culture au laboratoire. Il s'agit d'un regroupement des érythrocytes infectés entre eux pour former des micros agrégats susceptibles d'obstruer les capillaires profonds. Ce phénomène a été observé chez les patients porteurs de forte parasitémie en dehors de tout phénotype d'adhésion. Les mécanismes moléculaires qui prédisposent à sa survenue sont encore mal connus.

Le phénomène de formation des rosettes « rosetting »

Les hématies parasitées ont la faculté d'attirer au tour d'elles des hématies saines pour former des rosettes : c'est le phénomène de « rosetting ». La formation des rosettes est la conséquence de la liaison entre des ligands parasitaires (PfEMP1) présents à la surface des hématies infectées et leurs récepteurs sur les globules rouges non infectés. Plusieurs récepteurs pour les ligands parasitaires (PfEMP1) ont été décrits à la surface des globules rouges. On peut citer : le récepteur 1 du complément (CR1/CD35), les trisaccharides des groupes sanguins A et B, le CD36, le PECAM-1/CD31. Les anticorps (IgM et IgG) et certains composants du complément (C3b et C4b) jouent aussi un rôle dans ce phénomène à travers le CR1. Il aboutit à la formation d'un agrégat qui contribue à l'obstruction des petits vaisseaux sanguins. Ce phénomène a été bien étudié *in-vitro* sur des lignées cellulaires (fibroblastes). Il varie d'une souche plasmodiale à l`autre et est corrélé au degré de sévérité du paludisme [24, 25]. La formation de rosettes constitue un mode de protection pour le parasite contre le système phagocytaire de la rate et exerce un effet délétère pour l'hôte par blocage du flux sanguin.

Le phénomène de cytoadhérence

La cytoadhérence des hématies parasitées à l'endothélium vasculaire ou aux cellules trophoblastiques placentaires est le mécanisme qui a été le mieux étudié ces dernières années. Ce phénomène permet au *Plasmodium* de se développer plus facilement grâce à un environnement gazeux favorable et d'échapper à la clairance splénique. Les hématies parasitées expriment à leur surface des protubérances (knobs) qui semblent jouer un rôle important dans leur adhésion aux cellules endothéliales. Il s'agit de protubérances protéiniques auxquelles sont incorporés des antigènes plasmodiques. Parmi ces antigènes plasmodiques on peut citer : la PfEMP-1 et 2 (*Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1 et 2*) ; la PfHRP-1 (*Plasmodium falciparum Histidin Rich Protein*)

ou KAHRP (*Knob-Associated Histidin-Rich Protein*), RESA (*Ring Erythrocyte Surface Antigen*) et EDM (*Electron-Dense- Material*).

Parmi ces protéines parasitaires associées aux knobs, PfEMP-1 est le ligand parasitaire le mieux caractérisé. PfEMP-1 interagit avec des récepteurs spécifiques au niveau des cellules endothéliales vasculaires et du syncytiotrophoblaste, comme l'ICAM-1 (*Inter Cellular Adhesion Molecule-1*), le CD36, le VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesing Molecular-1*) le CD31 ou PECAM-1, Le CSA (*Chondroitin Sulfate A*), la sélection [26]. L'adhésion des hématies parasitées à ces récepteurs entraîne leur séquestration à l'intérieur de la microcirculation. La séquestration permet aux hématies parasitées d'échapper à la clairance splénique et contribue à la gravité du paludisme. Elle entraîne aussi une obstruction des micro-vaisseaux surtout au niveau cérébral qui semble être la principale cause du neuropaludisme. La séquestration entraînerait aussi une dilatation des micros vaisseaux par la libération du monoxyde d'azote (NO), responsable de l'œdème cérébral et pulmonaire.

3.3.2.2. Mécanisme immunologique

Le système à médiation cellulaire impliquant les lymphocytes CD4 et les macrophages joue un rôle très important dans la pathogénèse du neuropaludisme. Les antigènes plasmodiaux facilitent le recrutement des macrophages et la libération de nombreuses cytokines proinflammatoires dont l'Interféron gamma, le TNF-α, l'IL-1 et l'IL-6). Parmi les médiateurs macrophagiques, le TNF-α est un acteur important. Expérimentalement, l'injection du TNF-α chez les souris reproduit la plupart des manifestations cliniques et biologiques du paludisme grave. On pense aussi que la libération du TNF-α stimulerait l'expression des récepteurs des knobs au niveau endothélial, donc la séquestration.

Il faut rappeler que les fièvres observées au cours des accès palustres seraient dues à la libération dans le sang de l'hémozoïne (substance pyrogène résultant de la dégradation de l'hémoglobine par le *Plasmodium*) après éclatement des schizontes. Cette fièvre peut également être due aux cytokines proinflammatoires comme le TNF-α, l'IL-1 et l'IL-6.

3.4. Difficultés de la prévention et du traitement

La prévention du paludisme consiste en différentes mesures qui peuvent protéger soit contre l'infection, soit contre le développement de la maladie chez les individus infectés. Les mesures qui protègent contre l'infection visent le vecteur de la maladie, à savoir l'anophèle. Celles-ci peuvent être des mesures de protection personnelle (individuelles ou familiales): vêtements de protection, insectifuges, pulvérisation intradomiciliaire des habitations en utilisant des insecticides à effet rémanent, ou des mesures de protection de la collectivité ou population: gestion environnementale en vue de limiter la transmission.

Ainsi, la chimioprophylaxie doit être limitée aux seules femmes enceintes en zone endémique et aux voyageurs venant d'une zone impaludée.

Pour le traitement, l'utilisation des combinaisons thérapeutiques à base d'Artémisinine CTA est recommandée par l'OMS depuis 2004. En cas de paludisme grave, le traitement se ferra par les sels de quinine en perfusion intraveineuse ou par les dérivés de l'Artémisinine. Tous ces moyens nécessitent une politique économique et sociale onéreuse impliquant la participation de chacun pour une meilleure amélioration de la couverture sanitaire de la population. Le paludisme est un véritable handicape pour le développement socioéconomique des pays en voie de développement. La mortalité et la morbidité attribuée au paludisme dans les pays africains sont de plus en plus élevées et les fragilisent en termes de ressources humaines et économiques.

3.4.1. Quelques caractéristiques de l'immunité antipalustre

L'infection par le *Plasmodium*, parasite responsable du paludisme, engendre des réponses immunitaires de l'hôte. Ces réponses immunes sont régulées aussi bien par le système immunitaire non spécifique dit inné, par le système immunitaire spécifique ou acquis, que par des facteurs environnementaux. Les deux types d'immunité sont complémentaires. L'immunité innée se mobilise dès le début (dans les premières heures) de toute infection en attendant la mise en place de l'immunité « acquise » qui est opérationnelle dans les dix jours suivant l'infection. L'immunité acquise naturellement dépend des espèces parasitaires mais aussi des stades de développement spécifiques du parasite ainsi que de la répétition de l'exposition [27, 28].

Dans les régions où le paludisme est endémique avec une transmission annuelle stable, les enfants nés de mères semi-immunes seraient protégés contre la maladie durant la première moitié de leur première année de vie par les anticorps maternels. Cette immunité s'estompe au cours du temps et l'on observe chez l'enfant, après le sixième mois de sa vie, une augmentation de la sensibilité au paludisme [27]. En général, l'acquisition d'une immunité semi protectrice contre le paludisme est ainsi lente. Cependant, il faut une exposition continue et répétée au parasite pour son installation. . La variabilité génétique de l'hôte et du *Plasmodium* rend instable cette immunité [27, 29].

3.4.1.1. Immunité innée ou naturelle

L'immunité innée ou naturelle est assurée par les cellules, les molécules et les enzymes (lysozymes). Les mécanismes cellulaires et humoraux de cette défense dite « non spécifique » ne sont pas très bien connus. De récentes études dans des systèmes non parasitaires ont permis de démontrer qu'une famille de protéines codée par la lignée germinale (les Toll-Like Receptors ou TLR) serait importante pour la défense innée de

l'hôte, aussi bien chez les vertébrés que chez les invertébrés. Les études dans plusieurs régions endémiques palustres ont démontré que l'infection palustre induit l'activation des récepteurs Toll-like, TLR1, TLR2, TLR4 et TLR9 [30, 31]. Chez les mammifères, l'activation des macrophages par l'intermédiaire des TLRs entraîne l'induction de gènes effecteurs. Ces gènes contrôlent et exécutent la défense innée dans un grand nombre de variété de bactéries et de systèmes viraux [32].

L'infection palustre induit une augmentation des concentrations sériques des immunoglobulines non spécifiques dûe à une activation des cellules B polyclonales [2]. Les cellules de l'immunité innée comme les cellules tueuses naturelles (cellules NK), les cellules dendritiques et les cellules T γδ sont impliquées dans la clairance des parasites et des érythrocytes infectés ainsi que dans l'élimination des hépatocytes infectés [33]. Les neutrophiles, les monocytes et les macrophages participent à la phagocytose, à la cytotoxicité et à l'inhibition du parasite [34]. Les cellules NK stimulent la production d'IFNγ qui active le macrophage conduisant ainsi à la lyse des cellules parasitées [35]. Les lymphocytes T gamma delta (γδ T) semblent jouer un rôle protecteur pendant la phase précoce de l'infection palustre indiquant une contribution de l'immunité innée dans le contrôle de la parasitémie [36].

Le complément, les chémokines, les interférons (IFN-α et IFN-β) et l'oxyde nitrique (NO) constituent les principales molécules de l'immunité innée jouant un rôle clé dans l'immunité antipalustre. Cependant, il n'existe pas un consensus sur le rôle protecteur ou pathogénique du complément. Il a été observé en Afrique de l'Ouest que les enfants souffrant de paludisme à *P. falciparum* présentaient un faible taux de C3 [37]. Des études suggèrent que la formation des immuns complexes par des antigènes solubles du parasite est probablement la cause de l'activation du complément. On estime que le complément activé se fixe à des complexes immuns. Ces derniers se lient à la surface des parasites et entraînent leurs lyses par le biais du complexe d'attaque membranaire [38].

Le rôle de l'oxyde nitrique (NO) a été également décrit. En effet, la production des cytokines proinflammatoires telles que l'IFN-γ, induit la synthèse de NO. Ce dernier inhibe le développement du parasite à ses différents stades de développement, y compris les stades asexués qui sont responsables des manifestations cliniques de la maladie [39, 40]. Les principales enzymes impliquées dans la protection contre le paludisme constituent les lysozymes retrouvés dans les cellules phagocytaires.

3.4.1.2. Immunité adaptative ou acquise

Ce sont les travaux de Robert Koch en 1900 effectués dans deux populations différentes vivant dans une zone de transmission forte et faible de paludisme qui ont permis de

démontrer l'existence d'une immunité acquise protectrice contre cette infection. Cette immunité n'est pas stérilisante car en zone d'endémie palustre de transmission stable, le portage du parasite sans manifestations cliniques est fréquent. Cet état immunitaire qui permet de contrôler la parasitémie à un seuil sans manifestation clinique a été appelé prémunition par les frères Sergents [41].

De nombreux travaux en zone d'endémie palustre ont démontré que l'induction de l'immunité antipaludique adaptative nécessite une exposition longue. Elle se met en place progressivement avec l'âge et les expositions répétées. Elle fait intervenir non seulement les réponses humorales mais aussi celles à médiation cellulaire [41].

Réponses humorales ou Anticorps

Le rôle des anticorps particulièrement les IgG, dans la protection contre l'infection palustre a été démontré par les expériences de transfert passif de plasma provenant d'individus vivant en zone d'endémie à des personnes naïves non exposées [2, 3, 5]. Chez les résidents des zones endémiques, l'infection palustre induit la production des immunoglobulines spécifiques et polyclonales. Ces anticorps sont produits par les cellules lymphocytaires B. Au cours de l'infection palustre, les anticorps produits sont constitués essentiellement par des immunoglobulines M et G (IgM et IgG), mais aussi d'autres types d'immunoglobulines telles que les immunoglobulines E (IgE) et immunoglobulines A(IgA).

L'IgG est la plus importante parmi les isotypes d'anticorps. Chez les individus protégés, les sous-classes cytophiliques IgG1 et IgG3 ont été fréquemment rencontrées. Cependant, l'augmentation de la concentration d'IgG peut être associée à une diminution du risque d'infection palustre. La sous-classe IgG4 qui est non cytophilique tout comme IgG2 peut inhiber les mécanismes effecteurs par inhibition des anticorps cytophiliques [42, 43].

Le rôle protecteur des IgM dans le cas du paludisme reste à être élucidé. De même, aucune fonction spécifique antipaludique n'a été attribuée aux IgA [44].

Les infections palustres chez l'homme aussi bien que chez les animaux ont été associées à des concentrations élevées d'IgE totale et IgE anti-malarique spécifique. L'élévation d'IgE apparaît être associée à la gravité du paludisme (Paludisme cérébral et autres formes sévères de paludisme) [45]. Cependant une étude chez les Peulh et les Dogon au Mali a démontré une association positive entre de faibles parasitémies et des taux élevés d'IgE spécifiques d'antigènes de *P. falciparum* [46].

Les anticorps agissent par divers mécanismes : i) inhibition de l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes par opsonisation c'est-à-dire facilitation de leur phagocytose ; ii) inhibition de l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes ; iii) inhibition de la croissance intra-érythrocytaire du parasite (mesurée par l'essai GIA « *Growth Inhibition Assay* »); iiii) la clairance des érythrocytes infectés par ADCI «*Antibody Dependant Cellular Inhibition*, inhibition cellulaire dépendante des anticorps» [5, 34, 47]. Des anticorps monoclonaux spécifiques du CSP de *P. falciparum* sont capables d'inhiber l'invasion et le développement de ce parasite dans les érythrocytes [48]. Les études séro-épidémiologiques conduites en Afrique de l'Ouest et au Kenya ont démontré que la réponse anticorps naturelle contre l'antigène palustre AMA-1 (*Apical Membran Antigen-1*) est très largement distribuée avec une forte fréquence [49]. Les réponses humorales et cellulaires contre AMA-1 augmentent avec l'âge dans les populations continuellement exposées au paludisme [50]. Les anticorps spécifiques d'AMA-1 naturellement acquis chez les individus vivant en zone d'endémie palustre sont capables d'inhiber la croissance *in-vitro* de *P. falciparum* [6]. L'antigène MSP-3 (*merozoite surface protein-1*) induit des anticorps cytophiliques protecteurs et le mécanisme de base serait l'ADCI [5].

De nombreuses études réalisées *in-vitro* ont démontré que des cellules effectrices comme les monocytes/macrophages ou les neutrophiles, étaient capables, en association avec les IgG spécifiques, d'éliminer les stades sanguins du parasite ou d'inhiber leur prolifération. En effet, les monocytes de souris, de singes et des humains sont capables de phagocyter et d'éliminer les mérozoïtes et les globules rouges infectés en présence de sérums De personnes immunes ou d'IgG purifiés à partir de ces sérums [51-53]. Une étude similaire réalisée sur des cultures de *P. falciparum in-vitro* a mis en évidence un mécanisme original faisant intervenir les monocytes ou les neutrophiles et les IgG spécifiques [5].

Ce nouveau mécanisme nommé ADCI (*Antibody Dependant Cellular Inhibition*) se distingue de l'ADCC (*Antibody Dependant Cellular Cytotoxicity*, cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps) par le fait qu'il n'induit pas uniquement la lyse des globules rouges parasités, mais aussi une inhibition de la croissance du parasite, partiellement réversible lorsque ceux-ci sont remis en culture sans monocytes, ni IgG. Par la suite, d'autres études ont démontré que l'ADCI avait pour cible principale des antigènes du mérozoïte [5, 47, 54].

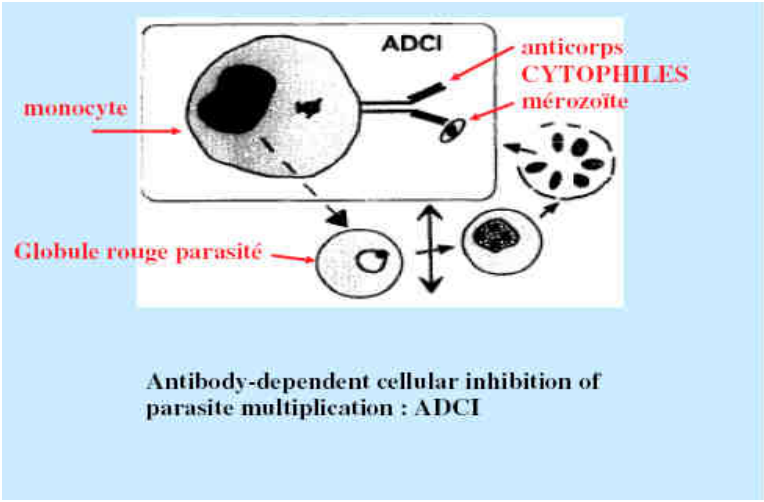


Figure 2: Schéma de l'Inhibition cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCI)
Source : Jean-Louis Pérignon, Unité de Parasitologie Biomédicale,
Pierre Druilhe, Institut Pasteur, Paris ReMeD Paris, 3 novembre 2008

Réponse cellulaire

Les cellules T $CD4^+$ ou T helper et les T $CD8^+$ ou T cytotoxiques interviennent dans l'immunité anti-palustre. Il est actuellement bien établi que les cellules T $CD4^+$ et T $CD8^+$ reconnaissent des peptides antigéniques du *Plasmodium* présentés respectivement par les molécules du CMH classe II et Classe I exprimés à la surface des hépatocytes infectés [55-57]. Il a été démontré que les cellules T $CD4^+$ de type Th1 spécifiques d'épitopes de la CSP sont capables de conférer la protection contre *P. yeolii* chez la souris [58]. Les lymphocytes T $CD4^+$ peuvent par le biais des cytokines activer les cellules T cytotoxiques contre les hépatocytes infectés. Ils sont essentiels à la protection contre les formes asexuées sanguines du *Plasmodium* aussi bien chez l'homme que chez la souris. Les souris immunisées présentaient des infiltrats inflammatoires après leur infection par des sporozoïtes de *P. berghei*. Ces infiltrats étaient dépendants des cellules T $CD8^+$ spécifiques des antigènes de ce *Plasmodium* [56]. Chez la souris, les érythrocytes infectés induisent une réponse cellulaire T $CD4^+$ et $CD8^+$ spécifiques de *P. berghei*. En outre, ce parasite exprime des antigènes présentés par les cellules dendritiques lesquelles induisent des cellules T cytotoxiques spécifiques [59, 60].

Les études de vaccination avec les sporozoïtes atténués ont démontré que les cellules T cytotoxiques infiltraient le foie et pouvaient intervenir dans la destruction des hépatocytes infectés par le *Plasmodium* [61]. Les études de vaccination chez l'homme ont démontré qu'AMA-1 induit le développement d'une réponse cellulaire mémoire aussi bien chez les personnes naïves que chez celles vivant en zone d'endémie palustre [59, 62].

3.4.2. Vaccins antipalustres

Un vaccin est une préparation à caractère antigénique issu d'un agent pathogène (parasites, bactéries, virus, etc.) qui lorsqu'on l'administre à un individu réceptif à la maladie ne contracte pas la maladie ; mais dont l'organisme est capable de le reconnaître et de monter une réponse immunitaire protectrice (humorale et/ou cellulaire) et garde en mémoire la structure de l'antigène et s'opposera à toute infection ultérieure même si cet organisme n'avait pas auparavant rencontré l'agent pathogène en question[63].

3.4.2.1. Antigènes candidats vaccins de *P. falciparum*

Les candidats vaccins antipaludiques sont constitués d'antigènes qui servent de cible pour le système immunitaire. Ces antigènes peuvent être des protéines entières exprimées par le parasite, des sous-unités de ces protéines antigéniques qui stimulent mieux le système immunitaire, des toxines parasitaires ou des gènes qui codent pour ces protéines. Tous les stades du cycle de vie du parasite chez l'hôte sont étudiés sur le plan immunologique afin de connaître les antigènes susceptibles d'être utilisés comme un vaccin [64-67]. Nous nous intéresserons aux antigènes ci-dessous qui sont du stade érythrocytaire et sont tous impliques dans l'invasion de l'érythrocyte :

3.4.2.1.1. AMA1 (Apical Membran Protein)

AMA1 est une protéine membranaire de type 1 (aussi connu sous le nom de Pf83; RMA-1; RMA1) ; localisée dans le micronème (organelle présente dans la région apicale du mérozoïte). Elle contient des ligands pour des récepteurs des globules rouges [68]. La protéine comporte une région ectoplasmique de 546 acides aminés, un segment transmembranaire de 21 acides aminés et un domaine cytoplasmique de 55 acides aminés [69]. Lors de l'invasion de l'érythrocyte par le parasite, AMA1 se repartit sur toute la surface externe de l'organisme et subit une série de coupure protéolytique. AMA1 est un polypeptide de 83 kDa qui est transformé par une dégradation protéolytique en une molécule de 66 kDa avant d'être exportée à la surface du mérozoïte lors de la rupture des schizontes [70, 71]. AMA1 a une structure tridimensionnelle.

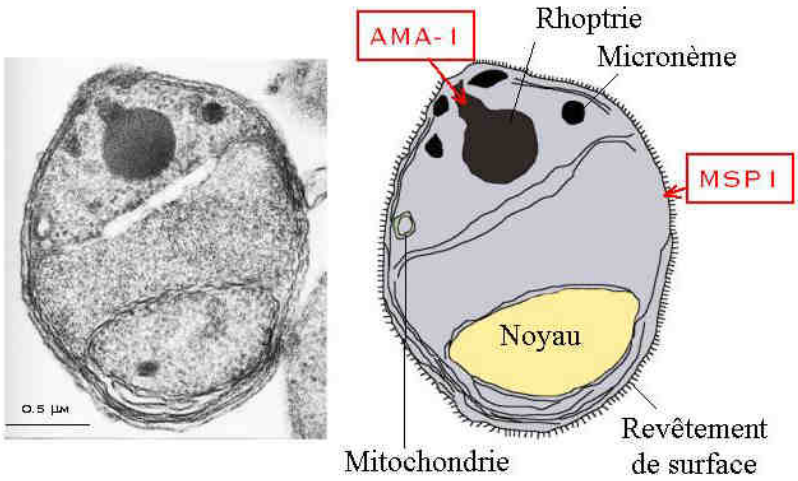


Figure 3: Localisation de AMA 1 (Antigènes de surface du *Plasmoduim* ;
Source : http//www.pasteur.fr/recherche/unités/ImmStr)

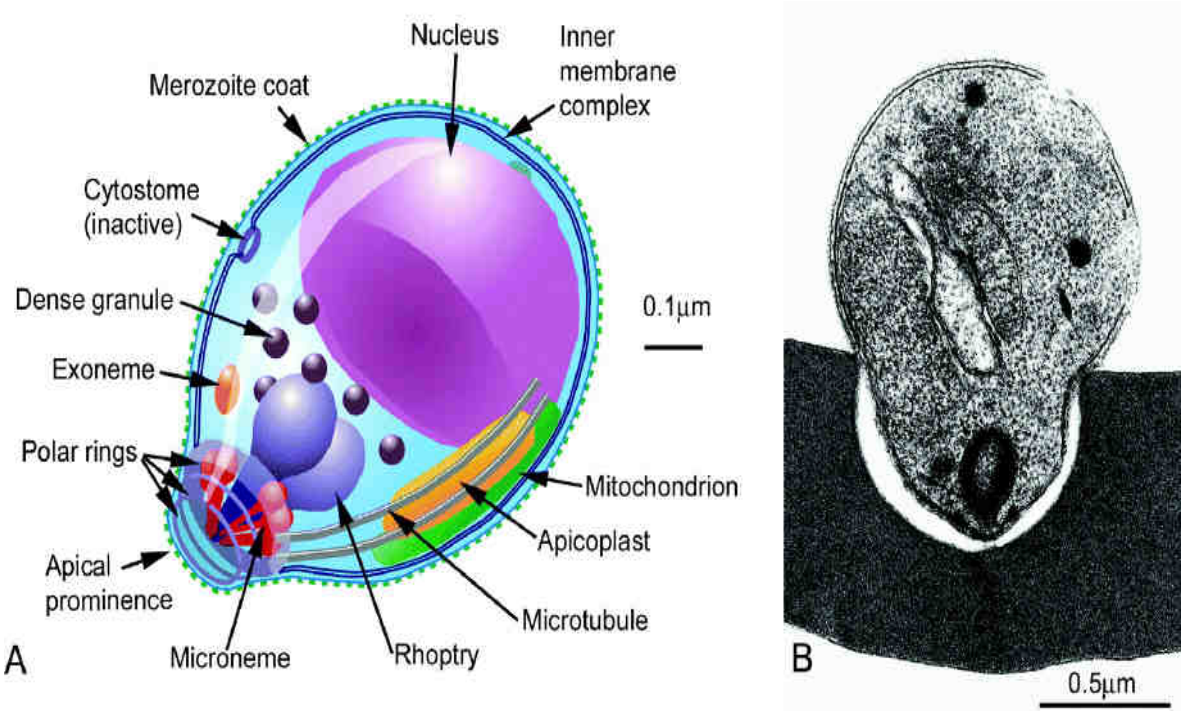


Figure 4: Résumé des points de vue actuels de l'organisation cellulaire d'un mérozoïte de *Plasmodium falciparum*, basés sur les données de recherche des 40 dernières années [72]

Bien que la fonction biologique d'AMA1 ne soit pas encore bien caractérisée au niveau moléculaire, un rôle important dans l'invasion érythrocytaire est fortement indiqué par l'observation que la présence d'anticorps anti-AMA1 peut inhiber ce processus. Le gène

codant pour AMA1 est relativement conservé [73]. L'antigène AMA1 est un candidat potentiel pour la vaccination contre les stades érythrocytaire de *P. falciparum* [68].

AMA1 est exprimée essentiellement pendant la phase asexuée ou sanguine de *P. falciparum* et l'examen des séquences d'AMA1 dans les infections naturelles à *P. falciparum* a montré l'extrême diversité de ce gène. Il ya jusqu'à 62 sites polymorphes d'acides aminés dans AMA1, représentant plus de 15% des sites acides aminés répartis sur trois domaines de la protéine [74, 75]. Le plus grand polymorphisme est observé dans le domaine I, en particulier dans un cluster d'acides aminés à proximité d'une poche hydrophobe [76] qui semble jouer un rôle dans l'invasion érythrocytaire, la boucle du cluster 1 du domaine I (c1L), qui comprend les résidus d'acides aminés 196, 197, 199, 200, 201, 204, 206 et 207 [9]. Sur la base de la modélisation d'échappement antigénique, sur les essais de croissance et d'inhibition de l'invasion [77] ainsi que les études d'épidémiologie moléculaire sur l'impact du polymorphisme d'AMA1 sur le risque de paludisme clinique [78, 79], le c1L a été identifié comme une cible clé a la fois des anticorps spécifiques de souche et d'allèle acquis naturellement lors des réponses immunitaires protectrices.

Plusieurs raisons amènent l'antigène AMA1 à la tête des candidats vaccins :
Les anticorps naturels anti-AMA1 existent chez une grande proportion de personnes (>90%) à Donéguébougou selon une étude préliminaire[38]. Dans une étude transversale portant sur 200 personnes âgés de 6 mois à 45 ans, conduite entre 2002 et 2003, les médianes des titres des anticorps anti-AMA1 ont atteint approximativement 1000 unités pendant le pic de la saison de transmission palustre, bien qu'une variation significative ait été observée entre les groupes d'âge [38]. L'immunisation active de la souris et du singe par l'AMA1 confère une protection contre le paludisme de la souris et du singe [80, 81].
L'antigène AMA-1 est également ciblé par les vaccins antipaludiques contre le stade sanguin du parasite. Cette protéine de 83 kDa contient trois grands domaines stabilisés par huit ponts disulfures [82] et est synthétisée au cours de la phase tardive intra-érythrocytaire. La protéine est d'abord présente dans le complexe apical du mérozoïte [83], puis transformée en une forme de 66kDa qui se déplace à la surface quand le mérozoïte est libéré de l'érythrocyte infecté [84]. L'antigène AMA-1 semble jouer un rôle dans l'invasion érythrocytaire, soit par la réorientation du mérozoïte après le contact initial avec le globule rouge ou par la mise en contact de jonction entre le mérozoïte et la cellule hôte [85]. Des études protéomiques ont démontré que l'AMA-1 est également exprimée dans le stade sporozoïte [86], suggérant qu'il peut jouer un rôle similaire dans l'invasion des hépatocytes [87].

Toute la diversité des séquences dans le gène codant pour l'AMA-1 est sous la forme de SNP (*Single Nucleotide Polymorphism* ou mutation ponctuelle), il n'y a pas de régions

répétées comme il ya dans d'autres antigènes candidats vaccins (par exemple, MSP-1 et la protéine circumsporozoïte (CSP). La plupart de ces SNPs sont situés dans le domaine I. Une analyse récente de 355 séquences AMA-1 dans la base de données GenBank a montré 32 positions d'acides aminés polymorphiques dans le domaine I, 11 dans le domaine II et 9 dans le domaine III, à l'exclusion des polymorphismes observés dans une seule séquence [88]. Ces polymorphismes sont situées principalement sur une face de la molécule d'AMA-1, avec la plupart des résidus polymorphes situés à proximité d'un creux hydrophobe qui est supposé être un site de liaison au récepteur entre l'AMA-1 et les protéines associées qui forment le mécanisme de l'invasion érythrocytaire [76, 89]. Dans les travaux en cours, plus de 200 haplotypes uniques d'AMA-1 ont été identifiés parmi au moins 500 échantillons prélevés dans la seule ville de Bandiagara au Mali [90]. Aucun haplotype unique ne prédomine, avec tous les haplotypes ayant une fréquence inférieure à 4%, et environ 3% des haplotypes ayant un acide aminé correspondant exactement à celui de la souche 3D7 de *P. falciparum*. À ce jour, il n'existe pas d'haplotypes d'AMA-1 dont la séquence d'acides aminés correspond exactement à celui de la souche FVO.
Les personnes vivant dans les zones d'endémie palustre produisent des anticorps contre l'AMA-1 [91, 92]. Ces anticorps sont capables d'inhiber l'invasion érythrocytaire *in-vitro* [93] et sont associés à la protection lors des études de terrain [92]. Plusieurs études dans les modèles animaux ont démontré une claire spécificité d'allèle de l'activité inhibitrice des anticorps anti-AMA-1 [6, 94], et ces résultats ont été corroborés par des expériences ultérieures d'échange allélique [77, 95]. La spécificité d'un anticorps monoclonal inhibiteur a été démontrée comme dépendante de l'acide aminé présent en position 197, le site le plus polymorphe de la molécule, avec six acides aminés possibles. Chez les personnes exposées au paludisme en Papouasie-Nouvelle-Guinée, les anticorps contre les régions conservées de l'AMA-1 ont été prédominants chez la plupart des personnes, mais la plupart avait aussi une petite fraction d'anticorps spécifiques d'allèle [88, 91].

3.4.2.1.2. MSP1 (Merozoite Surface Protein 1, protéine 1 de surface du mérozoïte)

La protéine 1 de surface du mérozoïte (MSP-1) de *P. falciparum* est une protéine de surface importante avec une taille moléculaire d'environ 190 kDa, qui joue un rôle important dans l'invasion érythrocytaire par le mérozoïte [96]. La protéine est la principale cible des réponses immunitaires humaines [97-99] et est un candidat prometteur pour un vaccin sous-unité de sang stade [100, 101]. Le gène du MSP-1 a 7 blocs variables qui sont séparées par des régions conservées ou semi-conservées. Le Bloc 2, une région proche de la région N-terminale du gène de la MSP-1, est la partie la plus polymorphe de l'antigène et semble être sous la plus forte diversification de sélection au sein des populations naturelles[100]. Jusqu'à présent, quatre types d'allèles différents du bloc 2 ont été identifiés: MAD20, K1, RO33, et MR [102-105].

La MSP1 est synthétisée au cours de la schizogonie érythrocytaire à partir d'une seule copie du gène de 5,1kb situé sur le chromosome 9. Cette protéine polymorphe subit une maturation en deux étapes. La première étape conduit aux fragments 33, 42 et 83 kDa. La deuxième étape a lieu au moment de l'invasion des érythrocytes, entraînant le clivage de la partie C- terminale du fragment 42 kDa pour donner les fragments 33kDa (MSP-1_{33}) et 19kDa (MSP-1_{19}) [106]. La MSP-1_{19} reste ancré à la surface du mérozoïte par une liaison de type glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) au cours de l'invasion [107]. Ce processus est essentiel à l'invasion de l'érythrocyte par le mérozoïte. La MSP1-19 contient deux domaines du facteur de croissance épidermique (EGF)-semblable, dont on pense qu'ils ont un rôle important dans l'invasion érythrocytaire [108]. Les anticorps naturellement acquis contre MSP1-19 peuvent inhiber l'invasion érythrocytaire en empêchant la transformation secondaire qui libère ce fragment du reste du complexe MSP1 [107, 109, 110], et sont associés à la protection contre le paludisme clinique dans les études de terrain [111-113].

Les anticorps dirigés contre la portion C-terminale de la MSP1 induisent une immunité protective contre une forte parasitémie, l'anémie palustre et l'accès palustre clinique [111]. Ces anticorps entraînent *in vitro* une inhibition du développement des parasites [114] et préviennent l'invasion des érythrocytes [115]. Cette inhibition de l'invasion serait due à un clivage protéolytique de la MSP1 en fragments plus petits [101].

Une étude d'immunisation chez le singe *Aotus nancynaï* avec un vaccin à base de MSP1 menée par Kumar et coll. en 2000 a démontré que ce vaccin induit une protection efficace contre une infection létale [116]. L'étude de phase 1 menée en 1999 par Keitel et coll. à Washington DC avec une protéine recombinante de la partie C-terminale de la MSP1 fusionnée à des épitopes des cellules T helper de la toxine tétanique a entraîné une séroconversion qui a protégé 9 sur 16 volontaires en 3 immunisations à forte dose [117].

3.4.2.1.3. EBA175 (Erythrocyte Binding Antigen 175)

L'antigène érythrocytaire de liaison 175 de *Plasmodium falciparum* (EBA-175) est un ligand pour l'invasion des mérozoïtes dans les érythrocytes humains qui se lie à la glycophorine A d'une manière dépendante de l'acide sialique [118]. EBA175 est une protéine de *P. falciparum* de 175 kDa, située dans le micronème à l'extrémité apicale des mérozoïtes, qui se lie aux résidus d'acide sialique sur la glycophorine A pour négocier l'entrée dans l'érythrocyte [119]. Le domaine de liaison aux récepteurs de l'EBA175 a été localisé à l'extrémité N-terminale, un domaine riche en cystéine, la région RII [120]. La région RII est hautement conservée parmi plus de 30 isolats de laboratoire et de terrain [121] et a été établie comme un candidat vaccin [122, 123]**.** Elle se compose de deux régions : F1 et F2, elles sont riches en cystéine. F1 et F2 sont homologues à la protéine de liaison Duffy de *P. vivax* et sont donc appelés les domaines *Duffy binding-*

like (DBL) [124]. Les domaines DBL (F1 et F2) sont propres aux *Plasmodium* et constituent donc une bonne cible thérapeutique [125]**.** La région F2 est plus particulièrement concernée par la liaison aux récepteurs. Il a été démontré que les anticorps dirigés contre F2 bloquent l'invasion des globules rouges par *P. falciparum in-vitro* en inhibant sa liaison à l'acide sialique sur le domaine de mucine de la glycophorine A [120]. La présence d'un ou deux domaines DBL dans la région C-terminale riche en cystéine (région VI) et un domaine transmembranaire-like de type I définissent EBA-175 en tant que membre de la superfamille EBL (erythrocyte binding-like) [124].

Des niveaux élevés d'IgG à chacun des EBA étaient fortement associés à la protection contre le paludisme symptomatique et la parasitémie élevée, mais pas avec le risque de réinfection en soi [126]. Les sous-classes IgG prédominants étaient soit IgG1 ou IgG3, en fonction de l'antigène. La prédominance des IgG1 contre IgG3 reflète les caractéristiques structurelles des régions spécifiques des protéines. IgG3 a été le plus fortement associés à la protection, même pour les antigènes qui ont eu une réponse IgG1 prédominante. L'EBA semblent être des cibles importantes de l'immunité protectrice acquise. Ces résultats appuient leur développement en tant que candidats vaccins.

3.4.2.1.4. MSP 2 (Merozoite Surface Protein 2, protéine 2 de surface du mérozoïte)

La MSP2 est une glycoprotéine exprimée à la surface du mérozoïte avec un poids moléculaire de 45 à 50 kDa. La MSP2 dispose d'une région de répétition centrale qui a une variation significative entre les isolats tandis que les régions N et C-terminales sont bien conservées [96, 127]. La protéine 2 de surface du mérozoïte de *Plasmodium falciparum* (MSP) -2, est une protéine polymorphe dont les régions variables définissent deux familles alléliques, les familles 3D7/IC-1 et FC27/D10. Le gène codant pour MSP-2 est localisé sur le chromosome 2 immédiatement en région-3' du gène codant pour la protéine de surface du mérozoïte-5 (MSP-5) avec une région intergénique de 1096 pb qui contient le promoteur de la MSP-2 [128]. La MSP-2 *de P. falciparum* est un autre antigène principal candidat vaccin sous-unité contre le paludisme [129]. Les allèles de la MSP-2 se répartissent généralement en deux types alléliques, FC27 et 3D7, qui diffèrent considérablement de la structure dimorphe de la région variable centrale, le bloc 3.

La réponse d'anticorps est presque entièrement dirigée vers les régions variantes de MSP-2. MSP-2 est un candidat prometteur pour un vaccin antipaludique. Les études *in-vitro* et *in-vivo* ont démontré la capacité de MSP2 à induire une réponse immunitaires pouvant inhiber la multiplication du parasite [130]. Mais un grand polymorphisme génétique avec divers types a été identifié dans le domaine de MSP-1 et de MSP-2 de *P. falciparum* chez des isolats du Myanmar [128].En raison de leurs caractéristiques polymorphes, les gènes MSP-1 et MSP-2 ont été utilisés comme marqueurs polymorphes dans les études de la dynamique de transmission du paludisme dans des isolats naturels de *P. falciparum*.

3.4.2.2. Candidats vaccins actuels antipalustres

Il existe au moins 94 candidats vaccins antipaludiques actuellement en étude. Ils sont dérivés d'une vingtaine d'antigènes [131]. Les candidats vaccins se distinguent d'abord par les stades parasitaires auxquels les antigènes sont exprimés. De ces stades, dépendent l'effet attendu du vaccin et le type de réponse immune susceptible d'être protectrice. Il y a des candidats vaccins contre le parasite au stade pré érythrocytaire, des candidats vaccins contre le parasite au stade érythrocytaire et des candidats vaccins contre le parasite au stade sexué.

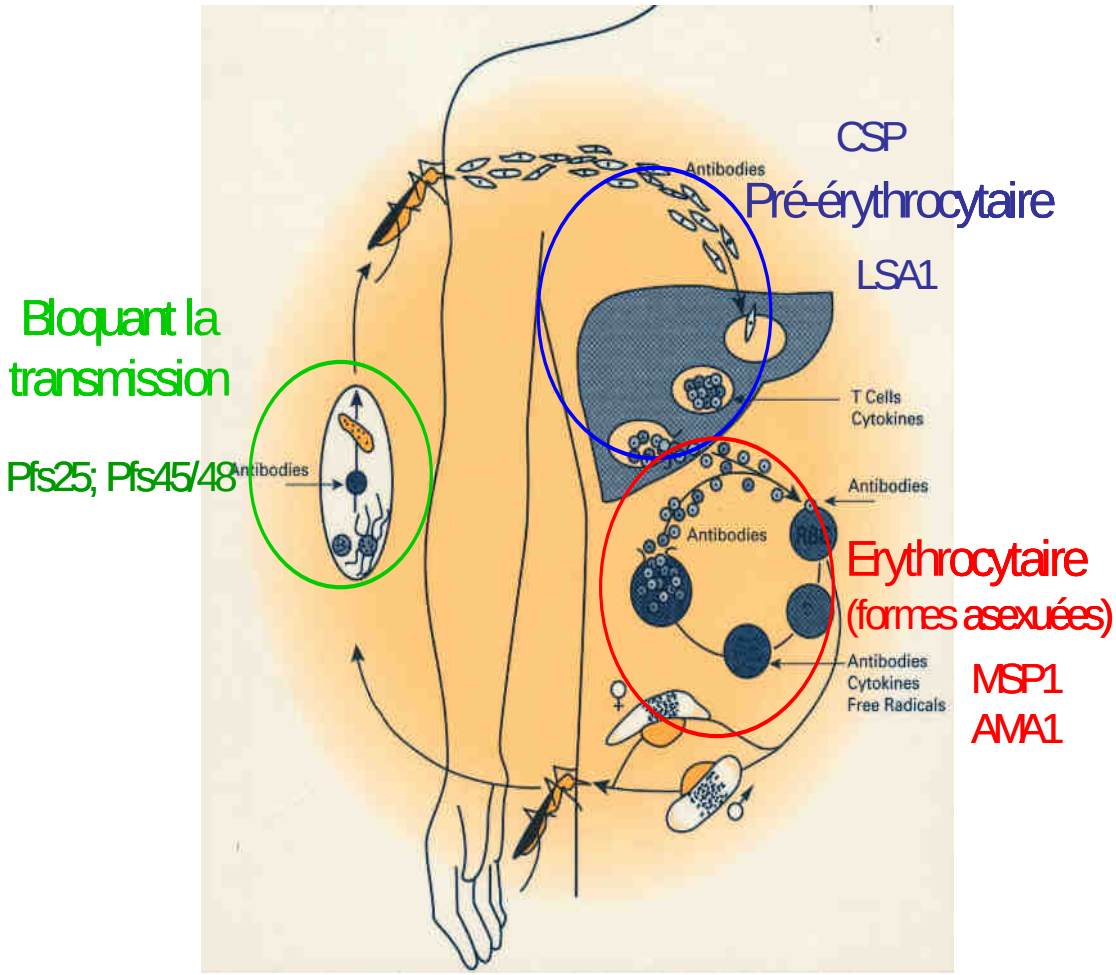


Figure 5: Différents types de vaccins antipaludiques et leurs cibles.
Source: DANIEL J. Carucci & STEPHEN L. Hoffman, Nat. Med. Web Reprint. Special Malaria focus – 2000 page 6

- Les vaccins contre les stades pré-érythrocytaires

Les vaccins pré-érythrocytaires préviendraient l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes ou entraîneraient la destruction des parasites dans les hépatocytes infectés. Le

mécanisme de cette immunité protectrice est mal élucidé mais le rôle des lymphocytes T est évident dans la lyse des hépatocytes infectés [56]. Les anticorps dirigés contre les antigènes du parasite du stade hépatique préviendraient l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes. La protéine la mieux caractérisée est la CSP (*Circum Sporozoïte Protein*) qui est exprimée avant et pendant l'infection des hépatocytes [132]. Beaucoup d'efforts ont été focalisés sur l'épitope immunodominant composé par un tétrapeptide répétitif NANP (Asn-Ala-Asn-Pro) de cette protéine.

Le candidat vaccin le plus avancé dans ce groupe est le RTS, S/AS02A qui est le résultat de l'assemblage de trois composants: le CSP de *P. falciparum,* un antigène de surface du virus de l'hépatite B et un adjuvant AS02 de GlaxoSmithKline [133-135]. Le RTS, S/AS02A a été un bon inducteur de la réponse cellulaire de type Th1 et a entraîné une forte réponse humorale avec production d'une forte concentration d'IgG dirigée contre la région répétitive du CSP [80]**.**

Nous pouvons aussi citer d'autres candidats vaccins du même stade: *Liver Stage Antigen 3* (LSA-3) [66] et une protéine adhésive relative de thrombospondin (DNA/MVA-ME-TRAP) [136, 137].

- Les vaccins contre les stades érythrocytaires

A ces stades, les parasites ne peuvent être atteints que par des anticorps, par des réponses à médiation cellulaire dépendantes des anticorps (ADCC) ou par la lyse cellulaire dépendant du complément. Ces vaccins pourraient interrompre le cycle érythrocytaire et par conséquent, éviter les manifestations cliniques provoquées par la schizogonie érythrocytaire. Un vaccin dirigé contre ce stade pourrait donc réduire la pathogénicité, la morbidité et la mortalité du paludisme et à la longue, éviter les complications telles que le paludisme cérébral, l'anémie palustre, la défaillance rénale et d'autres formes graves du paludisme chez la femme enceinte en bloquant l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes. Parmi les vaccins de cette catégorie, la protéine de surface du mérozoïte 1 (MSP1) [116, 117] et l'AMA1 [84, 138] sont les plus avancés en développement clinique. AMA1 induit la production des anticorps qui sont présumés être des composants importants des réactions immunitaires acquises, pour la protection contre le *P. falciparum* [139]**.**

En plus de ces deux candidats vaccins, il existe d'autres antigènes du même stade comme: La MSP-3 (protéine 3de surface du mérozoïte) qui est un long peptide ; la GLURP (protéine riche en glutamate) également un long peptide ; l'EBA-175 (*Erythrocyte Binding Protein*) et la MSP2 (protéine 2 de surface du mérozoïte) [131].

- Les Vaccins contre les stades sexués

Les anticorps peuvent bloquer le stade sexué du parasite dans l'estomac des anophèles avant que la fécondation ne puisse initier son développement dans le vecteur. Un vaccin dirigé contre le stade sexué des parasites pourrait réduire ou interrompre la transmission du parasite. Ce type de vaccin ne viserait pas à protéger l'individu vacciné mais à limiter la transmission des parasites de l'homme au vecteur et secondairement du vecteur à l'homme.

Les candidats vaccins de cette catégorie les plus étudiés sont les antigènes des gamétocytes de *P. falciparum* notamment le Pfs28 et le Pfs25. Les anticorps dirigés contre le Pfs28 entraînent un blocage de la transmission de *P. falciparum* et présentent une action synergique lorsqu'ils sont combinés aux anticorps dirigés contre le Pfs25. Ces deux antigènes sont très immunogènes et ont une diversité antigénique limitée [140].

4. Matériel et Méthodes

4.1. Cadre d'étude

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche sur la résistance innée et acquise du paludisme à *P. falciparum* au Mali. Le projet rentre dans le cadre d'une collaboration entre le Centre de Recherche et de Formation sur le Paludisme (sigle anglais : MRTC) de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie (FMPOS) et le laboratoire de recherche sur le paludisme et les vecteurs de l'Institut National d'Allergie et de Maladies Infectieuses des Instituts Nationaux de la santé des Etats-Unis d'Amérique (LMVR/NIAID/NIH). Cette étude a été menée dans les villages de Kéniéroba, Bozokin et Fourda dans la commune rurale de Bancoumana (figure 7). En outre, le prélèvement des Dogon et des Peulh a été effectué dans la zone périurbaine de Mopti.

- Village de Kéniéroba

Ancien village de bataille situé à 74 Km au sud-ouest de Bamako sur la route de Kangaba. Refondé il y a plus de cent ans après son premier déclin par Maré Famissa KEITA, qui fit réunir ses frères dispersés à Kéniéroba (la terre de leur ancêtre). Il compte environ 2079 habitants (recensement MRTC/FMPOS, 2008) composé essentiellement de malinké, de peulh et de bambara.

- Village de Fourda

C'est un hameau de pêche situé le long du fleuve Niger à 3Km au sud-est de Kéniéroba. Il fut fondé par les frères SOGORE dans le but de faire la pêche. Il s'agit de Kalifa ; de Sinimba, de Fodé, de Mamady et de Drissa. Fourda compte environ 269 habitants (recensement MRTC/FMPOS, 2008) dont la majorité est Somono (malinké) en plus de quelque Bambara et peulh.

Kéniéroba et Fourda partagent une même école fondamentale, une même medersa et un centre de santé ou est base notre équipe de recherche.

- Village de Bozokin

C'est un hameau de pêche du village de Bancoumana situé à 7 Km au sud-est. Il a été fondé par Soungalo TRAORE il y a plus de 100 ans. Il est essentiellement habité par les Bozo (Konta) convertis en Konaté par le langage mandingue. Il compte environ 247 habitants (recensement MRTC/FMPOS, 2008). Les Malinké constituent le groupe ethnique majoritaire, suivi par les Peulh et les Dogon. Le village utilise le centre de santé communautaire et l'école fondamentale de Bancoumana.

Ces trois villages se situent dans une zone climatique soudano-guinéenne (figure 6 et figure 7). Deux grandes saisons se succèdent dans cette zone : la saison des pluies de juin à octobre et la saison sèche de novembre à mai avec une courte saison de transition que les communautés rurales désignent sous l'appellation vernaculaire de *fôbònda*. Elle est représentée par un adoucissement voire un rafraîchissement des températures par l'arrivée des côtes atlantiques de l'harmattan. Elle s'étale de novembre à janvier.

-Zone périurbaine de Mopti

La ville de Mopti, capitale de la cinquième région administrative du Mali, est située dans le delta intérieur du Niger et à 650 km de Bamako. Elle a été fondée vers la fin du XIXe siècle par les Bozos Naciré et Konta sous le nom de *Sangha* qui signifie lieu de rassemblement. Située au confluent du fleuve Niger et du fleuve Bani, d'où son surnom de «Venise malienne», Mopti avec une superficie de 79 017 Km^2 compte aujourd'hui environ 100 000 habitants composés de Peulh, de Dogon, de Bozo, de Bambara, de Songhaï et de Bobo. La région de Mopti est composée de 08 préfectures, de 55 sous-préfectures, 108 communes et 2020 villages.

Jadis, la localité était construite sur un seul îlot mais la ville s'est agrandie et a pris de l'importance sur le plan économique. En 1882 déjà, des hommes de tous les horizons s'y étaient installés. Troisième ville du Soudan, la ville ne possédait qu'une unique porte d'entrée et de sortie par voie terrestre jusqu'aux grands travaux d'aménagement des plaines rizicoles par l'opération riz (1978). Erigée en commune mixte en 1919, en commune de moyen exercice en 1952, la ville comprend, entre autres quartiers: Komoguel I, Komoguel II, Bougoufié, Gangal, Tougeul, Mossin-Goré.

Deux zones naturelles distinctes sont généralement reconnues pour symboliser la géographie de la Région de Mopti : la zone exondée et de la zone inondée. La première couvre les Cercles de Koro, Bankass, Bandiagara et Douentza, tandis que le second synonyme d'enclavement désigne les Cercles de Mopti, Djenné, Ténenkou et Youwarou. Le delta est caractérisé par les inondations saisonnières (septembre à janvier) qui favorisent la prolifération des habitats d'eau, idéal pour la reproduction des moustiques. La région a un climat typiquement sahélien avec une pluviométrie annuelle moyenne entre 200 et 500 mm, concentrées en une seule saison des pluies de juin à septembre et suivie par une longue saison sèche de 8-9 mois.

Les établissements socio sanitaires sont l'hôpital régional, le centre ophtalmologique, l'atelier de lunetterie et les cliniques privées. Il existe 4 centres de santé communautaire (CSCOM) à Mopti et trois à Sévaré. Cinq de ces 7 CSCOM ont été déjà mis en place en 1998, tandis que deux, Sévaré III et Toguel, ont été ouverts en 2004 en réponse à la

demande accrue de services de santé due à une urbanisation rapide. Avec sept CSCOM, les populations de Mopti et Sévaré ont un accès élevé aux soins de santé primaires par rapport aux autres zones urbaines du Mali.

Mopti est une zone de transmission saisonnière et intense du paludisme pendant la saison des pluies de juillet à novembre. Le taux de prévalence de *P. falciparum* varie entre 40 et 80% et le paludisme représente 30% des causes de la mortalité globale des enfants dans la région [141]. Le principal vecteur du paludisme est *Anopheles gambiae sl* et *P. falciparum* est l'espèce prédominante avec plus de 95% de la formule parasitaire. Aux heures de pointe, le taux d'inoculation entomologique (TIE) peut atteindre 22 piqûres infectantes par personne et par nuit [141]. La région est considérée comme endémique pour le paludisme, marquée par la transmission stable et faible avec des pics pendant la saison des pluies. Environ un tiers des enfants de moins de cinq ans vus dans un établissement de santé à Mopti entre 1998 et 2006 ont été diagnostiqués comme des cas présomptifs de paludisme. Les résultats des études sur le paludisme à Mopti corroborent avec les résultats précédents qui suggèrent que l'origine ethnique Peulh est protecteur contre le paludisme [141, 142].

Les activités économiques sont l'agriculture, l'élevage, la pêche et l'artisanat. L'agriculture de la région est largement tributaire des aléas climatiques et du niveau de crue des fleuves parce qu'elle est essentiellement basée sur les cultures exondées (mil, sorgho, fonio), les cultures maraîchères et la riziculture en zone inondée.

L'élevage dans la région est de type extensif et revêt un caractère fortement culturel qui fait du bétail un potentiel économique mal exploité. La réorganisation des éleveurs et leur orientation vers des perspectives mieux adaptées s'imposent dans cette zone encore considérée comme l'une des plus importantes en production de cheptel.

La pêche la région de Mopti étant à moitié située au cœur du delta central, elle consacre une zone piscicole par excellence. La production halieutique est commercialisée sous forme de poisson séché, fumé et frais alimentant outre l'autoconsommation des producteurs et les commerces intérieurs un fort courant d'exploitation à destination de la Côte d'Ivoire et du Burkina-Faso. La ville de Mopti au centre du delta abrite à cet effet le plus grand port de pêche artisanal de l'Afrique de l'Ouest.

L'artisanat connaît un essor certain grâce à son organisation au sein des structures de la fédération nation des artisans et la chambre des métiers. Une direction régionale de la promotion de l'artisanat a été créée en 2004 pour soutenir et consolider les acquis encore fragiles dans ce domaine. Les localités se sont spécialisées dans la production de certains

articles : laiterie à Ténenkou et à Youwarou ; masques de statuettes et paniers carrés à Bandiagara ; sandales en cuir à Douentza et poteries à Mopti.

Le commerce concerne surtout les produits de l'agriculture, de l'élevage, de la pêche et de l'artisanat. Les partenaires commerciaux sont le Burkina, la côte d'Ivoire et le Ghana.

Dans ces différents sites d'étude, l'habitat est de type traditionnel. Il est constitué de cases rondes et rectangulaires, en terre battue, aux toitures en chaumes coniques. Quelques maisons ont des toits en tôle. Ces différents types de maisons encourageant le repos des moustiques, favorisent une densité et une agressivité anophélienne élevées. L'environnement physique des villages est propice à la transmission du paludisme. Les villages sont situés dans une grande plaine qui s'étend jusqu'au fleuve Niger. La plaine présente de nombreuses retenues d'eau pendant la saison des pluies. C'est une plaine de riziculture. Les retenues d'eau avec des crevasses naturelles du sol peuvent constituer des gîtes larvaires potentiels. Pendant la saison des pluies, il existe des cultures intra domiciliaires et une prolifération d'herbes sauvages dans le village, contribuant ainsi à augmenter l'agressivité des moustiques.

La température la plus élevée se situe à ~40°C au mois de mai et la plus basse est voisine de 18°C au mois de décembre-janvier. La température moyenne annuelle est autour de 23°C. D'une manière générale, le climat y est assez agréable et la végétation est luxuriante.

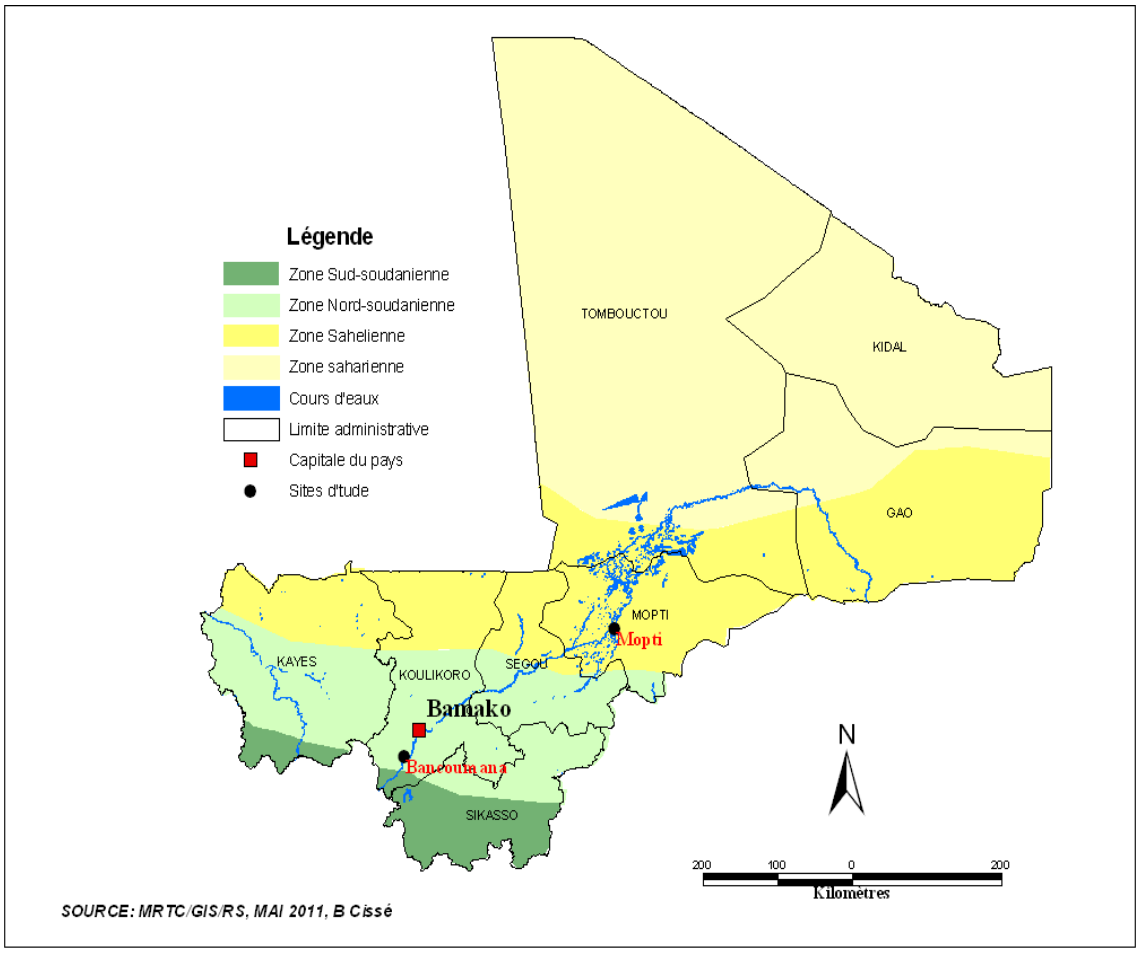


Figure 6: Sites d'étude

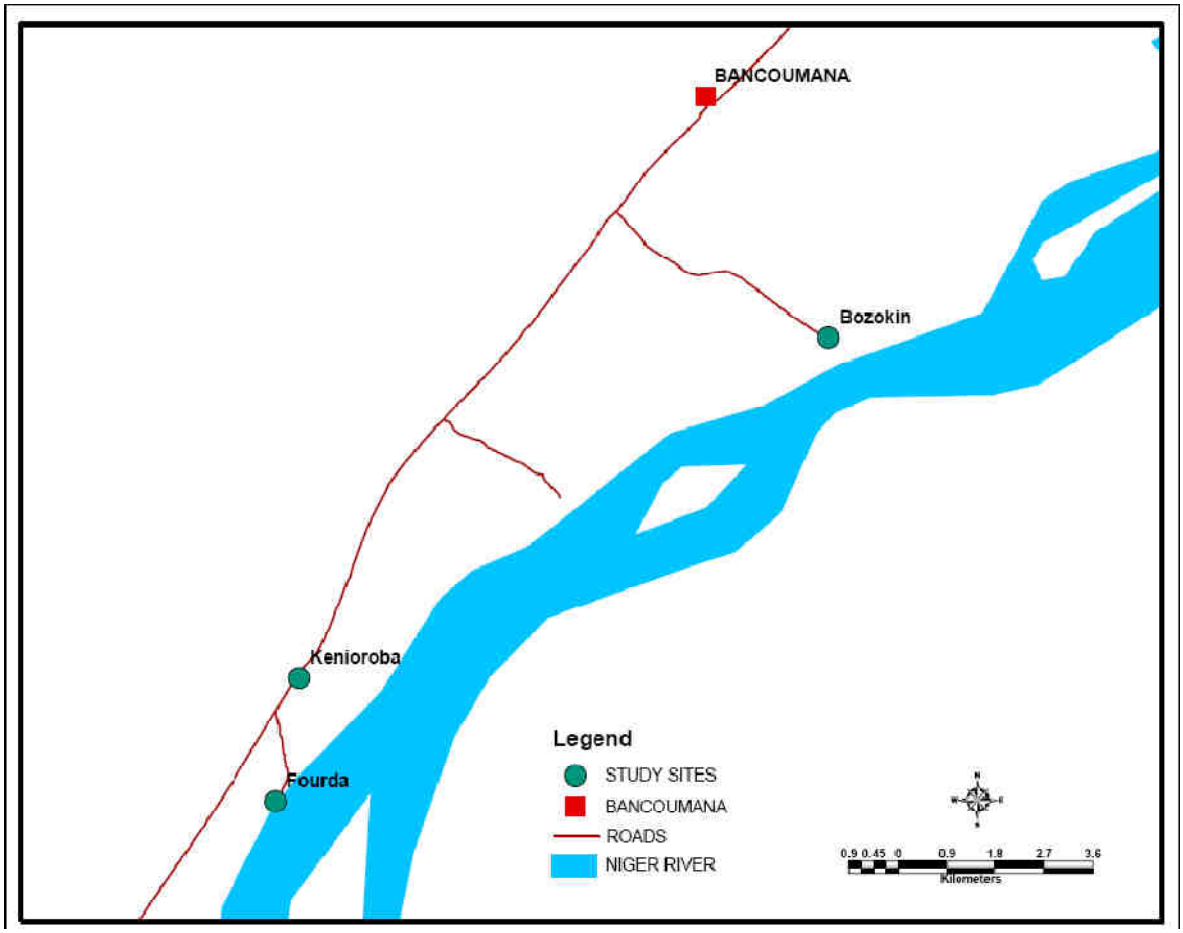


Figure 7: Plan de masse des trois villages d'étude dans la commune rurale de Bancoumana

Source: Unité GIS MRTC/FMPOS

4.1.1. Situation géographique, climat et végétation de Bancoumana

Située a 60 Km de Bamako (la capitale Malienne) en zone soudano guinéenne, la commune rurale de Bancoumana est facilement accessible par la route nationale 15 (RN 15) Bamako –Kangaba. Elle est limitée au Nord par la commune rurale de Siby, a l'est par la commune rurale du Mandé, au Sud et au Sud-ouest par la commune rurale de Minindian, au Sud-est par les communes rurales de Niagadina et Kourouba (toutes situées sur la rive droite du fleuve Niger).

La principale formation végétale est une savane arborée (25% du terroir) avec quelques galeries forestières le long du fleuve Niger. On y distingue :

- (i) une strate arborée avec les espèces telles que *Bombax costatum* (kapokier), *Vitellaria paradoxa* C.F. Gaertn. (Karité), *Parkia biglobosa* Jacq. (Néré), *Tamarindus indica* L. (tamarinier), *Manguifera indica L.* (manguier);

- (ii) une strate arbustive composée de *Combretum micranthum* G. Don (*kinkéliba*); *Guiera senegalensis* JF.Gmel (*kundiè* en bambara), *Cassia sieberiana DC* (case de sieber, sindja (Pular));
- (iii) une strate herbacée ou savane de graminées dont *Cymbopogon giganteus* Chiov. (*Tièkala*), *Pennisetum pedicellatum* Trin *et Andropogon sp (Ouaga) ;* et
- (iv) une galerie forestière caractéristique de la savane guinéenne se forme le long du fleuve Niger.

Le réseau hydrographique est dominé par le fleuve Niger.

La couverture végétale originale rencontrée sous un climat soudano-guinéen marque la transition entre la savane arborée et la forêt claire guinéenne. Ce type de végétation existe encore à l'état délictuel au niveau des bois sacrés et le long du fleuve Niger. Les feux de brousse, l'exploitation du bois de chauffage, les défrichements nécessaires aux cultures ont profondément dégradé cette végétation, devenant propice à l'implantation des moustiques.

La faune entomologique est constituée d'invertébrés et d'arthropodes. *Anopheles gambiae* et *A. funestus* abondent dans les villages où ils assurent la transmission du paludisme et de la filariose de Bancroft surtout en saison des pluies. Les similies transmettent l'onchocercose durant l'hivernage tandis que les glossines (mouche tsé-tsé) transmettent la maladie du sommeil. *Anopheles gambiae* est le vecteur majeur du paludisme rencontré dans la zone d'étude[143].

4.1.2. Infrastructures socio-sanitaires de Bancoumana

La commune dispose :

- dans le domaine de l'éducation :

Dix (10) écoles publiques dont 4 seconds cycles
Trois (03) écoles communautaires
Sept (07) medersas communautaires
Dix Huit (18) centres d'alphabétisation.

- dans le domaine de la santé :

Quatre (04) dispensaires (Kéniéroba, Djiguidala, Ouoronina et Niamé)
Cinq (05) maternités
Huit (08) dépôts pharmaceutiques
Un CSCOM: celui de Bancoumana
Une pharmacie (officine privée)

4.1.3. Activités socio-économiques et culturelles de Bancoumana

Les activités socio-économiques dominantes dans la commune rurale de Bancoumana sont marquées par l'agriculture, l'élevage, la pêche, l'artisanat, le commerce et la cueillette.

L'agriculture constitue la principale activité économique des populations. La plaine de Bancoumana est propice aux cultures vivrières et industrielles. Aux abords du village, dans les retenues d'eau (deux digues), la culture du riz (*Oryza sativa L., O. glaberrima S.)* est très développée. Celle du sorgho (*Sorghum vulgare J.*), du mil (*Pennisetum typhoides Stapf. & Hubb)*, du maïs (*Zea mays L.*), du haricot (*Vigna unguiculata L.*), du papayer (*Carica papaya L.*), de l'orange (*Citrus sinensis L.*) et du citron (*Citrus limonum* RISSO.) a lieu surtout dans les enlatours des concessions ou dans des jardins.

La culture du dah (*Hibiscus sabdariffa L.*), du coton (*Gossypium barbadense L.*), de l'arachide (*Arachis hypogae L.*), de la courge (*Cucurbita pepo L.*), du melon (*Cucurmis melo L.*), de concombre (*Cucumis sativus L.*) de l'oignon (*Allium cepa L*), de la patate douce (*Ipomoea batatas L.*), de la pomme de terre (*Solanum tuberosum L.*), du piment (*Pimenta officinalis* Lindl.), de la poivre de guinée (*Capsicum annum L.*), du tabac (*Nicotiana tabaccum L.*), du cotonnier (*Gossypium herbaceum L.*), du sésame (*Sesamum indicum L.*), de la tomate (*Solanum lycopersicum L.*), de la banane (*Musa paradisiaca L.*) ainsi que d'autres produits maraîchers constituent d'importantes ressources de revenu pour la population. La taille des exploitations est très variable et dépend de la capacité du travail potentiel de la famille ainsi que du patrimoine foncier.

L'élevage des ovins, des caprins et des bovins y est pratiqué comme une activité économique secondaire. On y retrouve aussi quelques équidés (ânes et chevaux) utilisés comme animaux de trait. La plupart des villageois thésaurisent leurs revenus dans l'élevage et dans les cultures industrielles. La pêche est également pratiquée par les ethnies Bozo et Somono principalement dans les villages de Fourda et de Bozokin. L'artisanat local est peu développé (cordonnerie, forgerie, maçonnerie, poterie). En dehors de la commercialisation des produits agricoles ; le commerce des produits de consommation courante y est pratiqué. Une foire hebdomadaire a lieu à Kéniéroba chaque jeudi favorisant ainsi le phénomène d'automédication par la circulation facile des médicaments.

L'islam représente la religion la plus dominante avec 95% de sujets qui s'en déclarent. Cependant, les religions traditionnelles sont assez présentes dans certaines grandes familles et sont visibles dans les pratiques quotidiennes de la vie socio- culturelle.

4.2. Type et Période d'étude

Nous avons mené une étude transversale en Décembre 2009.

4.3. Critères d'inclusion et de non-inclusion

4.3.1. Critères d'inclusion

Nous avons inclus dans cette étude tous les adultes répondant aux critères suivants :

- résider dans les villages de Kéniéroba, Fourda, Bozokin ou Mopti,
- accepter volontairement de participer à l'étude comme attestée par le consentement libre et éclairé,
- être âgé de 18 à 60 ans, et
- avoir un taux d'hémoglobine $\geq$ 10 g/dl

4.3.2. Critères de non inclusion

Nous n'avons pas inclus dans notre étude les adultes qui sont dans l'une des deux situations ci-dessous.

Toute condition rendant l'adulte incapable de suivre le protocole (par exemple : maladie psychiatrique, hémophilie).

Toute condition pouvant être un facteur de risque d'exposition inutile du personnel (par exemple : sujets affectés ou infectés par le VIH/SIDA).

4.4. Population d'étude et Echantillonnage

La population d'étude était constituée par un sous-échantillon des adultes de 18 à 60 ans résidants dans les villages (Kéniéroba, Bozokin et Fourda) et dans la ville de Mopti. Nous avons inclus 93 dans cette étude à partir d'un échantillonnage exhaustif de l'ensemble des adultes qui ont répondus aux critères d'inclusion.

4.5. Collecte, gestion et analyse des données

Les données ont été enregistrées sur des fichiers standards de rapport de cas (*CRF*). Elles ont été saisies sur Microsoft Excel 2007 et analysées avec les logiciels STATA et le logiciel libre de Statistique R.

Le taux d'anticorps de chaque adulte a été converti en Unité ELISA. La moyenne géométrique des Unités ELISA de chaque groupe a été calculée. Le test de K-W (Kruskal-Wallis) a été utilisé pour comparer les différents groupes. Le seuil de

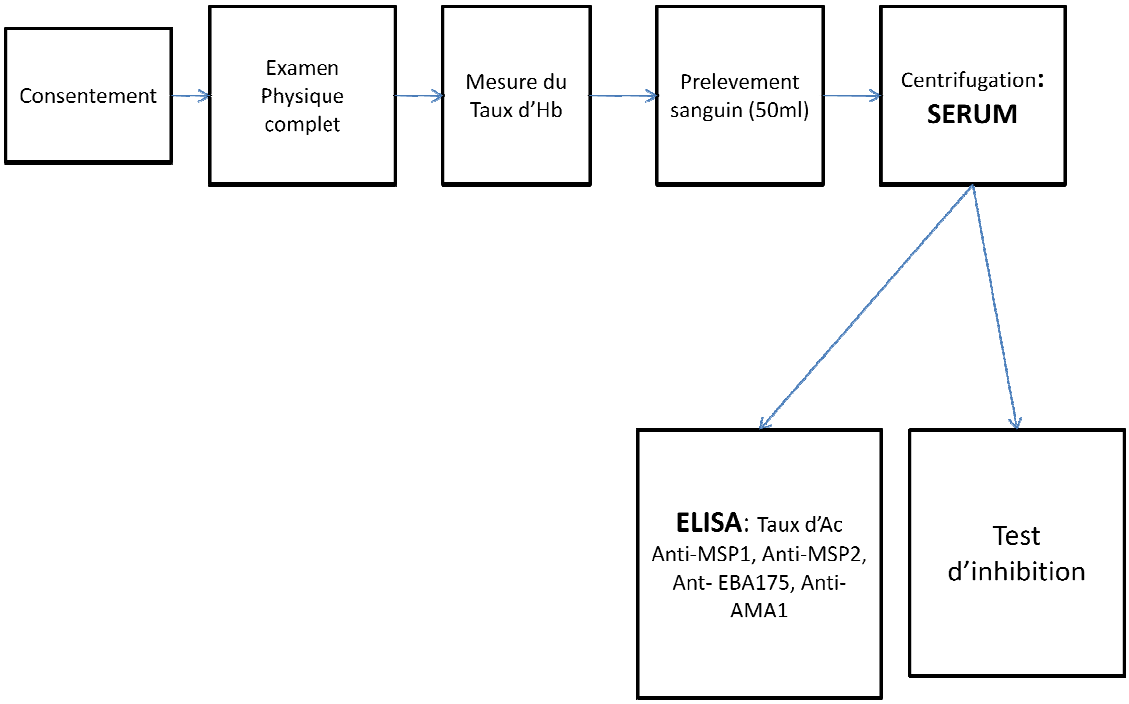
signifiance a été fixé pour une valeur du $p \leq 0,05$. Le test de Spearman a été utilisé pour calculer les coefficients de corrélation.

4.6. Variables mesurées

Les variables suivantes ont été mesurées :

- **variables sociodémographiques** : l'âge, le sexe et la résidence ;
- **variables biologiques :** le taux d'hémoglobine, et les taux d'anticorps anti-AMA1, anti-MSP1, anti-EBA175 et anti-MSP2.

4.7. Déroulement pratique de l'étude:



4.8. Examens de laboratoires utilisés

Chaque adulte inclus a fait l'objet d'un prélèvement veineux sanguin au niveau du pli du coude. Sur ce prélèvement, nous avons effectué les analyses suivantes (décrites en détails en annexe) portant sur :

- la détermination du taux d'hémoglobine en utilisant l'appareil HemoCue (cf. annexe, [144]);

- la détermination de l'infection palustre à partir des gouttes épaisses, lues au microscope (cf. annexe, [145]);

- le reste du prélèvement sanguin veineux a été utilisé pour le dosage des anticorps antipalustres par le test ELISA (cf. annexe, [146]).

4.8.1. Le prélèvement sanguin et la préparation des échantillons biologiques.

Au total, 50 ml de sang veineux étaient prélevés dans des tubes contenant l'héparine de sodium. Les tubes de sang étaient acheminés au laboratoire immédiatement après le prélèvement. Ces tubes étaient transvasés sous hotte dans d'autres tubes pour la séparation des cellules mononuclées du sang périphérique. Après la centrifugation, le plasma était collecté dans des tubes stériles à fond conique de 1,8ml.

Ces plasmas étaient conservés dans les Revco à une température de -80˚C avant le test ELISA.

4.8.2. Test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Tous les échantillons de plasma ont été testés contre les antigènes AMA1, MSP1, EBA175 et MSP2. Le taux d'anticorps de chaque échantillon a été converti en unité ELISA. Le test ELISA a été réalisé grâce aux procédures standard normalisées (SOP, *Standard Operating Procedures*) développées par l'Unité de développement des vaccins du NIAID/NIH (cf. annexe, [146]).

4.8.3. Test d'inhibition croissance de *P.f in vitro*

Le test consiste à évaluer l'impact des sérums (Anticorps) sur la croissance du *PLASMODIUM falciparum* en culture *in vitro* pendant 48 heures. Le taux d'inhibition de la croissance est déterminé en rapportant l'augmentation de la quantité d'ADN parasitaire observée en utilisant le sérum étudié à celle observée en utilisant un pole de sérum de sujets non immunisés.

4.9. Considération éthique et déontologiques

Le protocole de recherche a été soumis à l'approbation du comité d'éthique institutionnel de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie de l'Université de Bamako ainsi qu'aux Instituts Nationaux de Santé des Etats-Unis d'Amérique. Nous avons également travaillé selon les bonnes pratiques de recherche clinique sur l'homme et selon les bonnes pratiques de laboratoire telles que énoncés dans les conventions internationales (déclaration d'Helsinki, Conférence internationale d'harmonisation des bonnes pratiques de recherche biomédicale).

Sur le terrain, la communauté (autorités administratives, coutumières et les associations féminines) a été informée de tous les aspects de l'étude. Une restitution des résultats est prévue à la fin de l'étude.

4.9.1. Risques et effets secondaires potentiels

4.9.1.1. Effets secondaires des prélèvements sanguins

Le protocole soumis aux comités d'éthique a été rigoureusement appliqué par un personnel médical et paramédical qualifié et professionnel. L'équipe de recherche a respecté les lignes directrices concernant les bonnes pratiques en matière de recherche (bonne pratique clinique et bonne pratique de laboratoire). Afin de prévenir toute contamination induite par les instruments souillés de sang, chaque prélèvement sanguin a été effectué à l'aide d'un matériel stérile à usage unique, le port de gants à usage unique. Les zones de prélèvement ont été rigoureusement nettoyées avec de l'alcool à 70% avant chaque prise de sang. Chaque fois qu'un gant était souillé, il était remplacé immédiatement.

4.9.1.2. Risques contre bénéfices

Le bénéfice emportant sur le risque a favorisé la participation dans cette étude. Le risque constaté a été l'inconfort occasionné par les prélèvements (capillaire et veineux) et la perte de temps lors des différents rendez-vous. Le grand bénéfice a été le traitement médical gratuit, le suivi clinique durant l'étude et la proximité d'un service médical permanent dont la population ne bénéficiait pas auparavant. En plus, le besoin de développer de nouvelles stratégies pour diagnostiquer et/ou retarder la chimiorésistance est une urgence au Mali et en Afrique sub-saharienne. Tout le matériel utilisé pour le traitement et les prélèvements (seringues, vaccinostyles, gants, lames, etc.) ont été mis à l'abri des enfants dans un puits et incinéré; évitant ainsi tout usage du matériel souillé par les enfants.

4.9.2. Compensation

Les modalités de compensation ont été discutées avec la communauté. Il leur a été notifié qu'un volontaire du protocole ne pourra pas recevoir directement de l'argent liquide pour sa participation libre et éclairée au protocole. Un autre aspect du bénéfice a été la prise en charge par le projet de tous les cas de paludisme simple et compliqué. Les autres pathologies aiguës des volontaires de l'étude ont été également prises en charge par le projet. Le centre de santé de Kéniéroba a reçu une compensation pour les pertes de recettes occasionnées par la prise en charge des enfants du protocole et a été complètement rénové par le projet en plus de la construction d'un grand hangar dans la cours du dispensaire.

5. Résultats

5.1. Données sociodémographiques

Tableau II: Répartition des sujets selon le sexe

Sexe	Effectif	Pourcentage
Masculin	39	41,9
Féminin	54	58,1
Total	**93**	**100**

Le sexe ratio était de 1,38 en faveur des femmes.

Tableau III: Répartition des sujets selon l'ethnie

Ethnie	Effectif	Pourcentage
Malinké	31	33,3
Dogon	31	33,3
Peulh	31	33,3
Total	**93**	**100**

Les trois groupes ethniques (Malinké, Dogon et Peulh) étaient proportionnellement représentés dans notre étude avec 33,3%.

Tableau IV: Répartition des sujets selon la classe d'âge

Classe d'âge	Effectif	Pourcentage
18-30 ans	47	50,5
31-45 ans	29	31,2
46-60 ans	17	18,3
Total	**93**	**100**

La classe d'âge 18 à 30 ans était majoritaire avec 47% tandis que les plus de 46 ans ne représentaient que 18,3% de notre étude.

Tableau V: Répartition des sujets selon l'ethnie, le sexe et la classe d'âge

Ethnie	sexe	Classe d'âge			Total
		18-30 ans	31-45 ans	46-60 ans	
Malinké	Masculin	1	4	2	**7**
	Féminin	6	9	9	**24**
	Total	**7**	**13**	**11**	**31**
Dogon	Masculin	19	7	2	**28**
	Féminin	2	1	0	**3**
	Total	**21**	**8**	**2**	**31**
Peulh	Masculin	11	5	3	**19**
	Féminin	8	3	1	**12**
	Total	**19**	**8**	**4**	**31**
Total		**47**	**29**	**17**	**93**

Sur l'ensemble de notre échantillon, le sexe masculin était majoritaire chez les Dogon et les Peulh. Par contre, le sexe féminin était majoritaire chez les Malinkés avec 24 personnes. Chez les sujets Peulh, le sexe masculin était majoritaire avec un sexe ratio de 1,58. Les sujets Dogon et Peulh étaient relativement plus jeune comparés aux sujets Malinké avec un âge compris entre 18 et 30 ans.

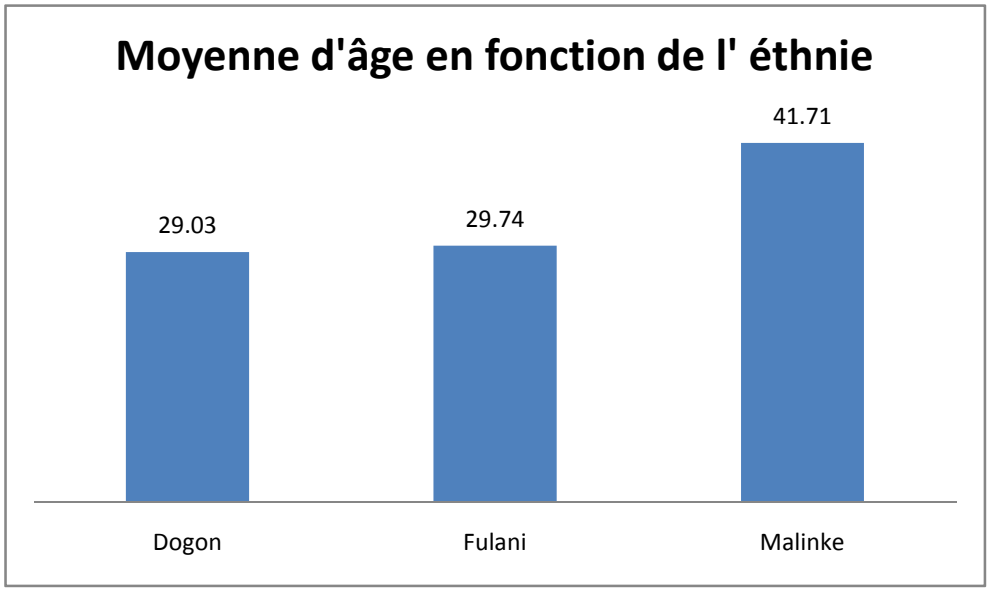


Figure 8: Description statistique de l'âge moyen des sujets selon les ethnies

Tableau VI: Répartition de l'âge moyen dans les différents groupes ethniques

Age moyen	Age moyen	Effectifs	Std. Déviation	Variance	Médian
Malinké	29.03	31	9.229	85.166	28.00
Dogon	41.71	31	11.458	131.280	41.00
Peulh	29.74	31	10.570	111.731	25.00
Total	33.49	93	11.883	141.209	30.00

L'âge moyen était de 41,71 ans chez les sujets Malinké contre respectivement 29,03 ans et 29,74 ans chez les sujets Dogon et Peulh.

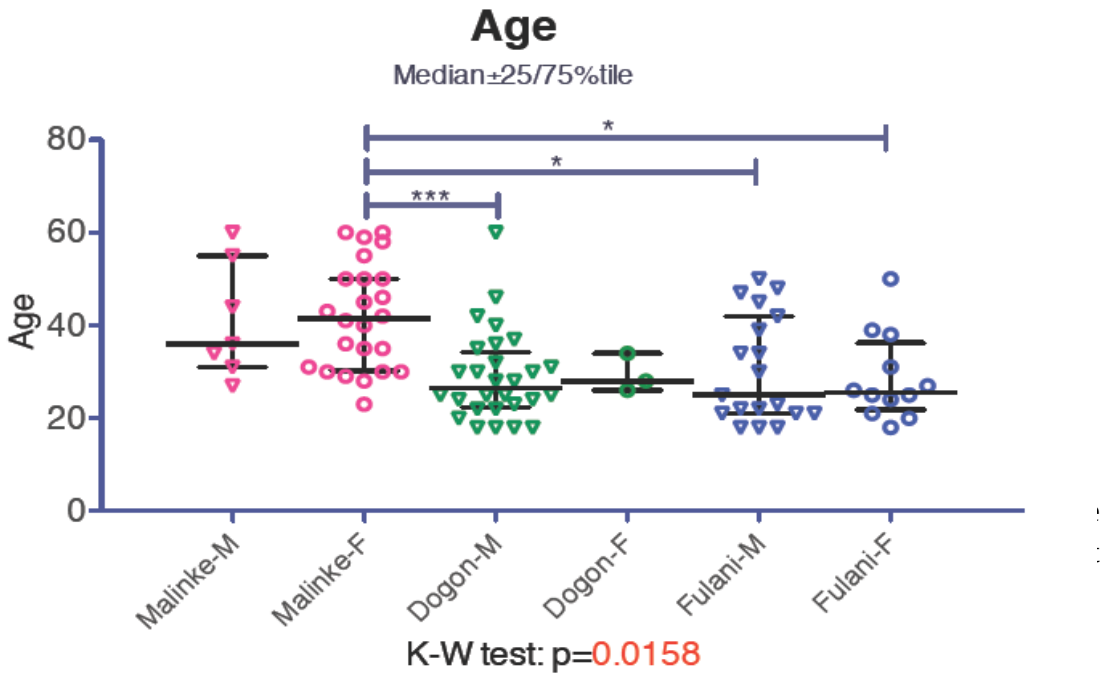


Figure 9: Répartition des sujets en fonction de l'âge, de l'ethnie et du sexe

Les sujets Malinké de sexe féminin avaient un âge médian significativement plus élevé que les autres groupes (P=0,0158).

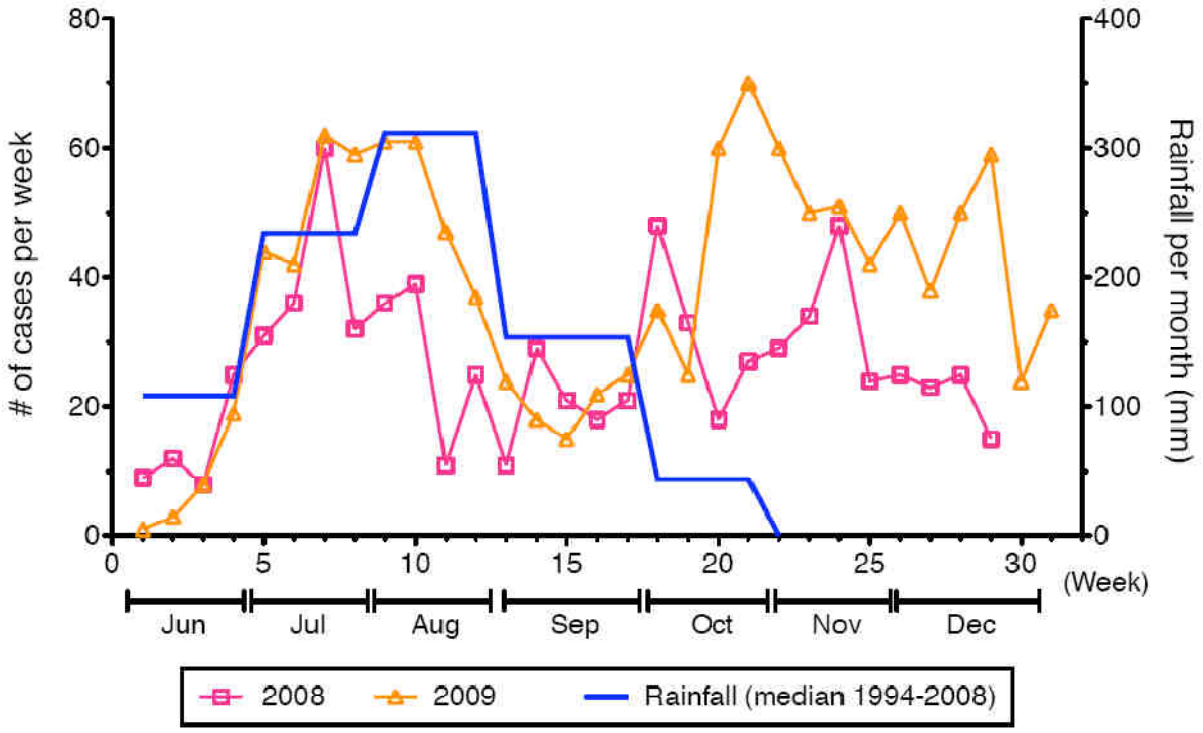


Figure 10: Evolution de la pluviométrie et de l'incidence du paludisme en 2008 et 2009 à keniéroba.

Légende

- # of cases per week: nombre de cas par semaine
- Rainfall per month: pluviometrie par mois
- Median: mediane
- Week: semaine

De façon générale, nous avons constaté plus de cas de paludisme en 2009 qu'en 2008 de juin à décembre. Le pic du paludisme se situe à la fin de la saison de pluies en fin octobre et début de novembre, respectivement. Ce pic suit toujours le pic de la pluviométrie.

5.2. Résultats analytiques

Tableau VII: Moyenne du taux des anticorps anti-AMA1-3D7, Anti-MSP1-42-3D7, Anti-EBA175, et Anti-MSP2-257

Anticorps	Effectifs	Minimum	Maximum	Moyenne	Std. Déviation
Anti-AMA1-3D7	93	0	27978	2036,89	3843,727
Anti-MSP1-42-3D7	93	0	4189	482,88	832,785
Anti-EBA175	93	0	47686	3250,73	7075,479
Anti-MSP2-257	93	0	14628	1333,68	2680,218

Les taux moyens des anticorps en Unité ELISA ont varié de 3250,73 pour l'anticorps anti-EBA175 à 482,88 pour l'anticorps anti-MSP1. Le taux moyen d'anti-AMA1 était de 2036,89 Unité ELISA alors que le taux moyen d'anticorps anti-MSP2 était de 1333,68 Unité ELISA.

Tableau VIII: Répartition de la distribution des taux d'anticorps anti-AMA1-3D7, anti-MSP1-42-3D7, anti-EBA175 et anti-MSP2-257 en fonction de l'âge

Statistiques	AMA1-3D7	MSP1-42-3D7	EBA175	MSP2-257
Coefficient de corrélation	0.046	0.296	0.096	0.127
Valeur du p (bilatérale)	0.658	0.004	0.362	0.226
Nombre d'échantillon	93	93	93	93

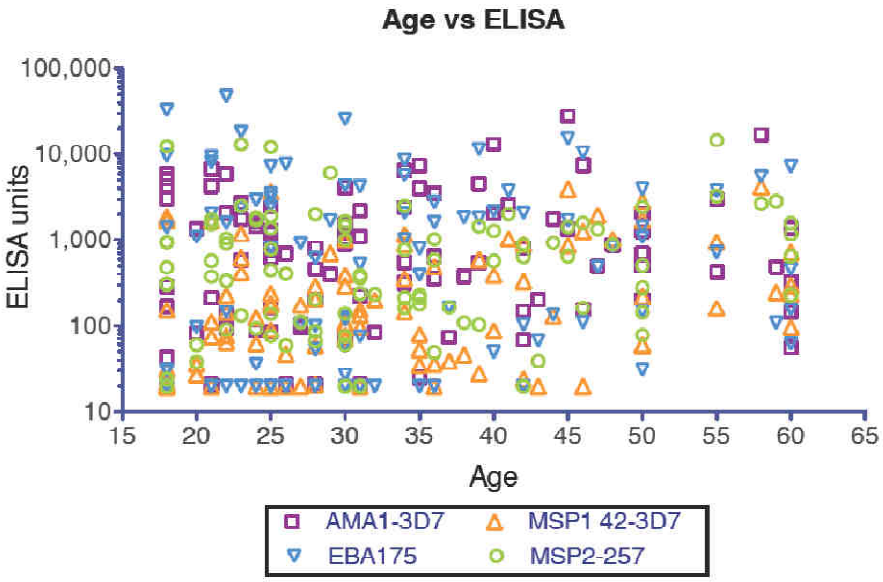


Figure 11: Distribution des taux d'anticorps anti-AMA1-3D7, anti-MSP1-42-3D7, anti-EBA175 et anti-MSP2-257 en fonction de l'âge

Légende

Units: unités

La répartition des taux d'anticorps en fonction de l'âge montre une corrélation statistiquement significative entre le taux des anticorps anti-MSP-1 et l'âge. (r=0.296, p = 0.0045, tableau VIII). Aucune corrélation statistiquement significative n'a été observée entre l'âge et le niveau des autres anticorps dirigés contre les autres antigènes examinés.

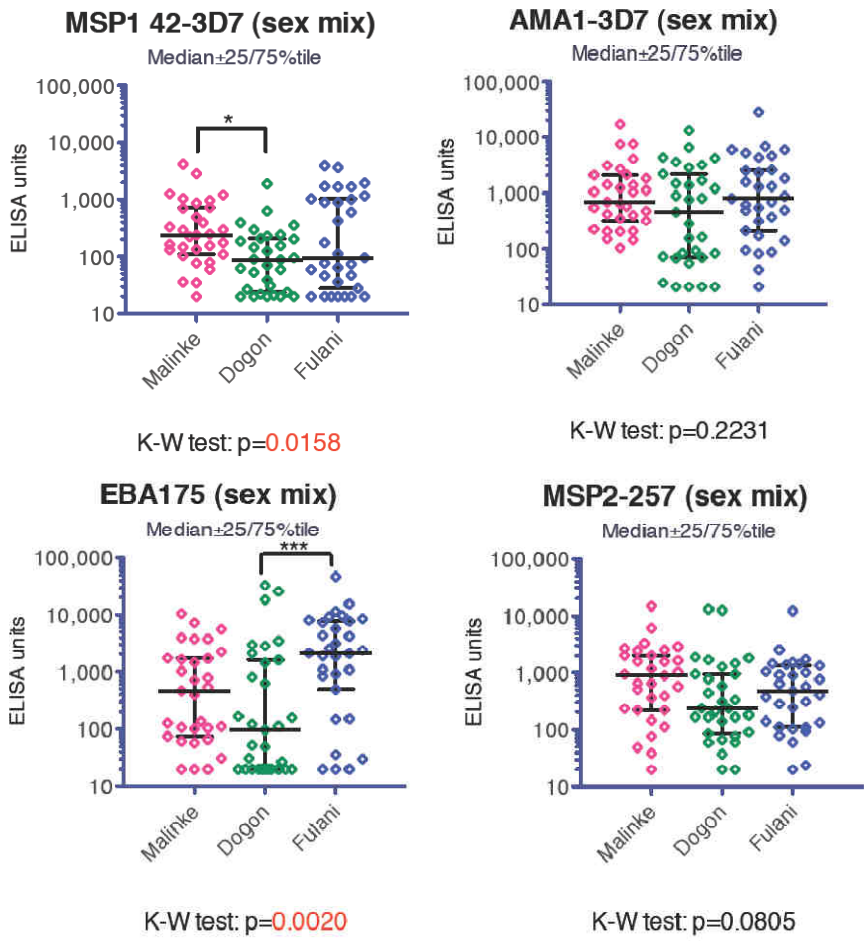


Figure 12: Répartition des taux d'anticorps selon l'ethnie (Malinké, Dogon, Peulh)
Légende: Units: unités
Sex mix: hommes et femmes

Selon la figure ci-dessus, les taux des anticorps anti-AMA-1-3D7 et anti MSP2-257 étaient similaires dans les 3 groupes ethniques et nous n'avons observé aucune différence statistique significative entre la médiane des taux d'anticorps anti-AMA-1-3D7 et anti MSP2-257. Par contre, la médiane des taux d'anticorps anti-MSP-1-42-3D7 était statistiquement plus élevée chez les sujets Malinké comparé au Dogon (p = 0.0158). Aucune différence statistiquement significative n'a été observée en termes du taux des anticorps anti-MSP-1 entre les autres groupes. La médiane du taux des anticorps anti-EBA-175 était plus élevée chez les sujets Peulh comparée au Dogon (p = 0.002).

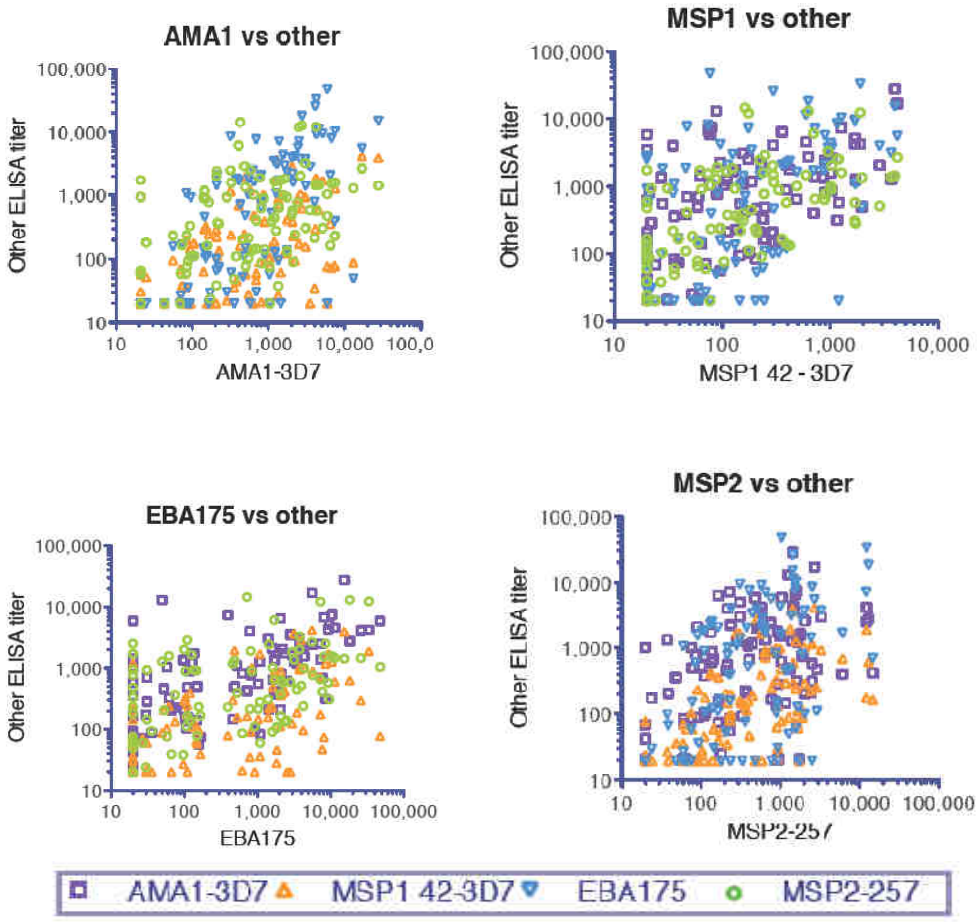


Figure 13: Corrélation entre le taux des anticorps dirigés contre les 4 antigènes étudiés

Légende:

Other ELISA titer: autre titrage

Other: autre

Tableau IX: Répartition de la distribution des taux d'anticorps anti-AMA1-3D7, anti-MSP1-42-3D7, anti-EBA175 et anti-MSP2-257 en fonction des autres antigènes

	Statistiques	AMA1-3D7	MSP1-42-3D7	EBA175	MSP2-257
AMA1-3D7	Coefficient de corrélation	1.000	0.476	0.667	0.384
	Valeur du p (bilatérale)	.	0.000	0.000	0.000
	Effectif	93	93	93	93
MSP1 42-3D7	Coefficient de corrélation	0.476	1.000	0.555	0.576
	Valeur du p (bilatérale)	0.000	.	0.000	0.000
	Effectif	93	93	93	93
EBA175	Coefficient de corrélation	0.667	0.555	1.000	0.433
	Valeur du p (bilatérale)	0.000	0.000	.	0.000
	Effectif	93	93	93	93
MSP2-257	Coefficient de corrélation	0.384	0.576	0.433	1.000
	Valeur du p (bilatérale)	0.000	0.000	0.000	.
	Effectif	93	93	93	93

Nous constatons une très bonne corrélation positive ($p < 0,0001$) entre le taux des anticorps dirigés contre les antigènes étudiés.

Inhibition de la croissance de *P. falciparum in-vitro* : Le taux d'inhibition de la croissance de *P. falciparum in-vitro* observé avec les plasmas des 93 sujets inclus dans l'étude a varié de -12% à 90% avec un taux moyen de 23,32%.

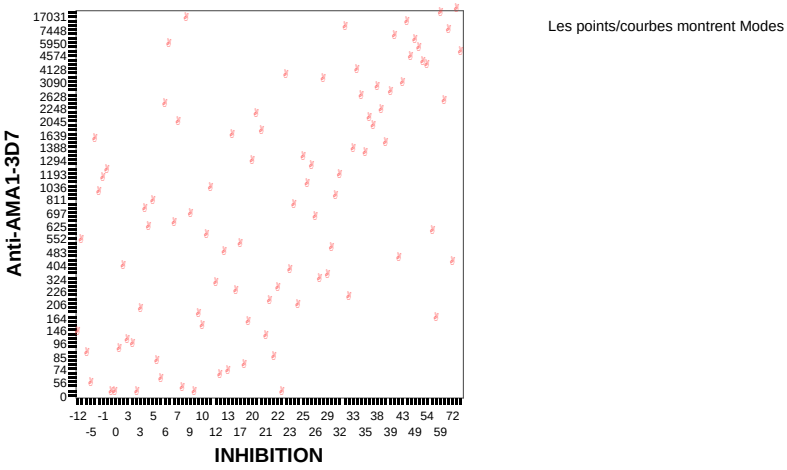


Figure 14: Corrélation entre le taux d'anti-AMA1-3D7 et le pourcentage d'inhibition de la croissance de *P. falciparun in-vitro.*

Il existait une corrélation statistiquement significative entre les anticorps anti-AMA-1 et le taux d'inhibition de la croissance des parasites *in-vitro* (r = 0,561, p = 0,000).

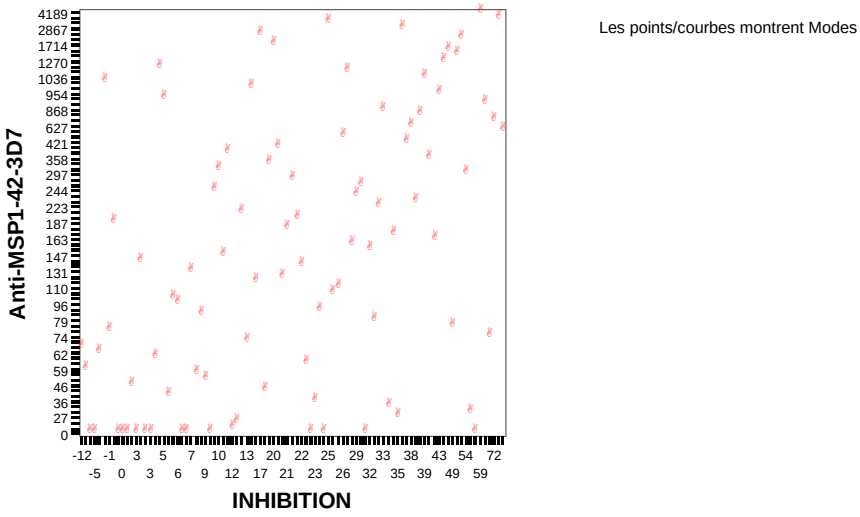


Figure 15: Corrélation entre le taux d'anti-MSP1-42-3D7 et le pourcentage d'inhibition de la croissance de *P. falciparum in-vitro.*

Il existait une corrélation statistiquement significative entre les anticorps d'anti-MSP1-42-3D7 et le taux d'inhibition de la croissance des parasites *in-vitro* (r = 0,470, p = 0,000).

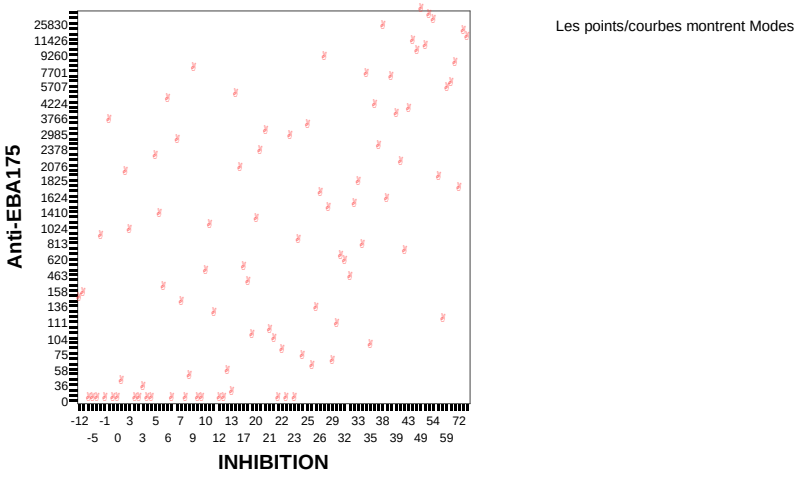


Figure 16: Corrélation entre le taux d'anti-EBA175 et le pourcentage d'inhibition de la croissance de *P. falciparum in-vitro*

Il existait une corrélation statistiquement significative entre les anticorps d'anti-EBA175 et le taux d'inhibition de la croissance des parasites *in-vitro* (r = 0,602, p = 0,000).

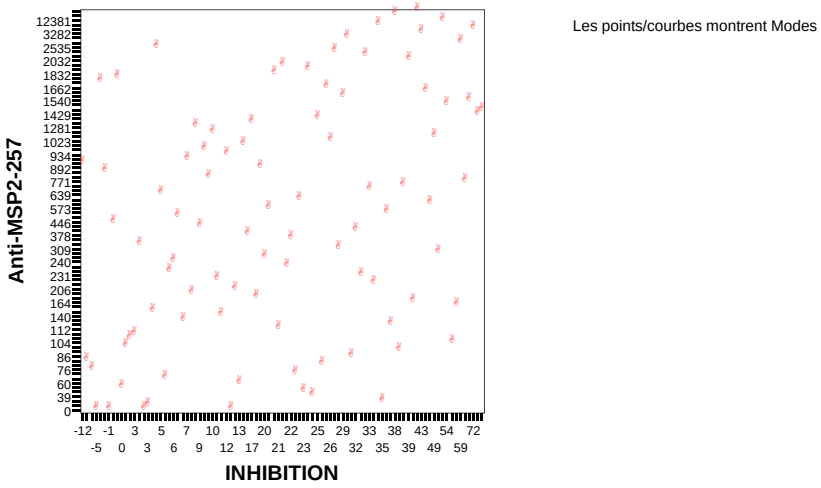


Figure 17: Corrélation entre le taux d'anti-MSP2-257 et le pourcentage d'inhibition de la croissance de *P. falciparum in-vitro*

Il existait une corrélation statistiquement significative entre les anticorps d'anti-MSP2-257 et le taux d'inhibition de la croissance des parasites *in-vitro* (r = 0,379, p = 0,000). D'une façon générale, une corrélation statistiquement significative a été observée entre le taux des anticorps et le pourcentage d'inhibition de la croissance du parasite in-vitro.

Tableau X: Proportion des sujets n'ayant pas d'anticorps contre les différents antigènes.

Antigènes	**Effectif**	**Proportion**
AMA1 3D7	5	5,4
MSP1 42-3D7	15	16,1
EBA175	19	20,4
MSP2-257	4	4,3

Nous avons constaté que certaines personnes incluses dans l'étude ne possédaient pas d'anticorps dirigés contre les antigènes étudiés. Cette proportion est de 20,4% pour EBA175 ; 16,1% pour MSP1-42-3D7 ; 5,4% pour AMA1-3D7 et 4,3% pour MSP2-257.

6. Commentaires et discussion

La biologie complexe de *P. falciparum* a dévoilé des obstacles majeurs au développement de vaccins efficaces contre le paludisme. Comme il passe par les étapes de son cycle de vie, le *Plasmodium* exprime les différents antigènes spécifiques de stade, chacun peut stimuler une réponse immunitaire spécifique. En outre, *P. falciparum* a une longue histoire évolutive avec son hôte humain et exhibe une grande diversité génétique, en particulier dans les antigènes de surface qui ont été sous pression sélective prolongée par la réponse immunitaire de l'homme et qui sont les principales cibles des vaccins sous-unitaires [147]. En outre, le parasite continue d'évoluer grâce à la mutation et la recombinaison sexuelle en réponse aux médicaments et aux autres interventions contre le paludisme, fournissant une cible mouvante pour ces interventions. Lorsque les vaccins antipaludiques sont déployés, "le paludisme résistant au vaccin" peut émerger et menacer l'efficacité du vaccin comme la résistance aux médicaments a compromis l'efficacité des médicaments utilisés pour prévenir et traiter le paludisme.

Pour élaborer des stratégies afin de surmonter la grande diversité génétique de *P. falciparum* et de concevoir des vaccins largement efficaces, il est utile de comprendre d'abord la distribution et la dynamique naturelle des polymorphismes de chaque antigène vaccinal dans les populations endémiques où la diversité est entraînée par l'immunité naturellement acquise. Dans les essais cliniques des vaccins contre le paludisme, l'efficacité spécifique de l'allèle doit être mesurée comme un critère clé de l'étude, et cette information sert à informer sur la conception de vaccins et des essais ultérieurs.

Cette étude constitue un travail préliminaire qui rentre dans le cadre d'une étude quinquennale portant sur l'immunité innée et acquise du paludisme au Mali. L'objectif de cette étude était d'analyser la réponse anticorps à certains antigènes candidats vaccins de *P. falciparum* chez les adultes vivant en zone d'endémie palustre au Mali. Nous avons aussi mesuré certains paramètres sociodémographiques (sexe, âge, ethnie).

6.1. Au plan méthodologique

L'étude a consisté à mesurer les taux d'anticorps dirigés contre quatre antigène de *P. falciparum* à savoir AMA1-3D7, MSP1 42-3D7, EBA175 et MSP2-257. Elle a concerné 3 groupes ethniques du Mali : les Malinké vivant dans le village de Kéniéroba, les Dogon et les Peulh vivant dans la ville de Mopti. L'influence du sexe et de l'âge aussi a été prise en compte. Le fait d'enrôler les sujets Malinké à Kenieroba et les sujets Dogon et Peulh à Mopti pourrait affecter la comparaison entre les taux des anticorps chez les sujets Malinké et les sujets Dogon et Peulh vu la différence du niveau d'endémicité entre les deux zones. Le choix de ces deux localités n'est pas fortuit. En effet, au Mali il est très

difficile de trouver une localité où ces trois groupes ethniques sont suffisamment représentés.

Sur le plan éthique, un consentement libre et écrit, détaillant les avantages et les risques de l'étude, signé a été obtenu de chaque participant avant son enrôlement. Une compensation de 10 kilogrammes de sucre était donnée à chaque participant pour le temps consacré à l'étude.

Au total, 93 sujets âgés de 18 à 60 ans ont été enrôlés dans cette étude dont 31 de chaque groupe ethnique. La représentation des deux sexes au sein des groupes ethniques était très variée, il y avait 42% des hommes contre 58% des femmes dans notre étude. Si chez les sujets Malinké, les femmes étaient plus représentées avec une fréquence de 77%, ce déséquilibre était inversé chez les Dogons où elles ne représentaient que 10%. Chez les Peulh, la proportion des hommes et des femmes était de 61% et 39% respectivement.

L'âge moyen des participants à l'étude était de 33,49 ans. Il était plus élevé chez les sujets Malinké (41,71 ans) que chez les Dogon ou les Peulh où il était respectivement de 29,03 ans et 29,74 ans.

6.2. Au plan de la réponse humorale aux différents antigènes

En analysant les taux des anticorps dirigés contre les quatre antigènes de *P. falciparum* étudiés, nous avons constaté de façon générale que le taux des anticorps augmentait parallèlement à l'âge (Figure 9). Cependant, cette corrélation était statistiquement significative uniquement avec le taux des anticorps anti-MSP1-42-3D7 (Figure 9). Ce constat peut s'expliquer par le faite que les zones d'inclusion des volontaires étaient d'endémicité différente. Par exemple, les Malinké ont été recrutés dans la zone de Kéniéroba tandis que les Peulh et les Dogon ont été recrutés en zone périurbaine de Mopti. En outre, les sujets les plus âgés ont subit une exposition plus longue à ces différents antigènes, contribuant à booster le taux des anticorps chez ces sujets. Une étude a démontré que la longévité de la réponse des anticorps IgG aux antigènes de *P. falciparum* dans le sérum des jeunes enfants est dépendante de l'âge et augmente pendant leur croissance lorsque l'immunité contre le paludisme clinique est normalement acquise dans la population d'étudiée [23, 148].

Le développement des vaccins antipaludiques a été surtout axé sur deux antigènes du mérozoïte, la protéine 1 de surface du mérozoïte (MSP-1) et l'antigène 1 apical du mérozoïte (AMA-1). Ces deux antigènes ont démontré une certaine utilité comme candidats vaccins, corrélant avec l'immunité acquise naturellement lors de multiples études épidémiologiques aussi bien que de niveaux élevés de protection dans les études

précliniques des vaccins sous-unités chez les rongeurs et chez les singes [88, 149]. La MSP-1 est le candidat vaccin classique du stade érythrocytaire bien qu'exprimé aussi par les stades tardifs hépatiques de *P. falciparum* [150, 151]. Les anticorps contre MSP1-19 de la région terminale ont été retrouvés être associés à la protection contre le paludisme, a la fois dans les modèles animal [152] et humain au Ghana [153].

Chez les humains exposés à *P. falciparum* ou immunisés avec l'antigène recombinant de 42-kDa de la région (MSP1-42, composée de MSP1-19 et MSP1-33), la réponse des cellules mémoires T $CD4^+$ apparaît être directement dirigée contre l'épitope à l'intérieur de MSP1-33 [154, 155]. La plupart des vaccins candidats actuels ciblant MSP1 sont basés sur la protéine MSP1-42 [156].

Il a été démontré que les groupes ethniques ayant eu une longue association avec le paludisme soient moins susceptibles à l'infection et à la maladie. La meilleure preuve du concept d'une variation de susceptibilité génétique chez l'homme vient d'une étude comparative de trois groupes ethniques sympatriques au Burkina Faso [157]. L'étude révèle une réduction du taux d'infection et de morbidité chez les Peulh, un groupe traditionnellement nomade, en comparaison avec les Mossis et les Rimaibés, dans une situation où les trois groupes ethniques cohabitent dans les mêmes villages.

Au Mali Dolo et coll. avaient trouvé en 2005 que la réponse des antigènes AMA1 et MSP1 était plus élevée chez les peulh par rapport aux Dogon[158]. Ces résultats concordent avec la clinique qui montre une incidence du paludisme plus bas chez les Peulh qui résulteraient du taux élevé d'anticorps pouvant entrainer l'inactivation des antigènes AMA1 et MSP1 et par conséquent, le blocage de l'invasion des érythrocytes par les antigènes du mérozoïte.

Au cours de notre étude, nous avons observé que les taux d'anticorps anti-AMA-1-3D7 et anti MSP2-257 étaient similaires dans les 3 groupes ethniques (figure 12). Ceci pourra suggérer que l'ethnie n'a pas d'influence sur la production des anticorps anti-AMA-1-3D7 et anti MSP2-257. La médiane des taux d'anticorps anti MSP-1-42-3D7 était statistiquement plus élevée chez les Malinkés comparée au Dogon (P= 0.0158). Cette remarque s'explique par le fait que les sujets Malinké sont relativement plus âgés et ont donc eu une plus longue exposition au paludisme comparé aux sujets Dogon et Peulh. En effet, Dolo et coll. (2005) avait rapporté que les sujets Peulh étaient relativement plus résistants au paludisme que les sujets Dogon avec lesquels ils vivent en sympathie au Mali [142]. Les études faites au Burkina Faso [159, 160] et au Mali [160, 161] ont démontré que les peulh avaient peu d'épisodes palustres, peu de formes sévères et des titres anticorps élevés par rapport aux autres groupes ethniques. Cette différence de

susceptibilité semble être liée à un polymorphisme au niveau du promoteur du gène d'interleukine-4 [162].

L'antigène 1 de la membrane apicale (AMA1) est une protéine polymorphe du mérozoïte qui est une cible des anticorps de l'immunité acquise naturellement, inhibiteurs de l'invasion du globule rouge et cet antigène est un candidat vaccin de premier plan pour la phase asexuée de *P. falciparum*.

En Papouasie-Nouvelle-Guinée, la majorité des personnes vaccinées avec le vaccin candidat AMA1 avaient des niveaux très élevés d'anticorps contre AMA1 et la prévalence et le titre de ces anticorps augmentaient avec l'âge [91] comme observé dans notre étude. Bien que les anticorps contre les régions conservées de la molécule aient été prédominants chez la plupart des individus, la plupart des échantillons de plasma contenait également des anticorps dirigés contre des régions polymorphes de l'antigène. Dans un petit nombre d'individus, principalement des groupes d'âge plus jeunes, la majorité des anticorps contre AMA1 étaient été dirigés contre les épitopes polymorphes.

Des niveaux élevés d'anticorps sont généralement associés à une susceptibilité réduite subséquente au paludisme clinique [113, 163]. Généralement, les taux d'anticorps augmentent nettement en 1 ou 2 semaines après l'apparition des symptômes lors d'une réinfection palustre [164, 165]. Une étude suggérait que les augmentations des avidités d'anticorps se produisent lors de la résolution de l'infection à *P. falciparum* chez les humains, reflétant la maturation des réponses anticorps à *P. falciparum* [166]. Nous avons constaté une très bonne corrélation positive entre les taux des anticorps mesurés contre les 4 antigènes étudiés au cours de notre étude. L'augmentation du taux des anticorps dirigés contre un antigène donné se manifeste par l'augmentation du taux des anticorps contre les autres antigènes. Ce résultat était attendu vu que les sujets sont exposés de façon naturelle et dans les mêmes conditions aux 4 antigènes.

L'antigène 1 de la membrane apicale (AMA1) et la protéine 1 de 42 kDa de la surface du mérozoïte (MSP1-42) sont les principaux candidats vaccin contre le paludisme. Plusieurs essais précliniques et cliniques ont été menés et une inhibition de la croissance *in-vitro* du parasite test a été utilisée pour évaluer les activités biologiques des anticorps résultant. Dans une phase de 1 essai avec le candidat vaccin AMA1-C1/Alhydrogel plus CPG 7909, la vaccination anti-AMA1 a suscité l'inhibition de 96% par les immunoglobulines G (IgG)[167]. Cependant, les anticorps induits par le candidat vaccin MSP1-42-C1/Alhydrogel plus CPG 7909 ont démontré moins de 32% d'inhibition *in-vitro*. Cette même étude a démontré qu'il y avait des différences significatives entre les espèces (souris, 0,28 mg / ml, et le singe, à 0,14 mg / ml, contre les parasites 3D7). Bien qu'il ne sache pas si l'activité inhibitrice de croissance *in-vitro* reflète l'immunité protectrice in-

vivo, cette étude a démontré que le taux d'inhibition par les anticorps varie en fonction de l'antigène parasitaire et des espèces hôtes.

Nous avons également déterminé l'impact des anticorps dirigés contre les 4 antigènes sur la croissance de *P. falciparum in-vitro* en utilisant les sera étudiés. Ainsi, nous avons observé une très bonne corrélation positive entre le taux des anticorps et l'inhibition de la croissance *in-vitro* de *P. falciparum*. Le coefficient de corrélation variait de 0.384 (MSP2-257 vs AMA1-3D7) à 0.667 (EBA175 vs AMA1-3D7). Nous n'avons pas pu déterminer l'impact individuel de chacun des 4 anticorps sur l'inhibition de la croissance de *P. falciparum in-vitro*. Les résultats de ce test sont en conformité avec les observations faites par Osier et coll. (2008) qui avait rapporté au Kenya que des taux d'anticorps élevés contre plusieurs antigènes plasmodiques étaient associés à une protection contre les manifestations cliniques du paludisme [163]. De façon générale, nous avons observé une corrélation positive statistiquement significative entre les taux d'anticorps et le pourcentage d'inhibition de la croissance du parasite *in-vitro* (figure 12-15).

Nous avons constaté également qu'une proportion non négligeable des sujets inclus dans l'étude ne possédait aucun anticorps détectable par ELISA dirigé contre l'un des antigènes étudiés. Cette proportion était de 20,4% pour EBA-175, 16,1% pour MSP1-42-3D7, 5,4% pour AMA1-3D7 et 4,3% pour MSP2-257. L'absence d'anticorps contre des antigènes plasmodiques utilisés comme candidat vaccin antipalustre chez des adultes vivant en zone endémique palustre nous amène à nous interroger sur l'efficacité d'un vaccin basé sur ces antigènes. Après la vaccination, il n'y avait pas de différence significative dans les taux d'anticorps déterminés par ELISA entre les enfants maliens et les adultes maliens, mais les adultes des États-Unis ont montré des niveaux d'anticorps plus faibles [168]. Cette étude a démontré que la réponse humorale induite par le vaccin AMA1 varie en fonction de la population, ce qui reflète probablement la plupart des différents niveaux d'exposition précédente au paludisme. Ainsi, la prédiction des réponses immunitaires des populations non-cibles n'est pas souhaitable pour l'évaluation des antigènes candidats vaccins.

6.3. Problèmes de non-réponse et d'hétérogénéité des antigènes

En outre, il a été démontré qu'il existe une hétérogénéité des antigènes candidats vaccins dans les régions où le paludisme est hyper endémique, expliquant en partie, la non-réponse de certaines populations à ces antigènes. Par exemple, une étude a démontré qu'au Mali, après trois années de surveillance, les parasites avec les haplotypes de MSP1-19 correspondant aux souches FVO et FUP prédominaient alors que la souche vaccine 3D7 était à une faible prévalence pendant les 3 années successives de transmission du paludisme à Bandiagara [90].

Depuis longtemps, l'hypothèse que le polymorphisme présente dans certains antigènes du paludisme peut être le résultat de la sélection naturelle positive agissant à maintenir la diversité génétique et permettant au parasite d'échapper à l'attaque du système immunitaire humain. En effet, la preuve de la sélection a été rapportée pour les trois antigènes, candidats vaccins de pointe, MSP-1, AMA-1 et CSP.

Dans le cas de MSP-1, la région de la protéine sous forte sélection est le bloc N-terminal 2 de la région répétitive [97], mais il existe également des preuves pour la sélection positive agissant pour le MSP1-19 [169, 170], la portion C-terminale de la molécule qui a été inclus dans les vaccins MSP-1 actuellement en essai. Une comparaison récente de la MSP1-42 de *P. vivax* et de *P. falciparum* a fourni des preuves que le polymorphisme de MSP1-19 est en cours de sélection positive, et contrairement aux régions N-terminale de la molécule, qui ont été proposées à titre d'équilibrage de sélection, cette analyse suggère que la MSP1-19 est en cours de sélection directionnelle [169]. Le polymorphisme dans l'antigène AMA-1 semble également être maintenue par la sélection naturelle positive sous la forme de la sélection d'équilibrage, en particulier pour le domaine I [139, 171] et le domaine III [171]. La preuve de la sélection naturelle agissant positivement sur les régions polymorphiques des cellules T de la CSP est mitigée, certaines études fournissant des éléments de preuve pour la sélection [147, 172] et d'autres n'ont démontré aucune preuve [173]. Ces résultats contradictoires peuvent être dus à des différences de taille de l'échantillon, aux populations de l'échantillon, ou à l'utilisation de différents tests pour estimer l'éloignement de la neutralité.

La séquence du gène de MSP-1 peut être organisée en 17 blocs en fonction de la variabilité de séquence [105, 174]. La plupart des séquences de MSP-1 sont groupées en deux familles d'allèle distinctes [105], à l'exception du bloc 2, qui est une région répétitives qui se compose de quatre familles d'allèle [104, 174]. Le bloc 17 contient MSP1-19, qui a fait l'objet de développement d'un vaccin contre le paludisme en raison de sa séquence hautement conservée et de l'hypothèse de sa fonction critique. Cependant, même cette région contient au moins six polymorphismes de nucléotides non-synonymes (SNP). Des études ont démontré une réaction croisée dans la réponse anticorps entre les haplotypes de MSP1-19 [175, 176], mais aussi une certaine reconnaissance différentielle [175], en particulier des acides aminés polymorphes dans le second domaine EGF-like [176].

La fréquence des haplotypes de MSP1-19 (basée sur les six sites polymorphes) a été examinée sur trois ans dans une étude de cohorte d'enfants et de jeunes adultes sur un site d'essais de vaccins au Mali [90]. Les parasites avec des séquences d'acides aminés de MSP1-19 correspondant aux souches FVO (QKSNGL) et FUP (EKSNGL) de *P. falciparum* ont été les plus répandues dans les trois années de l'étude et dans tous les

groupes d'âge, tandis que les parasites avec des séquences correspondant à la souche 3D7 (ETSSRL, la plus proche des souches sauvages) ont été moins fréquents. Les parasites correspondant à la souche FUP (EKSNGL) avaient également la fréquence la plus élevée au Vietnam [98], au Kenya [177], et en Thaïlande [178]. Si l'immunité induite par un vaccin à base de MSP1-19 est spécifique d'allèle, un vaccin issus soit de la souche FVO ou FUP pourrait avoir une meilleure efficacité initiale d'un vaccin dérivé de la souche vaccinale 3D7 [179] dans les régions où ces haplotypes de MSP1-19 prédominent et les haplotypes correspondant à 3D7 sont moins fréquentes [90, 180]. Ceci pourrait partiellement ou totalement expliquer l'échec du vaccin basé sur la souche 3D7 de MSP-1 d'induire une efficacité protectrice chez les enfants Kényans [181].

La justification de l'utilisation des analyses génétiques des populations pour identifier les parties spécifiques des antigènes du paludisme sous une plus grande sélection naturelle positive est fondée sur le désir d'identifier les polymorphismes qui sont les plus immunogènes dans l'espoir d'obtenir des informations qui peuvent guider la conception de vaccins et de donner un aperçu de l'évolution des protéines antigéniques. Récemment, des moyens plus directs ont été utilisés pour étudier le polymorphisme des antigènes immunologiquement pertinents, à savoir, les approches moléculaire épidémiologiques qui permettent d'évaluer les changements dans les génotypes parasitaires comme des facteurs de risque d'infection et de morbidité dans les populations semi-immunes.

6.4. Limites de notre étude

Dans l'avenir, il devrait y avoir autant d'uniformité entre les études que possible pour assurer une comparabilité maximale. Ce qui pourrait être amélioré par la quantification et la standardisation des réponses IgG, qui pourrait être atteint en établissant un réactif de référence pour déterminer les concentrations d'anticorps. En outre, les effets protecteurs des réponses anti-mérozoïte observée épidémiologique doit également être étayée par des preuves de la fonction de l'anticorps (inhibition de la croissance *in-vitro*). Le développement et l'application des tests fonctionnels plutôt que immuno-essais standard seraient aussi très précieux. Actuellement, les données sur la fonction des anticorps contre les antigènes mérozoïte est très limitée [8, 93, 114**]**. Enfin, il est nécessaire de tenir compte des réponses spécifiques à la souche (anticorps spécifiques d'allèle) et les paramètres d'examiner si la réponse protectrice contre les antigènes est notamment de souches transcendantes ou spécifique à la souche.

7. Conclusion et Recommandations

7.1. Conclusion

Au terme de cette étude, nous pouvons conclure que les antigènes AMA1-3D7, MSP1-42-3D7, EBA-175 et MSP2-257 entrainent la production d'anticorps chez les adultes vivants au Mali. La répartition du taux d'anticorps en fonction de l'âge montre une corrélation positive statistiquement significative entre les taux des anticorps anti-MSP-1 et l'âge. La médiane du taux des anticorps anti-MSP-1-42-3D7 était statistiquement plus élevée chez les sujets Malinké comparé aux sujets Dogon (P= 0.0158) et parallèlement, la médiane du taux des anticorps anti-EBA-175 était plus élevée chez les sujets Peulh comparée aux sujets Dogon (P=0.002).

L'objectif général de cette étude était de faire progresser notre compréhension de l'immunité naturellement acquise contre le paludisme et de contribuer au développement de vaccins rationnels. Cet objectif nous semble être atteint car nos résultats pourraient avoir des implications dans la compréhension actuelle de l'acquisition de l'immunité naturelle clinique au paludisme ainsi que dans la conception de vaccins plus efficaces. Nos données fournissent également une référence pour le taux de base des anticorps lors des études ultérieures portant sur le développement de vaccins ou lors des essais précliniques et cliniques.

7.2. Recommandations

Au terme de cette étude et vu nos résultats, nous pouvons formuler les recommandations suivantes:

• **Aux autorités sanitaires et administratives** :

- d'encourager la recherche vaccinale contre le paludisme et autres maladies infectieuses au Mali ; et

- de financer d'avantage la recherche médicale pour accélérer le développement de nouveaux médicaments ou vaccins antipaludiques.

• **Aux chercheurs:**

- de continuer ce type d'étude dans les autres localités du pays et avec les autres antigènes candidats vaccins afin de sélectionner les meilleurs antigènes de *P. falciparum* et de mieux comprendre l'acquisition de l'immunité naturelle de protection ; et

- Renforcer la collaboration entre les différents chercheurs travaillant sur l'infection palustre.

8. Références bibliographiques

1. Marsh, K. and S. Kinyanjui, *Immune effector mechanisms in malaria.* Parasite immunology, 2006. **28**(1-2): p. 51-60.
2. Cohen, S., G.I. Mc, and S. Carrington, *Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria.* Nature, 1961. **192**: p. 733-7.
3. Sabchareon, A., et al., *Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria.* Am J Trop Med Hyg, 1991. **45**(3): p. 297-308.
4. McCallum, F.J., et al., *Acquisition of growth-inhibitory antibodies against blood-stage Plasmodium falciparum.* PloS one, 2008. **3**(10): p. e3571.
5. Bouharoun-Tayoun, H., et al., *Antibodies that protect humans against Plasmodium falciparum blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes.* J Exp Med, 1990. **172**(6): p. 1633-41.
6. Hodder, A.N., P.E. Crewther, and R.F. Anders, *Specificity of the protective antibody response to apical membrane antigen 1.* Infect Immun, 2001. **69**(5): p. 3286-94.
7. Dutta, S., et al., *Invasion-inhibitory antibodies inhibit proteolytic processing of apical membrane antigen 1 of Plasmodium falciparum merozoites.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(21): p. 12295-300.
8. Persson, K.E., et al., *Variation in use of erythrocyte invasion pathways by Plasmodium falciparum mediates evasion of human inhibitory antibodies.* The Journal of clinical investigation, 2008. **118**(1): p. 342-51.
9. Cowman, A.F. and B.S. Crabb, *Invasion of red blood cells by malaria parasites.* Cell, 2006. **124**(4): p. 755-66.
10. Richards, J.S. and J.G. Beeson, *The future for blood-stage vaccines against malaria.* Immunology and cell biology, 2009. **87**(5): p. 377-90.
11. Gupta, S. and R.M. Anderson, *Population structure of pathogens: the role of immune selection.* Parasitology today, 1999. **15**(12): p. 497-501.
12. Singh, B., et al., *A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings.* Lancet, 2004. **363**(9414): p. 1017-24.
13. White, N.J., *Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite.* Clin Infect Dis, 2008. **46**(2): p. 172-3.
14. WHITE, G.B., ed. *Needs and progress in the application of new techniques to mosquito identification.* IN NEWTON, B. N. M., F., EDS ed. New approaches to the identification of parasites and their vector.1984: Geneva. Basle, Schwabe, UNDP/World Bank/WHO Special Programme.
15. WHO, *World Malaria Report 2010*, 2010, World Health Organisation.
16. Macdonald, G., *The epidemiology and control of malaria.* Oxford University Press, 1957.
17. DOUMBO, O., *Epidémiologie du paludisme au Mali, étude de la chimiorésistance, essai de stratégie de contrôle basé sur l'utilisation de rideaux*

imprégnés de perméthrine associé au traitement systématique des accès fébriles., in *Parasitologie, Pathologie, Ecologie*1992, Montpellier II, France.
18. WHO, *Terminology of malaria and of malaria eradication,* 1963, World Health Organisation: Geneve.
19. Angulo, I. and M. Fresno, *Cytokines in the pathogenesis of and protection against malaria*. Clin Diagn Lab Immunol, 2002. **9**(6): p. 1145-52.
20. Kwiatkowski, D., *Tumour necrosis factor, fever and fatality in falciparum malaria*. Immunology letters, 1990. **25**(1-3): p. 213-6.
21. McGuire, W., et al., *Levels of tumour necrosis factor and soluble TNF receptors during malaria fever episodes in the community.* Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1998. **92**(1): p. 50-3.
22. Newton, C.R. and S. Krishna, *Severe falciparum malaria in children: current understanding of pathophysiology and supportive treatment.* Pharmacol Ther, 1998. **79**(1): p. 1-53.
23. Marsh, K., et al., *Antibodies to blood stage antigens of Plasmodium falciparum in rural Gambians and their relation to protection against infection.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 1989. **83**(3): p. 293-303.
24. Rowe, A., et al., *Plasmodium falciparum rosetting is associated with malaria severity in Kenya.* Infection and immunity, 1995. **63**(6): p. 2323-6.
25. Rowe, J.A., et al., *P. falciparum rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1*. Nature, 1997. **388**(6639): p. 292-5.
26. Bull, P.C., et al., *Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria.* Nat Med, 1998. **4**(3): p. 358-60.
27. Marsh, K., *Malaria--a neglected disease?* Parasitology, 1992. **104 Suppl**: p. S53-69.
28. Trape, J.F., et al., *The Dielmo project: a longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal.* Am J Trop Med Hyg, 1994. **51**(2): p. 123-37.
29. Stevenson, M.M. and E.M. Riley, *Innate immunity to malaria.* Nat Rev Immunol, 2004. **4**(3): p. 169-80.
30. Coban, C., et al., *Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin.* J Exp Med, 2005. **201**(1): p. 19-25.
31. McCall, M.B., et al., *Plasmodium falciparum infection causes proinflammatory priming of human TLR responses.* J Immunol, 2007. **179**(1): p. 162-71.
32. Aderem, A. and R.J. Ulevitch, *Toll-like receptors in the induction of the innate immune response.* Nature, 2000. **406**(6797): p. 782-7.
33. Ho, M., et al., *Interleukin-10 inhibits tumor necrosis factor production but not antigen-specific lymphoproliferation in acute Plasmodium falciparum malaria.* J Infect Dis, 1995. **172**(3): p. 838-44.
34. Wahlin, B., et al., *Human antibodies to a Mr 155,000 Plasmodium falciparum antigen efficiently inhibit merozoite invasion.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(24): p. 7912-6.
35. Mohan, K., P. Moulin, and M.M. Stevenson, *Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage Plasmodium chabaudi AS infection.* J Immunol, 1997. **159**(10): p. 4990-8.

36. Salerno, A. and F. Dieli, *Role of gamma delta T lymphocytes in immune response in humans and mice.* Crit Rev Immunol, 1998. **18**(4): p. 327-57.
37. Dolo, A., *Réponse immunitaire anti-TRAP (Thrombospondin Related Adhesive Protein et morbidité palustre dans une zone d'hyper-endémie palustre du Mali (Afrique de l'Ouest)*, 1997, Rome(Italie): Rome.
38. DOLO, A., et al., *Strain-specific antibody responses to potential malaria vaccine antigens in Mali.* Am. J. Trop. Med. Hyg., 2003. **3**.
39. Burgner, D., K. Rockett, and D. Kwiatkowski, *Nitric oxide and infectious diseases.* Arch Dis Child, 1999. **81**(2): p. 185-8.
40. Taylor-Robinson, A.W. and E.C. Smith, *A dichotomous role for nitric oxide in protection against blood stage malaria infection.* Immunol Lett, 1999. **67**(1): p. 1-9.
41. Doolan, D.L., C. Dobano, and J.K. Baird, *Acquired immunity to malaria.* Clin Microbiol Rev, 2009. **22**(1): p. 13-36, Table of Contents.
42. Aucan, C., et al., *High immunoglobulin G2 (IgG2) and low IgG4 levels are associated with human resistance to Plasmodium falciparum malaria.* Infect Immun, 2000. **68**(3): p. 1252-8.
43. Bouharoun-Tayoun, H. and P. Druilhe, *Plasmodium falciparum malaria: evidence for an isotype imbalance which may be responsible for delayed acquisition of protective immunity.* Infect Immun, 1992. **60**(4): p. 1473-81.
44. Leoratti, F.M., et al., *Pattern of humoral immune response to Plasmodium falciparum blood stages in individuals presenting different clinical expressions of malaria.* Malar J, 2008. **7**: p. 186.
45. Perlmann, H., et al., *IgE elevation and IgE anti-malarial antibodies in Plasmodium falciparum malaria: association of high IgE levels with cerebral malaria.* Clin Exp Immunol, 1994. **97**(2): p. 284-92.
46. Farouk, S.E., et al., *Different antibody- and cytokine-mediated responses to Plasmodium falciparum parasite in two sympatric ethnic tribes living in Mali.* Microbes Infect, 2005. **7**(1): p. 110-7.
47. Bouharoun-Tayoun, H., et al., *Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of Plasmodium falciparum asexual blood stages.* J Exp Med, 1995. **182**(2): p. 409-18.
48. Mazier, D., et al., *Effect of antibodies to recombinant and synthetic peptides on P. falciparum sporozoites in vitro.* Science, 1986. **231**(4734): p. 156-9.
49. Thomas, A.W., et al., *Aspects of immunity for the AMA-1 family of molecules in humans and non-human primates malarias.* Mem Inst Oswaldo Cruz, 1994. **89 Suppl 2**: p. 67-70.
50. Udhayakumar, V., et al., *Longitudinal study of natural immune responses to the Plasmodium falciparum apical membrane antigen (AMA-1) in a holoendemic region of malaria in western Kenya: Asembo Bay Cohort Project VIII.* Am J Trop Med Hyg, 2001. **65**(2): p. 100-7.
51. Groux, H. and J. Gysin, *Opsonization as an effector mechanism in human protection against asexual blood stages of Plasmodium falciparum: functional role of IgG subclasses.* Res Immunol, 1990. **141**(6): p. 529-42.
52. Khusmith, S. and P. Druilhe, *Antibody-dependent ingestion of P. falciparum merozoites by human blood monocytes.* Parasite Immunol, 1983. **5**(4): p. 357-68.

53. Mota, M.M., et al., *Acute Plasmodium chabaudi chabaudi malaria infection induces antibodies which bind to the surfaces of parasitized erythrocytes and promote their phagocytosis by macrophages in vitro.* Infect Immun, 1998. **66**(9): p. 4080-6.
54. Oeuvray, C., et al., *A novel merozoite surface antigen of Plasmodium falciparum (MSP-3) identified by cellular-antibody cooperative mechanism antigenicity and biological activity of antibodies.* Mem Inst Oswaldo Cruz, 1994. **89 Suppl 2**: p. 77-80.
55. Hoffman, S.L., et al., *T lymphocytes from mice immunized with irradiated sporozoites eliminate malaria from hepatocytes.* Bull World Health Organ, 1990. **68 Suppl**: p. 132-7.
56. Hoffman, S.L., et al., *Sporozoite vaccine induces genetically restricted T cell elimination of malaria from hepatocytes.* Science, 1989. **244**(4908): p. 1078-81.
57. Hoffman, S.L., et al., *Irradiated sporozoite vaccine induces cytotoxic T lymphocytes that recognize malaria antigens on the surface of infected hepatocytes.* Immunol Lett, 1990. **25**(1-3): p. 33-8.
58. Renia, L., et al., *Effector functions of circumsporozoite peptide-primed CD4+ T cell clones against Plasmodium yoelii liver stages.* J Immunol, 1993. **150**(4): p. 1471-8.
59. Huaman, M.C., et al., *Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 vaccine elicits multifunctional CD4 cytokine-producing and memory T cells.* Vaccine, 2009. **27**(38): p. 5239-46.
60. Lundie, R.J., et al., *Blood-stage Plasmodium infection induces CD8+ T lymphocytes to parasite-expressed antigens, largely regulated by CD8alpha+ dendritic cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(38): p. 14509-14.
61. Overstreet, M.G., et al., *Protective CD8 T cells against Plasmodium liver stages: immunobiology of an 'unnatural' immune response.* Immunol Rev, 2008. **225**: p. 272-83.
62. Lyke, K.E., et al., *Cell-mediated immunity elicited by the blood stage malaria vaccine apical membrane antigen 1 in Malian adults: results of a Phase I randomized trial.* Vaccine, 2009. **27**(15): p. 2171-6.
63. DIAKITE, M., ed. *Paludisme uptodate.* 2 ed., ed. 22010: Bamako (Mali). 474 p.
64. Carvalho, L.J., C.T. Daniel-Ribeiro, and H. Goto, *Malaria vaccine: candidate antigens, mechanisms, constraints and prospects.* Scand J Immunol, 2002. **56**(4): p. 327-43.
65. Greenwood, B., *Malaria vaccines. Evaluation and implementation.* Acta Trop, 2005. **95**(3): p. 298-304.
66. Hill, A.V., *Pre-erythrocytic malaria vaccines: towards greater efficacy.* Nat Rev Immunol, 2006. **6**(1): p. 21-32.
67. Miller, L.H. and S.L. Hoffman, *Research toward vaccines against malaria.* Nat Med, 1998. **4**(5 Suppl): p. 520-4.
68. Crewther, P.E., et al., *Plasmodium falciparum: two antigens of similar size are located in different compartments of the rhoptry.* Exp Parasitol, 1990. **70**(2): p. 193-206.
69. Peterson, M.G., et al., *Third form of the precursor to the major merozoite surface antigens of Plasmodium falciparum.* Mol Cell Biol, 1988. **8**(6): p. 2664-7.

70. Howell, S.A., et al., *Proteolytic processing and primary structure of Plasmodium falciparum apical membrane antigen-1.* J Biol Chem, 2001. **276**(33): p. 31311-20.
71. Waters, A.P., et al., *A merozoite receptor protein from Plasmodium knowlesi is highly conserved and distributed throughout Plasmodium.* J Biol Chem, 1990. **265**(29): p. 17974-9.
72. Bannister, L.H. and G.H. Mitchell, *The malaria merozoite, forty years on.* Parasitology, 2009. **136**(12): p. 1435-44.
73. ESCALENT, A.A. and al, *polymorphism in the gene encoding the apical membrane antigen (AMA-1) of Plasmodium falciparum. X. Asembo Bay Cohort project.* Mol. Biochem. Parasitol., 2001: p. 113.
74. Nair, M., et al., *Structure of domain III of the blood-stage malaria vaccine candidate, Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 (AMA1).* Journal of molecular biology, 2002. **322**(4): p. 741-53.
75. Takala, S.L., et al., *Extreme polymorphism in a vaccine antigen and risk of clinical malaria: implications for vaccine development.* Science translational medicine, 2009. **1**(2): p. 2ra5.
76. Bai, T., et al., *Structure of AMA1 from Plasmodium falciparum reveals a clustering of polymorphisms that surround a conserved hydrophobic pocket.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(36): p. 12736-41.
77. Dutta, S., et al., *Structural basis of antigenic escape of a malaria vaccine candidate.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(30): p. 12488-93.
78. Ouattara, A., et al., *Lack of allele-specific efficacy of a bivalent AMA1 malaria vaccine.* Malaria journal, 2010. **9**: p. 175.
79. Takala, S.L. and C.V. Plowe, *Genetic diversity and malaria vaccine design, testing and efficacy: preventing and overcoming 'vaccine resistant malaria'.* Parasite immunology, 2009. **31**(9): p. 560-73.
80. Lalvani, A., et al., *Potent induction of focused Th1-type cellular and humoral immune responses by RTS,S/SBAS2, a recombinant Plasmodium falciparum malaria vaccine.* J Infect Dis, 1999. **180**(5): p. 1656-64.
81. Anders, R.F., et al., *Immunisation with recombinant AMA-1 protects mice against infection with Plasmodium chabaudi.* Vaccine, 1998. **16**(2-3): p. 240-7.
82. Hodder, A.N., et al., *The disulfide bond structure of Plasmodium apical membrane antigen-1.* The Journal of biological chemistry, 1996. **271**(46): p. 29446-52.
83. Peterson, M.G., et al., *Integral membrane protein located in the apical complex of Plasmodium falciparum.* Molecular and cellular biology, 1989. **9**(7): p. 3151-4.
84. Narum, D.L. and A.W. Thomas, *Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of Plasmodium falciparum merozoites.* Mol Biochem Parasitol, 1994. **67**(1): p. 59-68.
85. Mitchell, G.H., et al., *Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells.* Infection and immunity, 2004. **72**(1): p. 154-8.
86. Florens, L., et al., *A proteomic view of the Plasmodium falciparum life cycle.* Nature, 2002. **419**(6906): p. 520-6.

87. Silvie, O., et al., *A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by Plasmodium falciparum sporozoites.* The Journal of biological chemistry, 2004. **279**(10): p. 9490-6.
88. Remarque, E.J., et al., *Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review.* Trends in parasitology, 2008. **24**(2): p. 74-84.
89. Collins, C.R., et al., *An inhibitory antibody blocks interactions between components of the malarial invasion machinery.* PLoS pathogens, 2009. **5**(1): p. e1000273.
90. Takala, S.L., et al., *Short report: rare Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 19-kda (msp-1(19)) haplotypes identified in Mali using high-throughput genotyping methods.* The American journal of tropical medicine and hygiene, 2007. **76**(5): p. 855-9.
91. Cortes, A., et al., *Allele specificity of naturally acquired antibody responses against Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1.* Infection and immunity, 2005. **73**(1): p. 422-30.
92. Polley, S.D., et al., *Human antibodies to recombinant protein constructs of Plasmodium falciparum Apical Membrane Antigen 1 (AMA1) and their associations with protection from malaria.* Vaccine, 2004. **23**(5): p. 718-28.
93. Hodder, A.N., P.E. Crewther, and R.F. Anders, *Specificity of the protective antibody response to apical membrane antigen 1.* Infection and immunity, 2001. **69**(5): p. 3286-94.
94. Kocken, C.H., et al., *High-level expression of the malaria blood-stage vaccine candidate Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 and induction of antibodies that inhibit erythrocyte invasion.* Infection and immunity, 2002. **70**(8): p. 4471-6.
95. Healer, J., et al., *Allelic polymorphisms in apical membrane antigen-1 are responsible for evasion of antibody-mediated inhibition in Plasmodium falciparum.* Molecular microbiology, 2004. **52**(1): p. 159-68.
96. Genton, B., et al., *A recombinant blood-stage malaria vaccine reduces Plasmodium falciparum density and exerts selective pressure on parasite populations in a phase 1-2b trial in Papua New Guinea.* The Journal of infectious diseases, 2002. **185**(6): p. 820-7.
97. Conway, D.J., et al., *A principal target of human immunity to malaria identified by molecular population genetic and immunological analyses.* Nature medicine, 2000. **6**(6): p. 689-92.
98. Ferreira, M.U., et al., *Sequence diversity and evolution of the malaria vaccine candidate merozoite surface protein-1 (MSP-1) of Plasmodium falciparum.* Gene, 2003. **304**: p. 65-75.
99. Woehlbier, U., et al., *Analysis of antibodies directed against merozoite surface protein 1 of the human malaria parasite Plasmodium falciparum.* Infection and immunity, 2006. **74**(2): p. 1313-22.
100. Holder, A.A. and M.J. Blackman, *What is the function of MSP-I on the malaria merozoite?* Parasitology today, 1994. **10**(5): p. 182-4.
101. Holder, A.A., et al., *Merozoite surface protein 1, immune evasion, and vaccines against asexual blood stage malaria.* Parassitologia, 1999. **41**(1-3): p. 409-14.

102. Ferreira, M.U., et al., *The IgG-subclass distribution of naturally acquired antibodies to Plasmodium falciparum, in relation to malaria exposure and severity.* Annals of tropical medicine and parasitology, 1998. **92**(3): p. 245-56.
103. Happi, C.T., et al., *Molecular analysis of Plasmodium falciparum recrudescent malaria infections in children treated with chloroquine in Nigeria.* The American journal of tropical medicine and hygiene, 2004. **70**(1): p. 20-6.
104. Takala, S., et al., *Evidence for intragenic recombination in Plasmodium falciparum: identification of a novel allele family in block 2 of merozoite surface protein-1: Asembo Bay Area Cohort Project XIV.* Molecular and biochemical parasitology, 2002. **125**(1-2): p. 163-71.
105. Tanabe, K., et al., *Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite Plasmodium falciparum.* Journal of molecular biology, 1987. **195**(2): p. 273-87.
106. Lockyer, M.J., et al., *Immunogenicity of a hybrid Plasmodium falciparum malaria antigen.* Parasitology, 1993. **106 (Pt 5)**: p. 451-7.
107. Blackman, M.J., et al., *A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies.* J Exp Med, 1990. **172**(1): p. 379-82.
108. Holder, A.A., et al., *A malaria merozoite surface protein (MSP1)-structure, processing and function.* Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 1992. **87 Suppl 3**: p. 37-42.
109. Nwuba, R.I., et al., *The human immune response to Plasmodium falciparum includes both antibodies that inhibit merozoite surface protein 1 secondary processing and blocking antibodies.* Infection and immunity, 2002. **70**(9): p. 5328-31.
110. Guevara Patino, J.A., et al., *Antibodies that inhibit malaria merozoite surface protein-1 processing and erythrocyte invasion are blocked by naturally acquired human antibodies.* The Journal of experimental medicine, 1997. **186**(10): p. 1689-99.
111. Egan, A.F., et al., *Clinical immunity to Plasmodium falciparum malaria is associated with serum antibodies to the 19-kDa C-terminal fragment of the merozoite surface antigen, PfMSP-1.* J Infect Dis, 1996. **173**(3): p. 765-9.
112. John, C.C., et al., *Evidence that invasion-inhibitory antibodies specific for the 19-kDa fragment of merozoite surface protein-1 (MSP-1 19) can play a protective role against blood-stage Plasmodium falciparum infection in individuals in a malaria endemic area of Africa.* Journal of immunology, 2004. **173**(1): p. 666-72.
113. Riley, E.M., et al., *Naturally acquired cellular and humoral immune responses to the major merozoite surface antigen (PfMSP1) of Plasmodium falciparum are associated with reduced malaria morbidity.* Parasite Immunol, 1992. **14**(3): p. 321-37.
114. Egan, A.F., et al., *Human antibodies to the 19kDa C-terminal fragment of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 inhibit parasite growth in vitro.* Parasite Immunol, 1999. **21**(3): p. 133-9.
115. O'Donnell, R.A., et al., *Antibodies against merozoite surface protein (MSP)-1(19) are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria.* J Exp Med, 2001. **193**(12): p. 1403-12.

116. Kumar, S., et al., *Immunogenicity and efficacy in aotus monkeys of four recombinant Plasmodium falciparum vaccines in multiple adjuvant formulations based on the 19-kilodalton C terminus of merozoite surface protein 1.* Infect Immun, 2000. **68**(4): p. 2215-23.
117. Keitel, W.A., et al., *Phase I trial of two recombinant vaccines containing the 19kd carboxy terminal fragment of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 (msp-1(19)) and T helper epitopes of tetanus toxoid.* Vaccine, 1999. **18**(5-6): p. 531-9.
118. Sim, B.K., et al., *Plasmodium falciparum: further characterization of a functionally active region of the merozoite invasion ligand EBA-175.* Experimental parasitology, 1994. **78**(3): p. 259-68.
119. Peek, L.J., et al., *A systematic approach to stabilizing EBA-175 RII-NG for use as a malaria vaccine.* Vaccine, 2006. **24**(31-32): p. 5839-51.
120. Mamillapalli, A., et al., *Sequence polymorphisms in the receptor-binding domain of Plasmodium falciparum EBA-175: implications for malaria vaccine development.* Mol Biochem Parasitol, 2006. **146**(1): p. 120-3.
121. Liang, H. and B.K. Sim, *Conservation of structure and function of the erythrocyte-binding domain of Plasmodium falciparum EBA-175.* Mol Biochem Parasitol, 1997. **84**(2): p. 241-5.
122. Jones, T.R., et al., *Protection of Aotus monkeys by Plasmodium falciparum EBA-175 region II DNA prime-protein boost immunization regimen.* J Infect Dis, 2001. **183**(2): p. 303-312.
123. Sim, B.K., et al., *Induction of biologically active antibodies in mice, rabbits, and monkeys by Plasmodium falciparum EBA-175 region II DNA vaccine.* Mol Med, 2001. **7**(4): p. 247-54.
124. Adams, J.H., et al., *A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(15): p. 7085-9.
125. Aravind, L., et al., *Plasmodium biology: genomic gleanings.* Cell, 2003. **115**(7): p. 771-85.
126. Richards, J.S., et al., *Association between naturally acquired antibodies to erythrocyte-binding antigens of Plasmodium falciparum and protection from malaria and high-density parasitemia.* Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 2010. **51**(8): p. e50-60.
127. Ferreira, M.U. and D.L. Hartl, *Plasmodium falciparum: worldwide sequence diversity and evolution of the malaria vaccine candidate merozoite surface protein-2 (MSP-2).* Experimental parasitology, 2007. **115**(1): p. 32-40.
128. Kang, J.M., et al., *Genetic polymorphism of merozoite surface protein-1 and merozoite surface protein-2 in Plasmodium falciparum field isolates from Myanmar.* Malaria journal, 2010. **9**: p. 131.
129. Lawrence, G., et al., *Effect of vaccination with 3 recombinant asexual-stage malaria antigens on initial growth rates of Plasmodium falciparum in non-immune volunteers.* Vaccine, 2000. **18**(18): p. 1925-31.
130. Saul, A., et al., *Protective immunization with invariant peptides of the Plasmodium falciparum antigen MSA2.* J Immunol, 1992. **148**(1): p. 208-11.
131. WHO, *Portfolio of candidate malaria vaccines currently in development*, 2005.

132. Malik, A., et al., *Human cytotoxic T lymphocytes against the Plasmodium falciparum circumsporozoite protein.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(8): p. 3300-4.
133. Gordon, D.M., et al., *Safety, immunogenicity, and efficacy of a recombinantly produced Plasmodium falciparum circumsporozoite protein-hepatitis B surface antigen subunit vaccine.* J Infect Dis, 1995. **171**(6): p. 1576-85.
134. Bojang, K.A., et al., *Efficacy of RTS,S/AS02 malaria vaccine against Plasmodium falciparum infection in semi-immune adult men in The Gambia: a randomised trial.* Lancet, 2001. **358**(9297): p. 1927-34.
135. Alonso, P.L., et al., *Duration of protection with RTS,S/AS02A malaria vaccine in prevention of Plasmodium falciparum disease in Mozambican children: single-blind extended follow-up of a randomised controlled trial.* Lancet, 2005. **366**(9502): p. 2012-8.
136. Gilbert, S.C., et al., *A protein particle vaccine containing multiple malaria epitopes.* Nat Biotechnol, 1997. **15**(12): p. 1280-4.
137. Moorthy, V.S., et al., *A randomised, double-blind, controlled vaccine efficacy trial of DNA/MVA ME-TRAP against malaria infection in Gambian adults.* PLoS Med, 2004. **1**(2): p. e33.
138. Thomas, A.W., L.H. Bannister, and A.P. Waters, *Sixty-six kilodalton-related antigens of Plasmodium knowlesi are merozoite surface antigens associated with the apical prominence.* Parasite Immunol, 1990. **12**(2): p. 105-13.
139. Cortes, A., et al., *Geographical structure of diversity and differences between symptomatic and asymptomatic infections for Plasmodium falciparum vaccine candidate AMA1.* Infect Immun, 2003. **71**(3): p. 1416-26.
140. Duffy, P.E. and D.C. Kaslow, *A novel malaria protein, Pfs28, and Pfs25 are genetically linked and synergistic as falciparum malaria transmission-blocking vaccines.* Infect Immun, 1997. **65**(3): p. 1109-13.
141. Rose-Wood, A., et al., *Trends in malaria morbidity among health care-seeking children under age five in Mopti and Sevare, Mali between 1998 and 2006.* Malaria journal, 2010. **9**: p. 319.
142. Dolo, A., et al., *Difference in susceptibility to malaria between two sympatric ethnic groups in Mali.* Am J Trop Med Hyg, 2005. **72**(3): p. 243-8.
143. Baber, I., et al., *Population size and migration of Anopheles gambiae in the Bancoumana Region of Mali and their significance for efficient vector control.* PloS one, 2010. **5**(4): p. e10270.
144. Higgins, T.N., A. Khajuria, and M. Mack, *Quantification of HbA(2) in patients with and without beta-thalassemia and in the presence of HbS, HbC, HbE, and HbD Punjab hemoglobin variants: comparison of two systems.* American journal of clinical pathology, 2009. **131**(3): p. 357-62.
145. Munoz, M., et al., *Utility of point-of-care haemoglobin measurement in the HemoCue-B haemoglobin for the initial diagnosis of anaemia.* Clinical and laboratory haematology, 2005. **27**(2): p. 99-104.
146. Miura, K., et al., *Development and characterization of a standardized ELISA including a reference serum on each plate to detect antibodies induced by experimental malaria vaccines.* Vaccine, 2008. **26**(2): p. 193-200.

147. Escalante, A.A., A.A. Lal, and F.J. Ayala, *Genetic polymorphism and natural selection in the malaria parasite Plasmodium falciparum.* Genetics, 1998. **149**(1): p. 189-202.
148. Greenwood, B.M., et al., *Mortality and morbidity from malaria among children in a rural area of The Gambia, West Africa.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 1987. **81**(3): p. 478-86.
149. Holder, A.A., *The carboxy-terminus of merozoite surface protein 1: structure, specific antibodies and immunity to malaria.* Parasitology, 2009. **136**(12): p. 1445-56.
150. Kawabata, Y., et al., *Merozoite surface protein 1-specific immune response is protective against exoerythrocytic forms of Plasmodium yoelii.* Infection and immunity, 2002. **70**(11): p. 6075-82.
151. Wang, Q., et al., *Transcriptome of axenic liver stages of Plasmodium yoelii.* Molecular and biochemical parasitology, 2004. **137**(1): p. 161-8.
152. Kumar, S., et al., *Immunogenicity and in vivo efficacy of recombinant Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 in Aotus monkeys.* Molecular medicine, 1995. **1**(3): p. 325-32.
153. Dodoo, D., et al., *Cohort study of the association of antibody levels to AMA1, MSP119, MSP3 and GLURP with protection from clinical malaria in Ghanaian children.* Malaria journal, 2008. **7**: p. 142.
154. Egan, A., et al., *Characterization of human T- and B-cell epitopes in the C terminus of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1: evidence for poor T-cell recognition of polypeptides with numerous disulfide bonds.* Infection and immunity, 1997. **65**(8): p. 3024-31.
155. Huaman, M.C., et al., *Ex vivo cytokine and memory T cell responses to the 42-kDa fragment of Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 in vaccinated volunteers.* Journal of immunology, 2008. **180**(3): p. 1451-61.
156. Goodman, A.L., et al., *New candidate vaccines against blood-stage Plasmodium falciparum malaria: prime-boost immunization regimens incorporating human and simian adenoviral vectors and poxviral vectors expressing an optimized antigen based on merozoite surface protein 1.* Infection and immunity, 2010. **78**(11): p. 4601-12.
157. Modiano, D., et al., *Different response to Plasmodium falciparum malaria in west African sympatric ethnic groups.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(23): p. 13206-11.
158. Modibo, C., *Reponse humorale anti AMA-1 et anti MSP-1 de deux groupes ethniques vivant en sympatrie dans la région de Mopti* in *FMPOS*2004, Université de Bamako: Bamako. p. 76.
159. Bolad, A., et al., *Distinct interethnic differences in immunoglobulin G class/subclass and immunoglobulin M antibody responses to malaria antigens but not in immunoglobulin G responses to nonmalarial antigens in sympatric tribes living in West Africa.* Scandinavian journal of immunology, 2005. **61**(4): p. 380-6.
160. Kwiatkowski, D.P. and G. Luoni, *Host genetic factors in resistance and susceptibility to malaria.* Parassitologia, 2006. **48**(4): p. 450-67.
161. Vafa, M., et al., *Impact of the IL-4 -590 C/T transition on the levels of Plasmodium falciparum specific IgE, IgG, IgG subclasses and total IgE in two*

sympatric ethnic groups living in Mali. Microbes and infection / Institut Pasteur, 2009. **11**(8-9): p. 779-84.
162. Luoni, G., et al., *Antimalarial antibody levels and IL4 polymorphism in the Fulani of West Africa.* Genes and immunity, 2001. **2**(7): p. 411-4.
163. Osier, F.H., et al., *Breadth and magnitude of antibody responses to multiple Plasmodium falciparum merozoite antigens are associated with protection from clinical malaria.* Infect Immun, 2008. **76**(5): p. 2240-8.
164. Kinyanjui, S.M., et al., *Kinetics of antibody responses to Plasmodium falciparum-infected erythrocyte variant surface antigens.* J Infect Dis, 2003. **187**(4): p. 667-74.
165. Biswas, S., D. Tomar, and D.N. Rao, *Investigation of the kinetics of histidine-rich protein 2 and of the antibody responses to this antigen, in a group of malaria patients from India.* Ann Trop Med Parasitol, 2005. **99**(6): p. 553-62.
166. Ferreira, M.U., et al., *The isotype composition and avidity of naturally acquired anti-Plasmodium falciparum antibodies: differential patterns in clinically immune Africans and Amazonian patients.* Am J Trop Med Hyg, 1996. **55**(3): p. 315-23.
167. Miura, K., et al., *Anti-apical-membrane-antigen-1 antibody is more effective than anti-42-kilodalton-merozoite-surface-protein-1 antibody in inhibiting plasmodium falciparum growth, as determined by the in vitro growth inhibition assay.* Clinical and vaccine immunology : CVI, 2009. **16**(7): p. 963-8.
168. Miura, K., et al., *Immunological responses against Plasmodium falciparum Apical Membrane Antigen 1 vaccines vary depending on the population immunized.* Vaccine, 2011. **29**(12): p. 2255-61.
169. Pacheco, M.A., et al., *A comparative study of the genetic diversity of the 42kDa fragment of the merozoite surface protein 1 in Plasmodium falciparum and P. vivax.* Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases, 2007. **7**(2): p. 180-7.
170. Tanabe, K., et al., *Selection and genetic drift of polymorphisms within the merozoite surface protein-1 gene of Plasmodium falciparum.* Gene, 2000. **241**(2): p. 325-31.
171. Polley, S.D. and D.J. Conway, *Strong diversifying selection on domains of the Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 gene.* Genetics, 2001. **158**(4): p. 1505-12.
172. Hughes, A.L., *Circumsporozoite protein genes of malaria parasites (Plasmodium spp.): evidence for positive selection on immunogenic regions.* Genetics, 1991. **127**(2): p. 345-53.
173. Weedall, G.D., et al., *Differential evidence of natural selection on two leading sporozoite stage malaria vaccine candidate antigens.* International journal for parasitology, 2007. **37**(1): p. 77-85.
174. Miller, L.H., et al., *Analysis of sequence diversity in the Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 (MSP-1).* Molecular and biochemical parasitology, 1993. **59**(1): p. 1-14.
175. Egan, A.F., et al., *Serum antibodies from malaria-exposed people recognize conserved epitopes formed by the two epidermal growth factor motifs of MSP1(19), the carboxy-terminal fragment of the major merozoite surface protein of Plasmodium falciparum.* Infection and immunity, 1995. **63**(2): p. 456-66.

176. Shi, Y.P., et al., *Natural immune response to the C-terminal 19-kilodalton domain of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1*. Infection and immunity, 1996. **64**(7): p. 2716-23.
177. Qari, S.H., et al., *Predicted and observed alleles of Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 (MSP-1), a potential malaria vaccine antigen.* Molecular and biochemical parasitology, 1998. **92**(2): p. 241-52.
178. Sakihama, N., et al., *Allelic recombination and linkage disequilibrium within Msp-1 of Plasmodium falciparum, the malignant human malaria parasite.* Gene, 1999. **230**(1): p. 47-54.
179. Angov, E., et al., *Development and pre-clinical analysis of a Plasmodium falciparum Merozoite Surface Protein-1(42) malaria vaccine.* Molecular and biochemical parasitology, 2003. **128**(2): p. 195-204.
180. Chenet, S.M., et al., *Genetic diversity of vaccine candidate antigens in Plasmodium falciparum isolates from the Amazon basin of Peru.* Malaria journal, 2008. **7**: p. 93.
181. Ogutu, B.R., et al., *Blood stage malaria vaccine eliciting high antigen-specific antibody concentrations confers no protection to young children in Western Kenya.* PloS one, 2009. **4**(3): p. e4708.

Fiche signalétique

Nom: **COULIBALY** ***Prénom:*** Ismaïla
Nationalité: Malienne ***Date de soutenance****:* 2011
Ville de soutenance: Bamako

Titre: Réponse humorale aux antigènes candidats vaccins de *P. falciparum* chez les adultes maliens.

Lieu de dépôt: Bibliothèque de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie.

- **Secteur d'intérêt:** Parasitologie, Santé publique, Immunologie

Résumé:

L'objectif général de cette étude était de mieux comprendre l'immunité naturellement acquise contre le paludisme et de contribuer au développement de vaccins rationnels. Nous avons mesuré le taux des anticorps antigènes candidats vaccins de *P. falciparum* chez 93 adultes Malinké, Peulh et Dogon. Nous avons trouvé que le taux moyen d'anticorps en Unité Elisa était de 3250,73 pour l'anti-EBA175, 482,88 pour l'anti-MSP1, 2036,89 pour l'anti-AMA1 et 1333,68 pour l'anti-MSP2. Le taux moyen des anticorps anti-AMA-1-3D7 et anti-MSP2-257 était similaire chez les 3 groupes ethniques. Par contre, la médiane du taux des anticorps anti-MSP-1 était statistiquement plus élevé chez les Malinké comparée aux Dogon (P= 0.0158). En évaluant l'impact des sérums de ces adultes sur la croissance de *P. falciparum in-vitro* nous avons observé que les sérums induisaient une inhibition de la croissance allant de -12% à 90% avec un taux moyen d'inhibition de 23,32%. Le taux des anticorps était positivement corrélé à l'âge et l'inhibition de la croissance était significativement corrélée avec le taux des 4 anticorps mesurés dans les sérums (P<0.001).

Mots clés : Anticorps, AMA1, MSP-1, EBA175, MSP2-257, Adulte, Mali

Summary

Antibody response to vaccine candidate antigens of P. falciparum in Malian adults

Our objective in this study was to evaluate the acquisition of natural humoral immunity in three Malian adults living in malaria endemic area of Bancoumana and Mopti. The plasma samples were collected during the transmission season in 93 adults Malinke, Fulani and Dogon. Antibody response against 4 parasite blood-stage antigens (AMA1, MSP1, MSP2, and EBA175) in each sample was tested using a standardized ELISA.

We found that the average antibody ELISA units was 3250.73 for anti-EBA175, 482.88 for anti-MSP1, 2036.89 to 1333.68 and anti-AMA1 for anti-MSP2. The average rate of anti-AMA-1-3D7 and anti-MSP2-257 was similar among the 3 ethnic groups. For cons, the median rate of anti-MSP-1 was statistically higher among the Malinke compared to the Dogon ($P = 0.0158$). We assessed the impact of the sera of these adults on the growth of *P. falciparum in-vitro*. We observed that sera induced inhibition of growth ranging from -12% to 90% with an average rate of inhibition of 23.32%. The antibody levels were positively correlated with age and growth inhibition was significantly correlated with the rate of 4 antibodies measured in sera ($P < 0.001$).

The rationale for the use of different ethnic analysis to identify specific parts of the malaria antigens in a more positive natural selection is based on the desire to identify antigens that are more immunogenic in the hope of obtaining information that can guide the design of vaccines and provide an overview of the evolution of antigenic proteins. These results are useful for advancing the development of vaccines. Further prospective studies involving a larger number of key antigens and adults from different epidemiological settings and different ethnic backgrounds are greatly needed to ensure the generalization of our results.

Key words: Merozoite antigens, antibodies, growth inhibition Assay, adult, Mali

9. Annexes

9.1. Détermination du Taux d'hémoglobine

Le taux d'hémoglobine a été mesuré par l'appareil HemoCue Hb201+
Microcuvette

Figure 18: Analyseur et Microcuvette HemoCue
Source: Photo prise à Kenieroba

- Principe de la méthode

La réaction dans la microcuvette repose sur une réaction modifiée de formation d'azoture de méthémoglobine. Les érythrocytes sont hémolysés pour libérer l'hémoglobine. L'hémoglobine est convertie en méthémoglobine, laquelle réagit avec de l'azoture pour donner de l'azoture de méthémoglobine dont l'absorbance est mesurée dans l'analyseur. Cette absorbance est directement proportionnelle à la concentration de l'Hb.

- Matériel et réactifs

-Appareil analyseur
-Microcuvette HemoCue
-Lancette
-Alcool 70º
-Coton

- Technique

-Cibler un doigt, bien désinfecté avec le tampon d'alcool à 70º;
-Piquer en un coup sec avec une lancette ; nettoyer la première goutte de sang, presser le bout du doigt pour avoir une deuxième goutte;

- Appliquer la microcuvette sur la goutte de sang. La quantité nécessaire est aspirée automatiquement dans la microcuvette par capillarité.
-Après avoir enlevé minutieusement toute trace de sang présente à la surface de la microcuvette, la mettre sur son support et l'insérer ensuite dans le photomètre
Le résultat s´affiche automatiquement en 45-60 secondes.

9.2. Détermination du Taux d'anticorps

Le dosage des anticorps a été effectué par la technique de l'ELISA

. Matériels et réactifs

Matériels

- Machine de lavage des plaques d'ELISA
- Lecteur de microplaque
- Aspirateur électrique
- Agitateur Magnétique muni de deux systèmes de chauffage
- Micropipette multicanale 50-300µl
- Micropipette multicanale 5-50µl
- Micropipette 2 µl
- Micropipette, 20 µl
- Micropipette 200 µl
- Micropipette, 1000 µl
- Microplaque à fond plat
- Plaques de dilution ELISA 2ml
- Basin de solution pour les micropipettes multicanales
- Embout de micropipettes jetables de 1000µl, 200µl, 2Oµl ,10µl ,2µl
- Flacon Erlenmeyer stérile jetable 250 ml,
- Tubes coniques jetables avec bouchon à vis stériles de 50 ml et 15 ml
- Tubes coniques jetables avec bouchon à vis stériles de 150 ml
- Filtre de stérilisation à usage unique : unités 0,2µm et 150ml
- Filtre de stérilisation à usage unique 0,2µm et 500ml
- Tube Eppendorf de 1,5 ml
- Bars magnétiques
- Feuille d'aluminium
- Mouchoirs de nettoyage jetable
- Eprouvettes graduées à 100ml, 500ml et 1000ml
- gants Stériles
- Chronomètre approprié pour mesurer 20 min à 2 heures d'intervalle

Réactifs

- Antigène de revêtement.
- Sérum standard (Ex : 1/1000)
- Carbonate de Sodium

- Bicarbonate de sodium
- Trinitride de sodium (N3Na)
- Eau distillée
- Lait
- Solution tampon Tris (TBS) 10X
- Comprimées de substrat pour la Phosphatase104.
- Tween-20
- Glycérol ultra pur,
- Anticorps de chèvre anti-IgG humain marqué avec la Phosphatase alcaline

Solutions préparées:

- Tampon de revêtement (10X): (Carbonate de Sodium 0.15M + Bicarbonate de sodium 0.35M), pH = 9,6,

Pour préparer 1000 ml de tampon de revêtement (10X), dissoudre 15.74g du carbonate de sodium $(Na)_2CO_3$ et 29.4g de bicarbonate de sodium (NaHCO3) dans 1000 ml d'eau distillée

NB: pour préparer une solution 1X à partir d'une solution 10X mélangez 100ml de solution 10X et 900 ml d'eau distillée.

- Tampon de lavage: 0,1% de Tween-TBS.

Pour 1000 ml de tampon de lavage, mélangez 100 ml TBS (10x), 900 ml eau distillée et 1ml de Tween-20. Mélanger avec un agitateur magnétique pendant au moins 20 min à température ambiante avant l'utilisation.

- Tampon de Dilution / Blocage: 5% de lait dans du TBS (1X).

Pour préparer 300 ml de Tampon de dilution/blocage, mélangez 15g lait écrémé en poudre et 300 ml de TBS (1X) dans un Erlenmeyer sur l'agitateur magnétique pendant 20 minutes ou jusqu'à dissolution complète. Conserver à 4°C pour un maximum de cinq jours. Facultatif: 1) faire des aliquotes de 50 ml pour préparer du blocage / tampon dilution et conserver à-20C°. 2) Ajoutez le Trinitride de Sodium (0,01% final) au tampon de Dilution/ de la manière suivante et le lait peut être stocké pendant 2 à 3 semaines.

Pour obtenir le tampon de dilution/ blocage (1x) au Trinitride de Sodium (0,01%): mélangez 500 ml de tampon Dilution/ blocage (1X) et 2,5 ml de Trinitride de Sodium à 2%. Le tampon de Dilution/ Blocage (1X) au Trinitride de Sodium doit être gardé dans l'obscurité.

- Glycérol (50%) pour la dilution secondaire des anticorps: mélangez 5 ml glycérol (100%) et 5 ml d'eau distillée. Stérilisez par filtration et le gardez en aliquotes de 1,5 ml à -20ºC
- Solution d'anticorps secondaire:

NB: Les lyophilisés des anticorps secondaires sont reconstitués à 1 mg/ml avec 50% dans du glycérol (50%) et stockés à -20°C

Mélangez 10µl de la solution d'anticorps secondaires marqués avec de la phosphatase

alcaline (1mg/ml) avec 10 ml de tampon de Dilution/ Blocage (1X). Cette solution peut être préparée pendant que les plaques sont en incubation avec les anticorps primaires.
- Solution de substrat.
Pour 10 ml de solution de substrat, dissoudre 2 comprimés de substrat Phosphatase dans du tampon de revêtement (1X). Utilisez 10 ml de solution de substrat par plaque. Cette solution doit être préparée juste avant la fin de l'incubation avec les anticorps secondaires.

. Procédures

Revêtement des plaques avec l'antigène

NB: Les plaques revêtues avec l'antigène doivent être conservées à 4ºC et doivent être utilisées dans un délai d'une semaine.
- Identifiez chaque plaque avec le nom de l'antigène et la date de revêtement avec un marqueur indélébile sur le côté de la plaque.
- Le revêtement de chaque plaque nécessite 10 ml de solution de revêtement. Déterminez le volume total de solution de revêtement nécessaire pour revêtir le nombre de plaques utilisées.
- Diluez l'antigène de revêtement dans le tampon de revêtement (1X) à une concentration de 1µg/ml dans un tube de 50 ml ou un Erlenmeyer de 250 ml. La dilution souhaitée de l'antigène est déterminée par la concentration de la solution mère d'antigène.
- Mélangez la solution en retournant le tube ou le flacon, puis versez la solution dans le basin de solution pour micropipette multicanale.
- En utilisant une micropipette multicanale, mettre chaque puits 100 µl de la solution de revêtement.
- Empilez soigneusement les plaques en utilisant une plaque vide comme fermeture de l'autre et les enveloppez dans une pellicule en plastique ou en aluminium. Laissez les plaques pendant au moins une nuit au réfrigérateur à 4°C.

Plaques de blocage

- Prenez un nombre désiré de plaques du réfrigérateur. Marquez chaque plaque avec un marqueur indélébile.
- Lavez les plaques à l'aide de la machine de lavage des plaques ELISA. Prenez soin de s'assurer que les plaques ne sont pas complètement séchées avant d'ajouter le tampon de blocage.
- A l'aide d'une pipette multicanale, mettez dans chaque puits 200µl de tampon de blocage et de placer les plaques dans la chambre humidifiée ou les couvrir d'une pellicule en plastique et laissez pendant 2 heures 15min à la température ambiante.
- Lavez les plaques. Remplissez les plaques avec le tampon de lavage si les anticorps primaires ne sont pas prêts à être appliqués immédiatement.
- Mettez les plaques dans une chambre humidifiée jusqu'à ce que les anticorps primaires soient prêts à être appliqués

.

Préparation des sérums à tester et préparation des plaques.

NB: 24 sérums en triple exemplaire à une seule dilution peuvent être testés sur une plaque.

Sérum standard de dilution.

NB: une série de dilution en double exemplaire, des sérums de référence sont inclus dans chaque plaque d'ELISA.

Application des anticorps primaire (sérums).

- Veillez à ce que toutes les plaques revêtues, les plaques de dilution des sérums test et plaques de sérums standard sont disponibles et à la température ambiante. Réglez le volume de deux pipettes (STANDARD et TEST) multicanales 50-300µl à 100µl
- Réglez le chronomètre à 2 heures. Utilisez autant de chronomètre que de plaques ELISA utilisées pour le dosage.
- A l'aide de la pipette multicanale TEST, mélangez le contenu des puits de la ligne A de la plaque de dilution et ensuite transférez 100µl dans les puits de la ligne A de la plaque ELISA correspondante. Ne changez pas d'embout, utilisez le même embout pour l'ensemble des trois rangées A, B et C. Mélangez le contenu des puits de la ligne B de la plaque de dilution et transférez 100µl dans les puits de la ligne B de la plaque ELISA correspondante. Mélangez le contenu des puits de la ligne C de la plaque de dilution et transférez 100µl dans les puits de la ligne C de la plaque ELISA correspondante.
- Changez les embouts. A l'aide de la pipette multicanale "TEST", mélangez le contenu des puits de la ligne D de la plaque de dilution et ensuite transférez 100µl dans les puits de la ligne D de la plaque ELISA correspondante. Ne changez pas d'embouts, utilisez les mêmes embouts pour l'ensemble des trois rangées D, E et F. Changez les embouts, mélangez le contenu de la ligne G de la plaque de dilution et ensuite transférez 100µl de la ligne E de la plaque ELISA correspondante. Mélangez le contenu de la ligne H de la plaque de dilution et ensuite transférez 100µl dans les puits de la ligne F de la plaque ELISA correspondante.
- Lorsque 6 lignes de la première plaque ELISA ont été pourvues en utilisant la micropipette "STANDARD" et en prenant soin que la pipette est toujours utilisée dans la même orientation, transférez 100µl d'une rangée de la plaque de dilution standard à la ligne G de la plaque ELISA. Sans changez d'embouts, transférez 100µl des puits de la ligne suivante de la plaque de dilution standard aux puits de la ligne H de la plaque ELISA.
- Premier démarrage du chronomètre et mettre la plaque ELISA dans une chambre humide.
- Le temps d'incubation des sérums (anticorps primaires) est de 2 heures à la température ambiante.

Lavage et application des anticorps secondaires.

- Pendant l'incubation avec les anticorps primaires, réorganisez les plaques dans la

chambre humide de sorte que la première plaque soit plus accessible, la seconde suivante etc.. Préparez les anticorps secondaires. Veiller à ce que la machine de lavage des plaques soit allumée et qu'un volume suffisant de tampon de lavage soit préparé.

- A 2 heures commencez à laver la plaque,
- Dès que la plaque est lavée, réglez le chronomètre à 2 heures et ajouter 100µl de dilution des anticorps secondaires dans chaque puits en utilisant les micropipettes multicanale de 50-300µl. Démarrer le chronomètre
- Le temps d'incubation des anticorps secondaires est de 2 heures à la température ambiante.

Lavage et l'addition du substrat

- Pendant l'incubation avec un anticorps secondaire, au moins 30 minutes avant la fin de l'incubation, allumez le lecteur de la plaque ELISA. A 10 minutes avant la fin de l'incubation préparez la solution de substrat.
- A la fin de l'incubation (2 heures) commencez à laver la plaque ,
- Réglez le chronomètre à 20 minutes. Dès que la plaque est lavée, s'assurez vous que le fond de la plaque est propre (essuyer soigneusement avec un tissu si nécessaire). En utilisant une micropipette multicanale, ajouter 100µl de substrat par puits. Démarrez le chronomètre. Recouvrez la plaque avec du papier aluminium.

Lecture des plaques ELISA

- A la fin des 20 minutes, lisez la plaque à 405 nm sur SpectraMAX ELISA Reader. Le lecteur doit être programmé pour agiter la plaque pendant 5 secondes avant de lire.
- Enregistrer les données sous forme de fichier PDF

. Etablissement de la courbe standard d'Elisa :

Le titre du sérum en Unités Elisa était déterminé comme le facteur de dilution de la dilution du sérum donnant une densité optique à 405nm =1. Par exemple : si la dilution **1/1000** du sérum donne un DO_{405}=1, le titre du sérum est donc = **1000 Unité Elisa**.

9.3. Test d'inhibition de croissance

Matériels

Eau pure pour culture cellulaire
RPMI poudre
HEPES poudre
Hypoxanthine,
Bicarbonate de sodium 7,5% solution
Globules rouges de groupe sanguin O+
Albumax poudre
Gentamicine solution, 10 mg/mL,
Percoll, Amersham Pharmacia Biotech,
PBS 10X,
HCl Tris, pH 8.0,
Triton-X,
Diaphorase de Clostridium klyiveri,
Comprimé de Nitro Blue Tetrazolium, (10mg), Sigma
D-Sorbitol, Sigma
3-Acetylpyridine Adenine Dinucleotide (APAD), Sigma
L (+)-Lactic Acid, Sodium Salt,
Ethanol 70%
Solutions Préparées

- PBS 1X

Pour préparer 500 ml de PBS 1X, Mélangez 50 ml de PBS 10X avec 450 ml d'eau pure pour culture.

- Milieu incomplet de culture (MIC)

Pour préparer un litre de MIC, Prenez 1 litre d'eau pure pour culture et ajoutez un sachet de RPMI poudre (10.4g), 5,95 mg de HEPS poudre, et 0.05mg de Hypoxanthine. Filtrez le mélange après dissolution totale de l'HEPES et de l'Hypoxanthine. Le MIC peut être gardé à 4ºC pendant un mois.

- Milieu complet de culture à 10% Albumax (MC 1X)

Pour préparer 1 litre de MC, prenez 85 Ml de MIC et ajoutez 10g d'Albumax, 14 ml de Bicarbonate de Sodium et 1ml de gentamicine. Après dissolution totale de l'Albumax, filtrez la solution de MC. Elle peut être gardée à 4ºC pendant 14 jours.

- Milieu complet de culture à 20% Albumax, 2X bicarbonate de sodium, 2X gentamicine) (MC 2X)

Pour préparer 100 ml de CM 2X, prenez 75 ml de MIC, ajoutez 6.4 ml de bicarbonate de sodium 7,5%, 2 g d'albumax et 0,2 ml de Gentamicine

(10mg/ml) et il faut bien mélanger jusqu'à dissolution totale de l'albumax. Filtrez le MC 2X et il peut être gardé à 4ºC pendant 14 jours.

- Tampon du substrat pour LDH

Pour préparer 500 ml de tampon pour substrat de LDH, Mélangez 50 ml de Tris HCl (pH 8,0) et 450 ml d'eau pure pour culture. Ajoutez 2,8g de Sodium L-Lactate, Ajoutez 1,25 ml de Triton X-100. Mélangez bien avec l'agitateur magnétique à la température ambiante pendant au moins 30 minutes. Faites des aliquotes de 50 ml et les gardez à -20ºC

- Solution de Nitro Blue Tetrazolium (NBT)

Prenez 50 ml de tampon du substrat pour LDH du congélateur et le réchauffez à la température ambiante. Ajoutez un comprimé de NBT (10mg). Recouvrez avec du papier aluminium et attendre 15 minutes. Ne doivent être pas agités. Mélangez doucement, la solution préparée peut être gardée à 4ºC pendant 3 semaines à l'abri de la lumière.

- Solution mère du 3-Acetylpyridine Adenine Dinucleotide (APAD 10 mg/mL)

Pour préparer 10 ml de solution mère d'APAD, il faut dissoudre 100mg d'APAD dans 10ml de d'eau pure pour culture. Faites des aliquotes de 50ul dans des tube PCR et les gardez à -30ºC.

- Solution de mère de Diaphorase (50 unités/ml)

Pour préparer la solution mère de Diaphorase, il faut dissoudre dans un tube de 1500 unités de Diaphorase dans 30 ml d'eau pure pour culture. Gardez la solution mère à -3ºC.

- Solution à 65% de Percoll dans du PBS (doit être fraichement préparée)

Préparez d'abord une solution de Percoll à 90% dans du PBS en mélangeant 1 ml de PBS 10X et 9 ml de Percoll 100%. Pour préparer une solution de 65% de Percoll, mélangez 6,5ml de Percoll 90% et 2,5ml de PBS 1X.

- Solution de Sorbitol 5%

Pour préparer 100ml de solution de Sorbitol 5%, il faut dissoudre 5g de D-Sorbitol dans 100 ml d'eau pure pour culture. Filtrez la solution et faites des aliquotes de 50ml. La solution est gardée à la température ambiante.

Procédure

Synchronisation de la culture

- Faites croitre les parasites dans des flasques 37ºC, 5% CO2. Les parasites doivent être au stade de trophozoites matures ou schizontes juste avant la synchronisation. Préparez 65% Percoll solution.

- Mettez 5 ml de Percoll 65% dans un tube 15 ml stérile et le placez à 37ºc dans un bain marie pendant au moins 15 minutes avant utilisation.
- Centrifugez la suspension de culture contenant des trophozoites matures et des schizontes (150 – 200 µL de culot de GR dans 10 ml culture) pendant 4 minutes à 830g dans des tubes de 15ml.
- Aspirez le surnageant en laissant environ 1 ml de CM.
- Il faut resuspendre le culot avec une pipette de 2ml
- En utilisant une pipette de 2 ml, déposez doucement la suspension de culture sur le Percoll 65% dans un tube de 15 ml sans mélanger.
- Centrifugez à 1870 g pendant 5 minutes à la température ambiante
- Constatez la couche brune de schizontes et de trophozoites matures entre le CM et le Percoll.
- Aspirez doucement le CM au dessus de la couche brune en laissant approximativement 1 ml de CM
- Collectez dans un tube de 15 ml la couche brune en utilisant une pipette de 2 ml
- Ajouter environ 13 ml de CM dans le tube et mélangez doucement en inversant le tube.
- Centrifugez à 830 g pendant 4 minutes et aspirez le surnageant en laissant 1 à 2 ml de surnageant dans le tube (le culot est très fragile)
- Reprenez les deux dernières étapes.
- En fonction du volume du culot, ajoutez 200 à 600ul de globule rouge (50% ht) et complétez avec du CM de façon à obtenir une suspension de culture à 2 à 3 ht. Mettez la suspension dans un nouveau flasque.
- Approximativement 24 heures après la synchronisation, faites un traitement au sorbitol 5%
- Déterminez la parasitemie en faisant un frottis suivi d'une coloration Giemsa. Les parasites de la culture doivent être majoritairement des anneaux.

Préparation des globules rouges non infectés.

Les globules rouges non infectés sont lavés et resuspendus à 2% Ht pour les futures tests.

Préparation des échantillons pour le test.

- Avant le test, tous les sérums doivent être inactivés par chauffage à 56ºC dans un Bain marie pendant 20 minutes.
- Les sérums sont ensuite pré adsorbés sur les GR (Par exemple: Ajoutez 50ul de GR 50% Ht dans 1 ml de sérum à tester dans un tube. Mélangez et gardez à la

température ambiante pendant 1 heure. Apres 1 heure d'incubation, centrifugez pendant 10 minutes à 14000 t/min dans une centrifugeuse 5417C. Transférez doucement le surnageant dans un nouveau tube. Placez le tube dans le réfrigérateur à 4ºC et jetez les culots.

- 16 échantillons peuvent être testés en triplicata sur une plaque.

Préparation de la suspension de parasite pour le test d'inhibition de la croissance in vitro.

- Déterminez la parasitemie de la culture synchronisée. Les parasites doivent être au stage de trophozoites matures ou schizontes au moment de commencer le test.
- Le volume de culture nécessaire pour le test est de 3 ml pour une plaque (la culture doit être de 0,2 à 0.4% parasitemie et 2% Ht)
- Transférez la culture dans un tube stérile et centrifugez à 830 g pendant 4 minutes. Aspirez le surnageant et resuspenez le culot à 2% Ht avec du CM 2X
- Diluez la parasitemie de la culture à 0,2-0.3% avec le stock de GR (2% Ht dans du CM 2X)

Par exemple:

Ajoutez 6ml de GR non infectés (2% Ht) à 3ml de culture (1% Parasitemie et 2% Ht).

- Placez le tube contenant la culture pour le test à 37ºC.

Le test d'inhibition de la croissance

- L'hématocrite final dans chacun des tests doit être de 1%
- La parasitemie dans chacun des puits de la plaque au moment du test doit être le même (0,2 à 0.3%) sauf dans le contrôle contenant les GR seulement.
- Tous les échantillons sont contrôlés et ajoutés dans la plaque suivant le plan ci dessous.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O
B	H_2O	Pré-Immune GR non infecté Contrôle Négative	Pré-Immune GR Infectés Contrôle Positive	Echantillon #1	Echantillon #2	Echantillon #3	Echantillon #4	Echantillon #5	Echantillon #6	Pré-Immune GR Infecté Contrôle Positive	Pré-Immune GR non infecté Contrôle Négative	H_2O
C	H_2O											H_2O
D	H_2O											H_2O
E	H_2O	Echantillon #7	Echantillon #8	Echantillon #9	Echantillon #10	Echantillon #11	Echantillon #12	Echantillon #13	Echantillon #14	Echantillon #15	Echantillon #16	H_2O
F	H_2O											H_2O
G	H_2O											H_2O
H	*H_2O*	*H_2O*	*H_2O*	*H_2O*	*H_2O*	*H_2O*	*H_2O*	*H_2O*	*H_2O*	*H_2O*	*H_2O*	*H_2O*

- Remplissez les lignes B et G avec 20ul de chaque échantillon.
- Ajoutez 30µl de MI à tous les échantillons et 50µl de MI aux puits contenant les GR infectés et non infectés
- Mettez 50µl de la suspension de parasite (0,2 à 0,4% parasitemie à 2% Ht dans le CM 2X) dans chaque puit d'essai sauf les puits de contrôles négatifs seulement (B2-D2 et B11-D11)
- Ajoutez 50µl de suspension de GR non infecté (2%Ht dans les puits de contrôle négatifs seulement (B2-D2 et B11- D11)
- Remplissez les puits de bordure et tout autres puits non utilisés avec de l'eau (250ul/puits)
- Placez la plaque d'essai dans l'incubateur (37ºC, 5% CO_2, 5% O_2, 90%N_2)
- Après avoir fini la mise en place de l'essai, faites un frottis pour chaque échantillon (pour déterminer la parasitemie initiale).
- 40 à 42 heures après la mise en place de l'essai, arrêtez l'essai en retirant la plaque d'essai de la chambre de culture et en le plaçant à 4ºC. Remplissez les puits d'une autre plaque d'essai avec 250µl de PBS et le placez à 4ºC jusqu'au moment de l'utilisation.

- A l'aide d'une pipette multicanale, mélangez bien le contenu des puits de la plaque d'essai et transférez 50µl dans les puits correspondants de la plaque contenant le PBS 1X, refroidis à 4ºC.
- Centrifugez la plaque pendant 10 min à 1300g (4ºC)
- A l'aide d'une pipette multicanale, enlevez 240µl de surnageant de chaque puit sans perturber le culot.
- Transférez le contenu des puits de contrôle de GR infectés Pré-immunes positifs (B3-D3 et B10-D10) dans un tube eppendorf. Faites un frottis mince pour avoir la parasitemie de récolte.

Le test au LDH

NB: le NBT est photo sensible. Il faut donc éviter de l'exposer directement à la lumière.

- Préparez la solution de NBT dans le tampon LDH dans un tube et l'enveloppez avec du papier aluminium. Ramenez la solution à la température ambiante (10 ml par plaque).
- La plaque à traiter doit être à la température ambiante au moins 30 minutes avant le test.
- Préparez le substrat complet de LDH en mélangeant 50µl de la solution mère de 3-Acetylpyridine Adenine Dinucleotide (APAD et 200µl du stock de Diaphorase pour chaque plaque). Le substrat complet doit être immédiatement utilisé.
- Ajoutez 100µl de la solution complet de substrat dans chaque puit et attendre 10 à 15 minutes.
- Centrifugez la plaque brièvement à 1800g à la température ambiante pour éliminer les bulles d'air.
- Couvrez la plaque avec du papier aluminium et l'agitez doucement sur un agitateur plat à la température ambiante.
- Faites la lecture de la plaque à 650 nm au « SpectraMAX ELISA Reader » à 15 minutes et à 30 minutes.

Calcul

NB: Calculez la parasitemie dans les puits controles avant de calculer les pourcentages d'inhibition.

- Calculez le pourcentage d'inhibition en utilisant l'absorbance à 650nm donnée par le SpectraMAX ELISA Reader.

- Utilisez la formule suivante:

$$\% \text{ Inhibition} = 100\% - \frac{(\text{A650 Echantillon Immune - A650 GR seulement})}{(\text{A650 Echantillon Pré-immune control - A650 GR seulement})} \times 100$$

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et mes condisciples :

D'honorer ceux qui mon instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ;

En aucun cas, je ne consentirais à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels ;

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ! Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Je le jure !