

UNIVERSITÉ CHEIKH ANTA DIOP DE DAKARECOLE DOCTORALE

« Science de la vie, de la Santé et de l'Environnement » (ED-SEV)

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES



Année : 2020 N° d'ordre : 2019-26

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : GENETIQUE DES POPULATIONS

Présentée par :

BABACAR DIOUF

**Paramètres génétiques et immunologiques de l'infection
asymptomatique à *Plasmodium falciparum* dans un contexte
de faible prévalence du paludisme.**

Soutenue le 20 Juillet 2020

Devant le jury composé de :

Président :	M.	Alioune	DIEYE	Professeur Titulaire FMPO/UCAD
Rapporteurs :	M.	Malick	FALL	Professeur Assimilé FST/UCAD
	M.	Ibrahima	DIA	Directeur de Recherche (HDR) IPD
	M.	Babacar	MBENGUE	Professeur Assimilé FMPO/UCAD
Examineurs :	Mme	Aïda Sadikh	BADIANE	Professeur Assimilée FMPO/UCAD
	M.	Gora	DIOP	Maitre de conférences Titulaire FST/UCAD
Directeur de thèse :	M.	Mbacké	SEMBENE	Professeur Titulaire FST/UCAD

DEDICACE

الْحَمْدُ لِلَّهِ الَّذِي بِنِعْمَتِهِ تَتِمُّ الصَّالِحَاتُ

Nous témoignons notre reconnaissance à Allah dont le soutien permet de parachever les bonnes œuvres.

« Mon Seigneur met en place en toute douceur ce qu'Il veut. Et c'est Lui l'Omniscient, le Sage. Créateur des cieux et de la terre, Tu es mon protecteur, ici-bas et dans l'au-delà. Fais-moi mourir en parfaite soumission et fais-moi rejoindre les vertueux ».

« Ô Seigneur ! Inspire-moi pour que je rende grâce au bienfait dont Tu m'as comblé ainsi qu'à mes père et mère, et pour que je fasse une bonne oeuvre que Tu agréas. Et fais que ma postérité soit de moralité saine. Je me repens à Toi et je suis du nombre des Soumis »

« Seigneur, pardonne-nous, ainsi qu'à nos frères qui nous ont précédés dans la foi; et ne mets dans nos coeurs aucune rancœur pour ceux qui ont cru. Seigneur, Tu es Compatissant et Très Miséricordieux ».

« C'est Lui Allah. Nulle divinité autre que Lui, le Connaisseur de l'Invisible tout comme du visible.

C'est Lui, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux. C'est Lui, Allah. Nulle divinité autre que Lui; Le Souverain, Le Pur, L'Apaisant, Le Rassurant, Le Prédominant, Le Tout Puissant, Le Contraignant, Le Majestueux. Gloire à Allah ! Il transcende ce qu'ils Lui associent.

C'est Lui Allah, le Créateur, Celui qui donne un commencement à toute chose, le Formateur. A Lui les plus beaux noms. Tout ce qui est dans les cieux et la terre Le glorifie. Et c'est Lui le Puissant, le Sage ».

لِلَّهِ مَقْصُورٌ غَيْرِي مُحَمَّدٌ وَعَلَى آلِ مُحَمَّدٍ وَعَلَى آلِ بَرَاءِ يَوْمِ؛ نَكَ
حَيْدٌ مَجِيدٌ. لِلَّهِ مَجْدٌ وَعَلَى مُحَمَّدٍ وَعَلَى آلِ مُحَمَّدٍ، كَمَا بَارَكْتَ عَلَيَّ بِبَرَاءِ يَوْمِ وَعَلَى آلِ
بَرَاءِ يَوْمِ؛ نَكَ حَيْدٌ مَجِيدٌ

« Ô Seigneur ! Prie sur Mohammed et sur la famille de Mohammed comme Tu as prié sur Ibrâhîm et sur la famille d'Ibrâhîm, Tu es certes digne de louange et de glorification. Ô Seigneur ! Bénis Mohammed et la famille de Mohammed comme Tu as béni Ibrâhîm et la famille d'Ibrâhîm, Tu es certes digne de louange et de glorification ».

REMERCIEMENTS

Cette thèse est le résultat de la collaboration entre la Fondation Institut Pasteur (IPD) et l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar (UCAD). Une des deux parties de la thèse s'inscrit dans le cadre du projet EDCTP/WANETAM coordonné par le Dr Aïssatou Touré tandis que l'autre partie est une continuité du projet Dielmo-Ndiop. Le travail a été effectué à l'Unité d'Immunologie, actuel Pôle d'Immunophysiopathologie et Maladies infectieuses (IMI) de la Fondation Institut Pasteur de Dakar. Le Directeur de thèse est le Professeur Mbacké SEMBENE et la supervision a été assurée par le Dr Aïssatou Touré, le Dr Makhtar Niang et le Dr Inès VIGAN-WOMAS qui a remplacé récemment le Dr Aïssatou Touré.

Je voudrais adresser mes sincères remerciements :

Au Docteur **Aïssatou TOURE**, Chef de service de l'Unité d'Immunologie pour nous avoir confié ce travail. Votre soutien fut constant et votre analyse pertinente fut la boussole qui permit de toujours garder le bon cap.

Au Professeur **Mbacké SEMBENE**, nous vous témoignons notre gratitude pour avoir accepté de diriger cette thèse. Nous nous sommes abreuvé à la source de votre savoir tout au long de notre formation universitaire. Vous êtes un modèle qui incite à la rigueur scientifique et à une quête permanente du savoir, le prix à payer pour suivre l'évolution rapide des connaissances. Nous prions Allah de garder cette source intacte pour les générations futures.

Au Professeur **Alioune Dieye**, qui nous a fait l'honneur de présider et juger ce travail. Nous avons toujours été impressionné par l'exemplarité de votre comportement. Et nous avons trouvé en vous le modèle de l'enseignant qui transmet en même temps le savoir être et le savoir. Nous aimons en vous la pertinence et la clarté du discours. En un mot, vous serez toujours pour nous une référence.

Au Professeur Assimilé **Malick FALL**, au Directeur de Recherche **Ibrahima DIA**, au Professeur Agrégé **Babacar MBENGUE**, nous exprimons ici notre reconnaissance et nos sincères remerciements pour avoir, en tant que rapporteurs de la thèse, apprécié positivement ce travail. Vos suggestions pertinentes ont permis d'améliorer le document de manière conséquente.

Au Professeur Agrégé **Aïda BADIANE**, au Maître de conférences Titulaire **Gora Diop**, veuillez recevoir nos sincères remerciements pour avoir de manière spontanée, accepté de siéger à ce jury. Vous avez consacré de votre précieux temps pour lire et critiquer ce travail, soyez assurés de notre reconnaissance.

Nos remerciements vont également :

- ✓ Au Dr Amadou Alpha Sall Administrateur Général de la Fondation IPD pour avoir autorisé l'inscription à cette thèse et permis que ce travail soit mené au sein de la Fondation IPD. Nous associons à ces remerciements la Direction Scientifique, la Direction des Ressources Humaines de l'IPD.
- ✓ Au Dr Inès VIGAN-WOMAS qui malgré son arrivée récente nous a apporté tout son soutien pendant la rédaction de la thèse.
- ✓ Au Dr Makhtar Niang, au Dr Ronald Perraut pour avoir assuré une part importante de l'encadrement de ce travail.
- ✓ A Mr Oumar Samb et Mr Malick Diop du Pôle d'Immunophysiopathologie et Maladies infectieuses (IMI).
- ✓ Au Dr Maouloud Diallo du Pôle de Zoologie Médicale pour votre soutien.
- ✓ Au Dr Oumar Faye et au Dr Ndeye Bop du Pôle Virologie, vous avez aussi rendu ce travail possible.
- ✓ Aux Dr Cheikh Loucoubar, Dr Fatoumata Diène, Dr Cheikh Talla, à Mr Joseph Faye et Mr Gaoussou Diakhaby du Pôle Epidémiologie, Recherche clinique et Science des données.
- ✓ Aux amis, Dr Yakhya Dieye, Dr Alassane Thiam, Dr Fodé Diop; Malick Fall, Ababacar Diouf, Babacar Diallo.
- ✓ A notre frère le Dr Ibrahima Diouf

Nous saluons la générosité des enseignants de la Faculté des Sciences et Techniques de l'UCAD.

Nous exprimons notre reconnaissance aux populations engagés dans les projets Dielmo-Ndiop et EDCTP/WANETAM.

LISTE DES ABREVIATIONS

ACT	: Artemisinin Combination-based Therapy
ADN	: Acide désoxy-ribonucléotidique
AM	: Asymptomatique microscopique
ASM	: Asymptomatique submicroscopique
ApiAP2	: Apicomplexan specific AP2
ARN	: Acide ribonucléotidique
AT	: Adénine-Thymine
CIDR	: Cystein-rich Inter Domain Region
COI	: Complexity of infection
CR-1	: Complement receptor type 1
CSA	: Chondroïtine Sulfate A
DBL	: Duffy binding-like Domain cystéine
DDT	: Dichloro Diphényl 29 Trichloro-éthane
EDTA	: Ethylene-diamine-tetra-acetic acid
EIR	: Entomological Inoculation Rate
GMM	: Go Taq Green Master Mix
HBsAg	: Hepatitis B surface Antigen
HMGB	: High Mobility Group box B
HRP2	: Antigène histidine rich protein 2
ICAM-1	: Intercellular adhesion molecule 1
IM	: Infections Multiples
ITN	: Insecticide-Treated bednets
KDa	: Kilo Dalton
KH	: Domaine d'Homologie K
LDH	: Lactate déshydrogénase
MOI	: Multiplicity of Infection
MPT	: Modifications Post-Traductionnelles
<i>m</i>sp-1	: merozoite surface protein 1
<i>m</i>sp-2	: merozoite surface protein 2
OMS	: Organisation mondiale de la santé (WHO, World Health Organization)
<i>P. falciparum</i>	: <i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. knowlesi</i>	: <i>Plasmodium knowlesi</i>

<i>P. malariae</i>	: <i>Plasmodium malariae</i>
<i>P. ovale</i>	: <i>Plasmodium ovale</i>
<i>P. vivax</i>	: <i>Plasmodium vivax</i>
Pb	: Paire de bases
PBMC	: Peripheral blood mononuclear cell
PBS	: Phosphate Buffer Salin
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PECAM-1	: Platelet And Endothelial Cell Adhesion Molecule 1
PfEMP1	: <i>P. falciparum</i> Erythrocyte Membrane Protein-1
PfMyb1	: <i>P. falciparum</i> facteur de transcription Myb1
PfSPZ	: <i>Plasmodium falciparum</i> sporozoites
PfTRZ	: <i>P. falciparum</i> Telomere Repeat-binding Zinc factors
PREBP	: Facteur de transcription PRE Binding Protein
qPCR	: Real time PCR (PCR en temps réel)
TARE	: Télomère Associated Repeat Elements
TBE	: Trizma Boric acid EDTA
UV	: Ultra-Violet
VLP	: Virus-Like Particle

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Stratification des régions du Sénégal en fonction de la prévalence parasitaire	7
Tableau II : Critères cliniques et biologiques de paludisme grave de l’OMS ..	12
Tableau III : Caractéristiques démographiques de la cohorte AM	44
Tableau IV : Diversité génétique de <i>m_{sp}-1</i> et <i>m_{sp}-2</i> associée au portage asymptomatique microscopique	45
Tableau V : Caractéristiques de la cohorte Ndiop 2016 et de la cohorte appariée PCR positive versus PCR négative	47
Tableau VI : Diversité génétique associée au portage ASM.....	48

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Evolution de la morbidité et de la mortalité proportionnelle de 2001 à 2017 en fonction des interventions majeures	5
Figure 2 : Evolution des niveaux d'endémicité en Afrique entre 2000 et 2015	7
Figure 3 : Cycle de <i>P. falciparum</i>	9
Figure 4 : Variations des formes cliniques du paludisme grave suivant l'endémicité palustre et l'âge des patients.....	13
Figure 5 : Modèle d'organisation des chromosomes chez <i>P. falciparum</i>	16
Figure 6 : Modèle schématique du cluster de télomères de <i>P. falciparum</i>	17
Figure 7 : Représentation de la structure du gène <i>msp-1</i> avec 17 blocs, 5 séquences conservées, 5 semi-conservées et 7 variables. Le bloc 2 est le plus polymorphe et comprend 3 familles alléliques : K1, MAD20 et RO33.....	21
Figure 8: Structure des deux familles alléliques du gène <i>msp-2</i> , 3D7 et FC27. Les blocs N et C terminaux sont constants tandis que le bloc central polymorphe porte la spécificité de la famille allélique.....	22
Figure 9 : Facteurs associés à l'immunité anti-palustre et anti-maladie)	23
Figure 10 : Fréquence des délétions du gène codant pour l'HRP2.	32
Figure 11 : Les 8 villages du projet EDCTP et les sites de Recherche de Ndiop et Dielmo	35
Figure 12 : Association entre la prévalence parasitaire déterminée par qPCR (PCR+) et la séroprévalence des IgG (IgG+) contre l'extrait brut de la souche 0703 en fonction de l'âge.	47
Figure 13 : En 13 A, la distribution des familles FC27, 3D7 et combinaisons de familles alléliques FC27/3D7 de <i>msp-2</i> par classe d'âge et en 13 B, la distribution des infections monoclonales et polyclonales par classe d'âge avec le marqueur <i>msp-2</i> . Les p-values non significatifs sont déterminés par test exact de Fisher.	49

- Figure 14 :** Comparaison de la densité parasitaire microscopique moyenne entre les infections polyclonales et monoclonales génotypées avec les marqueurs *msp-1* et *msp-2*. La densité parasitaire est plus élevée chez les enfants asymptomatiques ayant des infections polyclonales : $p= 0,012$ pour *msp-1* et $p = 0,00008$ pour *msp-2* (test t de Student) 50
- Figure 15 :** Corrélation entre les fréquences de la combinaison de familles alléliques K1/MAD20/RO33, de la famille allélique MAD20 de *msp-1*, de la famille allélique FC27 de *msp-2* et les classes de parasitémie : F1 (< 50 parasites/ μ l de sang), F2 (50–499 parasites/ μ l), F3 (500–4999 parasites/ μ l), F4 (5000–49,999 parasites/ μ l) et F5 ($\geq 50,000$ parasites/ μ l)..... 51
- Figure 16 :** Comparaison de la réponse anticorps IgG et IgM contre l'extrait brut de la souche 0703 et de la réponse anticorps IgG contre l'antigène MSP-3 chez les enfants porteurs submicroscopiques (PCR+) et non porteurs (PCR-) de moins de 10 ans. On observe de différence significative que pour la réponse IgM contre l'extrait brut ($p= 0,034$, t-test de Student) 52
- Figure 17 :** Comparaison de la réponse anticorps IgG et IgM contre l'extrait brut de la souche 0703 et de la réponse anticorps IgG contre l'antigène MSP-3 chez les enfants porteurs submicroscopiques (PCR+) et non porteurs (PCR-) entre 10 et 15 ans. Aucune une différence significative n'est observée pour tous les antigènes entre les porteurs et les non porteurs..... 53
- Figure 18 :** Comparaison de la réponse anticorps IgG et IgM contre l'extrait brut de la souche 0703 et de la réponse anticorps IgG contre l'antigène MSP-3 chez les porteurs submicroscopiques (PCR+) et non porteurs (PCR-) de plus de 15 ans. On observe une différence significative pour la réponse IgG contre les 2 antigènes : $p= 0,021$ et $p= 0,035$ (t-test de Student) pour l'extrait brut et l'antigène MSP-3, respectivement..... 53

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
1. DÉFINITION	3
2. HISTORIQUE	3
3. ASPECTS ÉPIDÉMIOLOGIQUES.....	4
3.1. Au niveau mondial.....	4
3.1.1.Mortalité et morbidité palustres	4
3.1.2.L'évolution globale de la prévalence parasitaire	4
3.2. Au Sénégal.....	5
3.2.1.Mortalité et morbidité palustres	5
3.2.2.Faciès épidémiologiques du Sénégal.....	6
3.2.3.Prévalence parasitaire.....	6
3.3. Contribution des différentes stratégies de lutte	7
4. BIOLOGIE DE PLASMODIUM FALCIPARUM	8
4.1. Taxonomie et espèces plasmodiales.....	8
4.2. Cycle du Plasmodium chez l'homme.....	8
4.2.1.Cycle exo-érythrocytaire ou hépatique	8
4.2.2.Cycle érythrocytaire	8
4.3. Cycle chez l'anophèle femelle	9
4.3.1.Vecteurs du paludisme humain	9
4.3.2.Phase sporogonique chez le moustique.....	10
5. ASPECTS CLINIQUES	10
5.1. Accès palustre simple.....	10
5.2. Paludisme grave.....	11
5.2.1.Définition et critères de gravité.....	11
5.2.2.Manifestations cliniques du paludisme grave	12
5.2.2.1. Détresse respiratoire.....	12
5.2.2.2. Anémie sévère.....	13

5.2.3. Paludisme cérébral ou neuropaludisme.....	14
5.2.3.1. Définition	14
5.2.3.2. Pathogénèse.....	14
5.2.4. Différentes manifestations cliniques du paludisme grave chez l'adulte et l'enfant.....	15
5.2.5. Le paludisme chez la femme enceinte.....	15
6. VARIATION ET POLYMORPHISME ANTIGÉNIQUE.....	16
6.1. Le génome du Plasmodium	16
6.2. Mécanismes de régulation de la transcription	17
6.2.1. Mécanismes épigénétiques	18
6.2.2. Facteurs de transcription	18
6.3. Variation antigénique	18
6.3.1. Protéine Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane protein 1 (PfEMP-1).....	18
6.3.2. Les récepteurs (ou contre-ligands) de PfEMP-1	19
6.4. Polymorphisme antigénique	20
6.4.1. Marqueurs du polymorphisme antigénique.....	20
6.4.1.1. Gène msp-1	20
6.4.1.2. Gène msp-2	21
7. ASPECTS IMMUNOLOGIQUES	23
7.1. Immunité anti-palustre.....	23
7.2. Immunité anti-maladie.....	24
7.1.1. Rôle de l'inflammation dans la pathogénèse du paludisme.....	24
7.1.2. Mécanismes de réduction de l'inflammation.....	24
7.1.2.1. Immunosuppression directe des cellules immunitaires par des globules rouges infectés.....	24
7.1.2.2. Baisse du niveau d'activation des cellules dendritiques par des globules rouges infectés.....	25

7.1.2.3. Régulation négative des cytokines pro-inflammatoires sur l'immunité adaptative	25
7.1.2.4. Perte de cellules immunitaires	25
8. TYPES DE VACCINS.....	26
8.1. Vaccins du stade hépatique	26
8.1.1. Vaccins à base de sous-unité de la protéine circumsporozoite	26
8.1.1.1. RTS, S/AS01	26
8.1.1.2. Vaccin R21.....	26
8.1.2. Vaccins à base de sporozoites entiers: Vaccin PfSPZ	26
8.2. Vaccins du stade sanguin.....	27
8.2.1. PfAMA1	27
8.2.2. RH5.....	27
8.2.3. Vaccins bloquant la transmission (VBT)	27
9. NOTION DE PORTAGE ASYMPTOMATIQUE	28
9.1. Définition.....	28
9.2. Caractéristiques du portage asymptomatique.....	28
9.2.1. Facteurs humains influençant la durée de l'infection	28
9.2.2. Facteurs liés au parasite influençant la durée de l'infection.....	29
9.3. Contribution du portage asymptomatique à la transmission de l'infection	29
9.4. Outils de détection.....	30
9.4.1. Goutte épaisse (GE) et Frottis sanguin (FS)	30
9.4.2. Polymérase chain reaction (PCR)	30
9.4.2.1. Utilisation de gènes cibles à copies multiples	30
9.4.2.2. Technique loop mediated isothermal amplification (LAMP)....	31
9.4.3. Tests de diagnostic rapide (TDR).....	31
9.4.3.1. Antigène histidine rich protein 2 (HRP2)	31
9.4.3.2. Lactate déshydrogénase (LDH)	32
9.4.4. Détection des anticorps anti-palustres.....	32

9.4.4.1. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	33
9.4.4.2. Les puces à protéines ou protéines microarray.....	33

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

1. OBJECTIFS	34
2. MATERIELS ET METHODES.....	34
2.1. Sites d'étude	34
2.1.1. Site de Ndiop	34
2.1.1.1. Projet Dielmo-Ndiop.....	34
2.1.1.2. Présentation du site de Ndiop	34
2.1.2. Site du Projet EDCTP/WANETAM	35
2.1.2.1. Le Projet EDCTP/WANETAM	35
2.1.2.2. Présentation du site	36
2.2. Populations d'études.....	36
2.2.1. Prélèvements de Ndiop.....	36
2.2.1.1. Autorisation du comité d'éthique.....	36
2.2.1.2. Échantillonnage et conception de l'étude.....	37
2.2.2. Prélèvements duProjet EDCTP/WANETAM	37
2.2.2.1. Autorisation du comité d'éthique.....	37
2.2.2.2. Échantillonnage et conception de l'étude.....	37
2.3. Méthodes	38
2.3.1. Diagnostic du paludisme et caractérisation des espèces par microscopie	38
2.3.2. Diagnostic et caractérisation des espèces plasmodiales par PCR....	38
2.3.2.1. Extraction et purification de l'ADN	38
2.3.2.2. Diagnostic par PCR en temps réel	39
2.3.2.3. Caractérisation des espèces par PCR nichée.....	39
2.3.3. Génotypage des gènes msp-1 et msp-2 de P. falciparum.....	40
2.3.3.1. Amplification par PCR nichée	40
2.3.3.2. Electrophorèse de l'ADN.....	40

2.3.3.3. Révélation des produits PCR	40
2.3.4. Détection des anticorps dirigés contre les antigènes de <i>P. falciparum</i>	41
2.3.4.1. Les antigènes	41
2.3.4.2. Le test Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	41
2.3.5. Analyses statistiques.....	42
2.3.5.1. Paramètres génétiques.....	42
2.3.5.2. Paramètres immunologiques	43
3. RÉSULTATS.....	44
3.1. Diversité génétique associée au portage asymptomatique microscopique (AM).....	44
3.1.1. Caractéristiques démographiques et parasitologiques de la cohorte AM	44
3.1.2. Diversité génétique de <i>m</i> sp-1 et <i>m</i> sp-2 associée au portage asymptomatique microscopique (AM)	44
3.2. Diversité génétique associée au portage asymptomatique submicroscopique (ASM)	46
3.2.1. Caractéristiques épidémiologiques à Ndiop en 2016, association entre la prévalence parasitaire et la séroprévalence des anticorps anti-IgG contre l'extrait brut de schizontes (souche 0703).....	46
3.2.2. Diversité génétique de <i>m</i> sp-2 associée au portage asymptomatique submicroscopique (ASM).....	48
3.2.3. Distribution des familles et combinaisons de familles alléliques de <i>m</i> sp-2 par classe d'âge.....	49
3.3. Association entre la parasitémie et la diversité génétique.....	50
3.3.1. Comparaison des niveaux de parasitémie microscopique entre les infections polyclonales et monoclonales	50
3.3.2. Etude de la relation entre les fréquences des familles alléliques de <i>m</i> sp-1 et <i>m</i> sp-2 et la parasitémie	51

3.4. Comparaison des niveaux de réponses anticorps entre les prélèvements positifs et négatifs en PCR.....	52
4. DISCUSSION.....	54
4.1. Diversité génétique associée au portage asymptomatique	54
4.2. Impact du polymorphisme associé à l'infection asymptomatique microscopique sur la parasitémie.....	56
4.3. Contribution du portage asymptomatique submicroscopique (ASM) à la réponse anticorps.....	56
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	93
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	95
ANNEXES	



INTRODUCTION

Le paludisme reste encore de nos jours un grave problème de santé publique. Le nombre de cas est estimé à 228 millions tandis que la mortalité est approximativement de 405 000 en 2018 (WHO, 2019). Le fardeau du paludisme est en baisse depuis 15 ans grâce aux interventions initiées par les programmes de lutte contre le paludisme au niveau mondial et national (WHO, 2014). La mortalité a ainsi chuté de 57% en Afrique sub-Saharienne entre 2000 et 2015 (Gething et *al.*, 2016). Au même moment, le nombre de cas et la prévalence ont baissé de 50% et 40%, respectivement, à travers toute l'Afrique (Bhatt et *al.*, 2015). Cette baisse est attribuée pour 60% à l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides, 19% aux traitements par les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine et 13% à l'utilisation d'insecticides à effet rémanent dans des aspersions intradomiciliaires (Bhatt et *al.*, 2015). Ces interventions soutenues ont, bien que de manière hétérogène, profondément modifié l'épidémiologie du paludisme en Afrique (Hemingway et *al.*, 2016; Noor et *al.*, 2014; Bhatt et *al.*, 2015). C'est ainsi que de nombreuses zones endémiques sont devenues des zones à faible prévalence parasitaire et la majorité des infections palustres sont devenues asymptomatiques (Niang et *al.*, 2017; Diop et *al.*, 2014). La diversité génétique de la population parasitaire est associée, à la pathologie du paludisme (Healer et *al.*, 2004), à l'acquisition de l'immunité (Conway et *al.*, 2000), à l'intensité de la transmission de l'infection (Babiker et *al.*, 1995) mais influence également la réponse aux différents candidats vaccins contre le paludisme (Richards and Beeson, 2009). L'immunité antipalustre est quant à elle associée à une réduction de l'échec du traitement antipaludique chez les populations endémiques (O'Flaherty et *al.*, 2017). Il devient alors indispensable de disposer de connaissances approfondies sur les paramètres génétiques et immunologiques associés à l'infection asymptomatique palustre et leurs impacts sur la transmission afin de mettre en place des stratégies appropriées pour atteindre l'élimination (Elliott et *al.*, 2014; Recker et *al.*, 2018).

C'est dans ce contexte que le présent travail a été mené avec comme objectif principal de déterminer le niveau de polymorphisme associé à l'infection asymptomatique à *P. falciparum* au niveau microscopique et submicroscopique.

Plus spécifiquement, l'impact du polymorphisme associé à l'infection asymptomatique microscopique sur la parasitémie d'une part et d'autre part celui du polymorphisme associé à l'infection asymptomatique submicroscopique sur la réponse immune ont été étudiés.

Après l'introduction générale où sont présentés la problématique, le contexte et les objectifs de l'étude, le document a été structuré en quatre parties:

La première partie comporte une revue de la littérature sur la biologie de *P. falciparum*, les aspects épidémiologiques, physiopathologiques, génétiques et immunologiques en rapport avec la thèse et les différents outils de diagnostic adaptés au contexte.

La seconde partie décrit la zone d'étude, l'échantillonnage et la méthodologie utilisée au cours des travaux.

Dans la troisième partie sont présentés les résultats de la diversité génétique et de l'impact du polymorphisme sur la parasitémie et la réponse anticorps.

Dans la quatrième partie sont présentés la discussion des résultats obtenus ainsi que la conclusion et les perspectives.



**PREMIERE PARTIE :
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

1. Définition

Le paludisme est une infection due à un protozoaire hématozoaire du genre *Plasmodium* transmis par un moustique femelle du genre *Anopheles*. Le paludisme est endémique dans certaines régions d'Asie, d'Afrique, d'Amérique centrale et du Sud, d'Océanie et de certaines îles des Caraïbes. En fonction du niveau de gravité, l'infection palustre peut être classée en :

- Portage asymptomatique avec la présence de parasites asexués dans le sang en l'absence de symptômes de la maladie.
- Paludisme simple avec une parasitémie palustre accompagnée de fièvre $>37,5^{\circ}\text{C}$ sans signes de gravité ou de dysfonctionnement des organes vitaux.
- Paludisme grave, forme aiguë de la maladie accompagnée de signes de gravité avec ou sans dysfonctionnement des organes vitaux (WHO, 2017).

2. Historique

Les premiers pas vers la connaissance du paludisme ont commencé par la découverte du parasite dans le sang de patients par Alphonse Laveran en 1880 (Laveran, 1884). Les stades sexués quant à eux ont été découverts par William MacCallum chez des oiseaux en 1897 (MacCallum, 1898), tandis que la transmission entre les oiseaux et les moustiques a été élucidée par Ronald Ross en 1897 (Bynum, 1998). En 1898, Giovanni Battista Grassi, Amico Bignami, Giuseppe Bastianelli, Angelo Celli, Camillo Golgi et Ettore Marchiafava prouvent que le paludisme humain était également transmis par des moustiques, en l'occurrence des anophèles (Grassi, 1900). La découverte du cycle hépatique ou exoérythrocytaire est l'œuvre de Henry Shortt et Cyril Garnham en 1948 (Shortt and Garnham, 1948; Cox, 2010).

Une des étapes clés de la recherche sur le traitement du paludisme a commencé avec Pelletier et Caventou qui isolent la molécule de quinine à partir d'écorces du quinquina en 1820 (Meshnick and Dobson, 2001). Plus tard dans les années 70, les propriétés anti-paludiques de l'artémisinine sont mises en évidence par la chinoise Tu Youyou en 1972 (Tu, 2016). En 2001, l'OMS recommande les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (ACT) pour le traitement du paludisme (Phyo et al., 2016).

La lutte anti-vectorielle a acquis son importance avec la découverte par Muller en 1939 des propriétés insecticides du DDT (Dichloro Diphényl 29 Trichloro-éthane) une molécule synthétisée par Othmar Zeidler en 1874 (Metcalf, 1973). Face à la résistance des moustiques

au DDT, la découverte des pyréthriinoïdes de synthèse en 1970 a permis de relancer la lutte anti-vectorielle avec l'utilisation massive des moustiquaires imprégnés d'insecticides (Lindsay and Gibson, 1988). Les avancées dans la connaissance de la biologie des parasites, les différents traitements mis au point et la lutte anti-vectorielle ont considérablement influencé l'épidémiologie du paludisme

3. Aspects épidémiologiques

3.1. Au niveau mondial

3.1.1. Mortalité et morbidité palustres

La mortalité au niveau mondial a été estimée à 405 000 en 2018. Parmi ces décès, 94% sont survenus en Afrique qui se place ainsi loin devant l'Asie du Sud-Est (WHO, 2019). Les enfants de moins de 5 ans sont les plus vulnérables face au paludisme. En 2018, ils ont représenté 67% (272000) des décès associés au paludisme dans le monde (WHO, 2019). La mortalité a chuté de 57% en Afrique sub-Saharienne entre 2000 et 2015 (Gething et *al.*, 2016). Malgré ces progrès, la baisse de la mortalité liée au paludisme a ralenti depuis 2015 (WHO, 2019).

Le nombre de cas de paludisme est quant à lui été estimé à 228 millions en 2018. La morbidité palustre est passée de 251 millions en 2010 à 231 millions en 2017 (WHO, 2019).

Plasmodium falciparum est responsable de 99,7% et 50 % des cas de paludisme en Afrique et en Asie du Sud-Est, respectivement. Les infections à *Plasmodium vivax* sont plus fréquentes en Amérique causant 75 % des cas et en Asie du Sud-Est avec 53 % des cas (WHO, 2019).

3.1.2. L'évolution globale de la prévalence parasitaire

Les régions épidémiologiques sont définies sur la base du portage parasitaire qui reflète le niveau de transmission. Ce portage parasitaire prend en compte le niveau de prévalence chez les enfants de 2 à 10 ans. Ainsi, 4 zones sont définies en fonction du niveau d'endémicité : la zone hypo-endémique avec une prévalence de 0–10%, la zone méso-endémique entre 10 et 50% de prévalence, la zone hyper-endémique de 50 à 75% de prévalence et la zone holo-endémique avec une prévalence supérieure à 75%) (WHO, 1951).

Selon l'OMS, les infections palustres ont diminué de moitié depuis 2000 chez les enfants des régions endémiques d'Afrique. La prévalence parasitaire chez les enfants âgés de 2 à 10 ans serait ainsi passée de 33 % en 2000 à 16 % en 2015 (WHO, 2015).

3.2. Au Sénégal

3.2.1. Mortalité et morbidité palustres

Le Sénégal a enregistré 284 décès pour 395 706 cas de paludisme en 2017 (PNLP, 2017). Cependant, ces chiffres sont en baisse. En effet, la morbidité proportionnelle palustre est passée de 4,86% en 2015 à 3,26% en 2017 (Figure 1). Cette baisse du nombre de cas est le résultat des différentes stratégies de lutte comme les moustiquaires imprégnées d'insecticides et les aspersions intradomiciliaires d'insecticides. Parmi les moyens de luttés nous avons également l'amélioration du diagnostic avec les tests de diagnostic rapides et l'amélioration du traitement grâce aux combinaisons à base de dérivés d'artémisinine. Cette évolution globalement favorable de la morbidité et de la mortalité est très hétérogène à l'échelle du pays en fonction du niveau de prévalence parasitaire (PNLP, 2017). La charge du paludisme est inégalement distribuée sur l'ensemble du pays. Les régions de Kolda, Tambacounda, Kédougou, Kaolack et Diourbel enregistrent 88% des cas confirmés de paludisme (348 712 sur 395 706 cas) et 72% des décès dus au paludisme (205 sur 284 décès) (PNLP, 2017).

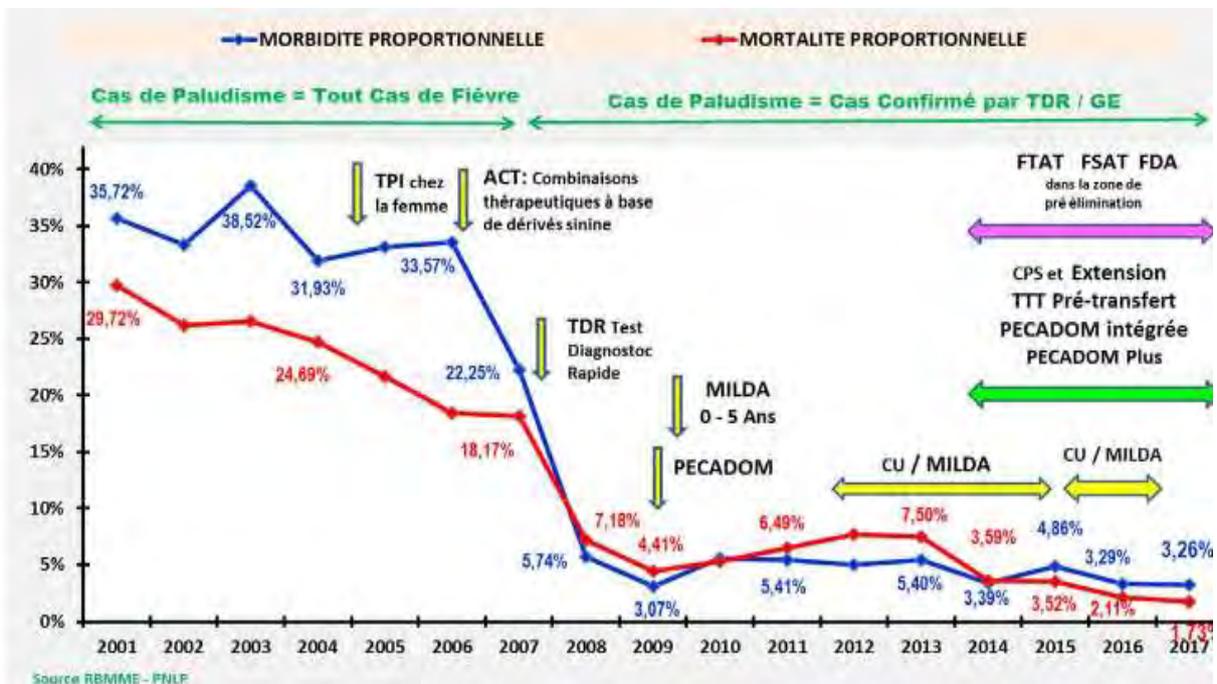


Figure 1 : Evolution de la morbidité et de la mortalité proportionnelle de 2001 à 2017 en fonction des interventions majeures (PNLP, 2017)

3.2.2. Faciès épidémiologiques du Sénégal

Un faciès épidémiologique est une région ou un ensemble de régions où le paludisme présente, dans ses manifestations pathologiques, des caractères communs liés aux modalités de transmission du parasite. Deux faciès épidémiologiques ont été identifiés au Sénégal : le faciès tropical et le faciès sahélien.

Le faciès tropical est caractérisé par une transmission saisonnière longue qui dure 4 à 6 mois (de Juillet à Décembre). La pluviométrie annuelle varie entre 800 et 1500 millimètres. Le paludisme y est méso-endémique et les principaux vecteurs sont : *Anopheles gambiae*, *An. arabiensis*, *An. funestus* et *An. nili*. Le nombre de piqûres infectantes (EIR) est de 20 à 100 piqûres infectantes/homme/an. Les régions de Ziguinchor, Kolda, Tambacounda et Kédougou sont les régions plus concernées (PNLP, 2016).

Le faciès sahélien comprend les régions situées au nord de la ligne reliant Mbour et Kidira. La saison de transmission y est courte (inférieure à 4 mois). La pluviométrie annuelle est inférieure à 500 millimètres. Le nombre de piqûres infectantes varie de 0 à 20 piqûres infectantes/homme/an. *Anopheles gambiae*, *An. arabiensis*, *An. funestus*, *An. melas* et *An. pharoensis* sont les principaux vecteurs. La morbidité palustre y est généralement faible et est influencée par la pluviométrie (PNLP, 2016).

Ces deux faciès peuvent subir des modifications locales grâce à des facteurs naturels ou anthropiques (PNLP, 2016).

3.2.3. Prévalence parasitaire

La prévalence parasitaire du paludisme est déterminée à partir du pourcentage d'enfants de 6-59 mois dont le résultat de la goutte épaisse (GE) est positif. Pour étudier l'évolution de la prévalence parasitaire, le Sénégal a été divisé en 4 grandes régions (Nord, Ouest, Centre et Sud). La prévalence parasitaire obtenue à partir l'Enquête Démographique et de Santé continue (EDS-Continue, 2012-2013) est comparée à celle de 2016 (EDS-Continue, 2016) pour les 4 régions (**Tableau I**). La prévalence parasitaire du paludisme est en baisse régulière, passant de 2,8% en 2012-2013 à 0,4% en 2017 (EDS-continue, 2017).

Tableau I : Evolution de la prévalence parasitaire (%) entre 2012 et 2016

Grandes Régions	2012	2016
Nord	1%	0,3%
Ouest	1%	0,0%
Centre	2%	0,9%
Sud	9%	3,2%
Sénégal	3%	0,9%

3.3. Contribution des différentes stratégies de lutte

Depuis 2000, des progrès importants ont été réalisés dans la lutte contre le paludisme. Selon les estimations, le nombre de cas de paludisme a globalement baissé de 41% entre 2000 et 2015, tandis que la mortalité a diminué de 62% (WHO, 2017). Le nombre de pays endémiques qui était de 108 en 2000 a baissé à 91 en 2015 (**Figure 2**) (WHO, 2017). En Afrique le nombre de cas de paludisme a baissé de 40% entre 2000 et 2015. Cette baisse est attribuée pour 60% à l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides, 19% aux combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine et 13% aux insecticides à effet rémanent (Bhatt *et al.*, 2015). De nombreuses zones à endémicité palustre sont devenues des zones à faible transmission et la majorité des infections palustres sont devenues asymptomatiques et submicroscopiques (Niang *et al.*, 2017 ; Diop *et al.*, 2014).

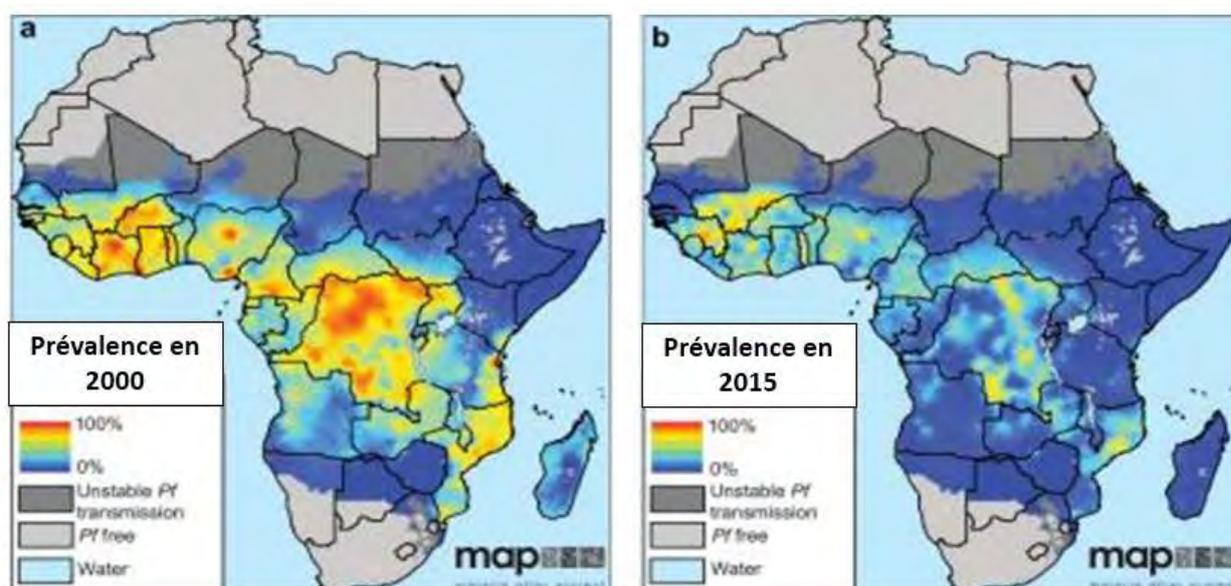


Figure 2 : Evolution des niveaux d'endémicité en Afrique entre 2000 et 2015

(Bhatt *et al.*, 2015)

4. Biologie de *Plasmodium falciparum*

4.1. Taxonomie et espèces plasmodiales

Les parasites du genre *Plasmodium* appartiennent au règne des protistes, à l'embranchement des *Apicomplexa*, à la classe des *Sporozoa*, à la sous-classe des *Coccidia*, à l'ordre des *Eucoccida*, au sous-ordre des *Haemosporina* et à la famille de *Plasmodiidae*. Ce sont des parasites intracellulaires obligatoires des vertébrés. Ils infectent plusieurs hôtes parmi lesquels l'Homme, les primates, les oiseaux, les reptiles et les rongeurs. Les 5 espèces responsables de paludisme humain les plus importantes sont : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malaria*, *P. ovale* et *P. knowlesi* (un *Plasmodium* du singe rencontré chez l'homme dans certaines zones de forêts d'Asie du Sud-Est). *P. falciparum* et *P. vivax* sont les espèces les plus répandues. Cependant, *P. falciparum* est la plus mortelle de toutes les espèces (Lau *et al.*, 2016).

4.2. Cycle du *Plasmodium* chez l'homme

4.2.1. Cycle exo-érythrocytaire ou hépatique

Le parasite est transmis à l'homme (hôte intermédiaire) lorsqu'un moustique femelle infectant, du genre *Anopheles* prend un repas de sang et injecte simultanément des sporozoïtes dans la circulation sanguine. Les sporozoïtes envahissent ensuite les hépatocytes dans lesquels ils se développent en schizontes hépatiques et se reproduisent de façon asexuée (**Figure 3**). Après environ sept jours de développement dans le foie, chaque hépatocyte infecté libère jusqu'à 40.000 mérozoïtes dans la circulation sanguine (Nilsson *et al.*, 2015).

4.2.2. Cycle érythrocytaire

Les mérozoïtes libérés par les hépatocytes passent dans le sang et envahissent rapidement les hématies, initiant ainsi un cycle sanguin de réplication asexuée. Chaque mérozoïte se transforme en un trophozoïte uni-nucléé avec une forme typique en anneau (**Figure 3**) avant de se répliquer en schizonte pluri-nucléé qui produit 8 à 32 mérozoïtes fils. A ce stade, les hématies parasitées se rompent et libèrent les mérozoïtes qui vont envahir de nouveaux érythrocytes et effectuer de nouveaux cycles schizogoniques érythrocytaires secondaires. L'éclatement des globules rouges est la cause de l'accès de fièvre avec la libération d'hémozoïne dans la circulation sanguine. A chaque cycle érythrocytaire, un petit nombre de parasites se différencie en gamétocytes mâles et femelles. Une partie de ces gamétocytes quitte la circulation périphérique et entre dans l'espace extravasculaire de la moelle osseuse, où ils passent par différents stades de maturation (stades I à V, en 8-10 jours) qui correspond à

la gamétocytogénèse. Au stade V, les gamétocytes mâles et femelles réintègrent la circulation périphérique et peuvent infecter des moustiques (Nilsson *et al.*, 2015).

4.3. Cycle chez l'anophèle femelle

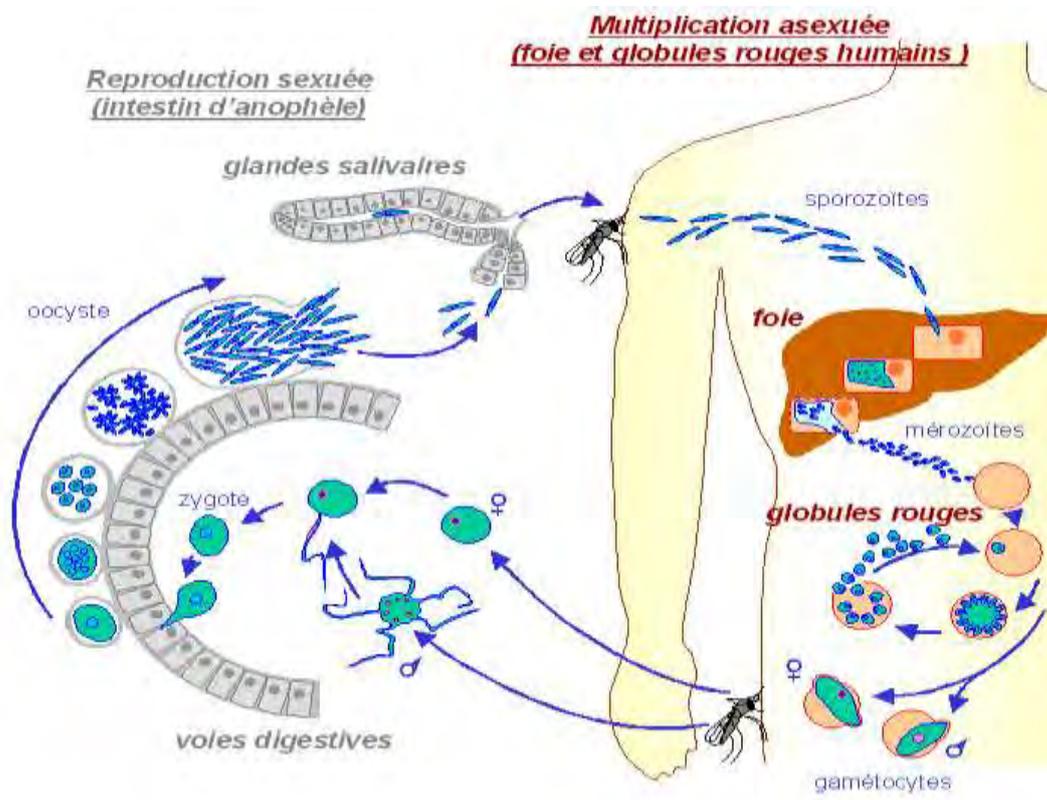


Figure 3 : Cycle de *P. falciparum* (Saidani, 2008)

4.3.1. Vecteurs du paludisme humain

Les vecteurs du paludisme appartiennent à l'embranchement des *Arthropoda*, à la classe des *Insecta*, à la sous-classe des *Pterygota*, à l'ordre des *Diptera*, au sous-ordre des *Nematocera*, à la famille des *Culicidae*, à la sous-famille des *Anophelina* et au genre *Anopheles*. Il existe plus de 460 espèces décrites dont une soixantaine sont considérées comme des vecteurs potentiels. En Afrique subsaharienne et au Sénégal, 4 espèces assurent l'essentiel de la transmission : *An. gambiae*, *An. coluzzii*, *An. arabiensis*, *An. funestus* (Mouchet, 2004; Faye *et al.*, 1998; Ngom *et al.*, 2013).

On distingue les anophèles anthropophiles qui se nourrissent sur l'homme des zoophiles qui se nourrissent sur les animaux. La femelle anthropophile fécondée a besoin d'un repas sanguin qui fournira les éléments protéiques nécessaires au développement des ovocytes (Mouchet, 2004).

4.3.2. Phase sporogonique chez le moustique

Chez le moustique (**Figure 3**), les gamétocytes pris lors d'un repas de sang chez un sujet infecté évoluent rapidement en gamètes (gamétogenèse). Dans l'intestin moyen, le gamétocyte mâle se divise jusqu'à huit microgamètes flagellés (par exflagellation), tandis que le gamétocyte femelle se développe en un seul macro-gamète. La fécondation d'un macro-gamète femelle par un microgamète mâle donne un zygote, qui subit une méiose et se développe en une ookinète invasive qui traverse la paroi intestinale du moustique. A ce niveau, l'ookinète forme un oocyste qui se reproduit de manière asexuée, donnant plusieurs milliers de sporozoïtes (sporogonie). Après la rupture des oocystes, les sporozoïtes migrent vers les glandes salivaires du moustique où ils peuvent être transmis à l'hôte humain pendant un repas de sang (Nilsson *et al.*, 2015).

5. Aspects cliniques

La majorité des infections à *P. falciparum* dans les zones endémiques sont asymptomatiques, n'entraînant pas de symptômes cliniques (Dokunmu *et al.*, 2019).

Il existe une forte association entre les manifestations cliniques et les densités parasitaires élevées. Ainsi la plupart des infections asymptomatiques sont associées à de faibles densités parasitaires, souvent en dessous de la limite de détection du microscope (Cox *et al.*, 1994; Rogier *et al.*, 1996). Cette situation confère aux techniques d'amplification des acides nucléiques une place de choix dans le diagnostic de ces cas asymptomatiques (Okell *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2015). Cependant dans un contexte de pré-élimination ces infections à faible densité parasitaire suscitent un regain d'intérêt, autant pour le développement d'un vaccin efficace, le traitement du paludisme symptomatique que pour l'étude la transmission (Riley and Stewart, 2013; Miller *et al.*, 2013).

5.1. Accès palustre simple

Les signes cliniques apparaissent après une période d'incubation d'une dizaine de jours en moyenne. Cette période d'incubation est associée à la phase hépatique asymptomatique du parasite. Sa durée est fonction de plusieurs facteurs notamment de la prise d'un traitement prophylactique ou curatif mais également du niveau d'immunité acquise contre le parasite. Les symptômes apparaissent lors de la phase érythrocytaire du parasite et sont dus à la libération du contenu érythrocytaire et de la réaction de l'hôte. La lyse des globules rouges infectés libère des toxines parasitaires qui sont reconnues par les récepteurs situés sur les

phagocytes et d'autres cellules immunitaires innées qui à leur tour produisent des médiateurs inflammatoires pyrogènes et des cytokines (Oakley et al., 2011). Le tableau est celui d'un syndrome grippal avec de la fièvre ($> 39^{\circ}\text{C}$), des céphalées, une anorexie, des nausées, des vomissements, une diarrhée et des douleurs abdominales (Trampuz et al., 2003). Du fait de cette symptomatologie atypique, le diagnostic parasitaire est important dans la prise en charge de la maladie. La difficulté est d'autant plus grande que chez le sujet immun, le portage asymptomatique est fréquent en zone d'endémicité palustre.

Les accès simples se présentent sous la forme de fièvre cyclique. Cette périodicité est de 48h (fièvre tierce) pour *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* et de 72 heures (fièvre quarte) pour *P. malariae*. Les accès simples se développent généralement en trois phases :

- Phase de frissons pendant laquelle le malade est agité avec des frissons violents qui l'obligent à se blottir de froid. La durée est d'environ 1 heure.
- Phase de chaleur avec une température pouvant dépasser 40°C . Elle dure 3 à 4 heures et s'accompagne de céphalées et de douleurs abdominales.
- Phase de sueurs, le malade sue abondamment. La température baisse rapidement. Pendant cette phase qui dure 2 à 4 heures le malade a une sensation de bien-être (BartoloniandZammarchi, 2012).

5.2. Paludisme grave

L'infection initiale peut évoluer vers un paludisme grave ou compliqué pouvant entraîner la mort. Le tableau clinique du paludisme grave varie également en fonction de l'état immunitaire.

5.2.1. Définition et critères de gravité

Ces critères ont été définis par l'OMS et sont classés en critères cliniques et biologiques (**Tableau II**). En Afrique, le paludisme à *P. falciparum* est la principale cause de mortalité chez les enfants âgés de 1 à 4 ans. Hors d'Afrique, *P. falciparum*, *P. vivax*, sont impliqués. Dans les régions d'Amérique du Sud, d'Inde et d'Asie du Sud-Est les populations adultes sont plus exposées au risque de paludisme grave à cause de la faible transmission (Wassmer et al., 2015).

Tableau II : Critères cliniques et biologiques de paludisme grave de l'OMS(WHO, 2000)

Critères cliniques et biologiques	Définitions de l'OMS
Prostration	Extrême faiblesse
Trouble de la conscience	Adulte : score de Glasgow > 11 Enfant score de Blantyre < 3 ou score de Glasgow ≤ 11
Respiratoire acidotique	Détresse respiratoire chez l'enfant
Convulsions répétées	Au moins 2 par 24 heures
Collapsus cardiovasculaire	Pression artérielle systolique <80 mm Hg chez l'adulte et < 70 mm Hg chez l'enfant en présence de signes périphériques d'insuffisance circulatoire
Œdème pulmonaire	Confirmation radiologique
Saignement anormal	Définition clinique
Anémie sévère	Enfant : hémocrite < 15 % ou hémoglobine < 5g/dL Adulte : hémocrite <20 % ou hémoglobine <7g/dL
Hypoglycémie	Glycémie < 2,2 mmol/L (< 40 mg/dL)
Hyperlactatémie	Lactates plasmatiques > 5 mmol/L
Hyperparasitémie	Parasitémie > 10% chez les globules rouges parasités

5.2.2. Manifestations cliniques du paludisme grave

En Afrique, la majorité des cas de décès dus au paludisme surviennent chez les enfants et sont dominés par trois syndromes qui peuvent survenir séparément ou en combinaison : la détresse respiratoire, l'anémie sévère et le neuropaludisme (Marsh et *al.*, 1995).

5.2.2.1. Détresse respiratoire

La détresse respiratoire est utilisée pour décrire l'état des enfants présentant une récession thoracique ou une respiration anormalement profonde. Selon les critères de l'OMS ce terme regroupe l'œdème pulmonaire, la respiration acidotique profonde et les symptômes connexes de respiration anormale (Newton et *al.*, 1998). La détresse respiratoire est un des indicateurs de risque chez le patient non immunisé. Chez les adultes, la détresse respiratoire aiguë secondaire suite à un œdème pulmonaire est une manifestation grave et souvent mortelle du paludisme grave à *P. falciparum*. Elle résulte souvent d'une perméabilité capillaire pulmonaire accrue avec une parasitémie et une acidose élevée dues à *P. falciparum*. Elle est rarement signalée dans les infections autres que celles dues à *P. falciparum* (Habib and Singh, 2004).

Chez les enfants africains atteints de paludisme, la présence d'une altération de la conscience ou d'une détresse respiratoire peut servir à identifier les enfants à haut risque de décès (Marsh *et al.*, 1995).

5.2.2.2. Anémie sévère

Les définitions les plus couramment utilisées dans les études sur le paludisme, basées sur les concentrations d'hémoglobine, sont les suivantes : anémie légère ≤ 11 g/dl, anémie modérée ≤ 8 g/dl, anémie sévère ≤ 5 g/dl (White *et al.*, 2018). Les conséquences cliniques du paludisme, et en particulier la prévalence de l'anémie, dépendent de l'intensité de la transmission (**Figure 4**). Les principaux déterminants de l'intensité de la transmission du paludisme sont la densité des vecteurs, leur longévité, leur comportement de piqûre et leur compétence vectorielle. Dans les milieux à transmission élevée, la population est infectée à répétition, mais ce sont les jeunes enfants qui sont les plus touchés par la maladie, et la plupart souffrent d'anémie (White *et al.*, 2018). La pathogenèse de l'anémie palustre est multifactorielle. Les globules rouges contenant des parasites sont détruits à la rupture du schizonte. Cependant, le facteur le plus important est la destruction à grande échelle des globules rouges non parasités (Looareesuan *et al.*, 1991). On estime que la perte d'érythrocytes non parasités représente environ 90 % de l'anémie aiguë due au paludisme (White *et al.*, 2018).

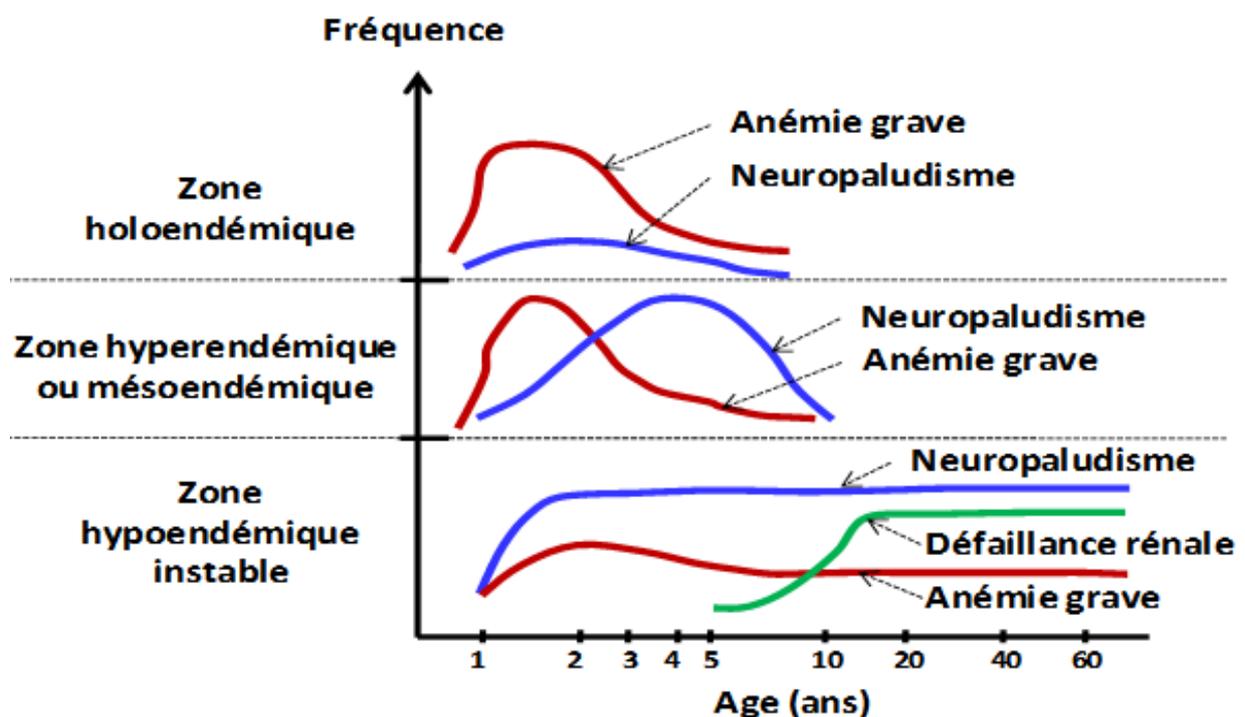


Figure 4 : Variations des formes cliniques du paludisme grave suivant l'endémicité palustre et l'âge des patients (White NJ *et al.*, 2018).

5.2.3. Paludisme cérébral ou neuropaludisme

5.2.3.1. Définition

Le neuropaludisme est défini comme un paludisme grave à *P. falciparum* avec des manifestations cérébrales, incluant généralement le coma (échelle de coma de Glasgow < 11 ou échelle de coma Blantyre < 3). Un paludisme dont le coma persiste pendant plus de 30 minutes après une crise est considéré comme un neuropaludisme (Bartoloni and Zammarchi, 2012). Il faut cependant exclure les autres facteurs qui pourraient causer une perte de conscience comme d'autres infections ou une hypoglycémie (WHO, 2015). Le neuropaludisme est la cause de 15 à 20 % de mortalité, et cela malgré un traitement anti-paludique et des soins intensifs efficaces. Les survivants peuvent développer des déficits neurologiques à long terme (Boivin et al., 2007). Cette forme grave de la maladie est la plus fréquente en Afrique subsaharienne où la transmission du paludisme est intense. Dans cette région, le neuropaludisme touche principalement les enfants de moins de cinq ans et est rare chez les adultes. Cependant, en Asie du Sud-Est, où la transmission du paludisme est faible, le neuropaludisme survient principalement chez les adultes (WHO, 2015). Les manifestations cliniques du neuropaludisme diffèrent entre les enfants et les adultes (14-16 ans), ce qui suggère que des caractéristiques physiopathologiques différentes sont associées au neuropaludisme en fonction de l'âge. Chez les adultes, le neuropaludisme s'accompagne souvent de complications touchant plusieurs organes, y compris un dysfonctionnement du système nerveux central, un dysfonctionnement hépatique, une insuffisance rénale aiguë et une insuffisance respiratoire. Par contre, chez les enfants africains, le neuropaludisme se manifeste habituellement par un coma, des convulsions et une anémie grave, mais les insuffisances respiratoires et rénales sont généralement rares (Marsh et al., 1995; Hawkes et al., 2013). Les anomalies rétinienne, y compris les hémorragies rétinienne, le papilloedème, le blanchiment de la rétine et les changements de couleur des vaisseaux rétiniens sont fréquentes chez les enfants atteints de neuropaludisme. Les composantes de la rétinopathie peuvent être utiles pour distinguer le coma dû au paludisme du coma non palustre (Beare et al., 2006).

5.2.3.2. Pathogénèse

Un modèle actuel simplifié de la pathogénèse du neuropaludisme suggère plusieurs facteurs importants qui interagissent pour causer la létalité. Le premier facteur identifié est la séquestration des parasites dans le cerveau. Cette séquestration est médiée par la liaison directe du globule rouge parasité à l'endothélium cérébral ou par l'accumulation de plaquettes.

Ces interactions entre les globules rouges parasités et les cellules endothéliales entraînent une rupture du contrôle du mouvement des liquides à travers la barrière endothéliale, en particulier dans les veinules post-capillaires. L'accumulation des leucocytes ainsi que des globules rouges parasités dans les veinules post-capillaires augmente la tension artérielle dans le cerveau, ce qui entraîne un œdème cérébral. Bien qu'une certaine destruction directe des cellules endothéliales puisse être médiée par les lymphocytes T CD8+, causant des saignements, le principal mode de lésion est lié à une perméabilité accrue de la barrière endothéliale et à une pression accrue dans les vaisseaux sanguins du cerveau, facilitant l'œdème (Ghazanfari et *al.*, 2018).

5.2.4. Différentes manifestations cliniques du paludisme grave chez l'adulte et l'enfant

Les manifestations cliniques du paludisme grave à *P. falciparum* diffèrent entre les enfants et les adultes. Le paludisme grave chez l'adulte tend à affecter les principaux organes que sont le cerveau, les poumons, le foie et les reins. Bien que la mortalité globale due au neuropaludisme soit d'environ 15 à 20 % chez l'adulte, le risque de décès dépend du dysfonctionnement des organes vitaux associés et est multiplié par trois en présence d'acidose ou d'insuffisance rénale. Par contre chez les enfants, les trois principales complications de la maladie sont le neuropaludisme, l'anémie grave et l'acidose, alors que la détresse respiratoire et l'insuffisance rénale sont rares. Ces trois syndromes peuvent survenir seuls ou en combinaison, cependant, l'anémie palustre grave touche généralement les plus jeunes enfants, alors que le neuropaludisme et l'acidose métabolique sont plus courants chez les enfants légèrement plus âgés. Le neuropaludisme et l'acidose métabolique sont chacun associés à des taux de mortalité élevés chez les enfants (12 % et 14 %, respectivement), et leur présence simultanée augmente considérablement le risque de décès (Wassmer et *al.*, 2015).

5.2.5. Le paludisme chez la femme enceinte

Le paludisme est responsable de plus de 10 000 décès maternels et 200 000 décès néonataux par an dans le monde. Il représente un risque très élevé pour la femme enceinte et son nouveau-né. Dans les zones d'endémie palustre, on estime qu'au moins 25% des femmes enceintes sont infectées, et la mortalité due au paludisme représente plus de 20% de tous les décès maternels (Schantz-Dunn et *al.*, 2009). L'infection palustre chez la femme enceinte entraîne des complications cliniques telles que l'anémie, l'œdème pulmonaire, l'hypoglycémie, le paludisme cérébral et parfois, la mort. Les conséquences du paludisme maternel chez le

foetus vont de l'avortement, le retard de croissance intra-utérin, l'accouchement prématuré et le faible poids à la naissance (Menendez et al., 2000; Kasumba et al., 2000). Dans les zones à faible transmission, les femmes, quel que soit le nombre de grossesses, sont plus vulnérables au paludisme (Nosten et al., 1991). Dans les zones de transmission stable, les femmes primigravides sont les plus à risque. Au cours des grossesses successives, les anticorps contre les globules rouges parasités qui lient le sulfate de chondroïtine A (CSA) dans le placenta, leur confèrent une résistance à *P. falciparum* en réduisant la densité parasitaire (Fried et al., 2012).

6. Variation et polymorphisme antigénique

6.1. Le génome du *Plasmodium*

Le génome nucléaire de *P. falciparum* de la lignée 3D7 est de 23 megabases réparties en 14 chromosomes et il code environ 5300 gènes. Les introns représentent 54% des gènes de *P. falciparum* (Gardner et al., 2002). Les chromosomes sont de différentes tailles, la région subtélomérique étant la plus variable. Cette différence de taille des chromosomes pourrait s'expliquer par des recombinaisons génétiques entre différents clones chez le moustique durant la méiose (Hyman et al., 2002). On note également une recombinaison à l'intérieur des blocs de répétitions (TARE : Telomere Associated Repeat Elements) dans la région subtélomérique, un mécanisme important dans la diversité antigénique de *P. falciparum* (Hinterberg et al., 1994; Corcoran et al., 1988). Dans cette région subtélomérique se trouve des familles de gènes multiples avec des parties du génome très diversifiées (**Figure 5**) : gènes var, rifin et stevor. Les télomères sont organisés en clusters qui augmentent le taux de recombinaisons (**Figure 6**) (Scherf et al., 2001).

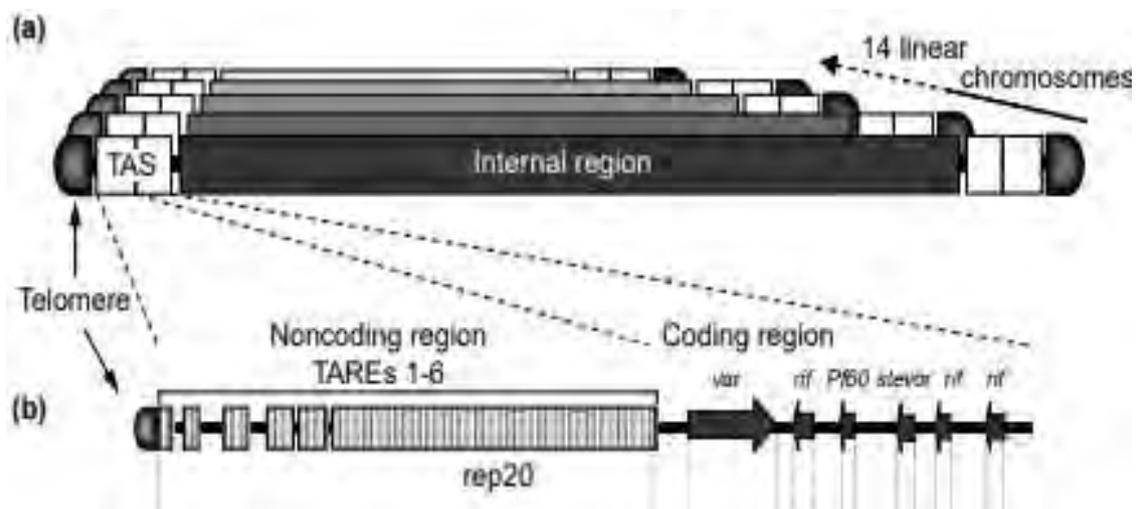


Figure 5 : Modèle d'organisation des chromosomes chez *P. falciparum* (Scherf et al., 2001).

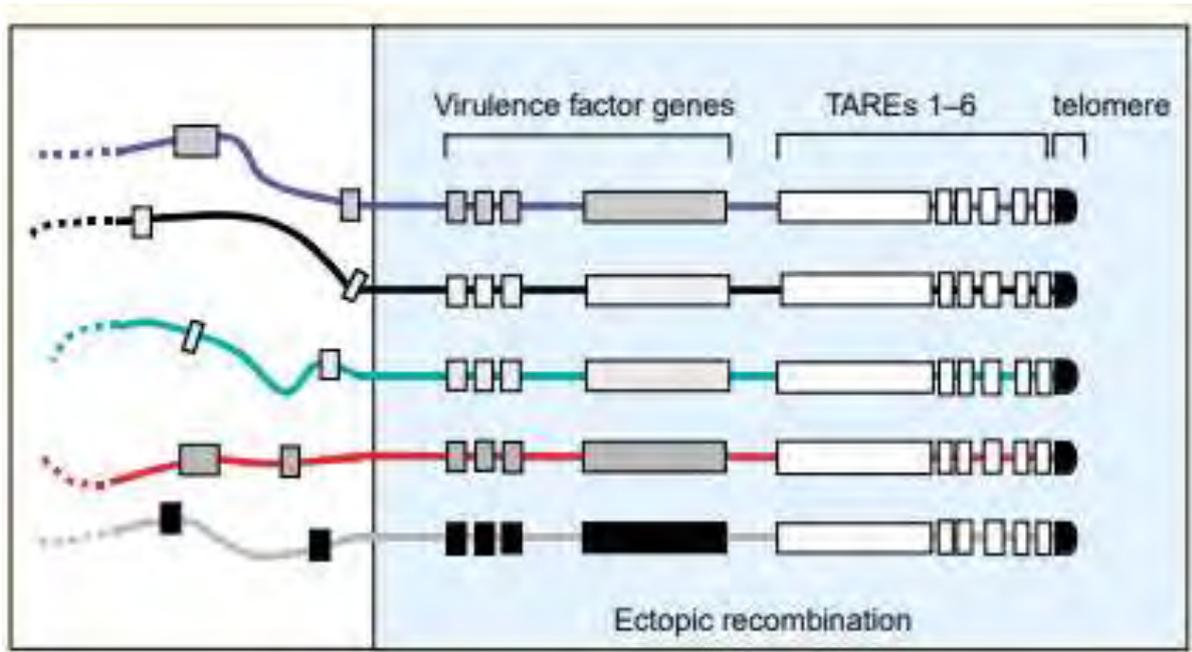


Figure 6 : Modèle schématique du cluster de télomères de *P. falciparum* (Scherf et al., 2001).

En plus de ce génome nucléaire, on trouve également deux autres génomes : un génome mitochondrial et un génome apicoplaste. Le génome mitochondrial comprend un seul chromosome long d'à peine 6 kb et codant seulement trois gènes : COX1, le COX3 et le cytochrome b (Conway et al., 2000). Le génome apicoplaste est quant à lui circulaire, mesure 35 kb et code pour plusieurs protéines (Le Ralph et al., 2004). L'unité de base du génome est le nucléosome, un morceau d'ADN d'environ 147 pb enroulé autour d'un noyau de huit protéines histones. Plusieurs couches de compactage de ces chaînes de nucléosomes forment ensemble un noyau très structuré. Les régions inter-géniques contiennent des niveaux de nucléosomes inférieurs à ceux des régions codantes et leur contenu est extrêmement élevé en AT (90-95%). Ces régions inter-géniques sont exclusivement occupées par des nucléosomes composés des variantes histones H2A.Z et H2B.Z, qui auraient adopté une fonction spécialisée pour permettre l'assemblage des nucléosomes dans ces régions très riches en AT (Hoeijmakers et al., 2013).

6.2. Mécanismes de régulation de la transcription

La régulation de la transcription repose sur des mécanismes épigénétiques et des facteurs de transcription.

6.2.1. Mécanismes épigénétiques

L'organisation de la chromatine est connue pour être impliquée dans la régulation transcriptionnelle (Nora et *al.*, 2013). Chez *P. falciparum*, des études de spectrométrie de masse ont permis d'identifier au moins 50 modifications post-traductionnelles (MPT) différentes des histones, notamment la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation, l'ubiquitylation et la sumoylation (Garcia et *al.*, 2007). L'inhibition de l'activité des histones acétyltransférases et des désacétylases influence les niveaux d'expression de la majorité des gènes et interfère avec la croissance des parasites, ce qui indique l'importance de l'acétylation dans la régulation des niveaux de transcription (Cui et *al.*, 2008).

6.2.2. Facteurs de transcription

Actuellement, la famille Apicomplexan specific AP2 (ApiAP2) est considérée comme la principale famille de facteurs de transcription du genre *Plasmodium* (Toenhake and Bártfai, 2019). Le facteur de transcription PfMyb1 a cependant été parmi les premiers facteurs de transcription étudiés. En utilisant la technique d'immunoprécipitation de la chromatine, il a été démontré que le PfMyb1 se lie à plusieurs promoteurs dans le noyau du parasite et participe directement à la régulation de la croissance du stade érythrocytaire (Gissot et *al.*, 2005). Une autre famille de facteur de transcription, le domaine C2H2 en doigt de zinc compte 12 protéines mais une seule, la telomere repeat-binding factors (PfTRZ) a été étudiée chez *P. falciparum* (Bertschi et *al.*, 2017). La famille HMGB (High Mobility Group box B) quant à elle compte 4 protéines, une seule ayant une liaison spécifique de séquence, tandis que les trois autres sont impliquées dans la liaison chromatine (Bschoff and Vaquero, 2010). Parmi les facteurs de transcription nous avons également le PRE Binding Protein (PREBP) à quatre domaines d'homologie K (KH). Le domaine KH est connu pour se trouver dans les protéines de liaison à l'ARN ou les protéines de liaison à l'ADN monocaténaire. Le PREBP est associé à une activation de l'expression génétique au stade intra-érythrocytaire du parasite (Omaki-Yasuda et *al.*, 2013).

6.3. Variation antigénique

6.3.1. Protéine *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane protein 1 (PfEMP-1)

La variation antigénique concerne essentiellement la protéine d'adhésion *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane protein 1 (PfEMP-1) exprimée à la surface des globules rouges au niveau des « Knobs » induits par l'infection par *P. falciparum*. La protéine PfEMP-1, de poids moléculaire entre 200 et 350 kD est codée par une famille d'une soixantaine de

gènes appelés les gènes var, chaque gène var codant pour un variant de PfEMP-1 d'antigénicité spécifique (Kraemer and Smith, 2006). PfEMP-1 possède plusieurs domaines DBL (Duffy binding-like domains) séparés par des régions inter-domaines riches en cystéine (CIDR pour Cystein-rich Inter Domain Region).

Les domaines DBL comprennent 5 classes (DBL α , DBL β , DBL γ , DBL δ , DBL ϵ) tandis que les CIDR ont été groupés en 3 classes (CIDR α , CIDR β et CIDR γ). En fonction de leur structure, de leur position chromosomique et de leur orientation, les gènes var ont à leur tour été classés en groupe (A, B et C) et en groupes intermédiaires (A/B, B/C) (Smith et al., 2000).

6.3.2. Les récepteurs (ou contre-ligands) de PfEMP-1

La protéine PfEMP1 s'est diversifiée en quatre phénotypes d'adhésion mutuellement exclusifs qui sont associés à différentes complications du paludisme.

- L'antigène Cluster of Differentiation36 (CD36) permet à *P. falciparum* d'adhérer à l'endothélium vasculaire. En plus de l'endothélium, c'est un récepteur qui est également exprimé par les plaquettes et les cellules dendritiques (McCormick et al., 1997).
- La molécule d'Adhésion Intercellulaire-1 (ICAM-1) est une protéine transmembranaire qui possède une extrémité amino-terminale extracellulaire et un domaine transmembranaire unique. C'est un récepteur inductible par une stimulation par les cytokines. *P. falciparum* peut adhérer à l'endothélium via l'ICAM-1 (Heddini et al., 2001).
- Le Platelet-Endothelial Adhesion Molecule-1 (PECAM-1, CD31) est un autre récepteur d'adhésion pour *P. falciparum*. Il se retrouve à la surface des plaquettes, des monocytes, des polynucléaires neutrophiles et de certaines cellules T. C'est une protéine transmembranaire grâce à laquelle les hématies parasitées peuvent adhérer aux hématies non-parasitées. Son implication a été suggérée dans le neuropaludisme (Heddini et al., 2001).
- Le récepteur-1 du complément (CR-1) a été identifié comme étant le principal récepteur de PfEMP-1 impliqué dans le rosetting des hématies non-infectées par les hématies infectées par *P. falciparum*. La formation des rosettes a été associée au paludisme sévère (Rowe et al., 2000).
- Le chondroïtine Sulfate A du placenta (CSA) est associé au paludisme de la femme enceinte (Turner et al., 2013).

6.4. Polymorphisme antigénique

L'existence d'un polymorphisme antigénique parmi les souches de *P. falciparum* a été suggérée pour expliquer le faible taux d'acquisition de l'immunité au paludisme par les habitants des zones endémiques et l'absence d'une immunité totale. Dans les infections expérimentales, l'immunité acquise semble impliquer une composante spécifique de la souche, ce qui confirme l'importance de la diversité antigénique. Cette diversité est, dans la plupart des cas, le résultat de la pression immunitaire puisque les mutations se produisent souvent dans des régions qui peuvent être reconnues par des anticorps ou des cellules (Frankset *al.*, 2003). Le polymorphisme dans la séquence codante peut être dû à des mutations ponctuelles, des insertions ou des délétions. Il est intéressant de noter que de nombreux antigènes du *Plasmodium* possèdent des régions répétées qui peuvent varier en taille et en nombre d'unités répétitives (Anders et *al.*, 1986). Une comparaison de ces séquences a révélé un degré remarquable de diversité entre les gènes alléliques de plusieurs antigènes asexués différents du stade sanguin. Les stades asexués du genre *Plasmodium* étant haploïdes, les séquences de ces gènes alléliques définissent la protéine exprimée dans les différents isolats du parasite (Anders and Smythe, 1989). Ce polymorphisme antigénique permet d'expliquer les difficultés de mise au point d'un vaccin contre le paludisme. Ainsi les résultats des essais cliniques du vaccin recombinant FMP2.1/AS02A, à partir de la protéine Apical Membrane Antigen 1 (AMA1) de la souche 3D7 de *P. falciparum* ont montré que le vaccin n'était efficace que contre le paludisme clinique causé par des parasites identiques à la souche vaccinale (Thera et *al.*, 2011). De même, le vaccin RTS,S/AS01 à partir de la protéine circumsporozoite de 3D7 a montré une plus grande activité contre les parasites homologues qui sont retrouvés chez moins de 10% des enfants de 5 à 17 mois de l'étude. Cela confirme l'efficacité souche dépendante du vaccin (Neafsey et *al.*, 2015).

6.4.1. Marqueurs du polymorphisme antigénique

6.4.1.1. Gène *msp-1*

Le gène *msp-1* est localisé sur le chromosome 9. La protéine MSP-1 (190 KDa) est un ligand abondamment exprimé à la surface des mérozoïtes et est essentielle pour l'invasion. Il a été montré une interaction entre le groupement aminé terminal de la protéine MSP-1 et la glycophorin A de la membrane des érythrocytes (Baldwin et *al.*, 2015). La protéine MSP-1 est considérée comme un potentiel candidat vaccin (Cowan et *al.*, 2014). Les anticorps qui la reconnaissent, inhibent la croissance parasitaire *in vitro* (Alaro et *al.*, 2013) et sont corrélés avec

la protection clinique (Riley *et al.*, 1992). Le gène *msp-1* est formé de 17 blocs (**Figure 7**). Le bloc 2 est le plus polymorphe et comprend 3 familles alléliques : MAD20, K1 et RO33.

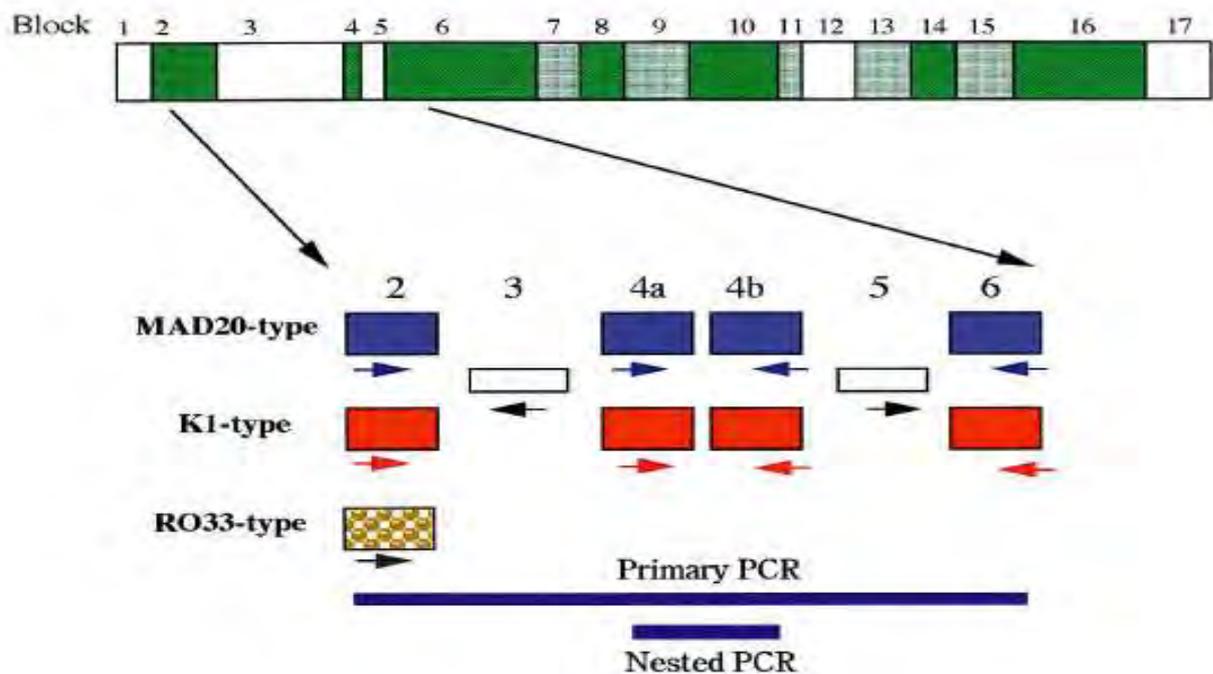


Figure 7 : Représentation de la structure du gène *msp-1* avec 17 blocs, 5 séquences conservées, 5 semi-conservées et 7 variables. Le bloc 2 est le plus polymorphe et comprend 3 familles alléliques : K1, MAD20 et RO33.

6.4.1.2. Gène *msp-2*

Le gène *msp-2* est localisé sur le chromosome 2 et est divisé en cinq blocs (**Figure 8**). La protéine MSP-2 est un candidat de choix pour l'élaboration d'un vaccin contre le paludisme (Balam *et al.*, 2014). Le polymorphisme marqué du gène *msp-2* en fait l'un des marqueurs les plus étudiés, surtout dans la distinction des populations parasites pour l'évaluation de l'efficacité thérapeutique des médicaments anti-paludiques (Bin Dajem, 2015).

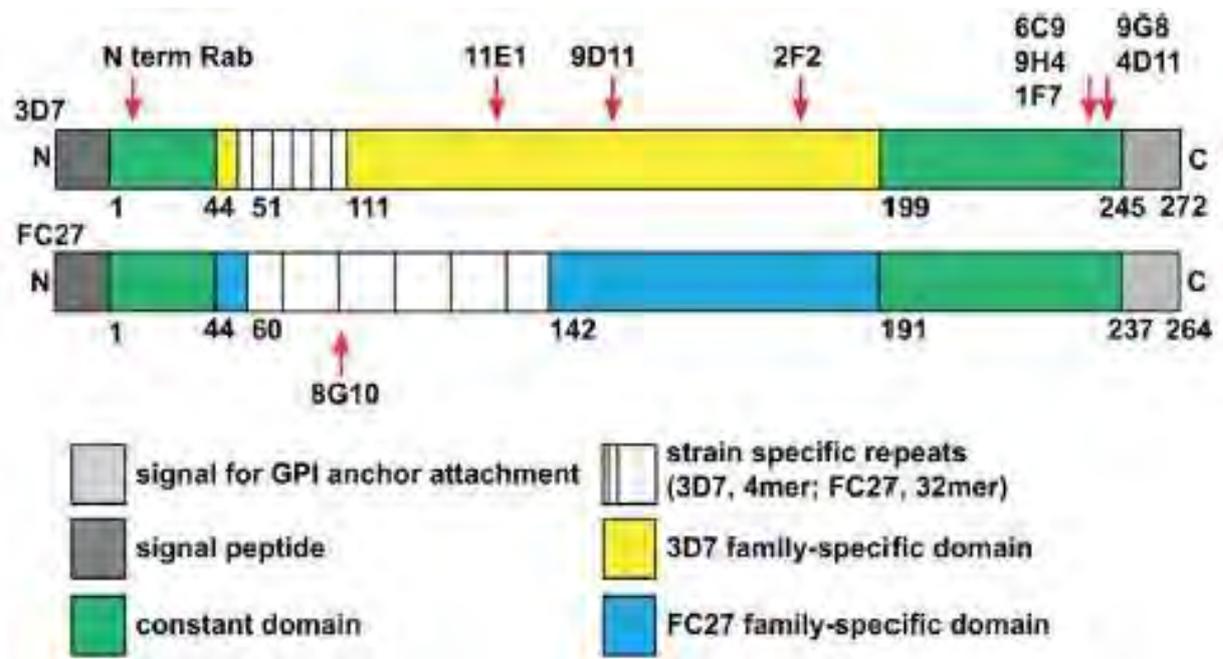


Figure 8: Structure des deux familles alléliques du gène *msp-2*, 3D7 et FC27. Les blocs N et C terminaux sont constants tandis que le bloc central polymorphe porte la spécificité de la famille allèlique (Boyle et al., 2014).

7. Aspects immunologiques

L'immunité contre le paludisme peut prendre deux formes : l'immunité anti-palustre dirigée contre la charge parasitaire et l'immunité anti-maladie dirigée contre les manifestations cliniques (**Figure 9**). Le mode d'acquisition de ces deux types d'immunité n'est jusqu'à présent pas parfaitement établi. L'immunité anti-palustre est l'aptitude à contrôler la densité parasitaire. Il est généralement admis que les densités parasitaires diminuent globalement avec l'âge quel que soit le niveau d'endémicité autant pour les infections symptomatiques qu'asymptomatiques. Quant à l'immunité anti-maladie, elle se définit par la capacité de tolérer une densité parasitaire donnée sans développer de fièvre (Rodriguez-Barraquer et *al.*, 2018).

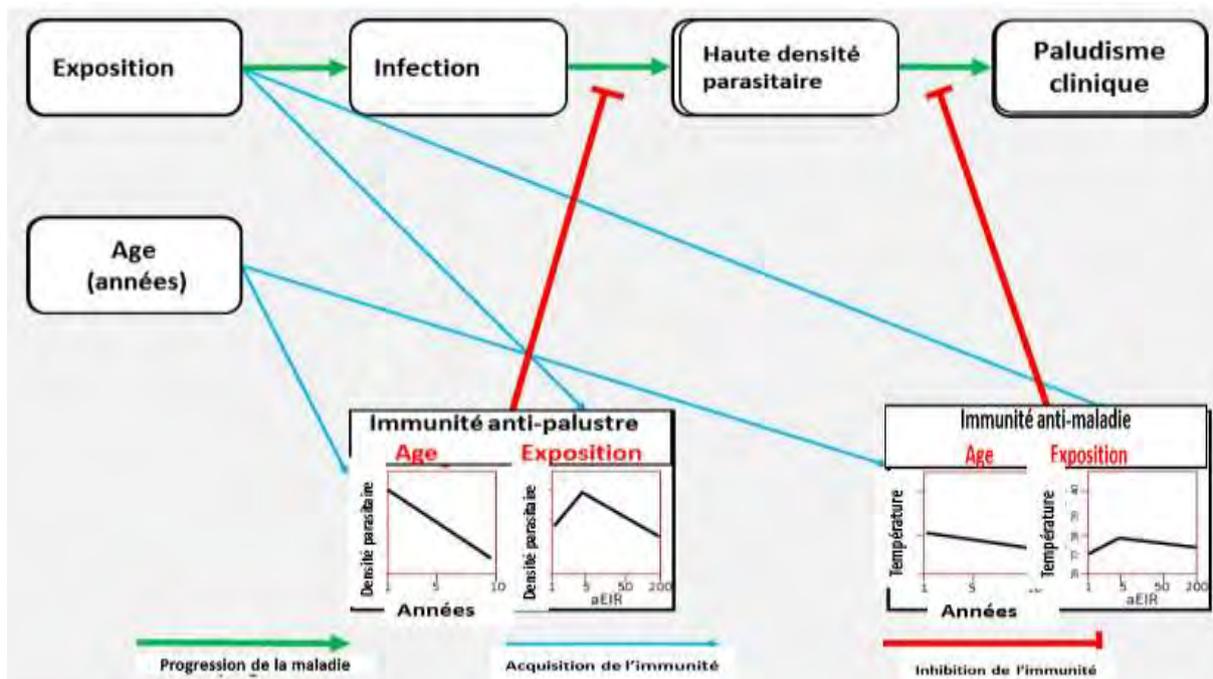


Figure 9 : Facteurs associés à l'immunité anti-palustre et anti-maladie (White and Watson, 2018)

7.1. Immunité anti-palustre

L'immunité acquise contre le paludisme met plusieurs années à se développer. Elle protège des manifestations cliniques mais ne parvient pas à une clairance parasitaire totale. Cette immunité implique aussi bien des effecteurs cellulaires qu'humoraux. Le rôle très important de l'immunité humorale a été démontré par la forte diminution des symptômes et de la parasitémie chez les patients traités par un transfert passif d'IgG de sujets immuns (Sabchareon et *al.*, 1991). Par contre, les mécanismes qui suppriment les réponses humorales

ont été associés à une parasitémie élevée dans les modèles de paludisme murin, confirmant ainsi la nécessité des réponses anticorps (Pérez-Mazliah *et al.*, 2015; Ryg-Cornejo *et al.*, 2016; Obeng-Adjei *et al.*, 2015).

Les cellules B productrices des anticorps sont activées par des cellules présentatrices d'antigène, principalement des cellules dendritiques. Les lymphocytes T CD4⁺ sont également nécessaires pour la prolifération des lymphocytes B et leur maturation. Les cellules T auxiliaires folliculaires, participent à l'activation des cellules B naïves dans les centres germinaux et leur réactivation lors des infections secondaires (Hansen *et al.*, 2017).

7.2. Immunité anti-maladie

7.1.1. Rôle de l'inflammation dans la pathogenèse du paludisme

La forme clinique du paludisme est de plus en plus considérée comme une immunopathologie. La cascade de cytokines libérées pendant la phase érythrocytaire plus particulièrement les cytokines pyrogènes telles que le TNF- α , l'IL-1 α et l'IL-6 serait à l'origine de l'inflammation (Clark and Cowden, 2003; Langhorne *et al.*, 2008). Ces cytokines sont nécessaires pour plusieurs processus effecteurs anti-parasitaires comme l'orientation de la réponse des lymphocytes T à une réponse lymphocyte auxiliaire de type 1 (Th1), la destruction directe des parasites par le TNF et l'IFN ou la destruction indirecte des parasites par activation des cellules phagocytaires (Inoue *et al.*, 2013, 2017). Cependant, si elles ne sont pas bien régulées, des concentrations élevées de ces cytokines et d'autres médiateurs pro-inflammatoires entraînent des effets néfastes qui se manifestent sous forme de fièvre et d'autres symptômes du paludisme. De toute évidence, l'inflammation est au cœur de la pathophysiologie du paludisme et un contrôle efficace de cette inflammation pourrait éviter la sévérité de la maladie. Il est intéressant de noter que des données provenant de régions endémiques d'Afrique montrent une plus grande tolérance aux parasites à des niveaux d'exposition élevés. Cette tolérance aux parasites semble être associée à une réduction des réponses inflammatoires (Soares *et al.*, 2017).

7.1.2. Mécanismes de réduction de l'inflammation

7.1.2.1. Immunosuppression directe des cellules immunitaires par des globules rouges infectés

Un des mécanismes possibles de réduction de l'inflammation est l'immunosuppression directe des cellules immunitaires par des antigènes parasitaires ou produits parasitaires conduisant ainsi à une altération fonctionnelle des cellules immunitaires (Millington *et al.*, 2006). Les

PBMC (Peripheral blood mononuclear cells) de personnes infectées ne prolifèrent pas lorsqu'ils sont stimulés *in vitro* avec des antigènes du parasite, contrairement aux PBMC de personnes non infectées avec lesquels on observe des niveaux de prolifération élevés (Ho et *al.*, 1986 ; Riley et *al.*, 1992).

7.1.2.2. Baisse du niveau d'activation des cellules dendritiques par des globules rouges infectés

Les globules rouges parasités ont la capacité d'adhérer aux cellules dendritiques et d'inhiber leur maturation réduisant ainsi leur capacité à stimuler les cellules T (Ho et *al.*, 1986 ; Riley et *al.*, 1992). Des études suggèrent que, dans les zones à transmission élevée, le paludisme a un impact négatif sur l'expression des marqueurs d'activation des cellules dendritiques chez les enfants. Le faible niveau d'activation des cellules dendritiques périphériques serait également dû à leur séquestration dans les tissus affectés (Yap et *al.*, 2019; Diallo et *al.*, 2008).

7.1.2.3. Régulation négative des cytokines pro-inflammatoires sur l'immunité adaptative

Il a été démontré que les mêmes médiateurs pro-inflammatoires qui sont à l'origine de la pathologie palustre grave ont des effets néfastes sur l'induction des réponses protectrices des lymphocytes B (Ryg-Cornejo et *al.*, 2016). Ainsi, les IFN de type I ont été identifiés comme étant les principales molécules immunorégulatrices pendant la phase sanguine du paludisme. Ils ont la capacité de supprimer l'immunité innée et adaptative. Ces résultats donnent un aperçu du développement de l'immunité pendant le paludisme et peuvent expliquer pourquoi les vaccins administrés dans les régions où la maladie est endémique fonctionnent de façon non optimale (Montes de Oca et *al.*, 2016 ; Yu et *al.*, 2018).

7.1.2.4. Perte de cellules immunitaires

Le nombre absolu de lymphocytes T augmente de façon marquée après un traitement comparé aux niveaux observés pendant une infection palustre concomitante, ce qui suggère une lymphopénie due au paludisme (Hviid et *al.*, 2001). En particulier la fraction V δ 2⁺ des lymphocytes T qui joue un rôle dans la prévention de l'infection palustre chez les enfants vivant en milieu endémique. On assiste cependant à leur perte progressive en fonction du nombre d'accès palustre. Le dysfonctionnement de ces cellules pourrait représenter un mécanisme de tolérance à la maladie (Bediako et *al.*, 2019).

8. Types de vaccins

8.1. Vaccins du stade hépatique

8.1.1. Vaccins à base de sous-unité de la protéine circumsporozoïte

8.1.1.1. RTS, S/AS01

Le vaccin se présente sous forme de particules de type virus non-infectieux (VLP) produites dans des cellules de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) par la technologie de l'ADN recombinant. Il est constitué de la protéine de surface du sporozoïte de *P.falciparum* fusionnée avec l'antigène de surface de l'hépatite B avec un ratio de 1/4. Il est couplé au puissant adjuvant liposomal AS01 de GlaxoSmithKline. Il est le seul vaccin qui a démontré son efficacité protectrice contre le paludisme clinique dans un essai clinique de phase III (RTS, S. C. T. P., 2015). La protection est partielle, diminue avec le temps et peut être âge dépendante. La vaccination se fait avec 3 injections à 1 mois d'intervalle. L'incidence chez les enfants de 5 à 17 mois a été une réduction de 51% des accès palustres au cours de la première année suivant l'administration de la troisième dose. Après 48 mois, l'efficacité était de 26%. Cette efficacité pouvait être portée à 39% en vaccinant les enfants avec une quatrième dose 18 mois après la troisième dose (Olotu et *al.*, 2016).

8.1.1.2. Vaccin R21

Il est composé d'une seule sous-unité équivalente à "RTS" seul sans l'excès quadruple de HBsAg. L'affichage d'une proportion plus élevée de CSP et de moins d'Ag HBsAg peut entraîner une amélioration des réponses IgG par rapport au RTS, S. Des essais cliniques sont en cours, en phase 1/2 a avec les adjuvants Matrix-M ou AS01 (Collins et *al.*, 2017).

8.1.2. Vaccins à base de sporozoïtes entiers: Vaccin PfSPZ

Ce vaccin a constitué une avancée majeure en termes de capacité d'isolement et de purification. Il a été montré qu'une administration intraveineuse du vaccin PfSPZ était nécessaire pour induire une immunité puissante chez l'homme (Seder et *al.*, 2013). Un essai mené auprès d'adultes maliens a révélé que le vaccin PfSPZ était bien toléré et sûr. Le groupe des vaccinés était mieux protégé contre l'infection que le groupe témoin (Sissoko et *al.*, 2017). Cependant, la comparaison des résultats des essais cliniques réalisés au Mali et en Guinée Equatoriale avec ceux obtenus par le même schéma vaccinal chez les adultes américains a montré des réponses IgG anti-PfCSP plus faibles chez les populations en zone d'endémicité. Des études d'optimisation sont en cours (Olotu et *al.*, 2018 ; Lyke et *al.*, 2017).

8.2. Vaccins du stade sanguin

Beaucoup d'efforts ont été faits pour la mise au point d'un vaccin contre les antigènes du parasite cibles de l'immunité acquise. Plusieurs essais cliniques ont concerné les antigènes du mérozoïte et du globule rouge parasité. Leur efficacité a été cependant limitée par la capacité de survie du parasite grâce à la variation antigénique et au polymorphisme génétique (Sirima et *al.*, 2017).

8.2.1. PfAMA1

Les efforts en cours se concentrent sur la mise en place d'un vaccin multiallélique, la recherche d'épitopes conservés et l'amplification de la réponse immune (Srinivasan et *al.*, 2017). A cet égard, le développement d'un vaccin associant PfAMA1 avec son ligand peptidique PfRON2 est prometteur. La protection *in vivo* des singes *Aotus* a été nettement améliorée (Coelho et *al.*, 2017 ; López et *al.*, 2018).

8.2.2. RH5

P. falciparum reticulocyte-binding protein homolog 5 (PfRH5) a été identifié comme un antigène du mérozoïte avec un polymorphisme limité. La protéine PfRH5 forme une liaison essentielle avec le basigin (CD147), récepteur à la surface du globule rouge pendant l'invasion (Crosnier et *al.*, 2011). Plusieurs études ont montré que c'est un antigène bien conservé entre des souches d'origines différentes de *P. falciparum* et une cible suffisamment sensible aux anticorps neutralisants dans la minute qui suit entre la sortie de schizonte et la ré-invasion du globule rouge (Bustamante et *al.*, 2013).

Cependant, des tests d'inhibition *in vitro* de la croissance parasitaire et des essais cliniques *in vivo* sur le singe *Aotus* suggèrent que des concentrations élevées d'IgG polyclonales spécifiques de PfRH5 (>300 µg/mL) sont probablement nécessaires pour une immunité efficace. De tels niveaux d'anticorps pourraient être difficiles à atteindre (Alanine et *al.*, 2019).

8.2.3. Vaccins bloquant la transmission (VBT)

Les vaccins contre les stades sexuels n'empêchent pas directement l'infection ou les symptômes cliniques chez l'hôte, mais préviennent la transmission en empêchant le développement des sporozoïtes chez le moustique. Les principaux antigènes des VBT sont la protéine de surface de l'ookinète Pfs25 et les antigènes gamétocytaires Pfs48/45 et Pfs230.

Les anticorps dirigés contre ces trois types d'antigènes ont donné de bons résultats dans les études précliniques (Kapulu et *al.*, 2015).

9. Notion de portage asymptomatique

9.1. Définition

L'infection palustre asymptomatique se définit par la présence de parasites du genre *Plasmodium* chez un individu en l'absence de symptômes ou de traitement antipaludique. Le paludisme symptomatique quant à lui est caractérisé par une température axillaire $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ ou tout antécédent de fièvre au cours des 24 dernières heures, accompagné par la présence confirmée de parasites (Espié et *al.*, 2015). Certaines études incluent d'autres critères pour caractériser le portage asymptomatique tels qu'un seuil limite de densité parasitaire (Tabue et *al.*, 2019), ou une durée de portage sans symptômes pouvant aller de 24 heures à 60 jours (Alves et *al.*, 2005). En fonction de la méthode de détection, l'infection asymptomatique est soit microscopique ou submicroscopique (uniquement détectable par PCR) (Niang et *al.*, 2017).

9.2. Caractéristiques du portage asymptomatique

Au cours des deux dernières décennies, les données sur la prévalence de l'infection palustre ont montré grâce aux techniques d'amplification des acides nucléiques que la majorité des infections étaient asymptomatiques. La plupart des infections asymptomatiques sont de faible densité parasitaire (Cox et *al.*, 1994; Rogier et *al.*, 1996; Muller et *al.*, 2009). Dans les zones où les niveaux de transmission sont faibles, une forte proportion des infections détectées lors des enquêtes de prévalence présentent souvent des densités parasitaires inférieures au seuil de détection des méthodes de diagnostic conventionnelles (microscopie et TDR) (Okell et *al.*, 2009). Les infections asymptomatiques chroniques se produisent dans un large éventail d'endémicité, bien que sa fréquence et sa durée soient probablement spécifiques au contexte, 5-6 mois au Ghana (Felger et *al.*, 2012), 6-9 mois au Myanmar (Landier et *al.*, 2017), 2-4 mois au Cambodge (Tripura et *al.*, 2016), 4 mois ou plus au Vietnam (Nguyen et *al.*, 2018).

9.2.1. Facteurs humains influençant la durée de l'infection

Les infections asymptomatiques et de faible densité parasitaire sont intimement liées à la tolérance d'un individu aux parasites (Schneider and Ayres, 2008).

Plusieurs caractéristiques de l'hôte sont en relation avec l'expression clinique différentielle de l'infection palustre :

- Les facteurs génétiques tels que les mutations de l'hémoglobine S (HbS) et de l'hémoglobine C (HbC) qui sont protectrices contre le paludisme clinique (De Mendonça *et al.*, 2012 ; Taylor *et al.*, 2012).
- L'immunité acquise : les adultes asymptomatiques ont moins de parasitémies que les enfants (Rogier *et al.*, 1996; Carneiro *et al.*, 2010; Doolan *et al.*, 2009). Les adultes sont également moins susceptibles de développer des symptômes (Felger *et al.*, 2012).
- Les co-infections avec des espèces plasmodiales autre que *P. falciparum*. Un effet protecteur du portage de *P. vivax* contre les épisodes cliniques à *P. falciparum* a été rapporté (Hofmann *et al.*, 2017).
- Le déficit en fer a été décrit comme ayant un effet protecteur contre le paludisme grave (Gwamaka *et al.*, 2012).
- Des études ont démontré des associations entre certaines communautés de microorganismes intestinales, la protection contre l'infection due à *Plasmodium* et la modulation de la gravité de la maladie (Ippolito *et al.*, 2018).

9.2.2. Facteurs liés au parasite influençant la durée de l'infection

Ils sont de plusieurs ordres et incluent :

- La taille de l'inoculum (le nombre estimé de sporozoïtes injectés par les moustiques *Anopheles* infectés) influence le temps nécessaire pour que les infections deviennent patentes (Churcher *et al.*, 2017).
- L'apparition de symptômes est souvent associée à l'apparition d'une nouvelle souche parasitaire dans le sang et à l'augmentation du niveau de parasitémie (Kun *et al.*, 2002 ; Hofmann *et al.*, 2017). Il a été montré que les infections asymptomatiques et les infections symptomatiques présentaient des souches de parasites différentes (Searle *et al.*, 2017).

9.3. Contribution du portage asymptomatique à la transmission de l'infection

Estimer la contribution du portage asymptomatique est particulièrement important dans un contexte de faible prévalence. Les tests d'infection expérimentale de moustiques ont montré une association entre la densité en gamétocytes et le pourcentage de moustiques infestés. Ces résultats suggèrent que les infections asymptomatiques qui sont souvent caractérisés par de

faibles taux de gamétocytes devraient avoir moins d'impact sur la transmission (Bousema et *al.*, 2012). Cependant, il a été démontré que malgré des parasitémies submicroscopiques, les porteurs asymptomatiques étaient capables d'infester les moustiques (Alves et *al.*, 2005). Ces résultats montrent que le portage asymptomatique constituait un réservoir pour la transmission. Cette contribution était d'autant plus importante que le portage asymptomatique pouvait s'étendre sur une longue période (Felger et *al.*, 2012 ; Nguyen et *al.*, 2018).

9.4. Outils de détection

Bien que l'examen microscopique du frottis sanguin (FS) et de la goutte épaisse (GE) soit la technique de référence préconisée par l'OMS (Gold Standard) (Singh et *al.*, 1999). La technique de polymérisation en chaîne (PCR) est de loin la technique la plus sensible pour l'étude de la prévalence parasitaire dans un contexte de faible prévalence. Les autres méthodes de diagnostic que sont les tests de diagnostic rapides (TDR) et la détection des anticorps anti-palustres sont surtout utilisées pour le diagnostic clinique et la mesure de l'évolution du niveau de transmission, respectivement.

9.4.1. Goutte épaisse (GE) et Frottis sanguin (FS)

La GE a un seuil de détection de 50 parasites/ μ l de sang et le FS permet le diagnostic d'espèce (Cordray and Richards-Kortum, 2012). C'est une technique peu coûteuse mais nécessitant un personnel expérimenté. La GE permet de différencier les infections asymptomatiques microscopiques des infections asymptomatiques submicroscopiques.

9.4.2. Polymérase chain reaction (PCR)

C'est la plus sensible des techniques de diagnostic, son seuil de détection est de l'ordre de 0,3 parasite/ μ l de sang. La PCR en temps réel (qPCR) permet une quantification rapide de l'ADN plasmodial (Kamau et *al.*, 2013). La Nested-PCR quant à elle permet l'identification des espèces. Le gène de la petite sous-unité 18S de l'ARN ribosomal (18S ARNr) a été la cible la plus utilisée pour le diagnostic moléculaire du paludisme (Snounou et *al.*, 1993). Pourtant la présence de ce gène dans le génome de *Plasmodium* est assez faible 5 à 8 copies (Mercereau-Pujalon et *al.*, 2002).

9.4.2.1. Utilisation de gènes cibles à copies multiples

La génomique a permis de découvrir de nouveaux gènes cibles à copies multiples spécifiques d'espèces (Demas et *al.*, 2011 ; Hofmann et *al.*, 2015, 2018).

Parmi les cibles prometteuses figurent les séquences répétées subtélomériques non codantes Pvr47 et Pfr364 présentes en 14 et 41 copies dans les génomes de *P. vivax* et *P. falciparum*, respectivement (Demas et al., 2011). Une étude comparative entre la Nested-PCR ciblant le gène 18S, la qPCR ciblant également le gène 18S et la qPCR ciblant les gènes Pvr47 et Pfr364 a montré que la qPCR ciblant les gènes Pvr47 et Pfr364 détectait 20% plus de positifs que les techniques basées sur le gène 18S (Amaral et al., 2019).

9.4.2.2. Technique loop mediated isothermal amplification (LAMP)

La technique LAMP est une méthode moléculaire isotherme utilisant une ADN polymérase de *Bacillus stearothermophilus* qui a une activité à température constante écartant le besoin d'un thermocycleur. Les différents tests disponibles, ciblant principalement le génome mitochondrial du *Plasmodium*, nécessitent un ensemble de six amorces différentes (Ponce et al., 2017). Les réactifs peuvent être lyophilisés ce qui facilite leur transport et leur conservation sur le terrain. Le résultat coloré peut-être lu à l'oeil nu. La sensibilité est similaire à celled'un test de PCR en temps réel avec des limites de détection ≤ 2.0 parasites/ μ l selon la méthode de préparation des échantillons utilisée (Lucchi et al., 2016). Imai et al., 2017) ont pu grâce à des amorces spécifiques d'espèce, en ciblant le gène ARN mitochondriale 18S, mettre en place un test multiplexe permettant de détecter en même temps toutes les espèces plasmodiales infectant l'homme. Les principales limites de cette technique étaient la quantification de la parasitémie et le diagnostic d'espèce (Imai et al., 2017).

9.4.3. Tests de diagnostic rapide (TDR)

Les TDR reposent sur le principe de l'immuno-chromatographie qui utilise des bandelettes sensibilisées par des anticorps monoclonaux spécifiques détectant des antigènes plasmodiaux (Wongsrichanalai et al., 2007). Leur positivité permet une prise en charge adéquate et rapide des patients. Les antigènes les plus utilisés sont :

9.4.3.1. Antigène histidine rich protein 2 (HRP2)

L'Antigène histidine rich protein 2 (HRP2) est une glycoprotéine spécifique de l'espèce *P. falciparum* et est produite par les stades érythrocytaires asexués du parasite. Plusieurs tests sont disponibles (Wanja et al., 2016). Leur seuil de détection varie de 100 à 200 parasites/ μ l (WHO, 2017). Les faux négatifs sont possibles, et seraient dus à des mutations du gène codant pour la protéine HRP2 ou la persistance de l'antigène HRP2 après la clairance parasitaire. La fréquence des délétions du gène codant pour l'HRP2 a été étudiée lors d'une récente enquête

mondiale à partir de 2671 échantillons de sang de patients atteints d'une infection à *P. falciparum* dans 27 pays (**Figure 10**). L'étude a montré une suppression du gène *pfhrp2* dans 0,6 % des cas, dans 9 des 27 pays. La fréquence des suppressions de *pfhrp2* était supérieure à 5 % dans trois pays (WHO, 2019).

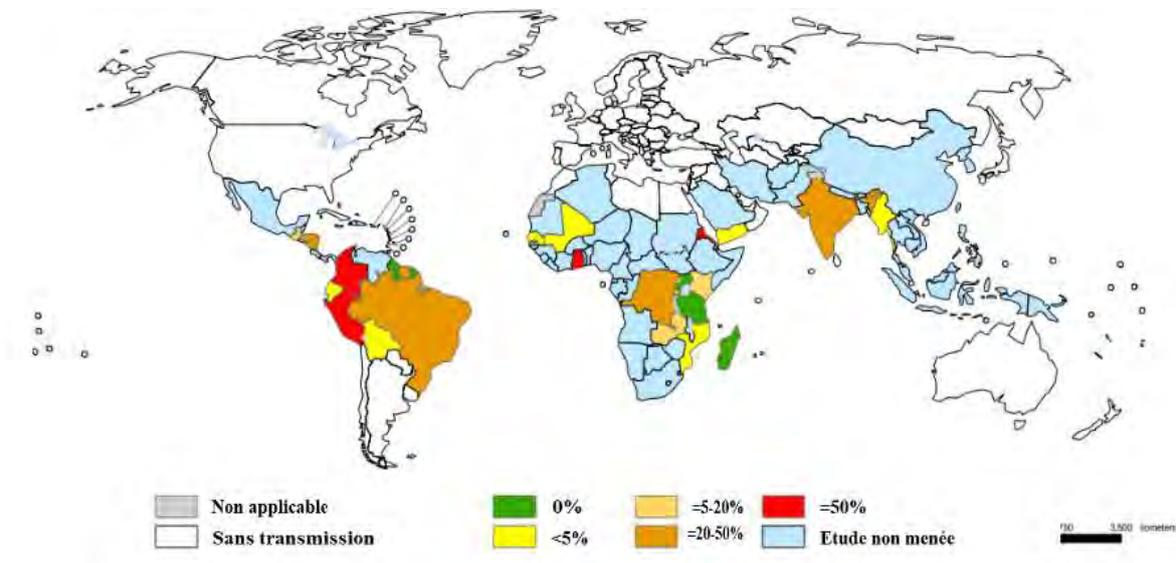


Figure 10 : Fréquence des délétions du gène codant pour l'HRP2 (WHO, 2019).

9.4.3.2. Lactate déshydrogénase (LDH)

La LDH a un seuil de détection identique à celui de l'HRP2. Sa clairance est par contre plus rapide conduisant à leur non persistance dans le sang après disparition du parasite, d'où leur intérêt dans la surveillance des patients traités (Wongsrichanalai et al., 2007). La plupart des tests immunochromatographiques utilisent deux types d'anticorps pour capter l'enzyme métabolique LDH du parasite : un anticorps spécifique pour *P. falciparum* et un anticorps monoclonal pan-spécifique réagissant avec les quatre espèces de *Plasmodium* responsables du paludisme chez l'homme : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*. Les formes sexuées et asexuées du parasite peuvent être détectées et il n'y a pas de réaction croisée avec la LDH humaine ou le facteur rhumatoïde (Wongsrichanalai et al., 2007).

9.4.4. Détection des anticorps anti-palustres

Les différentes techniques de diagnostic par PCR, TDR et GE fournissent des estimations de la prévalence parasitaire sur une courte période de temps et peuvent être imprécises dans les régions où la transmission est faible ou variable (Laban et al., 2015). La sérologie quant à elle constitue une alternative pour la surveillance du paludisme et fournit une mesure de l'exposition aux parasites sur des périodes de temps plus longues que les tests de diagnostic

standards (Corran et *al.*, 2007). C'est ainsi que les enquêtes sérologiques ont beaucoup été utilisées pour étudier l'impact des différentes interventions pour le contrôle de l'infection palustre, la mesure du niveau de transmission et l'identification des hétérogénéités spatiales (Corran et *al.*, 2007; Idris et *al.*, 2017; Biggs et *al.*, 2017).

9.4.4.1. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Le dosage immuno-enzymatique (ELISA) est une méthode fiable et relativement peu coûteuse pour mesurer les anticorps et autres protéines dans les échantillons biologiques. Pour l'analyse d'anticorps spécifiques dans le sérum, un antigène de capture est fixé sur une surface de polystyrène solide à partir de laquelle il peut capturer les anticorps. Les anticorps capturés sont ensuite détectés en utilisant un second anticorps conjugué à une enzyme. La détection s'effectue par addition d'un substrat colorimétrique et la lecture de l'absorbance (densité optique) (Murungi et *al.*, 2019).

9.4.4.2. Les puces à protéines ou protéines microarray

Les puces à protéines ont été développées pour pallier l'absence de corrélation entre l'activité des gènes détectés par les puces à ADN et l'expression protéique sur laquelle repose l'ensemble des activités cellulaires. Les puces à protéines quant à elles se basent sur les interactions antigènes/anticorps comme le test ELISA (MacBeath and Schreiber, 2000). Elles permettent d'analyser simultanément l'expression d'un grand nombre de protéines et sont classées en trois catégories :

- Puces à protéines fonctionnelles qui utilisent des supports avec des protéines purifiées (Chen and Zhu, 2006).
- Puces à protéines analytiques : l'antigène est soit directement fixé sur le support avant d'être soumis à l'anticorps pour la méthode directe ou sur un anticorps de capture pour la méthode dite sandwich (Kamuyu et *al.*, 2018).
- Puces à protéines en phase reverse : dans ce cas se sont des tissus cellulaires qui sont fixés sur le support (Seow et *al.*, 2017).



**DEUXIEME PARTIE :
ETUDE EXPERIMENTALE**

1. OBJECTIFS

L'objectif principal de ce travail était de déterminer le niveau du polymorphisme parasitaire associé à l'infection asymptomatique microscopique et submicroscopique à *P. falciparum*. Ce travail comprenait également l'étude de l'impact du polymorphisme parasitaire associé à l'infection asymptomatique microscopique sur la parasitémie d'une part et d'autre part celui du polymorphisme parasitaire associé à l'infection asymptomatique submicroscopique sur la réponse immune.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Sites d'étude

2.1.1. Site de Ndiop

2.1.1.1. Projet Dielmo-Ndiop

Le projet Dielmo-Ndiop a été initié par le Ministère de la Santé du Sénégal, l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar (UCAD), les équipes de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) et de l'Institut Pasteur de Dakar (IPD). L'objectif était de mener des investigations à long terme sur les relations hôtes-parasites et l'immunité contre le paludisme, mais surtout les mécanismes de l'acquisition de l'immunité anti-palustre (Trape et *al.*, 1994). C'est ainsi que les sites de Dielmo et Ndiop situés à environ 280 km de Dakar dans la région de Fatick au Sénégal, ont été mis en place en 1990 et 1993, respectivement.

2.1.1.2. Présentation du site de Ndiop

Ndiop était situé dans une zone mésoendémique à transmission saisonnière (**Figure 11**). La distribution de moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action (MILDA) à chaque ménage a été mise en place depuis 2008 (Trape et *al.*, 1994). Le nombre de piqûres infectantes a été évalué à 20, 79 et 4,6 par personne/an en 1993, 2000 et 2010 respectivement (Trape and Rogier, 1996 ; Diop et *al.*, 2014). La prévalence parasitaire microscopique a suivi la même tendance que le nombre de piqûres infectantes. Cette prévalence parasitaire microscopique était de 50%, 7%, 0,27% et 0% en 2000, 2010, 2014 et 2015, respectivement (Diop et *al.*, 2014 ; Niang et *al.*, 2017). A partir de 2014, la prévalence parasitaire à Ndiop devenue essentiellement submicroscopique a été évaluée par qPCR à 12,5 % et 7,29 % pour 2014 et 2015, respectivement et *P. falciparum* était la seule espèce diagnostiquée (Niang et *al.*, 2017).

2.1.2. Site du Projet EDCTP/WANETAM

2.1.2.1. Le Projet EDCTP/WANETAM

L'EDCTP (European and Developing Countries Clinical Trials Partnership) ou le partenariat des pays européens et des pays en voie de développement pour la mise en place des sites d'essais cliniques vise à accélérer le développement de moyens de lutte contre le VIH/SIDA, la tuberculose et le paludisme. Ses financements sont octroyés à travers des réseaux régionaux d'excellence. C'est le cas du réseau WANETAM (West African Network of Excellence for TB, AIDS and Malaria) qui est un réseau d'Excellence Ouest-Africain financé par EDCTP. Il regroupe 14 institutions de 14 pays Ouest africains dont le Sénégal. Ce réseau a pour objectif de renforcer les capacités et le transfert de technologies. Il vise à préparer les institutions d'Afrique à la conduite qualitative d'essais cliniques mais aussi de créer un réseau multidisciplinaire pour des collaborations scientifiques sous-régionales (Miuro *et al.*, 2013).

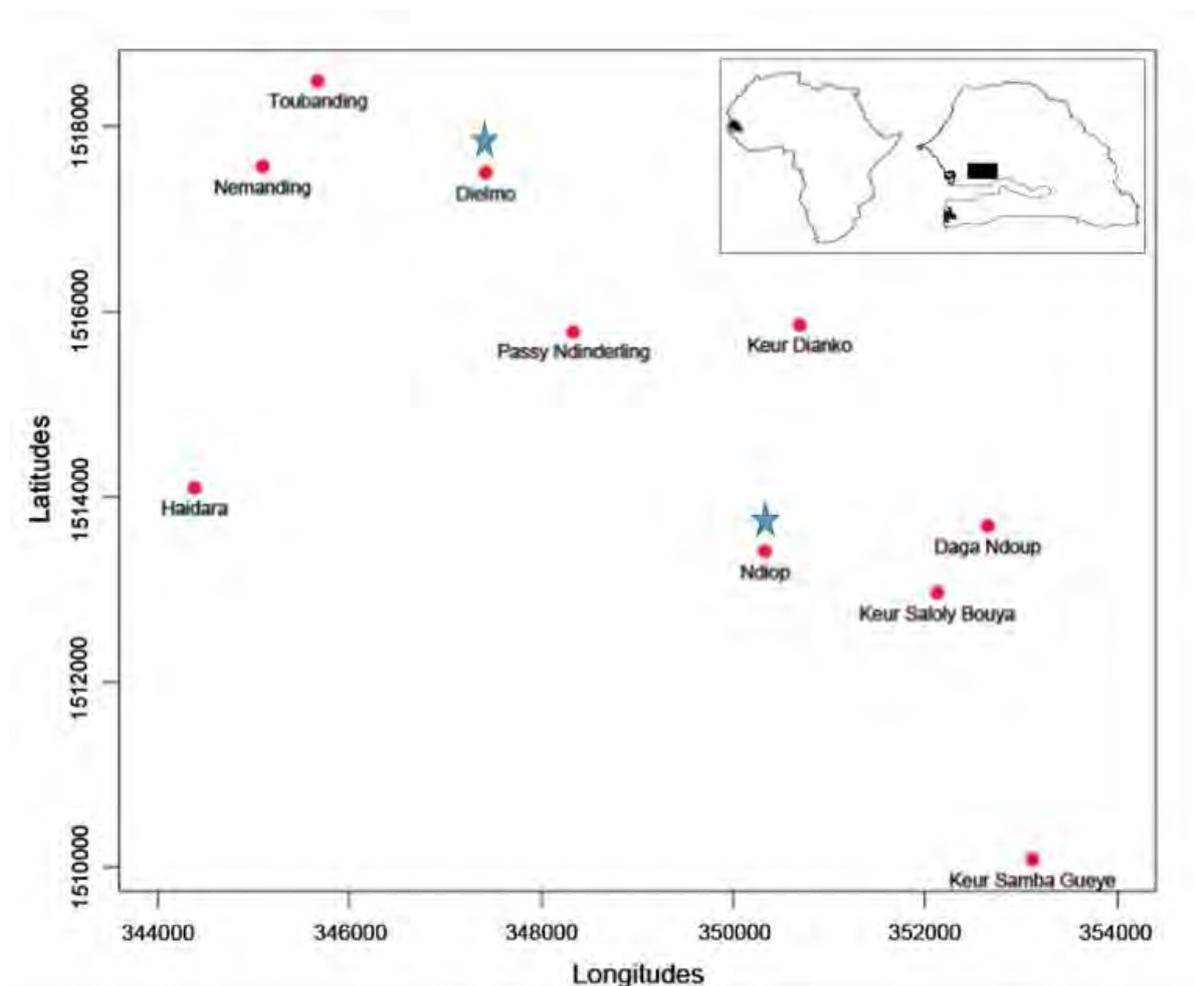


Figure 11 : Les 8 villages du projet EDCTP et les sites de Recherche de Ndiop et Dielmo

2.1.2.2. Présentation du site

Le site du projet EDCTP a été sélectionné dans l'arrondissement de Toubacouta, dans la région de Fatick. La zone d'étude couvre 8 villages et occupe une superficie de 31 km² (**Figure 11**). Il s'agit des villages d'Aïdara, Daga Ndoup, Keur Ndiako, Nemanding, Passy Ndinderling, Keur Saloly Bouya, Keur Samba Gueye et Toubanding traversé la rivière Néma. Le climat est de type soudano-sahélien caractérisé par une saison de pluies de Juin à Octobre avec une pluviométrie de 400 à 1000 mm et une saison sèche de Novembre à Mai. La population de la zone est estimée à 8000 habitants répartis en 7 groupes ethniques. L'ethnie dominante est l'ethnie wolof suivie de l'ethnie sérère et de l'ethnie peulh. En 2008-2009, 52% de la population générale et 65% des enfants dormaient sous une moustiquaire imprégnée. Le traitement gratuit du paludisme simple y est disponible depuis 2010 (Espié et *al.*, 2015). Des études entomologiques menées dans 3 villages (Toubanding, Daga Ndoup, Keur Samba Gueye) de Juillet à Décembre 2010 ont montré que le principal vecteur du paludisme était *An. Gambiae* dans chacun des trois villages. La transmission était maximale et restreinte au mois de Septembre sauf pour Toubanding où elle était active durant toute la période de transmission et était due principalement à *An. Gambiae* et dans une moindre mesure à *An. funestus*. Le nombre de piqûres infectantes s'élevait à 30, 4 et 4 respectivement pour Toubanding, Daga Ndoup, Keur Samba Gueye durant la période de transmission. Le niveau de transmission élevé à Toubanding était dû à une écologie particulière liée à la présence de la rivière Néma qui maintient une transmission durant toute l'année. Mis à part Toubanding, tous les 5 autres villages de l'étude peuvent être assimilés à Daga Ndoup et Keur Samba Gueye en termes de transmission (Niang et *al.*, 2013).

2.2. Populations d'études

2.2.1. Prélèvements de Ndiop

2.2.1.1. Autorisation du comité d'éthique

Le projet Dielmo/Ndiop a été initialement approuvé par le Ministère de la Santé du Sénégal et l'assemblée des villageois (Trape et *al.*, 1994). Le Comité national d'éthique pour la recherche en santé du Sénégal a également approuvé le projet. Le consentement éclairé et écrit des personnes, des parents ou des tuteurs des enfants a été régulièrement renouvelé.

2.2.1.2. Échantillonnage et conception de l'étude

Dans la conduite des activités du projet Dielmo-Ndiop, des prélèvements veineux ont été effectués chaque année chez chacun des participants au projet.

- **Critères d'inclusion et d'exclusion du projet** : tous les adhérents au projet et présents au village ont été prélevés.

Les prélèvements utilisés au cours de cette étude proviennent de la transversale annuelle de juin 2016. A partir d'échantillon de sang veineux prélevé sur tube EDTA de 5 ml, des frottis sanguins et des gouttes épaisses ont été préparés pour le diagnostic microscopique du paludisme. Le plasma et le culot globulaire ont été séparés et stockés à -20°C pour les études sérologiques et de biologie moléculaire respectivement.

La prévalence parasitaire microscopique a été déterminée par lecture au microscope de gouttes épaisses colorées au Giemsa. La prévalence parasitaire submicroscopique a quant à elle été obtenue par la technique de PCR en temps réel (qPCR). La séroprévalence des anticorps IgG a été estimée par une méthode ELISA détectant les antigènes de l'extrait brut de schizontes de la souche locale 0703 de *P. falciparum* adaptée à la culture *in vitro* au laboratoire.

2.2.2. Prélèvements du Projet EDCTP/WANETAM

2.2.2.1. Autorisation du comité d'éthique

Le protocole d'étude et le formulaire de consentement éclairé ont été approuvés par le Comité National d'Ethique pour la Recherche du Sénégal (CNERS). Chez les enfants de moins de 10 ans, des engagements écrits ont été obtenus des parents ou de leur tuteur légal. Pour ceux qui ne savent pas lire, le consentement était obtenu en présence d'un témoin indépendant. Il est à noter que tous les participants avaient droit à des soins gratuits pendant toute la durée de l'étude.

2.2.2.2. Échantillonnage et conception de l'étude

- **Critères d'inclusion du projet** : tous les enfants âgés de moins de 10 ans habitant dans les villages ciblés dont les représentants légaux ont donné leur consentement pour leur participation à l'étude ont été inclus.
- **Critères d'exclusion du projet**: dans la mesure où il s'agit d'un suivi de cohorte sans interventions médicales mises à part celles rendues nécessaires par l'état de santé de

l'enfant, données dans le cadre des soins usuels par le personnel du poste de santé, tous les enfants ont été inclus.

Les prélèvements sanguins ont été effectués entre Novembre et Décembre 2010. Les enfants ont été examinés par un médecin et les paramètres cliniques ont été enregistrés. Un échantillon de sang veineux sur tube EDTA 5 ml a été prélevé et utilisé pour la détermination du groupe sanguin, la mesure des paramètres biologiques et la préparation de gouttes épaisses et de frottis sanguins pour le diagnostic du paludisme. Le plasma et les culots globulaires ont été séparés et conservés à - 20 °C pour des analyses sérologiques et de biologie moléculaire, respectivement.

Critères d'inclusion de notre étude : tous ceux qui dans les 2 sites ont fait l'objet d'un prélèvement veineux sont inclus dans notre étude, s'ils sont asymptomatiques.

Critères d'exclusion de notre étude

Les cas de paludisme symptomatique ont été exclus de notre étude, de même que les prélèvements sur tubes capillaires.

2.3. Méthodes

2.3.1. Diagnostic du paludisme et caractérisation des espèces par microscopie

La densité parasitaire a été estimée par comptage au microscope du nombre de trophozoïtes jeunes pour 100 leucocytes après coloration de la goutte épaisse au Giemsa dilué au 1/10. Une lame est considérée négative après lecture d'au moins 200 champs sans parasite. Les formes sexuées ont également été dénombrées. Le diagnostic d'espèce a été réalisé grâce au frottis mince coloré au Giemsa. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de parasites par rapport aux leucocytes mais également en nombre de parasites par μ l. L'expression de la parasitémie en nombre de parasites par microlitre a été basée sur une moyenne théorique de 8000 leucocytes par microlitre de sang.

2.3.2. Diagnostic et caractérisation des espèces plasmodiales par PCR

2.3.2.1. Extraction et purification de l'ADN

L'extraction de l'ADN a été réalisée à partir 200 μ l de culot globulaire auxquels 20 μ l de protéinase K et 180 μ l de PBS ont été rajoutés. Le traitement a été réalisé avec un kit QIAGEN (QIAamp DNA Blood Mini kit 250 ; Qiagen, Hilden, Germany) en suivant les instructions du fabricant (**Protocole : Annexe A1**). L'ADN a été recueilli dans 50 μ l de tampon d'élution dans un tube Eppendorf bien étiqueté. L'ADN est ensuite dosé grâce à

l'appareil Nano Drop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific) qui mesure la concentration en acide nucléique à 260 nm. Il mesure également la concentration en protéine à 280 nm et donne l'indice de pureté (ratio 260/280). On obtient une bonne pureté si l'indice est supérieur à 1,8. L'ADN est ensuite conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

2.3.2.2. Diagnostic par PCR en temps réel

Le diagnostic du parasite du genre *Plasmodium* par PCR en temps réel est basé sur une comparaison de la courbe de fusion de l'échantillon avec celle des témoins négatifs et positifs. Il consiste à détecter les parasites par un "screening real-time PCR" en utilisant des amorces spécifiques du genre ciblant le gène du cytochrome B du *Plasmodium*. Brièvement, un volume de mélange de 20 µl a été préparé avec 4 µl de 5X Evagreen qPCR Master Mix (Solis Biodyne), 0,3 µl de 10 µM pour chaque amorce, 5 µl d'ADN génomique et 10,4 µl d'eau distillée (**Mix : Annexe A2, courbe de fusion : Annexe A3**) (Niang M et al., 2017).

2.3.2.3. Caractérisation des espèces par PCR nichée

Le diagnostic d'espèces concernant le portage submicroscopique est basé sur la PCR nichée grâce à des amorces ciblant le gène de l'ARN ribosomique de la petite sous-unité 18S (18S ssrARN) du *Plasmodium* comme précédemment décrit (Snounou and Singh, 2002). Une première amplification a été effectuée avec des paires d'amorces rPLU1 et rPLU5 (Tib Molbiol, Germany) spécifiques du genre *Plasmodium*. Un volume de 1 µl d'ADN matrice a été utilisé pour un volume final de 12,5 µl avec le tampon GoTaq Green Master Mix (n° de catalogue M7113, Promega) selon les recommandations du fabricant. La seconde PCR permet l'identification spécifique des espèces de *Plasmodium* en utilisant les paires d'amorces suivantes : rFAL1 et rFAL2 pour *P. falciparum*, rVIV1 et rVIV2 pour *P. vivax*, rOVA1 et rPLU2 pour *P. ovale* et rMAL1 et rMAL2 pour *P. malariae* (Tib Molbiol, Germany). Des produits de la première réaction de PCR spécifique du genre, 1 µl ont été utilisés comme matrice dans l'amplification de la PCR nichée spécifique de l'espèce selon les conditions de PCR décrites en **Annexe A4 et A5** (Zhou et al, 2014). Les tailles attendues pour les espèces testées sont : 120 pb pour *P. vivax*, 144 pb pour *P. malariae*, 205 pb pour *P. falciparum*, 375 pb pour *P. ovale*.

2.3.3. Génotypage des gènes *msp-1* et *msp-2* de *P. falciparum*

2.3.3.1. Amplification par PCR nichée

Les régions polymorphes du block 2 de *msp-1* et du block 3 de *msp-2* ont été amplifiées par PCR nichée (nested PCR). Cette technique utilise deux PCR successives. La première PCR consiste à l'amplification du block 2 pour *msp-1* et du block 3 pour *msp-2*. Le produit PCR obtenu sert ensuite de matrice pour une seconde PCR utilisant des amorces qui permettent d'amplifier spécifiquement les allèles des deux gènes. Pour la première amplification 1 µl des couples d'amorce (Tib Molbiol, Germany) *msp1-F/msp1-R* pour *msp-1* et *msp2-F/msp2-R* pour *msp-2* ont été utilisés avec 5,5 µl d'eau, 12,5 µl de Go Taq Green Master Mix (GMM: Promega) et 5 µl d'extrait d'ADN servant de matrice pour un volume final de 25 µl. Pour la deuxième amplification 1 µl des amorces spécifiques des allèles K1, MAD20 et RO33 de *msp-1* et FC27 et 3D7 de *msp-2* ont été ajoutés à 5,5 µl d'eau, 12,5 µl de GMM et 5 µl d'ADN du produit de la première réaction PCR. La préparation des Mix (**Annexe A6**), les séquences des amorces et le programme d'amplification des différentes PCR sont présentées en Annexe (**Tableau A7**).

2.3.3.2. Electrophorèse de l'ADN

Les produits obtenus à la deuxième PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% contenant 3 µl de bromure d'éthidium (S-éthyl-3,8-diamino-6-phénylphénanthidine, Eurobio). Dix (10) µl de chaque produit PCR pré-coloré en vert par le GMM, des contrôles (positif et négatif) de chaque famille allélique et un marqueur de poids 100 pb (1 kb Plus DNA ladder, Invitrogen) ont été déposés dans les puits du gel. Le gel contenant les produits PCR a été soumis à une migration d'une heure dans un tampon TBE IX (Trizma Boric acid EDTA, Biosolve) sous une intensité de 56 mA et une tension de 100 volts.

2.3.3.3. Révélation des produits PCR

Le bromure d'éthidium a la propriété de s'intercaler entre les brins de la double hélice d'ADN. Lorsqu'il est traversé par des rayons ultra-violet, il émet une fluorescence à 622 nm qui permet de localiser les fragments d'ADN positionnés à différents endroits du gel en fonction de leurs tailles. L'haploïdie des stades sanguins fait que chaque bande représente un génotype ou un clone. La lecture a été effectuée avec un appareil E-GEL IMAGER (Life Technologies) qui permet également de faire une capture d'écran du gel. Les témoins positifs et négatifs permettent de valider la manipulation. Le marqueur de poids moléculaire permet de vérifier

les tailles attendues pour chaque famille allélique : K1 (160-225 Pb), RO33 (160 Pb), MAD20 (180-250 Pb), 3D7 (480-550 Pb), FC27 (290-420 Pb) et de déterminer la taille des différents génotypes obtenus. Un isolat est déclaré positif pour une famille allélique s'il y a présence sur le gel d'une ou de plusieurs bandes après amplification avec les amorces spécifiques de cette famille (Profils de migrations : **Annexe A8**).

2.3.4. Détection des anticorps dirigés contre les antigènes de *P. falciparum*

2.3.4.1. Les antigènes

❖ L'extrait brut de schizontes

L'extrait brut de schizontes de la souche locale 0703 de *P. falciparum* provenant du village de Dielmo et adaptée à la culture *in vitro* a été obtenu à partir d'une culture avec des érythrocytes O+ (Aribot *et al.*, 1996). La culture selon la technique décrite par Jensen and Trager (1977) a été effectuée en milieu RPMI 1640 contenant 0,5% d'Albumax. Les parasites étaient maintenus en atmosphère riche en CO₂ (90% N₂, 5% CO₂, 5% O₂) grâce à un dispositif de mélange de gaz (Bei *et al.*, 2014). Les culots de schizontes ont été lysés dans trois volumes d'eau distillée stérile et stockés dans de l'azote liquide (Perraut *et al.*, 2002).

❖ La protéine recombinante MSP-3

La protéine recombinante MSP3 (clone T9/96) a été exprimée chez *Escherichia coli* (offerte gracieusement par le Dr C. Oeuvray) (Mbengue *et al.*, 2019). La protéine MSP-3 est synthétisée au moment de la schizogonie et libérée lors de l'éclatement des schizontes. Elle est localisée à la surface des mérozoïtes. Les anticorps anti-MSP-3 inhibent la croissance *in vitro* de *P. falciparum* en association avec les monocytes en test d'inhibition cellulaire dépendante d'anticorps (ADCI) et sont corrélés avec la protection (Oeuvray *et al.*, 1994). La protéine MSP-3 a été testée comme candidat vaccin sur des singes *Aotus nancymai* et a induit avec succès une protection clinique (Hisaeda *et al.*, 2002). La protéine recombinante MSP-3 de *P. falciparum* a également été exprimée chez le ver à soie pour assurer une production à grande échelle afin d'étudier son efficacité potentielle pour le sérodiagnostic (Deo *et al.*, 2019).

2.3.4.2. Le test Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Le test ELISA a été réalisé comme décrit précédemment (Diop *et al.*, 2014). L'extrait brut de schizonte de la souche 0703 a été dilué au 1/3000. Le facteur de dilution a été déterminé par effet-dose en utilisant un sérum hyper immun. Les plaques Maxisorp (Nunc, Roskilde,

Danemark) ont été sensibilisées avec 100 µl d'antigène dilué dans du tampon phosphate (PBS, pH 7,4). L'extrait de globules rouges non infectés a également été testé pour vérifier l'absence de liaison non spécifique. L'antigène MSP-3 a été dilué à 1 µg/ml dans le PBS et 100 µl ont été utilisés pour la sensibilisation des plaques Immulon 4HBX (Thermo Fisher Scientific). Toutes les plaques ont été incubées pendant la nuit à 4 °C, puis lavées quatre fois avec 200 µl/puits de tampon de lavage (PBS contenant 0,05 % de Tween 20). Les plaques ont ensuite été saturées avec 3 % de lait écrémé dans du PBS avec 0,05 % de Tween 20. Les sérums ont ensuite été dilués à 1/200 dans le tampon de dilution sérum (1 % de lait écrémé dans du PBS avec 0,05 % de Tween et 0,03 % d'azide de sodium) et 100 µl de sérum dilué ont été distribués dans chaque puits. Des témoins négatifs et positifs ont été inclus dans chaque plaque : les témoins positifs proviennent de personnes hyper immunes et les témoins négatifs de personnes naïfs (européens). 100 µl d'IgG et IgM anti-humains polyclonaux de chèvre ("Life Technologies", USA) conjugués à la peroxydase ont ensuite été ajoutés après dilution au 1/6000 et 1/3000 dans le tampon de dilution conjugué (1% de lait écrémé dans du PBS-Tween 0,05 %), respectivement. La peroxydase liée a été détectée avec 100 µl de substrat tétraméthylbenzidine (TMB Solution; Thermo Fisher Scientific Inc.) pendant 30 minutes et les réactions enzymatiques ont été arrêtées par addition de 50 µl d'acide sulfurique 0,2 mM. Pour chaque essai, des échantillons de sérum ont été testés en double sur la même plaque. La densité optique (DO) à 450 nm a été lue au spectrophotomètre BIO-RAD (iMark). La valeur de DO finale de chaque sérum testé a été obtenue en calculant la DO moyenne des duplicatas.

2.3.5. Analyses statistiques

2.3.5.1. Paramètres génétiques

Les résultats obtenus pour la diversité génétique ont été analysés en utilisant les paramètres suivants:

- La fréquence d'une famille allélique ou d'une combinaison de famille allélique est exprimée par le rapport entre le nombre d'échantillons positifs pour cette famille allélique et le nombre total d'échantillons testés.
- La fréquence des infections multiples (IM) est définie comme étant le rapport du nombre de patients portant plus d'un clone de *P. falciparum* sur le nombre total de sujets infectés pour chaque marqueur *msh-1* ou *msh-2*.
- La complexité des infections (COI) encore appelée multiplicité des infections (MOI) est définie par la présence de plus d'un allèle de *msh-1* ou *msh-2* dans un seul isolat. Il est

calculé en divisant le nombre total d'allèles détectés pour chaque gène *msh-1* ou *msh-2* par le nombre d'isolats positifs pour le même marqueur.

- Le taux d'hétérozygotie attendu (HA) est défini comme la probabilité d'être infecté par deux parasites différents au même locus. Les valeurs se situent entre 0 et 1 et sont calculées par la formule suivante : $HA = \frac{1}{n(n-1)} [1 - \sum p_i^2]$, n est le nombre de prélèvements positifs et p_i est la fréquence allélique à un locus donné.
- L'association entre la parasitémie et les combinaisons alléliques a été faite en utilisant la méthode de corrélation de Pearson. Les fréquences alléliques ont été comparées en utilisant le test exact de Fisher.

2.3.5.2. Paramètres immunologiques

Les résultats ont été exprimés sous la forme d'un ratio de DO.

- Ratio de DO = DO moyenne d'un test/ DO moyenne d'un témoin négatif
- Seuil de positivité = Ratio de DO > 2
- Les variations entre les essais pour les témoins positifs ne doivent pas dépasser 20 %.
- La reproductibilité de cette technique est jugée satisfaisante avec des coefficients de variation ne dépassant pas 4 % en utilisant deux témoins positifs, deux témoins négatifs et la même préparation d'extrait brut pour chaque plaque.

La comparaison des moyennes des ratios de DO tient compte de l'antigène, du statut (positif/négatif) et du groupe d'âge. Les différences sont calculées avec le t-test de Student.

L'association entre la prévalence du portage submicroscopique (qPCR+) et la séroprévalence (IgG+ contre l'extrait brut de la souche 0703) pour chaque classe d'âge a été étudiée par le test de khi-deux.

Lorsque la valeur de $p < 0,05$, on considère que les différences sont significatives. Toutes les analyses sont effectuées à l'aide du logiciel R (version 3.6.1).

3. RÉSULTATS

3.1. Diversité génétique associée au portage asymptomatique microscopique (AM)

3.1.1. Caractéristiques démographiques et parasitologiques de la cohorte AM

La cohorte d'enfant obtenue au niveau du site du Projet EDCTP nous a permis d'étudier la diversité génétique liée au portage AM. Le nombre de prélèvements était de 1316 dont 91 (6,91%) positifs après lecture des GE au microscope optique. *P. falciparum* était la seule espèce détectée après lecture au microscope des frottis minces. Quatre prélèvements positifs ont ensuite été exclus du fait de la détection de la présence de fièvre au moment du prélèvement. La moyenne d'âge des 87 sujets positifs restants était de 6,5 ans et le sexe ratio (M/F) de 1,35 (Tableau III). La densité parasitaire moyenne était de 8915,7 parasites/ μ l de sang tandis que la médiane était de 960 parasites/ μ l. Les parasitémies ainsi quantifiées concernaient des formes asexuées tandis que la présence de gamétocytes était signalée.

Tableau III : Caractéristiques démographiques de la cohorte asymptomatique microscopique

Caractéristiques des patients avec des GE positives	Nombre
Taille de l'échantillon	87
Moyenne d'âge en années (\pm SD)	6,5 (\pm 2,2)
Médiane des âges (intervalle)	6,8 (0,9 à 9,9 années)
Sexe ratio (M/F)	1,35 (50/37)

3.1.2. Diversité génétique de *m*sp-1 et *m*sp-2 associée au portage asymptomatique microscopique (AM)

Parmi les 87 prélèvements positifs traités en PCR, 96,5% (84/87) et 94% (82/87) ont pu être génotypés pour *m*sp-1 and *m*sp-2, respectivement.

Pour le gène *m*sp-1, 15 allèles différents ont été identifiés dont 6, 5 et 4 appartenant respectivement aux familles K1, MAD20 et RO33. La fréquence des allèles était de 40,2 % (88/219), 31,1 % (68/219) et 28,7 % (63/219) pour RO33, MAD20 et K1, respectivement (Tableau IV). L'hétérozygotie attendue (HA) était de 0,67 pour le locus *m*sp-1. Parmi les échantillons positifs pour le *m*sp-1, 69 % (58/84) étaient polyclonaux. La complexité moyenne de l'infection (COI) était de 2,5. Ces infections polyclonales impliquaient principalement des combinaisons de familles alléliques trimorphes et dimorphes : 27,4% (23/84) pour K1/MAD20/RO33, 16,7% (14/84) pour MAD20/RO33, 14,3% (12/84) pour K1/RO33 et 5,9% (5/84) pour K1/MAD20. Le nombre maximal de génotypes appartenant à la

même famille allélique détectés dans un seul isolat était de 3, 5 et 4, pour K1, MAD20 et RO33, respectivement.

Pour le gène *m*sp-2, 21 allèles différents ont été détectés avec 10 pour la famille allélique 3D7 et 11 pour FC27. Les fréquences des familles alléliques ont montré que le type allélique 3D7 était prédominant (53,7%, 206/384) par rapport à FC27 (46,3%, 178/384) (Tableau 4). La prévalence des infections multiples (IM) était de 89 % (73/82). L'hétérozygotie attendue (HA) était de 0,50 pour le loci *m*sp-2. La prévalence des infections multiples (IM) était de 89% (73/82). La complexité moyenne de l'infection était de 4,7. La fréquence des infections impliquant les deux familles alléliques de *m*sp-2 était de 63% (52/82). Le nombre maximum de génotypes appartenant à la même famille allélique détectés dans un seul isolat était de 5 et 7 pour 3D7 et FC27, respectivement.

Tableau IV : Diversité génétique de *m*sp-1 et *m*sp-2 associée au portage asymptomatique microscopique

Familles alléliques	N (%)	Familles alléliques	N (%)
<i>m</i> sp-1		<i>m</i> sp-2	
K1	12 (14.3)	3D7	20 (24.4)
MAD20	8 (9.5)	FC27	10 (12.2)
RO33	10 (11.9)	3D7/FC27	52 (63.4)
K1/MAD20	5 (5.9)		
K1/RO33	12 (14.3)		
MAD20/RO33	14 (16.7)		
K1/MAD20/RO33	23 (27.4)		
Total des combinaisons	84 (100)		82 (100)
Total K1	63 (28.7)	Total 3D7	206 (53.7)
Total MAD20	68 (31.1)	Total FC27	178 (46.3)
Total RO33	88 (40.2)		
Total des allèles	219		384
*MI	58 (69)		73 (89)
*COI	2.5		4.7

*IM : prévalence des infections multiples ; *COI: complexité des infections

3.2. Diversité génétique associée au portage asymptomatique submicroscopique (ASM)

3.2.1. Caractéristiques épidémiologiques à Ndiop en 2016, association entre la prévalence parasitaire et la séroprévalence des anticorps anti-IgG contre l'extrait brut de schizontes (souche 0703)

La transversale Ndiop 2016 était de 353 individus (**Tableau V**). Le sexe ratio (H/F) était de 0,5. Le diagnostic microscopique était négatif pour tous les prélèvements. La cohorte était entièrement submicroscopique. La prévalence parasitaire obtenue par PCR en temps réel était de 22,4% (79/353). La répartition de cette prévalence était de 8,5% (30/353), 4,5% (16/353), 9,3% (33/353) pour les enfants de moins de 10 ans, la classe d'âge de 10 à 15 ans et celle de plus de 15 ans, respectivement. La prévalence parasitaire était significativement plus élevée pour les classes d'âge de moins de 10 ans et de plus de 15 ans. *P. falciparum* était la seule espèce diagnostiquée par la PCR nichée. La séroprévalence des anticorps anti-IgG mesurée avec l'extrait brut de schizontes de la souche 0703 avec un seuil de positivité fixé à un ratio de $DO > 2$ était de 34,8% (123/353). La répartition de la séroprévalence par âge était de 6,2% (22/353), 4,8% (17/353), 23,8% (84/353) pour les enfants de moins de 10 ans, la tranche d'âge de 10 à 15 ans et de plus de 15 ans respectivement (**Figure 12**). La séroprévalence était significativement plus élevée pour la classe d'âge de plus de 15 ans; $p=0.0001$ (test Khi-deux) par rapport aux deux autres classes d'âge. La prévalence parasitaire et la séroprévalence sont étroitement liées pour les groupes d'âge de moins de 15 ans, par contre la séroprévalence est significativement plus élevée que la prévalence chez les adultes (test Khi-deux, $p=0,01$) (**Figure 11**).

Tableau V : Caractéristiques démographiques de la transversale Ndiop 2016, la cohorte appariée PCR positive versus PCR négative (ELISA) et la cohorte qPCR positive (génotypage *m*sp-2)

		Nombre	Sexe ratio H/F	Groupes d'âge		
				<10 ans	10-15 ans	>15 ans
Ndiop 2016		353	0,5	74	63	216
Cohorte appariée (ELISA)	PCR +	55	0,29	17	15	23
	PCR-	55	0,58	17	15	23
Cohorte (Génotypage)	PCR +	45	0,31	15	13	17

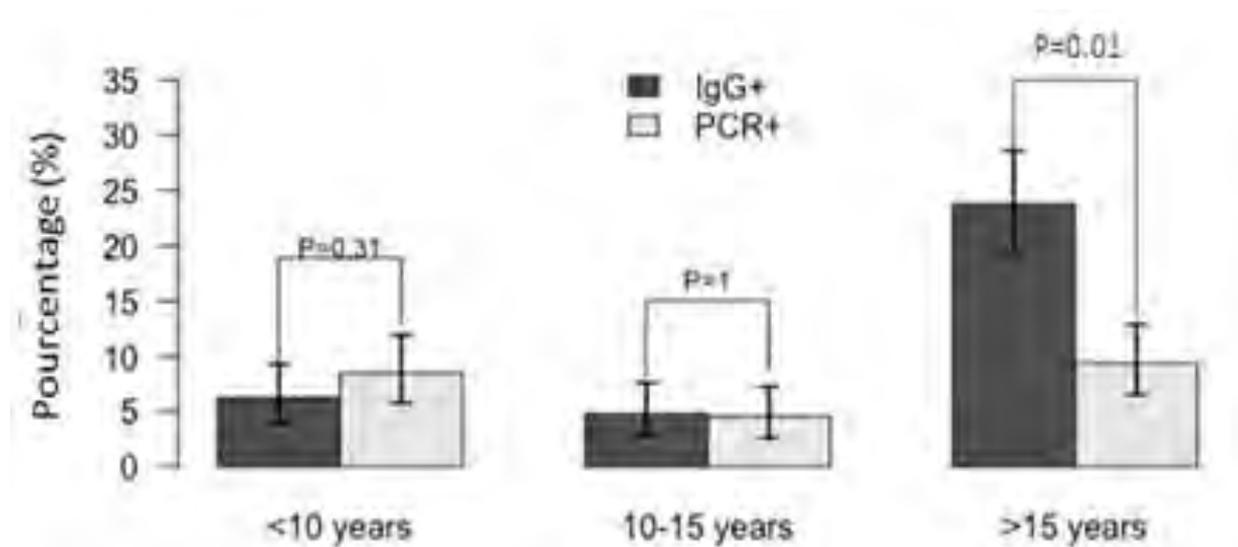


Figure 12 : Association entre la prévalence parasitaire déterminée par qPCR (PCR+) et la séroprévalence des IgG (IgG+) contre l'extrait brut de la souche 0703 en fonction de l'âge.

3.2.2. Diversité génétique de *m*sp-2 associée au portage asymptomatique submicroscopique (ASM)

Les prélèvements de la transversale Ndiop 2016 ont servi à l'analyse de la diversité génétique associée au portage ASM. Le génotypage par PCR nichée avec le marqueur *m*sp-2 a été effectué sur 45 porteurs ASM (PCR positive et microscopie négative) et a été réussi sur 42 prélèvements répartis comme suit : 15, 13 et 14 échantillons pour les classes d'âge de moins de 10 ans, entre 10 et 15 ans et plus de 15 ans, respectivement (**Tableau V**). Les résultats ont montré une complexité de l'infection (COI) de 2,4. Un total de 16 allèles différents a été détecté, 11 pour la famille allélique FC27 et 5 pour 3D7. La prévalence des familles alléliques FC27, 3D7 ou de la combinaison de familles allèles FC27/3D7 était de 28,6% (12/42), 11,9% (5/42), 59,5% (25/42), respectivement. L'hétérozygotie attendue (HA) du portage submicroscopique avec le marqueur *m*sp-2 est de 0,49. La prévalence des infections multiples (IM) était de 73,8% (31/42) (**Tableau VI**).

Tableau VI : Diversité génétique du gène *m*sp-2 associée au portage ASM

Familles alléliques de <i>m</i>sp-2	N (%)
FC27	12 (28,6)
3D7	5 (11,9)
FC27/3D7	25 (59,5)
Total des combinaisons	42 (100)
Total FC27	60 (59,4)
Total 3D7	41 (40,6)
Total des allèles	101
*MI	31 (73,8)
*COI	2,4

*MI : prévalence des infections multiples ; *COI: complexité des infections

3.2.3. Distribution des familles et combinaisons de familles alléliques de *msp-2* par classe d'âge

La répartition par âge des familles et combinaisons des familles alléliques de *msp-2* au cours des infections submicroscopiques montre une augmentation des fréquences des familles alléliques FC27 et 3D7 seules avec l'âge. Ainsi pour FC27, nous avons une fréquence de 20% (3/15), 31% (4/13) et 35,7% (5/14) pour les enfants de moins de 10 ans, les enfants entre 10-15 ans, et les individus âgés de plus de 15 ans respectivement. Tandis que, pour 3D7 les fréquences alléliques vont de 0% (0/15) ; 7,7% (1/13) et 28,6% (4/14) pour les moins de 10 ans, les individus entre 10-15 ans, et ceux de plus de 15 ans respectivement. A noter l'augmentation de la fréquence de la famille 3D7 chez les adultes de plus de 15 ans et son absence chez les enfants de moins de 10 ans. Par contre, les fréquences de la combinaison de familles alléliques FC27/3D7 diminuent avec l'âge. Elles vont de 80% (12/15) ; 61,5% (8/13) et 25,7% (4/14) pour les moins de 10 ans, les individus entre 10-15 ans, et ceux de plus de 15 ans respectivement. Les infections monoclonales augmentent avec l'âge : 13% (2/15) ; 23% (3/13) et 36% (5/14). Les infections polyclonales quant à elles diminuent avec l'âge : 87% (13/15), 77% (10/13) et 64% (9/14) (Figure 13).

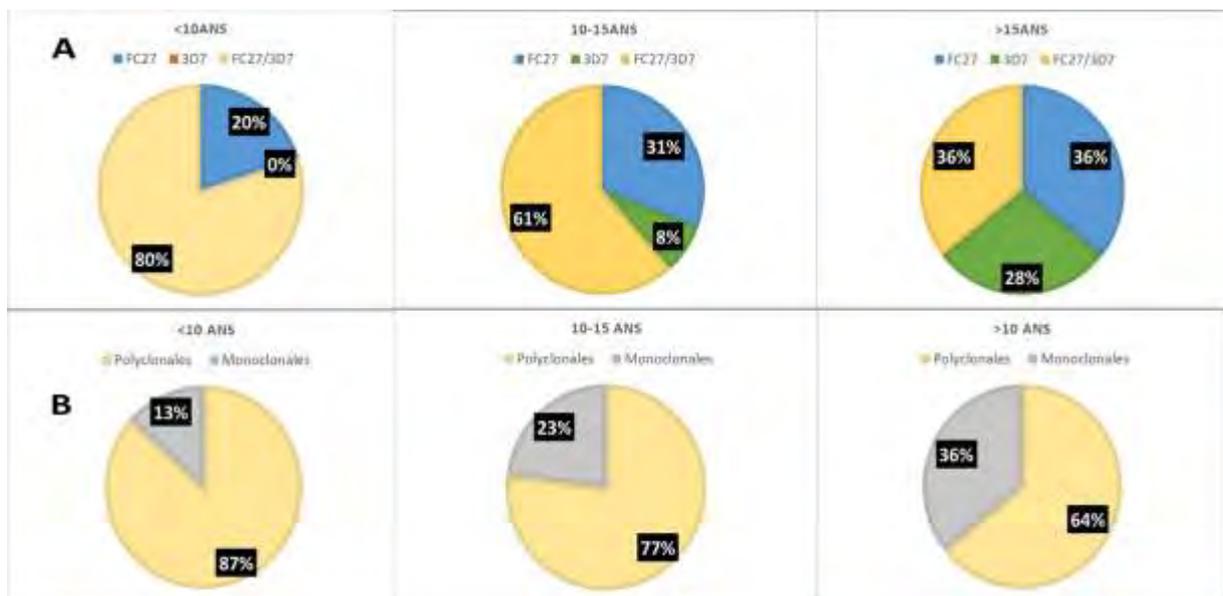


Figure 13 : En 13 A, la distribution des familles FC27, 3D7 et combinaisons de familles alléliques FC27/3D7 de *msp-2* par classe d'âge et en 13 B, la distribution des infections monoclonales et polyclonales par classe d'âge avec le marqueur *msp-2*. Les p-values non significatifs sont déterminés par test exact de Fisher.

3.3. Association entre la parasitémie et la diversité génétique

3.3.1. Comparaison des niveaux de parasitémie microscopique entre les infections polyclonales et monoclonales

Cette étude a été effectuée à l'aide de la cohorte d'enfants sélectionnés au niveau du site EDCTP (Tableau III). Les porteurs asymptomatiques microscopiques (AM) ont été génotypés pour les gènes *msh-1* et *msh-2*. Les niveaux de parasitémie entre les infections polyclonales et monoclonales ont ensuite été comparés. La densité parasitaire moyenne était significativement plus élevée (test t de Student T, $p = 0,012$) pour les isolats polyclonaux (densité moyenne = 3347 parasites/ μ l) en comparaison aux infections monoclonales (densité moyenne de 1229 parasites/ μ l) avec le marqueur *msh-1* (Figure 14). Un résultat similaire a été observé pour le gène *msh-2* (Figure 14), avec une parasitémie significativement plus élevée (test t de Student, $p = 0,00008$) pour les infections polyclonales (densité moyenne de 3092 parasites/ μ l) que pour les infections monoclonales (561 parasites/ μ l).

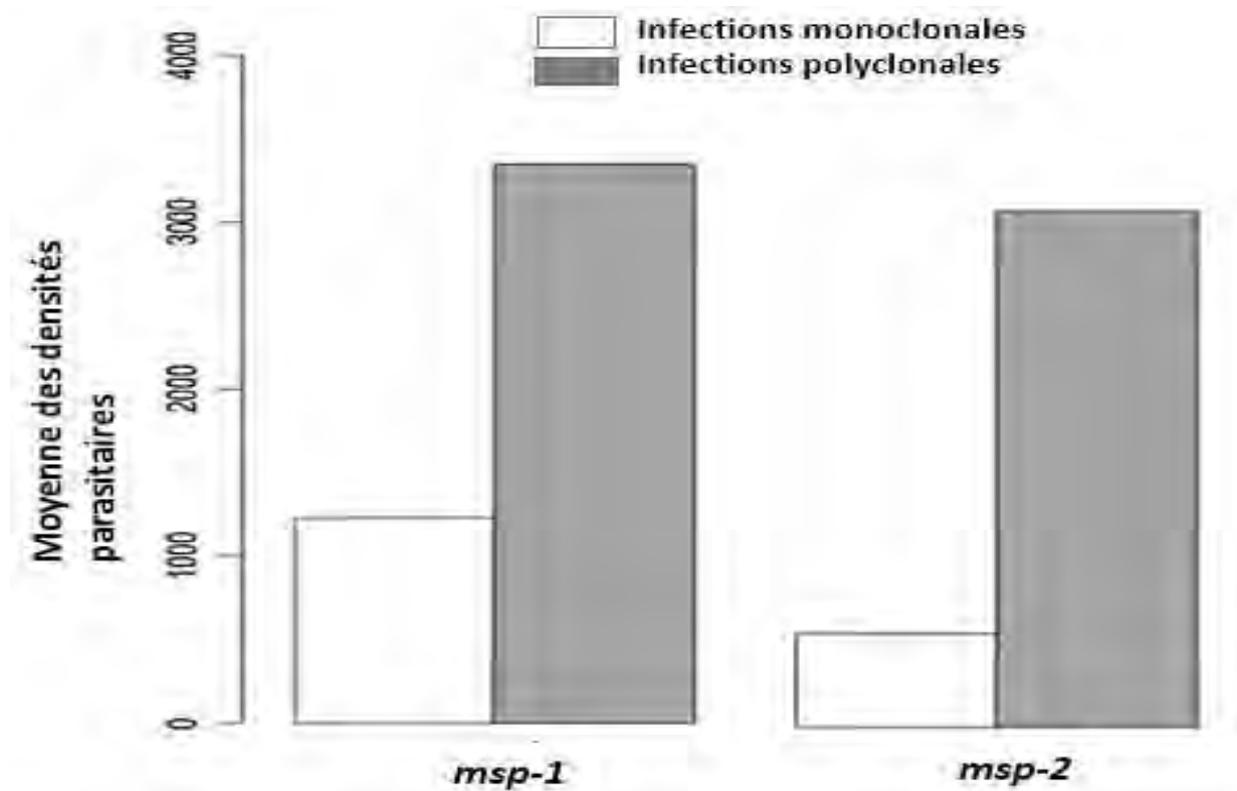


Figure 14 : Comparaison de la densité parasitaire microscopique moyenne entre les infections polyclonales et monoclonales génotypées avec les marqueurs *msh-1* et *msh-2*. La densité parasitaire est plus élevée chez les enfants asymptomatiques ayant des infections polyclonales : $p = 0,012$ pour *msh-1* et $p = 0,00008$ pour *msh-2* (test t de Student)

3.3.2. Etude de la relation entre les fréquences des familles alléliques de *msp-1* et *msp-2* et la parasitémie

Afin d'approfondir l'analyse de l'effet de l'infection polyclonale et monoclonale sur la parasitémie, l'influence de la fréquence des familles et combinaisons de familles alléliques sur la densité parasitaire a été étudiée. Pour ce faire, les échantillons ont été classés en cinq niveaux en fonction des densités parasitaires. L'analyse de la relation entre les combinaisons des familles alléliques de *msp-1* et la parasitémie a montré une association positive significative entre les infections trimorphiques K1/MAD20/RO33 et la parasitémie ($R^2 = 0,93$; $p = 0,007$). Par contre, la parasitémie était corrélée de façon significative et négative aux infections monoalléliques de MAD20 ($R^2 = 0,93$; $p = 0,008$). Pour le cas du gène *msp-2*, les infections monoclonales de FC27 étaient négativement associées à la parasitémie ($R^2 = 0,82$; $p = 0,034$) (Figure 15).

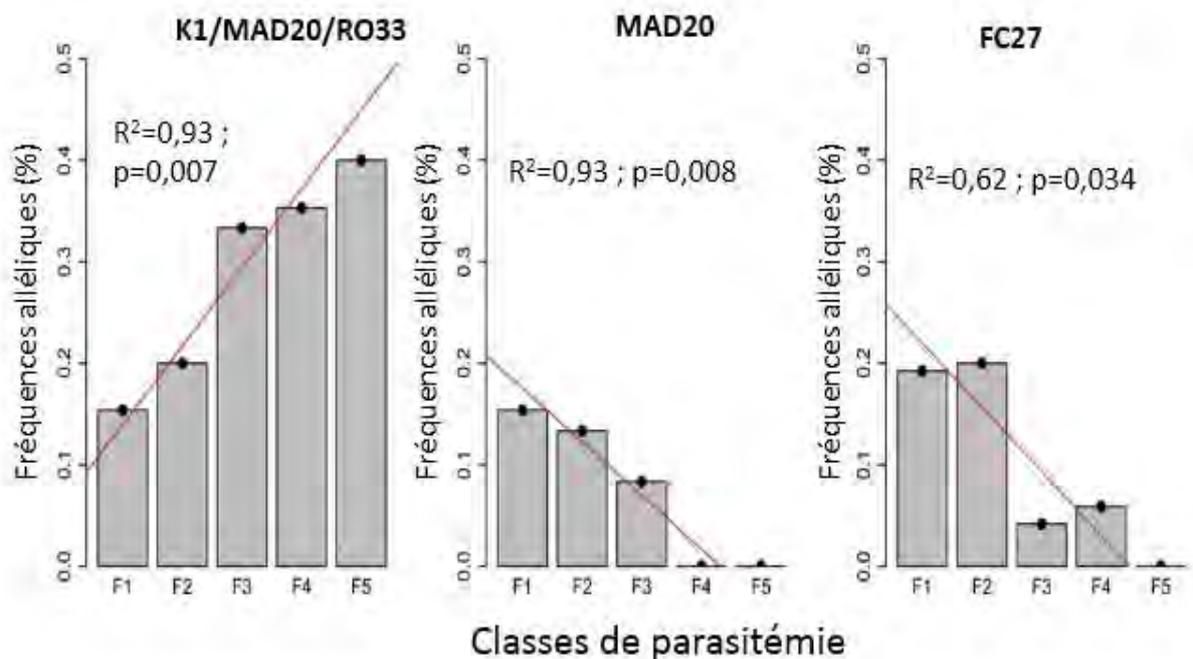


Figure 15 : Corrélation entre les fréquences de la combinaison de familles alléliques K1/MAD20/RO33, de la famille allélique MAD20 de *msp-1*, de la famille allélique FC27 de *msp-2* et les classes de parasitémie : F1 (< 50 parasites/ μ l de sang), F2 (50–499 parasites/ μ l), F3 (500–4999 parasites/ μ l), F4 (5000–49,999 parasites/ μ l) et F5 ($\geq 50,000$ parasites/ μ l).

3.4. Comparaison des niveaux de réponses anticorps entre les prélèvements positifs et négatifs en PCR

Pour mieux comprendre l'impact du portage asymptomatique submicroscopique (ASM) sur la réponse anticorps, nous avons analysé les niveaux de réponse en fonction de l'âge et de la présence ou non de parasites. Une cohorte appariée selon l'âge de 110 individus (**Tableau IV**) a été utilisée pour évaluer la moyenne des réponses IgG et IgM vis-à-vis de l'extrait brut de la souche 0703 et la moyenne des réponses IgG contre l'antigène MSP-3. Chez les jeunes de moins de 10 ans et entre 10 à 15 ans, il n'y a pas de différence significative entre les porteurs et les non porteurs pour la réponse IgG. La réponse IgM était toutefois significativement plus élevée ($p= 0,034$, t-test de Student) chez les porteurs pour les enfants de moins de 10 ans (**Figure 16 et 17**). Chez les adultes (âgés de plus de 15 ans), la réponse anticorps IgG était significativement plus faible chez les porteurs pour tous les antigènes testés : $p= 0,021$ pour 0703 et $p= 0,035$ pour MSP-3 (t-test de Student) (**Figure 18**). Les résultats ont également montré une augmentation des taux d'anticorps avec l'âge. L'extrait brut de la souche 0703 était plus reconnu (ratio de DO maximale < 7) que MSP-3 (ratio de DO maximale < 2).

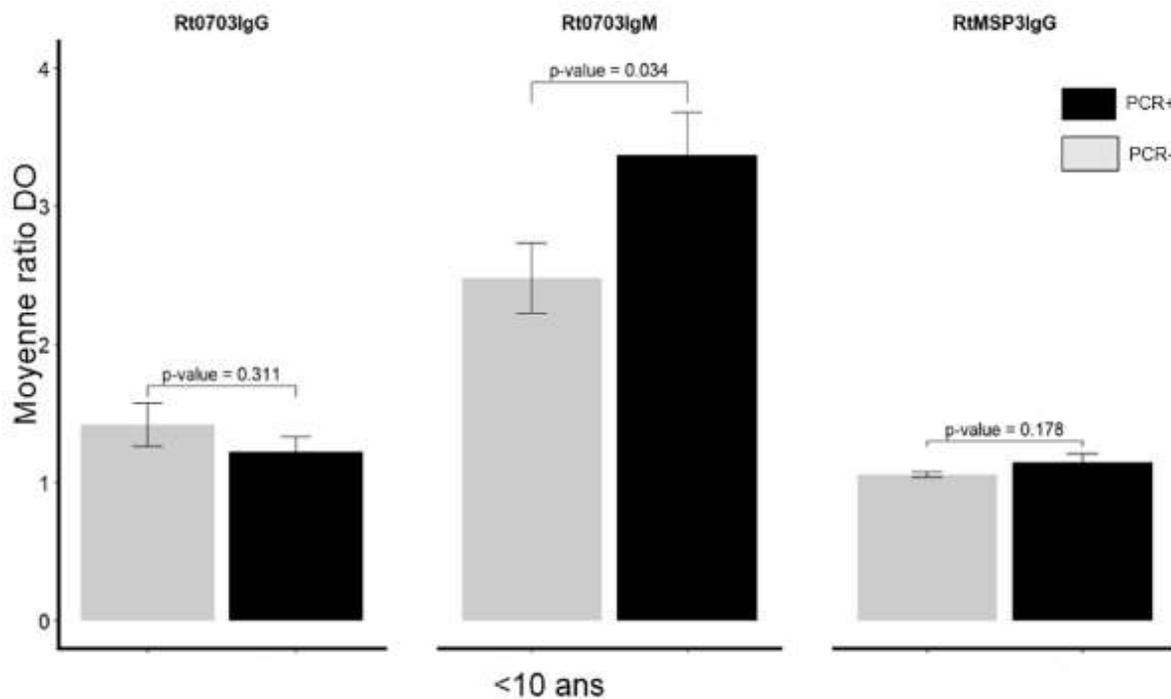


Figure 16 : Comparaison de la réponse anticorps IgG et IgM contre l'extrait brut de la souche 0703 et de la réponse anticorps IgG contre l'antigène MSP-3 chez les enfants porteurs submicroscopiques (PCR+) et non porteurs (PCR-) de moins de 10 ans. On observe de différence significative que pour la réponse IgM contre l'extrait brut ($p= 0,034$, t-test de Student)

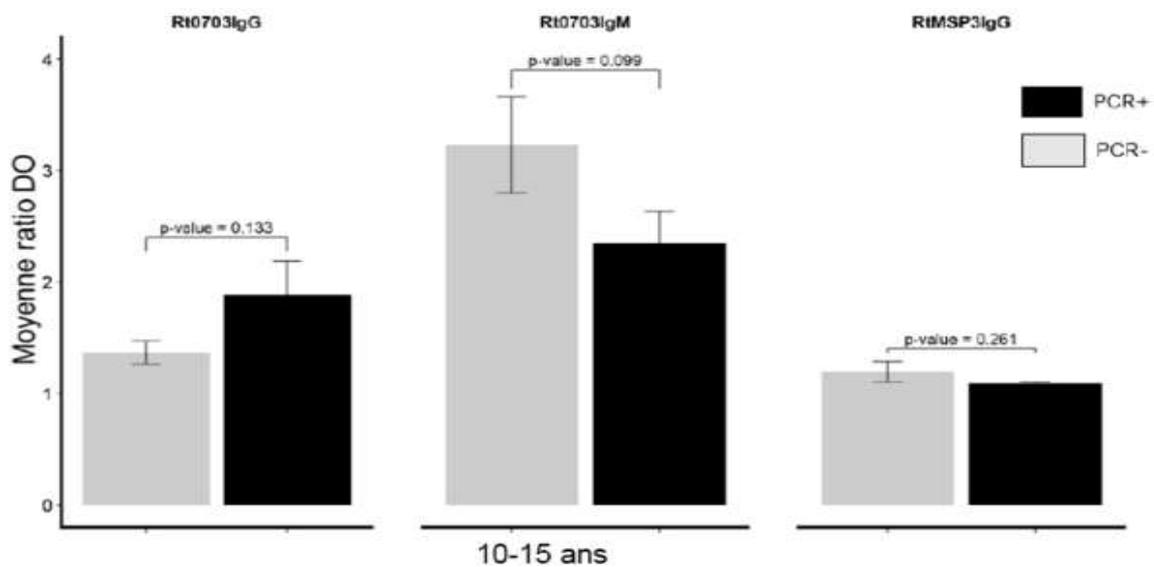


Figure 17 : Comparaison de la réponse anticorps IgG et IgM contre l'extrait brut de la souche 0703 et de la réponse anticorps IgG contre l'antigène MSP-3 chez les enfants porteurs submicroscopiques (PCR+) et non porteurs (PCR-) entre 10 et 15 ans. Aucune différence significative n'est observée pour tous les antigènes entre les porteurs et les non porteurs.

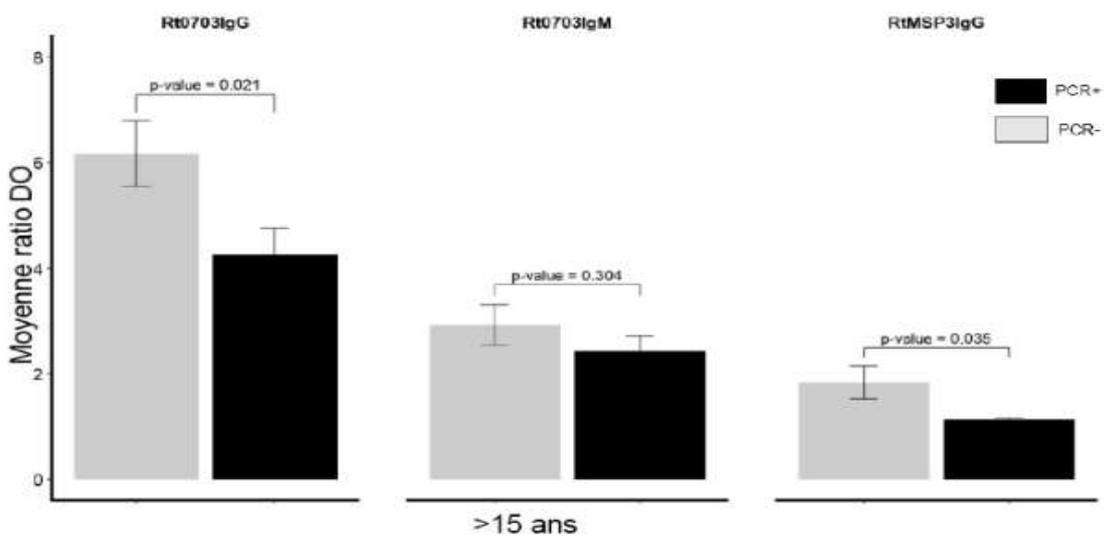


Figure 18 : Comparaison de la réponse anticorps IgG et IgM contre l'extrait brut de la souche 0703 et de la réponse anticorps IgG contre l'antigène MSP-3 chez les porteurs submicroscopiques (PCR+) et non porteurs (PCR-) de plus de 15 ans. On observe une différence significative pour la réponse IgG contre les 2 antigènes : $p=0,021$ et $p=0,035$ (t-test de Student) pour l'extrait brut et l'antigène MSP-3, respectivement.

4. DISCUSSION

Ce travail de thèse avait pour objectif principal d'étudier la diversité génétique en relation avec le portage asymptomatique de *P. falciparum* aussi bien au niveau microscopique (AM) que submicroscopique (ASM). En plus de la diversité génétique, l'impact du polymorphisme associé à l'infection AM sur la parasitémie et celui du polymorphisme associé à l'infection ASM sur la réponse immune, ont été étudiés.

4.1. Diversité génétique associée au portage asymptomatique

La diversité génétique associée au portage AM a été analysée avec des prélèvements provenant du site du Projet EDCTP dans le cadre d'études préliminaires pour la mise en place de sites d'essais cliniques pour le paludisme dans la communauté rurale de Toubacouta. Huit villages ont été sélectionnés. *P. falciparum* était la seule espèce diagnostiquée par microscopie dans cette cohorte d'enfants asymptomatiques de moins de 10 ans constituée au cours de la transversale de 2010. Une importante diversité génétique a été observée avec 15 et 21 allèles différents pour les gènes *msh-1* et *msh-2*, respectivement. Globalement, 69% et 89% des positifs étaient constitués d'infections multiples, pour les gènes *msh-1* et *msh-2*, respectivement. La grande diversité génétique de notre étude est en accord avec les résultats antérieurs sur des enfants asymptomatiques sur le site mésoendémique de Niakhar au Sénégal. Dans ce site, le génotypage avec le marqueur polymorphe *msh-2* a révélé un portage de 2 à 7 génotypes différents par individu avec 64% d'infections polyclonales (Vafa et al., 2008). Des résultats similaires ont été observés il y a 16 ans chez les enfants à Ndiop (Zwetyenga et al., 1998). L'analyse de l'évolution de la diversité génétique des isolats de *P. falciparum* à Ndiop entre les études de Zwetyenga et al., (1998) et notre étude montre une diversité génétique stable dans le temps malgré une différence d'un facteur de 12 entre les EIR (Entomological Inoculation Rate) des deux périodes. Cette baisse du niveau de transmission résulte de la mise en place des interventions de lutte contre le paludisme (Fontenille et al., 1997). Ce résultat montre que la diversité génétique de *P. falciparum* ne dépend pas seulement du niveau de transmission du parasite mais pourrait être due à d'autres facteurs. En effet il a été montré que le profil génotypique pouvait changer en l'espace de quelques heures ou de quelques jours dans les infections asymptomatiques (Färnert et al., 2008).

Quant à la diversité génétique associée au portage asymptomatique submicroscopique (ASM), elle a été analysée avec des prélèvements de la transversale de Ndiop 2016 en utilisant le locus *msh-2* comme marqueur. Les résultats montrent une diversité génétique modérée avec

seulement 16 génotypes différents. Les infections multiples (IM) avaient une prévalence de 73,8 % et la complexité des infections (COI) était de 2,4.

Pour comparer les niveaux de polymorphisme entre les AM et les ASM, les résultats de la classe d'âge des enfants ASM de moins de 10 ans de la cohorte de Ndiop 2016 sont comparés avec ceux de la cohorte AM de Toubacouta composée d'enfants de moins de 10 ans. La comparaison a porté sur le marqueur *msh-2* qui a été utilisé pour les deux cohortes. Les résultats chez les enfants de moins de 10 ans vont dans le même sens que les résultats globaux. Ils montrent une plus grande diversité génétique chez les AM et sont concordants avec ceux d'A-Elbasit et *al.* (2007) qui en comparant la diversité génétique liée au paludisme grave, à l'accès palustre simple et au portage asymptomatique submicroscopique, ont trouvé que la COI a été plus faible chez les ASM.

L'étude de la fréquence des familles ou combinaisons de familles alléliques en fonction de l'âge au cours de l'infection ASM montre une augmentation des fréquences des familles alléliques monomorphes FC27 et 3D7 avec l'âge. Par contre, la combinaison de familles alléliques FC27/3D7 diminue avec l'âge. La même tendance est observée avec l'analyse des infections monoclonales et polyclonales qui montre une augmentation des infections monoclonales avec l'âge tandis que les infections polyclonales diminuent avec l'âge. En résumé, nos résultats montrent, chez les ASM, une baisse de la diversité génétique avec l'âge aussi bien pour les combinaisons des familles alléliques que pour la polyclonalité. Pour le cas des AM, la distribution par classe d'âge n'a pu être réalisée puisque notre cohorte n'était composée que d'enfants de moins de 10 ans. Cependant, concernant l'influence de l'âge sur la diversité génétique des AM, les études antérieures ont abouti à différentes observations en fonction du niveau d'endémicité. C'est ainsi que Ntoumi et *al.* (1995) ont trouvé qu'à Dielmo, zone holoendémique, la diversité génétique était influencée par l'âge. En effet, ils ont montré qu'il y avait, à partir de 15 ans, une chute brutale du nombre de génotypes et du nombre de familles alléliques par individu (Ntoumi et *al.*, 1995). À Ndiop par contre, zone mésoendémique, Zwetyenga et *al.* (1998) ont montré qu'il n'y avait aucune influence de l'âge sur la diversité génétique (Zwetyenga et *al.*, 1998). L'influence de l'âge sur la diversité génétique des AM en zone holoendémique a été confirmée par Konaté et *al.* (1999) qui ont montré que la COI à Dielmo était le double de celui de Ndiop et était âge dépendante contrairement à Ndiop (Konaté et *al.*, 1999).

4.2. Impact du polymorphisme associé à l'infection asymptomatique microscopique sur la parasitémie

La relation entre le nombre de clones par individu et le niveau de parasitémie a été étudiée. Les résultats montrent que la polyclonalité est fortement associée à une parasitémie élevée. Ce résultat est concordant avec ceux d'autres études précédentes (Vafa et al., 2008; Mayengue PI et al., 2011; Peyerl-Hoffmann et al., 2001; Mayor et al., 2003). La densité parasitaire est considérée comme jouant un rôle majeur dans la physiopathologie du paludisme. D'ailleurs certains auteurs suggèrent qu'elle pourrait être utilisée comme marqueur de la morbidité et de la mortalité associées à cette maladie (Beadle et al., 1995; McElroy et al., 1994). La densité parasitaire est également considérée comme une pièce maîtresse de l'immunité anti-palustre. A cet égard, il a été démontré qu'un portage polyclonal asymptomatique pouvait protéger contre le paludisme clinique (Sonden et al., 2015; Males et al., 2008). Il est cependant à signaler que cette protection est partielle et serait probablement due au maintien des réponses immunitaires protectrices contre les parasites asexués du stade sanguin (Mayengue et al., 2011; Stanisic et al., 2009; Chen, 2007).

Par ailleurs, notre étude a montré une corrélation significativement positive entre la fréquence des infections trimorphes K1/MAD20/RO33 du gène *msp-1* et la parasitémie. Bien que les allèles représentatifs de cette association doivent être identifiés, ces résultats préliminaires renforcent la pertinence de candidats vaccins multivalents pour surmonter la diversité antigénique (Takala and Plowe, 2009).

4.3. Contribution du portage asymptomatique submicroscopique (ASM) à la réponse anticorps

Notre étude s'est focalisée sur la contribution du portage ASM de *P. falciparum* à la réponse anticorps. Le niveau d'anticorps a été comparé entre les porteurs ASM (positifs à la PCR et négatifs à la microscopie) et les non porteurs. Les prélèvements étaient appariés selon l'âge. Les résultats ont montré des taux d'anticorps significativement plus faibles chez les porteurs de *P. falciparum* âgés de plus de 15 ans par rapport aux non porteurs de la même classe d'âge pour les IgG dirigés contre l'antigène somatique de la souche 0703 et l'antigène MSP-3. Pour les classes d'âge de moins de 10 ans, et celles entre 10 et 15 ans cependant, les taux d'anticorps n'étaient pas différents, sauf pour les IgM, qui étaient significativement élevés chez les porteurs de moins de 10 ans. Les taux élevés d'IgM chez les plus jeunes enfants montrent qu'ils sont plus sensibles à l'infection primaire. En superposant ces résultats avec ceux de la distribution des familles et combinaisons de familles alléliques de *msp-2* montrant

une augmentation de la fréquence des infections monomorphes et monoclonales et une baisse de la fréquence des infections polymorphes et polyclonales avec l'âge, on peut en déduire qu'il y aurait une sélection clonale avec l'âge. Cette sélection de clones plus tolérés par le système immunitaire se traduit par une baisse de la réponse anticorps.

Ces résultats indiquent que les individus de plus de 15 ans ont développé une tolérance immunitaire envers les souches de *P. falciparum* qu'ils hébergent, démontrant ainsi que le portage asymptomatique à son niveau submicroscopique pourrait être le résultat d'une tolérance du système immunitaire vis-à-vis du parasite. Cependant, cette tolérance ne serait pas dirigée envers tous les parasites. Elle serait associée à la sélection clonale comme le suggère la stratification des familles alléliques de *msp-2* en fonction de l'âge (**Figure 13**). Ntoumi et al. (1995) ont montré en zone endémique que le nombre de génotypes et le nombre de familles alléliques par échantillon positif était réduit de façon significative vers 15 ans. D'une moyenne de 4 génotypes par porteur, avant 15 ans, le nombre de génotypes est passé à une moyenne de 2 par porteur après 15 ans.

L'hypothèse d'une tolérance immunitaire au paludisme a été mentionnée depuis longtemps (Sinton et al., 1938). L'argument principal était basé sur la différence des manifestations cliniques entre les individus naïfs et ceux vivants en zone d'endémicité et ayant expérimentés plusieurs épisodes palustres (Marsh and Kinyanjui, 2006 ; Ademolue et al., 2017). Cette différence clinique s'exprime à l'échelle moléculaire par la différence des niveaux de cytokines pro-inflammatoires (Schofield and Grau, 2005). De plus, la tolérance de certaines souches a été démontrée lors des traitements de malades atteints de paludisme clinique par transfert passif d'IgG provenant d'adultes immuns. En effet, il a été rapporté que bien que les IgG de sujets immuns entraînent une diminution rapide de la parasitémie et de la fièvre, certaines souches se sont cependant révélées résistantes au traitement (McGregor et al., 1963 ; Sabchareon et al., 1991). Cette tolérance immunitaire est également soutenue par la première série d'infections expérimentales chez l'homme, qui a montré que le risque d'épisodes de fièvre diminuait avec le nombre d'infections (Collins and Jeffery, 1999).

Parmi les arguments en faveur de la tolérance immune nous avons le fait que l'apparition d'un épisode clinique chez les porteurs asymptomatiques est souvent attribuée à l'émergence d'un nouveau génotype (Roper et al., 1998) et que les caractéristiques génétiques des populations parasitaires détectées lors des phases de portage asymptomatique différaient de celles de parasites provoquant un épisode clinique (Contamin et al., 1996). Le portage asymptomatique serait ainsi associé à une tolérance immunitaire relative, les adultes contrôlant mieux la densité parasitaire ainsi que les fluctuations génotypiques (Shanks, 2019). En effet, les

anticorps peuvent être classés en deux catégories : la première catégorie d'anticorps étant ceux acquis durant la petite enfance, résultant d'une infection primaire. Ces anticorps sont de courte durée de vie, plutôt des marqueurs d'exposition. La deuxième catégorie d'anticorps, à longue durée de vie est acquise grâce à des infections répétées et est associée à une certaine protection (Chanet *al.*, 2017 ; Yman et *al.*, 2019). Il a été suggéré que les parasites explorent d'abord le répertoire d'anticorps de l'hôte avant d'exprimer les antigènes pour lesquels les anticorps sont absents du répertoire (Warimwe et *al.*, 2013; Wang et *al.*, 2009). Il est alors compréhensible que pour assurer sa survie devant un répertoire d'anticorps matures, le parasite exprimera les variants les moins virulents, provoquant ainsi une diminution des taux d'anticorps chez l'adulte (Bachmann et *al.*, 2019).

Les arguments en faveur de la tolérance immunitaire sont également renforcés par la nature clone spécifique de l'immunité anti-palustre qui permet à un individu de résister à une infection dû à un clone particulier, et non à des clones hétérologues (Marsh and Howard, 1986 ; Gupta and Day, 1994). Ainsi, les deux familles alléliques de *msh-2*, FC27 et 3D7 sont associées à des manifestations cliniques différentes. La famille allélique FC27 a été décrite comme étant la plus susceptible d'être associée à un paludisme symptomatique ou grave (Engelbrecht *al.*, 1995 ; Al-Yaman et *al.*, 1997; Kidima and Nkwengulila, 2015). Par contre, la famille allélique 3D7 a été associée à une réduction du risque de paludisme clinique (Al-Yaman et *al.*, 1997). Cependant, il existe dans la littérature des résultats contradictoires sur les symptômes cliniques induits par FC27 et 3D7 qui peuvent être attribués soit au niveau de transmission de la zone d'étude, soit à l'âge des participants (Cortés et *al.*, 2004 ; Gnagne et *al.*, 2019). Par conséquent, toute sélection d'un génotype particulier peut avoir une incidence sur les manifestations cliniques, la parasitémie ou la réponse anticorps.

Au vu des résultats obtenus au cours de ce travail, une attention particulière devrait être accordée aux adultes immuns dont la tolérance aux infections pourrait favoriser la survie du parasite. Ils doivent être considérés comme des réservoirs potentiels pour la transmission. Les résultats montrent également les limites des outils sérologiques comme moyen de diagnostic dans un contexte de faible prévalence du paludisme où les niveaux de réponses anticorps sont sensiblement réduits. Parmi les deux types d'antigènes testés, l'extrait brut était plus sensible que l'antigène recombinant MSP-3 comme cela a été montré par Diop et *al.*, (2014).

Article 1 : Soumis le 05 /11/ 2018 ; accepté le 14 /02 2019 ; Malaria J; publié le 21 /02 2019

Association de fortes densités parasitaires de *Plasmodium falciparum* avec des infections polyclonales microscopiques chez des enfants asymptomatiques de Toubacouta, Sénégal

Babacar Diouf^{1*}, Fode Diop^{1†}, Yakhya Dieye^{2†}, Cheikh Loucoubar³, Ibrahima Dia⁴, Joseph Faye³, Mbacké Sembène⁵, Ronald Perraut¹, Makhtar Niang¹ and Aïssatou Toure-Balde¹

1. Immunology Unit, Institut Pasteur Dakar, 36 Avenue Pasteur, BP 220, Dakar, Senegal

2. Virology Unit, Institut Pasteur Dakar, 36 Avenue Pasteur, BP 220, Dakar, Senegal

3. Epidemiology of Infectious Diseases Unit, Institut Pasteur Dakar, 36 Avenue Pasteur, BP 220, Dakar, Senegal

4. Entomology Unit, Institut Pasteur Dakar, 36 Avenue Pasteur, BP 220, Dakar, Senegal

5. Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta Diop, P. O. Box 5005, Dakar, Senegal

Corresponding Author: Babacar Diouf

Babacar.Diouf@pasteur.sn

RESUME :

L'étude vient en complément des investigations pour la mise en place d'un site d'essais cliniques pour le paludisme dans l'arrondissement de Toubacouta, zone mésoendémique de la région de Fatick au Sénégal. L'objectif de l'étude était de déterminer la diversité génétique des souches de *P. falciparum* circulant dans la zone.

Les culots globulaires de 92 enfants, porteurs asymptomatiques de *P. falciparum*, âgés de moins de 10 ans d'un prélèvement transversal en Novembre 2010 ont été génotypés par la technique de PCR nichée en utilisant les marqueurs *msh-1* et *msh-2*.

Les résultats ont montré que les souches circulantes de *P. falciparum* étaient très polymorphes avec des infections multiples (IM) de 63% et 77%, des multiplicités des infections (MOI) de 2,6 et 3,7 respectivement pour *msh-1* et *msh-2*. Le gène *msh-2* était plus polymorphe que *msh-1*. Les familles alléliques de *msh-1* étaient par ordre d'importance RO33, K1 et MAD20. Pour *msh-2*, 3D7 était plus fréquent que FC27. La combinaison de familles alléliques K1/RO33/MAD20 de *msh-1* était significativement et positivement corrélée avec la parasitémie ($r^2=0,97$; $p=0,002$), tandis qu'une infection mono-allélique de MAD20 était significativement associée à de faibles parasitémies ($r^2 = 0.92$; $p = 0.01$). L'étude plaide en faveur d'une approche multi-allélique dans la conception des candidats vaccins actuels contre *P. falciparum*.

RESEARCH

Open Access



Association of high *Plasmodium falciparum* parasite densities with polyclonal microscopic infections in asymptomatic children from Toubacouta, Senegal

Babacar Diouf^{1*}, Fodé Diop^{1†}, Yakhya Diéye^{1†}, Cheikh Loucoubar², Ibrahima Dia⁴, Joseph Fayé¹, Mbacké Sembène³, Ronald Perraut¹, Makhtar Niang¹ and Aïssatou Toure-Balde¹

Abstract

Background: Malaria is a leading cause of mortality and morbidity in tropical countries, especially in sub-Saharan Africa. In Senegal, a control plan implemented in the beginning of the 2000s has enabled a substantial reduction of mortality and morbidity due to malaria. However, eradication of malaria requires a vaccine that protects against *Plasmodium falciparum* the deadliest species of the parasite that causes this disease. *Plasmodium falciparum* is characterized by an extensive genetic diversity that makes vaccine development challenging. In this study, the diversity of *P. falciparum* isolates was analysed from asymptomatic children residing in the district of Toubacouta, Senegal.

Methods: A nested PCR approach was used to perform genotyping of the *msp-1* and *msp-2* loci in samples from 87 asymptomatic children infected with *P. falciparum*, collected during a cross sectional survey in November and December 2010. Parasite densities in blood samples were determined by microscopic examination and statistical analyses were used to identify association of parasite genotype and parasitaemia.

Results: Genotyping was successful in 84/87 and 82/87 samples for *msp-1* and *msp-2*, respectively. A strong genetic diversity was found with a total of 15 and 21 different alleles identified for *msp-1* and *msp-2*, respectively. RO33 was the most frequent allelic family of *msp-1* followed by MAD20, then by K1. Regarding *msp-2* allelic families, 3D7 was more common than FC27. Multiple infections were predominant, since 69% and 89% of the samples genotyped for *msp-1* and *msp-2* showed more than one clone of *P. falciparum* with complexity of infection (COI) of 2.5 and 4.7, respectively. Expected heterozygosity (H_e) was 0.57 and 0.55 for *msp-1* and *msp-2*, respectively. Interestingly, polyclonal infections were significantly associated with higher parasitaemia.

Conclusions: The strong genetic diversity of *P. falciparum* clones and the association of polyclonal infection with high parasitaemia call for a multi-allelic approach in the design of vaccine candidates for efficient malaria eradication.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, Polymorphism, *msp-1*, *msp-2*, Asymptomatic

*Correspondence: Babacar.Diouf@pasteur.sn

[†]Fodé Diop and Yakhya Diéye contributed equally to this work.

¹Immunology Unit, Institut Pasteur Dakar, 36 Avenue Pasteur, BP 220, Dakar, Senegal

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2019. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Malaria is a leading cause of mortality and morbidity in tropical countries. In 2016, more than 212 million of clinical cases and 429,000 deaths were reported worldwide. Sub-Saharan African countries support 92% of the global malaria burden, with children younger than 5 years, pregnant women, and non-immune visitors to endemic areas being people the most at risk of developing severe or fatal malaria [1]. In Senegal, 492,253 clinical cases and 526 deaths were reported in 2015. These figures represent a 12-times reduction compared to those from 2001, a substantial decrease that highlights the success of the malaria control programme that was implemented in Senegal in the beginning of the 2000s [2]. This malaria control programme was based on several approaches including widespread use of insecticide-treated mosquito nets (ITNs), rapid diagnostic testing (RDTs), treatment with artemisinin-based combination therapy (ACT), indoor residual spraying of insecticides (IRS), intermittent preventive treatment in pregnancy (IPTp) and seasonal malaria chemoprevention (SMC) in children under 10 years of age with sulfadoxine-pyrimethamine plus amodiaquine in areas of high seasonal malaria transmission [1]. However, despite this undisputable success, multiple factors can threaten malaria control efforts and compromise elimination including the emergence of drug-resistant parasite strains [3], insecticide-resistant mosquito vectors [4] as well as the weakness of the healthcare systems since malaria endemic countries are among the poorest in the world [5].

Achieving malaria elimination requires the development of an effective vaccine, especially against *Plasmodium falciparum*, which is the deadliest of the five human malaria parasites. A major obstacle toward this goal is the extensive genetic diversity of natural parasite populations that complicate the design of an effective vaccine against all *P. falciparum* strains. The difficulty related to *P. falciparum* genetic diversity has been clearly illustrated in clinical trials that tested different vaccine candidates. For example, the malaria vaccine combination B, designed as a three-component blood-stage product targeting the merozoite surface proteins MSP-1 (K1 parasite line) and MSP-2 (3D7), and the ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA) was efficient against homologous parasites harboring the 3D7 allelic family of MSP-2, but failed to protect against those containing the FC27 allelic family, and was even associated with an increased rate of morbidity [6]. More recently, the malaria vaccine FMP21/AS02 (A), a recombinant protein based on the apical membrane antigen 1 (AMA1) from the 3D7 strain of *P. falciparum* did not provide significant protection against clinical malaria, but showed a strain-specific efficacy [7]. Moreover, a phase III clinical trial with RTS,S,

the most advanced malaria vaccine candidate, showed a greater activity against parasites carrying the matching allele of the circumsporozoite protein than against other strains. In this last trial, less than 10% of the 5–17 months old children who were infected harbored parasites carrying the vaccine allele [8]. Collectively, these results point out the need to study *P. falciparum* polymorphism as an important step toward the identification of efficient malaria vaccine candidates.

The study presented here falls within the framework of preliminary investigations aimed at establishing a malaria clinical trial site in the district of Toubacouta (Fatick region, Senegal). It follows epidemiological [9], entomological [10] and immunological investigations undertaken in the same area. The objective is to characterize the genetic diversity of *P. falciparum* isolates from asymptomatic children in the selected study site by PCR-amplification of polymorphic regions of the two marker genes *msp-1* and *msp-2*. The generated data are used to analyse the potential relationship between the levels of parasitaemia and specific parasite's allelic types.

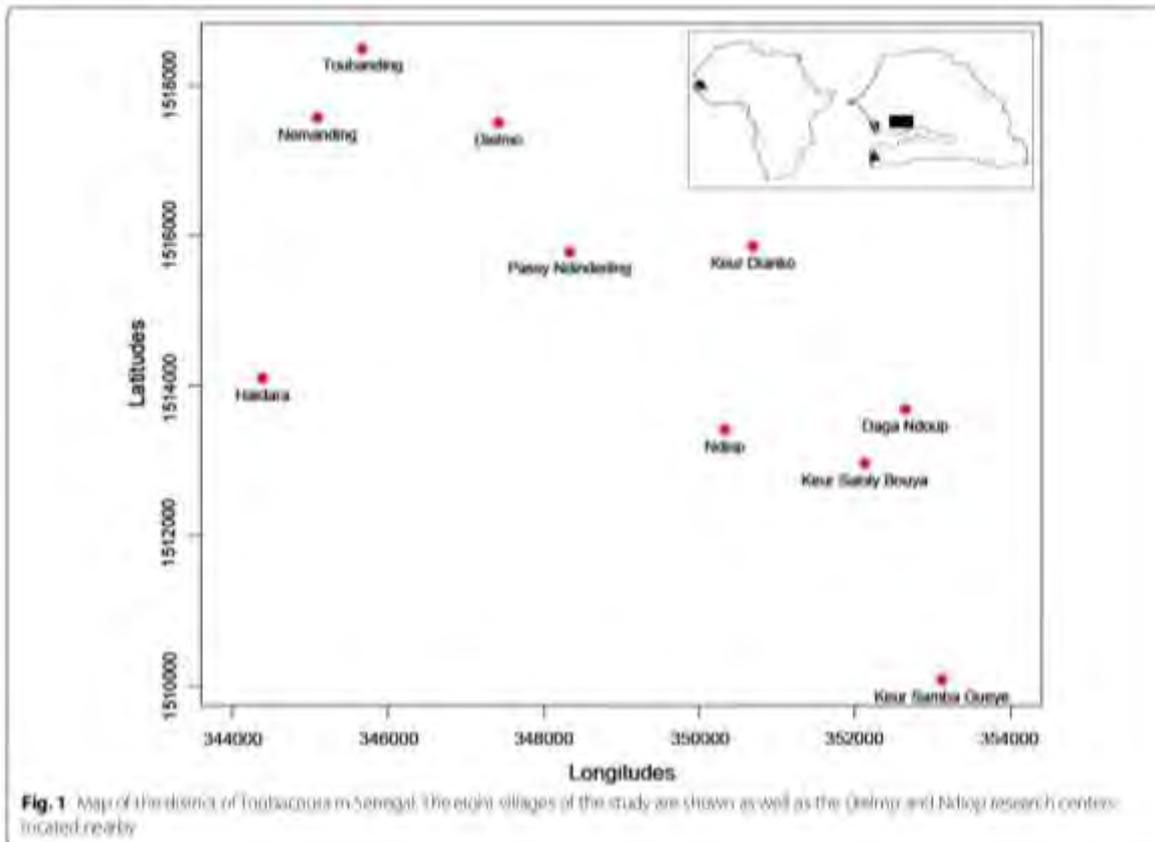
Methods

Study area

The study was conducted using samples from the rural community of Toubacouta situated in the region of Fatick (central-southern Senegal). The study area included eight villages: Haidara, Daga Ndoup, Keur Ndiako, Nemanding, Passy Ndinderling, Keur Saloly Bouya, Keur Samba Gueye and Toubanding (Fig. 1). Malaria is mesoendemic in Toubacouta area with seasonal transmission occurring mainly during the rainy season between August and October, and with a peak in September [10]. The main vector belongs to the *Anopheles gambiae* complex. Malaria is mainly caused by *P. falciparum* with an entomological inoculation rate (EIR) of four infective bites per person from July to December 2011 in seven of the eight villages. Toubanding, the eighth village had an EIR of 30 infective bites per person owing to its proximity to the river Nema [10]. The population was estimated to 8000 inhabitants with 1500 children under 10 years (18.75%). Insecticide-treated nets were used by 52% of the population [10] and ACT was freely available to children.

Sample collection

A total of 1316 children under 10 years of age were enrolled in the study from November to December 2010. Children were examined by a medical doctor and clinical parameters were properly recorded. A venous blood sample was taken and used for blood typing, measurement of biological parameters, and for preparation of thick and thin blood smears for malaria diagnosis. A symptomatic case of malaria was defined as an axillary temperature



≥ 37.5 °C or any reported history of fever within the last 24 h confirmed by RDT [9]. These cases were excluded from our study. Plasma and blood pellets were separated and stored at -20 °C for serological and molecular biology analyses, respectively.

Microscopic examination

Thick and thin smears were stained with 10% Giemsa for 25 min and microscopically examined for determination of parasite density and identification of species and developmental stages respectively. The number of parasites per 200 white blood cells (WBC) in thick-film was recorded and parasite density was estimated by counting the number of leucocytes by field examined and by arbitrarily considering that 8000 leucocytes were present in 1 μ l of blood. At least 200 thick-film fields were examined before a slide was declared negative. Two experienced microscopists read the blood smears and in the case of a discrepancy, a third microscopist examined the slide. A slide was considered positive after two concordant readings by two different microscopists. Parasitaemias were classified into five levels including F1 (≤ 50 parasites/ μ l

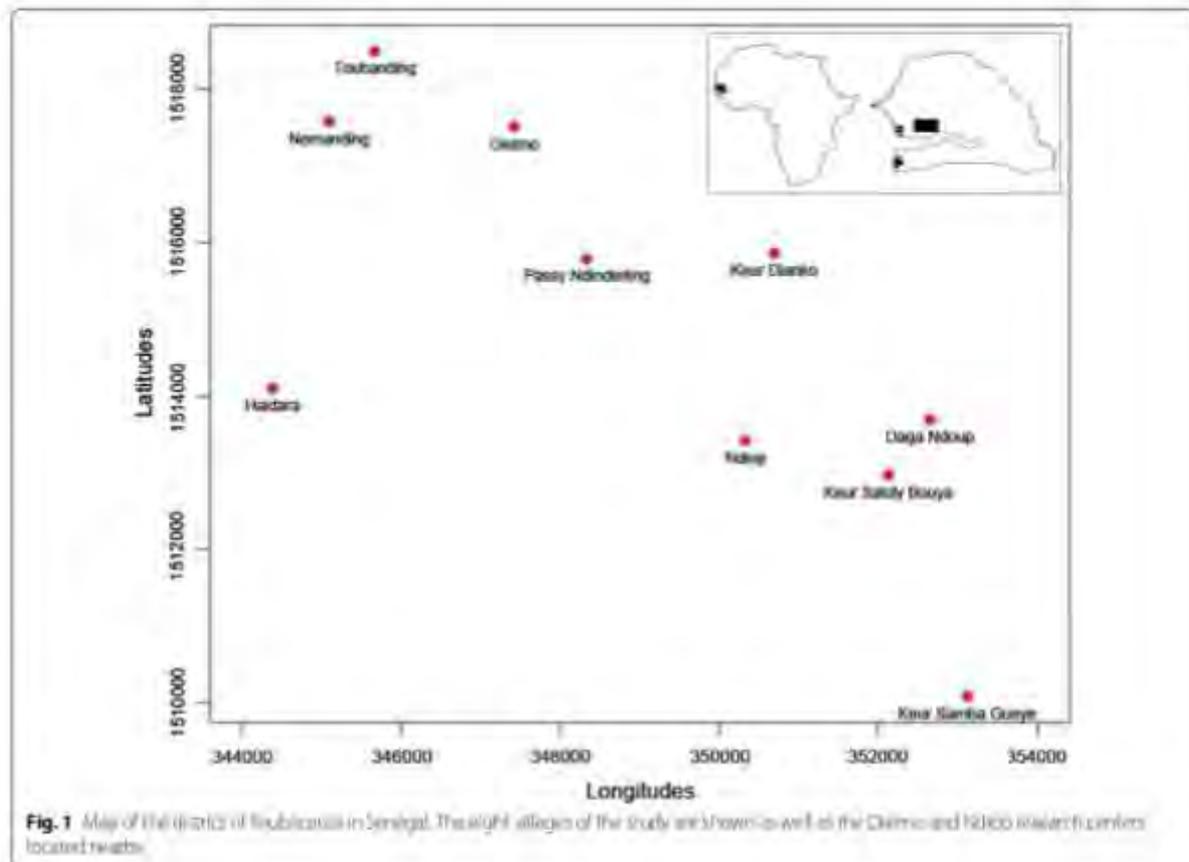
blood), F2 (50–499 parasites/ μ l), F3 (500–4999 parasites/ μ l), F4 (5000–49,999 parasites/ μ l) and F5 ($\geq 50,000$ parasites/ μ l) [11].

Extraction of parasite DNA

Genomic DNA (gDNA) was extracted from 100 μ l packed red blood cells using QiaAmp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The DNA was recovered in 50 μ l of elution buffer provided with the kit into a properly labelled Eppendorf tube. DNA concentration and purity were estimated using a NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific). Extracted DNAs were stored at -20 °C until used.

Genotyping of *Plasmodium falciparum* isolates

Genotyping of *P. falciparum* isolates was performed using a nested PCR approach targeting *msp-1* and *msp-2*, two highly polymorphic region of the parasite's genome as previously described [12]. All primers used were synthesized from Tib Molbiol (Germany). In the primary reaction, the primers used span the entire *msp-1* block



≥ 37.5 °C or any reported history of fever within the last 24 h confirmed by RDT [9]. These cases were excluded from our study. Plasma and blood pellets were separated and stored at -20 °C for serological and molecular biology analyses, respectively.

Microscopic examination

Thick and thin smears were stained with 10% Giemsa for 25 min and microscopically examined for determination of parasite density and identification of species and developmental stages respectively. The number of parasites per 200 white blood cells (WBC) in thick-film was recorded and parasite density was estimated by counting the number of leucocytes by field examined and by arbitrarily considering that 8000 leucocytes were present in 1 μ l of blood. At least 200 thick-film fields were examined before a slide was declared negative. Two experienced microscopists read the blood smears and in the case of a discrepancy, a third microscopist examined the slide. A slide was considered positive after two concordant readings by two different microscopists. Parasitaemias were classified into five levels including F1 (< 50 parasites/ μ l

blood), F2 (50–499 parasites/ μ l), F3 (500–4999 parasites/ μ l), F4 (5000–49,999 parasites/ μ l) and F5 ($\geq 50,000$ parasites/ μ l) [11].

Extraction of parasite DNA

Genomic DNA (gDNA) was extracted from 100 μ l packed red blood cells using QiaAmp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The DNA was recovered in 50 μ l of elution buffer provided with the kit into a properly labelled Eppendorf tube. DNA concentration and purity were estimated using a NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific). Extracted DNAs were stored at -20 °C until used.

Genotyping of *Plasmodium falciparum* isolates

Genotyping of *P. falciparum* isolates was performed using a nested PCR approach targeting *msp-1* and *msp-2*, two highly polymorphic region of the parasite's genome as previously described [12]. All primers used were synthesized from Tib Molbiol (Germany). In the primary reaction, the primers used span the entire *msp-1* block

Table 2 Allele families and diversity of *Plasmodium falciparum* genetic profiles

Allelic type	N (%)	Allelic type	N (%)
<i>msp-1</i>		<i>msp-2</i>	
K1	12 (14.3)	3D7	10 (24.4)
MAD20	8 (9.5)	FC27	10 (24.2)
RO33	10 (11.9)	3D7/FC27	52 (63.4)
K1/MAD20	3 (3.6)		
K1/RO33	12 (14.3)		
MAD20/RO33	18 (16.7)		
K1/MAD20/RO33	23 (27.6)		
Total combinations	84 (100)		62 (100)
Total K1	83 (28.7)	Total 3D7	206 (53.7)
Total MAD20	68 (81.1)	Total FC27	178 (46.3)
Total RO33	69 (80.2)		
Total alleles	219		384
MI	58 (69)		73 (89)
CI	3.3		4.7

MI: prevalence of multiple infections; CI: complexity of infection

to the same allelic family detected in a single isolate was 3, 5, and 4, for K1, MAD20 and RO33, respectively.

For *msp-2* gene, 21 different alleles were detected with 10 for 3D7 allelic family and 11 for FC27. Allelic family frequencies showed that the 3D7 allelic type was predominant (53.7%, 206/384) over FC27 (46.3%, 178/384) (Table 2). The prevalence of multiple infections (MI) was 89% (73/82). Expected heterozygosity (H_e) was 0.50 for *msp-2* loci. The prevalence of multiple infections (MI) was 89% (73/82). The mean complexity of infection was 4.7. The frequency of infections involving the two allelic families of *msp-2* was 63% (52/82). The maximum number of genotypes to belong to the same allelic family detected in a single isolate was 5 and 7 for 3D7 and FC27, respectively.

Ranges of fragment sizes for *msp-1* and *msp-2* allelic families are shown in Additional file 3: Table S2.

Parasitaemia is higher in polyclonal than in monoclonal asymptomatic infection by *Plasmodium falciparum*

Parasitaemias were compared in samples with polyclonal versus monoclonal infections. The analyses were performed after removal of eight samples that were found to be outliers (extreme 5% values showed as dots of boxplot in Additional file 4: Fig S2). Mean parasite density was significantly higher (Student T test, $P=0.012$) in polyclonal (mean density = 3347 parasites/ μ l) than in monoclonal infection (mean density of 1229 parasites/ μ l) for *msp-1* positives isolates (Fig. 2). A similar result was observed with *msp-2* (Fig. 2), with significantly higher parasitaemia (Student T test, $P=0.00008$) in polyclonal

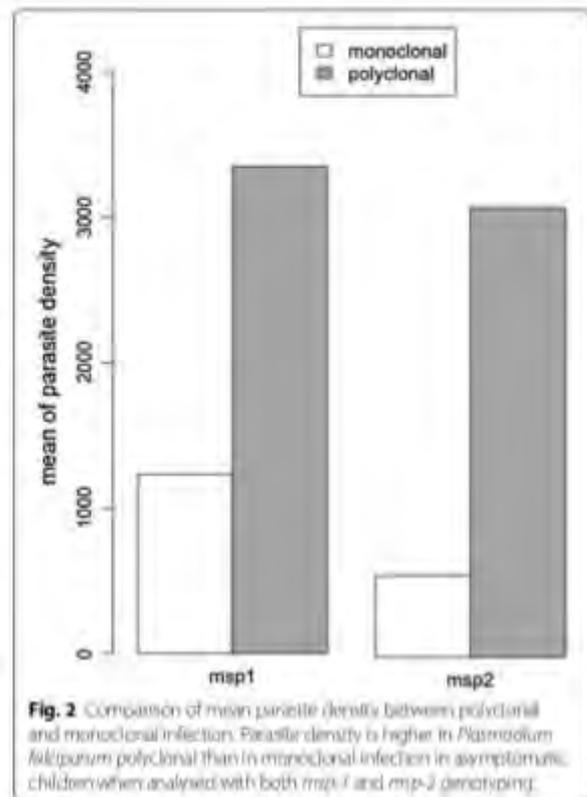


Fig. 2 Comparison of mean parasite density between polyclonal and monoclonal infection. Parasite density is higher in *Plasmodium falciparum* polyclonal than in monoclonal infection in asymptomatic children when analysed with both *msp-1* and *msp-2* genotyping

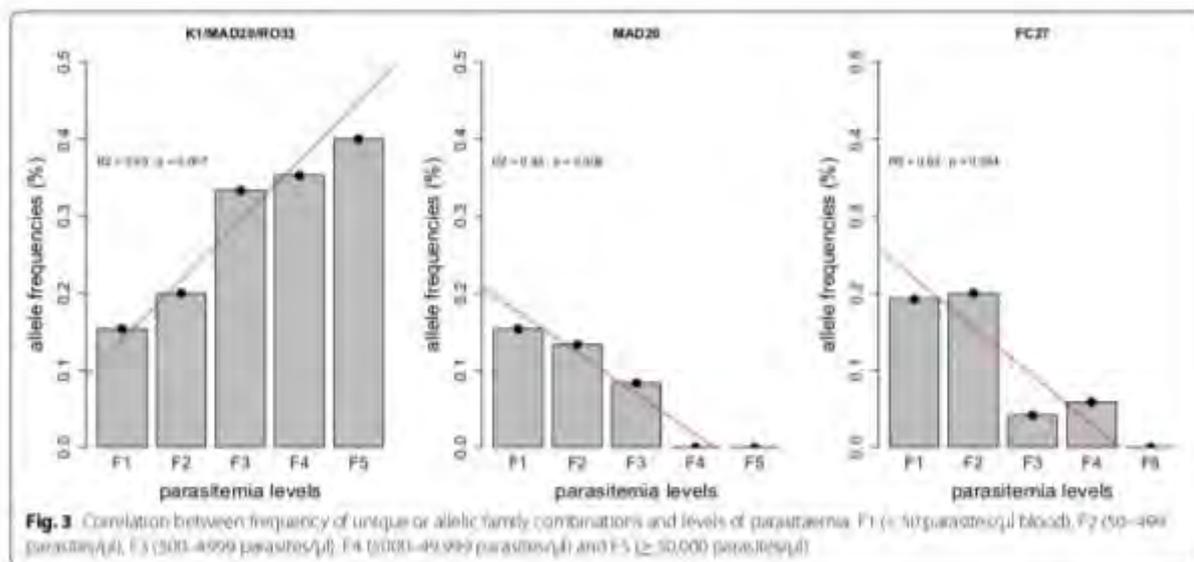
(mean density of 3092 parasites/ μ l) than in monoclonal infections (561 parasites/ μ l).

msp-1 and *msp-2* allelic families influence parasitaemia in asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection

To further analyse the effect of polyclonal infection on parasitaemia, the influence of specific allele combinations on parasite density was assessed. For this purpose, the samples were classified according to their parasite density and five levels of parasitaemia were set. Analysis of the relationship between *msp-1* allelic family combinations and parasitaemia (Fig. 3) showed a significant positive association between trimorphic infections K1/MAD20/RO33 and parasitaemia ($r^2=0.93$; $P=0.007$). In contrast, parasitaemia were significantly and negatively correlated with MAD20 monoallelic infections ($r^2=0.93$; $P=0.008$). Regarding *msp-2*, FC27 monoallelic infections were negatively associated with parasitaemia ($r^2=0.82$; $P=0.034$).

Discussion

Preliminary studies for a clinical trial site for malaria have been undertaken in the district of Toubaouta (Fatick region, Senegal). Eight villages were involved. The genetic diversity of *P. falciparum*, the only species diagnosed, was



analysed in samples from asymptomatic children collected through a cross-sectional survey. An important allelic diversity was observed with 15 and 21 different alleles, and 69% and 89% of multiple infections, for *msp-1* and *msp-2* genes, respectively. The high genetic diversity in our study is in agreement with previous findings on asymptomatic children in the mesoendemic malaria site of Niakhar in Senegal. In Niakhar, genotyping with the *msp-2* polymorphic marker revealed a range from 2 to 7 different fragments per carrier with 64% of multiclonal infections [16]. Similar results were observed 16 years ago in Ndiop in asymptomatic children [14]. Comparison of genetic diversity of *P. falciparum* isolates in Ndiop (1994) [14] and our study area (2010) in the nearby locality shows a stable genetic diversity over time. A high level of diversity persists despite a 12 times difference in transmission levels (63 infected bites per person per 4 months in 1994 compared to four infected bites per person per 3 months in 2010) between the two periods as a result of malaria control interventions [17]. This observation underlines that *P. falciparum* genetic diversity does not only rely on parasite transmission rate. Thus, it has been demonstrated that the genotypic profile changes within hours or days in asymptomatic infections [18].

Unlike genetic diversity, complexity of infection (COI) is more commonly associated with the level of malaria transmission. In line with this observation, Konate et al. [19] found that COI was twice higher in the holoendemic area of Dielmo than in the mesoendemic village of Ndiop. Low COI was also associated with low transmission rate in Malaysia [13]. Vafa et al. [16] highlighted COI variation within the same year according to transmission period. In this study,

COI is consistent with results from mesoendemic regions for both *msp-1* and *msp-2* markers [14, 20, 21].

Association between the number of clones per sample and the level of parasitaemia has been investigated. The results show that polyclonality is likely to be associated with high parasitaemia. This is consistent with previous studies [16, 21–23]. On the one hand, parasite density is attributed a major role in malaria physiopathology and some authors suggest that it might be used as a marker for morbidity and mortality associated with this disease [24, 25]. On the other hand, it is considered as the centerpiece of malaria immunity. In this regard, it has been shown that asymptomatic polyclonal carriage may protect against clinical malaria [26, 27]. Although the mechanism of this partial protection remains unclear, it is probably by maintaining protective immune responses to asexual blood stage parasites [21, 28, 29].

Moreover, this study emphasizes the significant positive correlation between frequencies of trimorphic infections K1/MAD20/RO33 of *msp-1* gene and parasitaemia (Fig. 3). Although the representative alleles of this combination have to be identified, these preliminary results point out the necessity of multivalent vaccine candidates to overcome antigenic diversity [30].

This study has some technical limitations. Firstly, PCR cannot discriminate between alleles of differing sequences with similar size and can thus underestimate the number of distinct alleles [30, 31]. Secondly, polymorphism of sub-microscopic infections is not taken into account in this study. Despite these limitations, the results provide an insight on the genetic diversity of *P. falciparum* clones circulating in Toubaouta, Senegal.

Conclusions

Despite the general decline in malaria prevalence observed following the implementation of various malaria control strategies, *P. falciparum* strains are substantially circulating in this study site and display a high genetic diversity. The level of this diversity is comparable to that found in malaria endemic and mesoendemic areas, therefore, making the site interesting for potential vaccine and therapeutic clinical trials. The positive correlation between *msp-1* trimorphic infection and parasitaemia suggests the use of field information on genetic diversity as starting blocks for designing new malaria vaccines.

Additional files

Additional file 1: Table S1. Primers and the reaction conditions used to amplify *msp-1* and *msp-2* genes.

Additional file 2: Fig. S1. Photographs of migration profiles of *msp-1* and *msp-2* allelic families in 1.5% agarose gel.

Additional file 3: Table S2. Ranges of fragment sizes for *msp-1* and *msp-2* allelic families.

Additional file 4: Fig. S2. Box plot of parasitaemia in samples from asymptomatic children infected with *Plasmodium falciparum*. The eight outliers remained prior to comparison of monoallelic and polyallelic infections are shown.

Abbreviations

DDT, rapid diagnostic test; IRS, indoor residual spraying; LLIN, long-lasting insecticide-treated nets; ACT, artemisinin-based combination therapy; IPTp, intermittent preventive treatment in pregnancy; SMC, seasonal malaria chemoprevention; *msp-1*, merozoite surface protein 1; *msp-2*, merozoite surface protein 2; EIR, entomological inoculation rate; DNA, deoxyribonucleic acid; PCR, polymerase chain reaction; LM, ladder; COI, complexity of infection; MOI, multiplicity of infection; MI, multiple infections; bp, base pairs; H_s, expected heterozygosity.

Authors' contributions

ATB conceived and coordinated the study, contributed to the methodology, to the revision of the manuscript and approved the final version. BD contributed to the conception of the study, performed molecular biology studies and data analysis and drafted the manuscript. FD contributed to the conception of the study, performed field studies, participated in the revision of the manuscript and approved the final version. ID contributed to data analysis, participated in drafting the manuscript and approved the final version. CI conducted the statistical analysis, and approved the final version. YD contributed to the analysis, participated in drafting and revising the manuscript and approved the final version. JF performed field recruitments, lead the management of the database and approved the final version. MS contributed to the methodology, participated in revising the manuscript and approved the final version. RP contributed to drafting and revising the manuscript and approved the final version. ANI participated in the design and the conducts of the molecular biology studies, contributed to revising the manuscript and approved the final version. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Immunology Unit, Institut Pasteur Dakar, 36 Avenue Pasteur, BP 220, Dakar, Senegal. ² Virology Unit, Institut Pasteur Dakar, 36 Avenue Pasteur, BP 220, Dakar, Senegal. ³ Epidemiology of Infectious Diseases Unit, Institut Pasteur Dakar, 36 Avenue Pasteur, BP 220, Dakar, Senegal. ⁴ Entomology Unit, Institut

Pasteur Dakar, 36 Avenue Pasteur, BP 220, Dakar, Senegal. ⁵ Faculty des Sciences de Techniques, Université Cheikh Anta Diop, P.O. Box 5005, Dakar, Senegal.

Acknowledgements

The authors would like to thank all the stakeholders involved in this study, and particularly the IPD staff, the inhabitants of Touba-Cosco rural community, the district health teams, the health workers, the local authorities and the communities. The authors gratefully acknowledge the Pasteur Institute of Dakar and the National Health Ministry. The authors gratefully thank I.D.C.T.P* for funding this study (Grant CB.07.41.700.007).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

The datasets analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

The study protocol was approved by the National Ethics Committee for Health Research of Senegal (ONRS). Written informed consent was obtained from parents or guardians of the children prior to recruitment. For those who were not literate, the protocol was translated into the local language, and consent was obtained in the presence of an independent witness.

Funding

This work was supported by Grant N° CB.2007.41.700.007 (Capacity building to prepare West African sites for clinical trials on HIV, TB and malaria) from European and Developing Countries Clinical Trials Partnership (EDCTP) (<http://www.edctp.org/>) in the framework of West African Network of Excellence for TB, AIDS, and Malaria (WANETAM) awarded to Aissatou Touré-Balide. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 5 November 2018 Accepted: 14 February 2019

Published online: 21 February 2019

References

1. WHO. World malaria report 2016. Geneva: World Health Organization; 2016.
2. PNLP. Bulletin Épidémiologique Annuel du Paludisme au Sénégal. Dakar: Programme National de Lutte contre le Paludisme; 2015. p. 24.
3. Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, Amarasinghe G, Lim P, Sun S, et al. Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med*. 2014;371:411–21.
4. Kilian M, Lines J, Njawa A, Muge C, Mink SF, Abeku TA. Exposure to deltamethrin affects development of *Plasmodium falciparum* inside wild pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* s.s. mosquitoes in Uganda. *Parasit Vectors*. 2016;9:102.
5. WHO. World malaria report 2015. Geneva: World Health Organization; 2015.
6. Genton B, Betsika L, Felger L, Al-Yaman E, Anders RF, Saul A, 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. *J Infect Dis*. 2002;185:1020–7.
7. Thera MA, Doumbo DK, Coulibaly D, Laurens MB, Quattara A, Kone AC, et al. A field trial to assess a blood-stage malaria vaccine. *N Engl J Med*. 2011;365:1004–13.

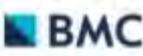
8. Neafsey DE, Jiravakul M, Bedford T, Benkeser D, Valm C, Griggs A, et al. Genetic diversity and protective efficacy of the RTS,S/AS01 malaria vaccine. *N Engl J Med*. 2015;373:2025–37.
9. Espte E, Diene San F, Diop F, Faye J, Richard V, Tall A, et al. Spatio-temporal variation in malaria incidence in children less than 10 years old, Health District of Sokone, Senegal, 2010–2013. *PLoS ONE*. 2015;10:e0137737.
10. Niang EHA, Toure A, Ngom BHM, Konate L, Faye O, Diello M, et al. Malaria transmission pattern in an area selected for clinical trials in the Sudanian Area of Senegal (West Africa). *J Trop Med*. 2013;2013:907375.
11. Trape JJ, Rogier C, Konate L, Diagne N, Bougivali H, Conque B, 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;51:123–37.
12. Sreunou G, Zhu X, Sripoon N, Jara W, Thathong S, Brown KN, et al. Based distribution of msp1 and msp2 allelic variants in *Plasmodium falciparum* populations in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1998;93:369–74.
13. Aensyeh W, Al-Mekhlafi H, Mahdy M, Saif Ali J, Al-Mekhlafi A, Suresh J. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates from Pahang, Malaysia based on MSP-1 and MSP-2 genes. *Parasit Vectors*. 2011;4:231.
14. Zwieryga J, Rogier C, Tall A, Fontenille D, Sreunou G, Trape J, et al. No influence of age on infection complexity and allelic distribution in *Plasmodium falciparum* infections in Ndop, a Senegalese village with seasonal, mesoendemic malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;59:726–35.
15. Centers for Disease Control and Prevention. https://www.cdc.gov/dpdx/resources/pdf/benchAids/malaria/parasitemia_and_lifeCycle.pdf. Accessed 24 July 2018.
16. Vafa M, Troye-Blomberg M, Anchang J, Garcia A, Mijot-Nabias F. Multiplicity of *Plasmodium falciparum* infection in asymptomatic children in Senegal: relation to transmission, age and erythrocyte variants. *Malar J*. 2008;7:17.
17. Fontenille D, Locheouan L, Diatta M, Sokhna C, Dia I, Diagne N, et al. Four years entomological study of the transmission of seasonal malaria in Senegal and the bionomics of *Anopheles gambiae* and *A. waikikiensis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1997;91:647–52.
18. Farnett A, Lebbad M, Fanja L, Koethi I. Extensive dynamics of *Plasmodium falciparum* diversity, stages and genotyping profiles. *Malar J*. 2008;7:241.
19. Konate L, Zwieryga J, Rogier C, Bhochoff E, Fontenille D, Tall A, et al. Variation of *Plasmodium falciparum* msp1 block 2 and msp2 allelic prevalence and of infection complexity in two neighbouring Senegalese villages with different transmission conditions. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1998;98(Suppl 1):21–8.
20. Mohammed H, Mindaaye T, Belayneh M, Kassa M, Awafa A, Tadesse M, et al. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates based on *mip-1* and *mip-2* genes from Kolla-Shele area, ArbaMinchi Zuria District, south west Ethiopia. *Malar J*. 2015;14:73.
21. Mayengue R, Kikounga M, Malonga FY, Barro M, Ntsoum F. Genetic polymorphism of merozoite surface protein-1 and merozoite surface protein-2 in *Plasmodium falciparum* isolates from Brazzaville, Republic of Congo. *Malar J*. 2011;10:276.
22. Peyari-Hoffmann G, Jelinek T, Kilian A, Kabagambe G, Metzger WG, Von Sonnenburg F. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* and its relationship to parasite density in an area with different malaria endemicities in West Uganda. *Trop Med Int Health*. 2001;6:607–13.
23. Mayor A, Saute E, Aponte JJ, Almeida J, Gomez-Olive FX, Djordje M, et al. *Plasmodium falciparum* multiple infections in Mozambique, its relation to other malariological indices and to prospective risk of malaria morbidity. *Trop Med Int Health*. 2003;8:3–12.
24. Beadle C, McEroy PD, Otter CN, Beier JC, Olbo AJ, Onyango PK, et al. Impact of transmission intensity and age on *Plasmodium falciparum* density and associated fever: implications for malaria vaccine trial design. *Infect Dis*. 1995;172:1017–24.
25. McEroy PD, Beier JC, Otter CN, Beadle C, Sherwood JA, Olbo AJ, et al. Predicting outcome in malaria: correlation between rate of exposure to infected mosquitoes and level of *Plasmodium falciparum* parasitemia. *Am J Trop Med Hyg*. 1994;51:573–82.
26. Sonden K, Doumbo S, Hammar U, Villa Horniani M, Griggols A, Traore B, et al. Asymptomatic multidonal *Plasmodium falciparum* infections carried through the dry season predict protection against subsequent clinical malaria. *J Infect Dis*. 2013;212:608–16.
27. Miles S, Gaye O, Garcia A. Long-term asymptomatic carriage of *Plasmodium falciparum* protects from malaria attacks: a prospective study among Senegalese children. *Clin Infect Dis*. 2008;46:516–22.
28. Okanni D, Richards JS, McCallum FJ, Michon P, King CL, Schoepflin S, et al. Immunoglobulin G subclass-specific responses against *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with control of parasitemia and protection from symptomatic illness. *Infect Immun*. 2009;77:1165–74.
29. Chen Q. The naturally acquired immunity in severe malaria and its implication for a PfPR-1 based vaccine. *Microbes Infect*. 2007;9:777–83.
30. Takala SL, Poove CV. Genetic diversity and malaria vaccine design: testing and efficacy: preventing and overcoming “vaccine resistant malaria”. *Parasite Immunol*. 2009;31:560–73.
31. Takala SL, Escalante AA, Branch OH, Karuki S, Biswas G, Chalyayoj SC, et al. Genetic diversity in the Block 2 region of the merozoite surface protein 1 (MSP-1) of *Plasmodium falciparum*: additional complexity and selection and convergence in fragment size polymorphism. *Infect Genet Evol*. 2006;6:417–28.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which promotes wider distribution of your research
- maximum visibility for your research: over 100M users of our platform

At BMC, research is always in progress.

Learn more <https://www.biomedcentral.com/publish>



Tolérance immunitaire aux infections asymptomatiques submicroscopiques à *Plasmodium falciparum* chez les adultes vivant en zones d'endémie palustre

Babacar Diouf^{1*}, Fode Diop^{1#}, Yakhya Dieye^{2#}, Adja Fatou Mbodji¹, Cheikh Talla³, Alassane Thiam¹, Ibrahima Dia⁴, Joseph Faye³, Mbacké Sembène⁵, Inès Vigan-Womas¹, Fatoumata Diène Sarr³, Ronald Perraut¹, Aïssatou Toure-Balde¹, Makhtar Niang¹,

- 1. Pôle d'Immunophysiopathologie et Maladies Infectieuses, Institut Pasteur de Dakar, 36 Avenue Pasteur, BP 220, Dakar, Senegal**
- 2. Pôle de Microbiologie, Institut Pasteur de Dakar, 36 Avenue Pasteur, BP 220, Dakar, Senegal**
- 3. Pôle d'Epidémiologie, Recherche clinique et Science des Données, Institut Pasteur de Dakar, 36 Avenue Pasteur, BP 220, Dakar, Senegal**
- 4. Pôle de Zoologie médicale, Institut Pasteur de Dakar, 36 Avenue Pasteur, BP 220, Dakar, Senegal**
- 5. Département de Biologie Animale, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta Diop, P. O. Box 5005, Dakar, Senegal**

Les auteurs ont contribué à part égale à ce travail

***Corresponding author**

Email: Babacar.Diouf@pasteur.sn

RESUME :

Ce travail a pour but d'étudier la contribution du portage asymptomatique submicroscopique sur la réponse anticorps. Elle est motivée par la forte baisse de la prévalence parasitaire suite aux différentes interventions pour lutter contre le paludisme et la nécessité de comprendre les déterminants de l'infection asymptomatique.

La transversale Ndiop 2016 avec 353 personnes asymptomatiques a permis de déterminer la prévalence (qPCR) et la seroprévalence globale (IgG contre l'antigène somatique). Nous avons génotypé de 42 qPCR positifs par le marqueur *msh-2* pour l'étude de la diversité

génétique et de la distribution des familles alléliques en fonction de l'âge. Avec une seconde cohorte de 110 individus appariée par âge entre prélèvements qPCR positifs et qPCR négatifs nous avons analysé la réponse anticorps IgG et IgM contre l'antigène somatique 0703 et IgG contre l'antigène recombinant MSP-3. L'étude a porté sur les 3 classes d'âges : <10 ans, 10-15 ans, ≥ 15 ans. Les résultats montrent chez les ≥ 15 ans une réponse anticorps significativement plus faible chez les porteurs (qPCR positifs) par rapport aux non porteurs. Pour les classes d'âges <10 ans, 10-15 ans il n'y a pas de différence de réponse anticorps entre les porteurs et les non porteurs sauf pour les <10 ans chez qui la réponse IgM est significativement plus élevée chez les porteurs, cette tranche d'âge étant plus sensible à l'infection primaire. La répartition selon âge des familles et combinaisons de familles alléliques montre une augmentation de la fréquence des familles alléliques FC27 et 3D7 et des infections monoclonales tandis que la combinaison familiale allélique FC27/3D7 et les infections polyclonales diminuent. Les résultats montrent une prévalence parasitaire étroitement associée à la séroprévalence pour les moins de 15 ans. Par contre, la séroprévalence était plus importante que la prévalence chez les plus de 15 ans. Nos résultats suggèrent que le portage asymptomatique submicroscopique résulte d'une tolérance immune chez les adultes par sélection de génotypes particuliers. Les adultes ont également un meilleur contrôle sur l'infection grâce à la synthèse d'anticorps de longue durée de vie.

Immune tolerance to asymptomatic submicroscopic *Plasmodium falciparum* infections in adults living in malaria endemic areas

Babacar Diouf^{1*}, Fode Diop^{1#}, Yakhya Dieye^{2#}, Adja Fatou Mbodji¹, Cheikh Talla³, Alassane Thiam¹, Ibrahima Dia⁴, Joseph Faye³, Mbacké Sembène⁵, Inès Vigan-Womas¹, Fatoumata Diène Sarr³, Ronald Perraut¹, Aïssatou Toure-Balde¹, Makhtar Niang¹,

Abstract

Background

Combined malaria control interventions have reduced mortality rate, number of clinical cases and parasite prevalence across Africa between 2000 and 2015. As a consequence, *Plasmodium* infections have become mostly asymptomatic and often sub-microscopic in many endemic areas. The present study aims to evaluate the contribution of asymptomatic sub-microscopic *P. falciparum* carriage on antibody responses against malaria antigens.

Methods

A total of 353 samples from a cross-sectional sampling conducted in Ndiop (Senegal) in 2016 were tested by qPCR and microscopy to determine parasite prevalence. *Plasmodium falciparum* positive samples were genotyped using *msh-2* marker. The IgG seroprevalence against crude schizont antigen of a local *P. falciparum* strain, tested by ELISA, was compared to parasite prevalence. An age-matched, under 10 years, 10-15 and over 15 years cohort of 110 positive and negative qPCR samples were used to determine the impact of sub-microscopic carriage on IgG and IgM antibody responses against schizont extract and MSP3 recombinant antigen.

Results

The microscopic diagnosis was negative for all thick smears defining a study cohort of submicroscopic asymptomatic individuals with an overall parasite prevalence of 22.37% (79/353) by qPCR. Submicroscopic infections were associated with significant lower IgG responses in qPCR positive samples for individuals over 15 years of age, for both crude

schizont ($p=0.021$) and MSP3 recombinant antigen ($p=0.035$). IgM responses were significantly higher ($p=0.034$) in children under 10 years, showing their susceptibility to primary infection. Above 15 years of age, a significant difference was found between parasite prevalence of 9.3% (33/353) and IgG seroprevalence of 23.8% (84/353) ($p=0.01$). The overall genetic diversity detected is characterized by a complexity of infection (COI) and a number of genotypes of 2.4 and 17, respectively.

Conclusion

Asymptomatic submicroscopic *P. falciparum* carriage is prevalent in the study area and is associated with immune tolerance to parasites in adults. The difference between parasite prevalence and IgG seroprevalence results from long-lived IgG in adults point out attention for elders in endemic areas as a stable parasite reservoir. In this context, mass molecular detection followed by treatment could be a valuable method for achieving elimination.

Keywords: Malaria, immune tolerance, submicroscopic parasite carriage, asymptomatic, *Plasmodium falciparum*, Senegal

Introduction

Malaria is a major health concern in endemic countries, causing 228 million cases and 405,000 deaths in 2018 [1]. Nevertheless, the burden of malaria has decreased over the past 15 years due to sustained investment in malaria control programs. These programs had a greater impact in Africa, which supports 93% of the global malaria morbidity and mortality [1]. As a result, the mortality rate fell by 57% in sub-Saharan Africa between 2000 and 2015 [2]. At the same time, the parasite prevalence and the number of malaria cases have decreased by 50%, while mortality declined by 40% across Africa. The overall decline of malaria prevalence is attributed for 60%, 19% and 13% to widespread use of insecticide-treated nets (ITNs), treatment with artemisinin-based combination therapies (ACTs) and indoor residual spraying (IRS) respectively [3]. The scaling-up of interventions on several fronts has led to a decrease in transmission, which, although heterogeneous, has profoundly changed the epidemiology of malaria in Africa [3, 4].

The intensity of malaria transmission can be directly measured by the entomological inoculation rate (EIR) [5], but generalization of EIR is limited by its cost and the wide

variation observed even within a single locality [6, 7]. EIR is also influenced by factors such as temperature, rainfall and urbanization [8]. Therefore, to overcome these limitations, parasite carriage in children aged 2-10 years was used to epidemiologically classify regions as there is a strong correlation between parasite prevalence and EIR [4]. However, some studies failed to establish a link between parasite prevalence and EIR [9]. For this reason, seroprevalence of antibodies to malaria antigens has also been considered to evaluate the burden of malaria [10, 11]. Both parasite prevalence and seroprevalence reflect the history of malaria and can be used to infer changes in transmission over time [10, 11, 13]. Seroprevalence is less affected by seasonal and local variations and reflects more recent changes in malaria exposure [10, 12]. Overall antibody responses to malaria antigens have proven to be a very useful epidemiological tool for monitoring transmission [14, 15].

Measurement of prevalence and seroprevalence has shown that malaria control interventions have favored transition from high to low transmission in many endemic areas [16]. As a consequence, most of *Plasmodium* infections are asymptomatic in these regions [17, 18]. Asymptomatic malaria can be classified as microscopic or submicroscopic depending on whether the parasite can be detected by thick blood smears examination or not.

Antibodies against *Plasmodium* antigens are associated with protection against clinical malaria in endemic areas [19, 20]. These antibodies are involved in mechanisms such as inhibition of invasion [21], parasite opsonization [19, 22], and complement mediated lysis of infected red blood cells [23]. Antimalarial immunity is also linked to reduced failure of malaria treatment in endemic regions [24].

To date, little information is available about submicroscopic asymptomatic carriage of *Plasmodium* in relation with the acquisition of antimalarial immunity. Therefore, understanding the role of submicroscopic asymptomatic parasites in the immune response could contribute to the development of effective vaccine [25, 26, 27] or treatment [28] towards malaria elimination.

In this study, we analyzed the contribution of asymptomatic submicroscopic carriage of *P. falciparum* on IgG and IgM responses to malaria antigens. We examined the association between parasite prevalence and IgG seroprevalence. We also studied the genetic diversity associated with these asymptomatic submicroscopic infections.

Methods

Study site

This study is part of an ongoing program initiated in the villages of Dielmo and Ndiop (Fatick region, Senegal) in 1990 and 1993 respectively. The project consists of long-term investigations on host-parasite relationships and the study of the mechanisms of protective immunity against malaria [29]. Ndiop is located 280 km from the capital Dakar and about 15 km north of the Gambian border. At the beginning of the study, Ndiop was a mesoendemic area with a moderate seasonal malaria transmission [30]. Vector control was implemented in July 2008 and long-lasting insecticide-treated nets (LLINs) were provided to each household [31]. The EIR was estimated to 20 infective bites/person/year in 1993 [32], 79 in 2000 and 4.6 in 2010 [33]. Microscopic parasite prevalence followed the same trend as EIR with 50%, 7% [33], 0.27% and 0% [34] in 2000, 2010, 2014 and 2015 respectively. From 2014, parasite prevalence in Ndiop has become predominantly submicroscopic with community-based prevalence estimated by qPCR to 12.5 % and 6.4 % in 2014 and 2015, respectively. The majority of these infections (95.5 %) were due to *P. falciparum* [34].

Ethical consideration

The Dielmo/Ndiop project was approved by the Senegalese Ministry of Health and National Ethics Committee for Health Research of Senegal [35]. Informed written consent was initially obtained from individuals, parents or guardians of children and was regularly renewed.

Sample collection and study design

The samples used in this study were collected during a cross-sectional survey conducted at the village level in June 2016 (just before the malaria transmission season) in Ndiop. A venous blood sample was taken from each participant, and thick and thin blood smears were prepared for malaria diagnosis by microscopy. Plasma and blood pellets were separated and stored at -20°C for serological and molecular analysis respectively.

The study involved 353 venous samples from individuals over 5 years of age. Children less than 5 years, whose blood was collected on capillary tubes, were excluded because DNA extraction required 200 µl globular pellet. The microscopic parasite prevalence was determined by examination of thick and thin blood smears stained with Giemsa. The submicroscopic parasite prevalence was determined by real-time PCR (qPCR). In order to compare parasite prevalence and IgG seroprevalence, all 353 samples were tested for IgG against the crude schizont antigen of a local *P. falciparum* strain using the ELISA technique. A first set of 45 qPCR positive samples were genotyped at the *msh-2* locus to investigate parasite genetic diversity. A second set of age-matched cohort of 110 individuals between qPCR positive (N=55) and qPCR negative (N=55) samples was used to analyze the impact of submicroscopic carriage of *Plasmodium* on the antibody responses. An age-stratified analysis was done with three age groups: under 10 years, 10-15 years and over 15 years old.

Microscopic examination

Thick and thin smears were stained with 10% Giemsa for 25 minutes and microscopically examined for determination of parasite density and identification of *Plasmodium* species. The number of parasites per 200 white blood cells in thick films was recorded and parasite density was estimated by counting the number of leucocytes by field examined and by arbitrarily considering that 8,000 leucocytes were present in 1µl of blood. At least two hundred thick-film fields were examined before a slide was declared negative. Each slide was read by two experienced microscopists and in the case of a discrepancy, a third microscopist examined the slide. A slide was considered positive after two concordant readings.

Molecular detection and characterization of *Plasmodium* species

The detection of *Plasmodium* spp was carried out by qPCR following genomic DNA isolation of *Plasmodium* parasites using QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions. Extraction was performed from 200 µl of packed red blood cells, and the DNA was recovered in 50 µl of elution buffer provided with the kit into a properly labelled 1.5 ml Eppendorf tube and was stored at - 20°C until used.

Parasite diagnostic by qPCR was based on melt curve comparison against negative and positive controls using "screening real-time PCR" with genus-specific primers targeting the *Plasmodium cytochrome b* gene [34]. Briefly, a 20 µl mix was prepared with 4 µl of 5X

Evagreen qPCR Master Mix (Solis Biodyne), 0.3 µl of each primer (10 µM), 5 µl of genomic DNA and 10.4 µl distilled water. Primers and running programs were as described by Carnier *et al.* [36].

Identification of *Plasmodium* species was carried out using a nested PCR technique with primers targeting the Plasmodium spp. 18S small sub-unit ribosomal RNA (18S *ssrRNA*) gene. A volume of 5 µl from the primary PCR amplification with Plasmodium genus-specific rPLU 5 and rPLU6 primers pairs is used as a template for the second PCR. The primer pairs: rFAL1 and rFAL2 for *P. falciparum*, rVIV1 and rVIV2 for *P. vivax*, rOVA1 and rOVA2 for *P. ovale* and rMAL1 and rMAL2 for *P. malariae* were synthesized from TIB MOLBIOL (Germany). The PCR conditions were described by Zhou *et al.* 2014 [37]. The expected sizes for the different species were: 120 bp for *P. vivax*, 144 bp for *P. malariae*, 205 bp for *P. falciparum*, 375 bp for *P. ovale*.

***m*sp-2 genotyping**

DNA from 45 qPCR *P. falciparum* positive samples was genotyped by nested PCR amplification of the highly polymorphic region of *m*sp-2 gene (block 3) as described previously [38, 39]. All primers used were synthesized from Tib Molbiol (Germany). In the primary reaction, the primers used span the entire *m*sp-2 block 3. The initial amplification was followed by individual nested PCR reactions using primers specific for FC27 and 3D7 allelic families of *m*sp-2. In the first PCR, 5 µl of DNA was amplified with 12.5 µl of 2×GMM (Go Taq Green Master Mix, Catalogue no M7113 Promega), 1 µl of each primer (10 µM) and sterile ultrapure water to a final volume of 25 µl. For the second PCR, 5 µl of product from the first PCR was amplified using 12.5 µl of 2× GMM (Go Taq Green Master Mix, M7113 Promega), 1 µl of each primer (10 µM) and sterile ultrapure water to a final volume of 25 µl. Positive and negative controls were included in each set of reactions. After amplification, 10 µl of each PCR product were separated by electrophoresis on a 1.5% agarose gel that was stained with ethidium bromide. The size of the PCR products was estimated using a DNA ladder (1 kb Plus DNA ladder, Invitrogen). Amplified DNA was visualized by ultraviolet trans-illumination using an E-GEL IMAGER (Life Technologies). Gel photographs were re-scored by visual comparison of DNA fragments and genotypes were identified according to band sizes for each individual sample. The size polymorphism for each allelic family was

analyzed assuming that one band represented one amplified PCR fragment derived from a single copy of *P. falciparum msp-2* gene.

Antigen preparation and ELISA assay

Crude schizont antigens from *P. falciparum* 0703 field-adapted strain [40] were prepared from *in vitro* continuous culture on O+ erythrocytes in RPMI medium containing 0.5 % Albumax [41]. The parasites were incubated in an atmosphere of 5% CO₂, 5% O₂, and 90% N₂ generated with an adjustable gas-mixing device [42]. Schizonts stage parasites were harvested and lysed in three volumes of sterile distilled water and stored into aliquotes in liquid nitrogen [43]. The MSP3 antigen (clone T9/96) was an *E. coli*-expressed DG-210 purified protein 28 (kind gift from Dr C. Oeuvray) [44]. The ELISA assay was performed as previously described [33, 44]. The 0703 crude extract was set to 1/3000 dilution by a dose-effect assay using positive control sera. Maxisorp plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with 100 µl of diluted crude extracts antigen in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). Non-infected red blood cell extracts were also tested for non-specific binding. MSP3 antigen was diluted to 1 µg/ml in PBS and 100 µl was used for coating the Immulon 4HBX plates (Thermo Fisher Scientific). All plates were incubated overnight at 4 °C and then washed four times with 200 µl/well of washing buffer (PBS containing 0.05% Tween 20). The wells were then blocked with 150 µl of blocking buffer (3% skimmed milk in washing buffer) for 1 hour. Plasma samples were diluted at 1/200 in a dilution buffer (1 % skimmed milk in PBS with 0.05 % Tween and 0.03% sodium azide) and 100µl of diluted sera were distributed in triplicate in the wells. Positive (a pool of 25 sera from clinically immune adults living in Dielmo) and negative (a pool of non-immune Europeans) controls were included on each plate. Following incubation with sera and washing, polyclonal goat anti-human IgG (Life Technologies, USA) or goat anti-human IgM (Life technologies, USA) conjugated to peroxidase were added at a dilution of 1/6000 and 1/3000 in the dilution buffer (1 % skimmed milk in PBS-Tween 0.05 %) respectively. Bound peroxidase was detected with 100 µl of substrate solution (TMB Solution; Thermo Fisher Scientific Inc.) for 30 min and the enzymatic reaction stopped by addition of 50 µl of 0.2 mM sulfuric acid. The optical density (OD) at 450 nm was read in a BIO-RAD Microplate Reader (iMark).

Parameters definition and statistical analysis

Genetic parameters

The frequency of allelic families was expressed as the percentage of fragments assigned to one allelic family or combination of allelic families out of the total number of fragments detected for *msp-2* gene. The complexity of infection (COI), also referred as the multiplicity of infection (MOI) or number of genotypes per infection was calculated by dividing the total number of fragments detected in *msp-1* or *msp-2* by the number of samples positive for the same marker. Multiple infections (MI) or polyclonal infections corresponded to the proportion of isolates with more than one amplified PCR fragment. Expected heterozygosity (HE) was defined as the probability of being infected by two parasites with different alleles at a given locus. Result of HE ranging from 0 to 1 was calculated by using the following formula: $HE = \frac{n}{n-1} [1 - \sum p_i^2]$, where n is the number of isolates sampled and p_i is the allele frequency at a given locus.

Immunological parameters

Results were expressed as optical density (OD) ratio calculated as follow: mean OD sample/mean OD naive serum pool. Sera with an OD ratio > 2 were considered as positive response for prevalence calculations [44] (Mbengue, B et al., 2019). Variations between tests for positive controls should not exceed 20 %. The Plate to plate reproducibility was considered satisfactory with coefficients of variation not exceeding 4 % using two positive controls, two negative controls and the same antigen for each plate.

Statistical analysis

Association between the prevalence of sub-microscopic *P. falciparum* carriage (qPCR+) and seroprevalence (IgG+ against crude schizont extract of strain 0703) was analyzed using the chi-square test. Mean OD ratio differences between qPCR positive and qPCR negative groups were calculated using Student's t-test. Differences were considered significant when p-value was less than 0.05. All analyses were performed using R software (version 3.6.1).

Results

Prevalence, seroprevalence and genetic diversity of malaria infections in Ndiop 2016

The 353 individuals considered in the study were divided into three age groups: under 10 years, 10-15 years and over 15 years old comprising 74, 63 and 216 individuals, respectively. The sex ratio was 2 in favor of females (Table 1). None of the subjects had fever at the time of sampling. The microscopic diagnosis was negative for all thick smears defining a study cohort of submicroscopic asymptomatic individuals. An asymptomatic malaria infection was defined as the presence of parasites of the genus *Plasmodium* in an individual in absence of clinical manifestations or antimalarial treatment. *P. falciparum* was the only species detected by nested PCR technique.

The overall parasite prevalence obtained by qPCR was 22.37% (79/353). The distribution of this prevalence was 8.5% (30/353), 4.5% (16/353), 9.3% (33/353) for children under 10 years, 10 to 15 years, and above 15 years old, respectively. There was a significant difference in qPCR parasite prevalence between age group 10-15 years and the two other age groups; under 10 years (Chi-square test, $p=0.03$) and over 15 years (Chi-square test, $p=0.01$).

The global IgG seroprevalence against the crude schizont antigen was 34.8% (123/353). The repartition of the seroprevalence by age group was 6.2% (22/353), 4.8% (17/353), 23.8% (84/353) for children under 10 years, 10 to 15 years, and above 15 years old, respectively. Seroprevalence was significantly higher for the age group over 15 years compared to the other two age groups ($p=0.0001$, Chi-square test).

Parasite prevalence and IgG seroprevalence were strongly related for age groups below 15 years of age. However, above 15 years of age, a significant difference was found between parasite prevalence of 9.3% (33/353) and IgG seroprevalence of 23.8% (84/353) ($p=0.01$, Chi-square test) (Figure 1).

The genotyping of *msp-2* marker was performed on samples from 45 *P. falciparum* positive individuals. Genotyping was successful in 42 samples distributed as follows: 15, 13 and 14 samples for age groups under 10 years, 10-15 years and over 15 years old, respectively (Table 1). The results revealed a complexity of infection (COI) of 2.4. A total of 17 different alleles were detected, 12 for the allelic family FC27 and 5 for 3D7. The frequencies of the allelic families FC27, 3D7 or the combination of FC27/3D7 allelic families were 28.6% (12/42), 11.9% (5/42), and 59.5% (25/42), respectively. The expected heterozygosity (HE) of

the sub-microscopic carriage for the *m*sp-2 marker was 0.49, and the prevalence of multiple infections (MI) was 73.8% (31/42) (Table 2).

Table 1: Demographic characteristics of Ndiop cross-sectional sampling in 2016, the ELISA age matched PCR (+)/ PCR (-) set and Genotyped samples

		Number	Sex ratio F/H	Age groups (year)		
				<10	10-15	>15
Ndiop 2016 cross-sectional sampling		353	2.01	74	63	216
Genotyped samples	PCR+	45	3.2	15	13	17
ELISA:age matched PCR (+)/ PCR (-)	PCR+	55	3.4	17	15	23
	PCR-	55	1.7	17	15	23

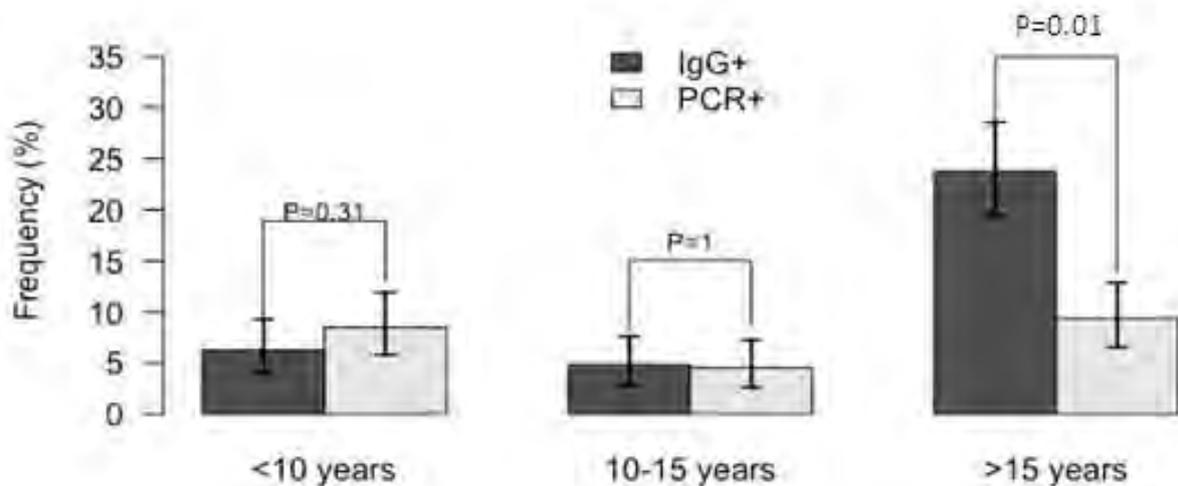


Fig 1 : Association between qPCR-determined parasite prevalence (PCR+) and IgG seroprevalence (IgG+) against crude schizont antigen according to age groups.

Table 2: Allelic diversity of *Plasmodium falciparum* msp-2 gene

Allelic families	N (%)
FC27	12 (2.6)
3D7	5 (1.9)
FC27/3D7	25 (59.5)
Total combinations	42 (100)
Number of different alleles	16 (11 FC27, 5 3D7)
Expected heterozygosity (HE)	0.49
Multiple infections (MI)	31 (73.8)
Complexity of infection (COI)	2.4

Contribution of sub-microscopic parasite carriage on immune responses

To assess the impact of submicroscopic parasite carriage on antibody responses to malaria, the levels of circulating antibodies against the crude extract of *P.falciparum* local strain and MSP-3 recombinant antigen were analyzed. This analysis was conducted on an age-matched cohort of 55 parasite-free individuals and 55 parasite submicroscopic carriers from the three defined groups (<10, 10 – 15, and >15 years). It is important to note that, the cohort was limited to 110 individuals as this was the maximum number that could be matched and only age parameter was taken into account. Interestingly, the level of circulating IgM, reflecting a recent infection, was significantly higher ($p=0.034$, Student t-test) in young children infected (below 10 years) whereas there was no significant difference in older children and adults (Figure 2). The level of circulating IgG was significantly lower in adults carrying parasite for both crude schizont extract ($p=0.021$, Student t-test) (Figure 3) and MSP-3 recombinant antigen ($p=0.034$, Student t-test) (Figure 4). In contrast, IgG level was comparable in children (10 and 10 – 15 years) independently of the presence of parasite (Figures 3, 4). All together, these results suggest that submicroscopic carriage of *P. falciparum* is accompanied by a progressive establishment of a tolerance toward the parasite.

IgM/crude antigen 0703

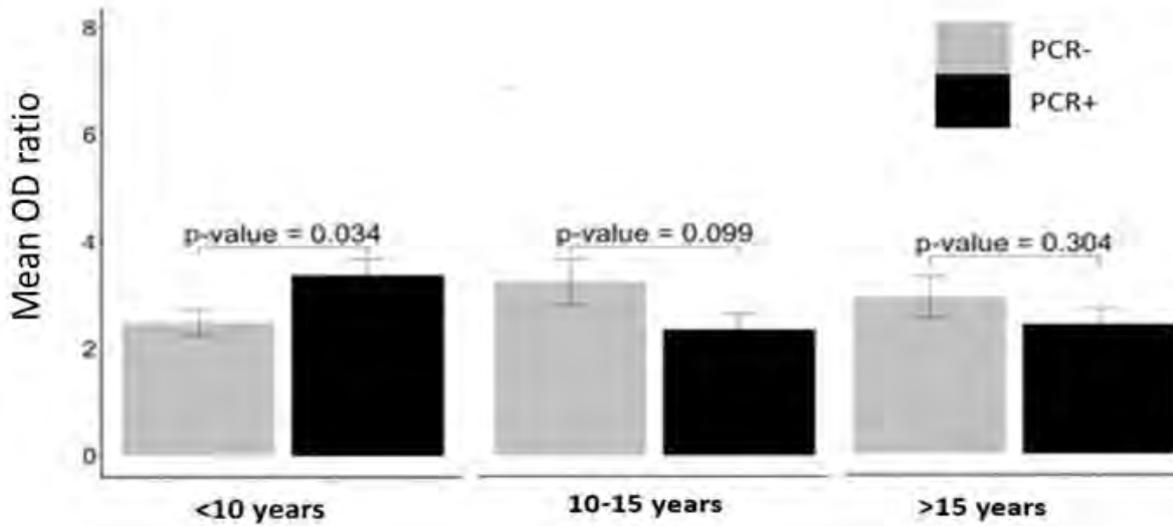


Fig 2: Levels of circulating IgM antibodies against crude schizont extract antigen in age-matched groups <10 years, 10 – 15 years and >15 years. Results expressed as mean OD ratios are shown for infected (PCR+) and non-infected (PCR-) individuals.

IgG/crude antigen 0703

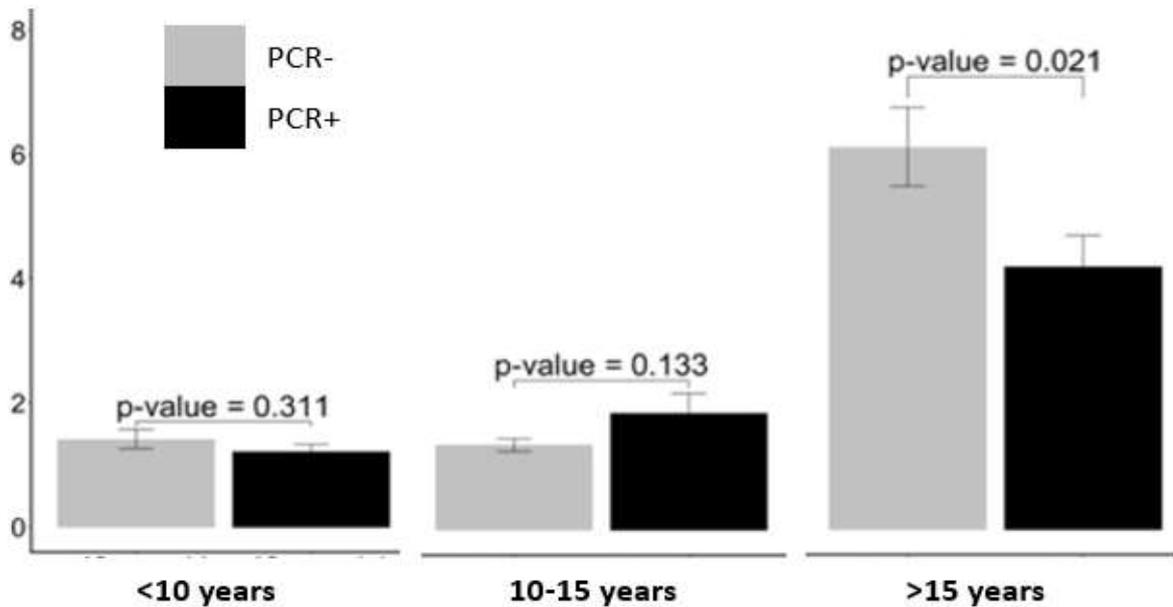


Fig 3: Levels of circulating IgG antibodies against crude schizont extract antigen in age-matched groups <10 years, 10 – 15 years and >15 years. Results expressed as mean OD ratios are shown for infected (PCR+) and non-infected (PCR-) individuals.

IgG/recombinant MSP-3

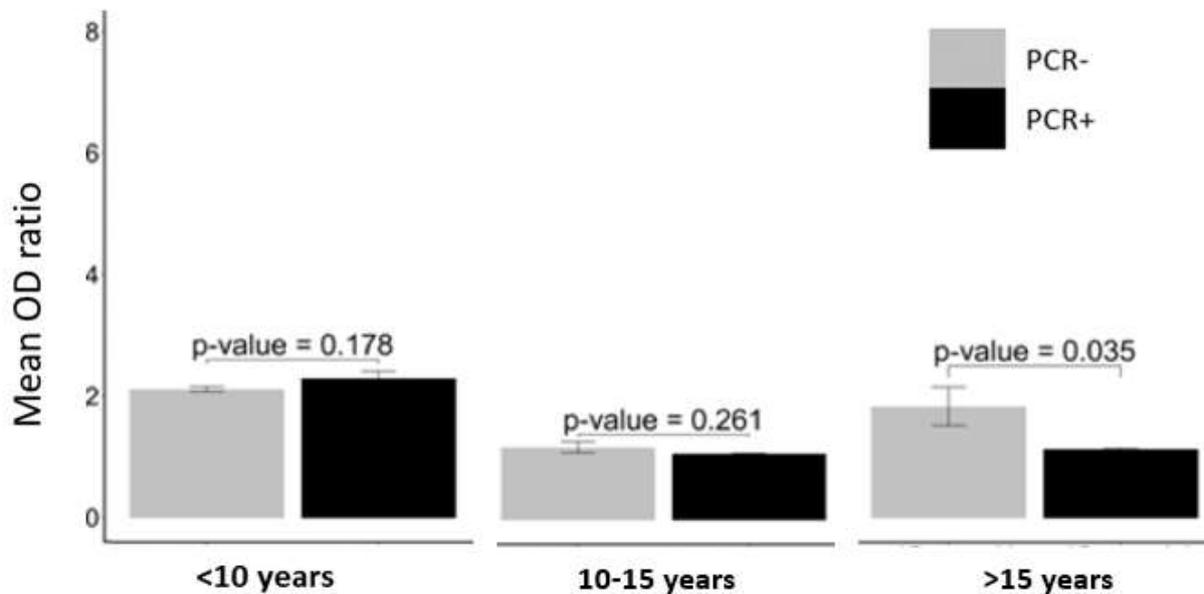


Fig 4: Levels of circulating IgG antibodies against the MSP-3 recombinant antigen in age-matched groups <10 years, 10 – 15 years and >15 years. Results expressed as mean OD ratios are shown for infected (PCR+) and non-infected (PCR-) individuals.

DISCUSSION

The study focused on the contribution of asymptomatic submicroscopic *P. falciparum* carriage to immune responses. The level of antibody compared between submicroscopic carriers (qPCR positive and microscopy negative) and age-matched non-*P. falciparum* carriers (qPCR negative and microscopy negative) shows clearly acquisition of immune tolerance to carried parasites for elders population (over 15 years).

The results showed significantly lower antibody levels in *P. falciparum* carriers over 15 years of age compared to non-carriers of the same age group for IgG against crude schizont and MSP-3 recombinant antigen. For age groups under 15 years, however, antibody levels did not differ significantly between *P. falciparum* carriers and non-carriers, except for IgM responses, which were significantly elevated in parasite carriers under 10 years of age, indicating a greater sensitivity to primary infection. These results indicate that individuals over 15 years of age have not developed significant immune responses against carried parasites reflecting the

possible immune tolerance to malaria that was mentioned very early in a previous study [45]. The main argument based on the difference in clinical manifestations between naïve and immune individuals from endemic areas [46, 47] is expressed at the molecular level by different rates of pro-inflammatory cytokines between naïve and immune subjects [48].

This immune tolerance is also supported by the first series of experimental malaria infections in humans, which revealed that the risk of fever decreases with the number of infections [49]. According to Shanks [50], parasites in asymptomatic carriage benefit from relative immune tolerance and adults exercise better control over parasite density and genotypic fluctuations. Indeed, antibodies can be classified into two groups, those acquired during early childhood, resulting from the primary infection, short-lived in nature, considered as marker of exposure and those with a long lifespan acquired through repeated infections and associated with protection [51, 52, 53]. Longer-lasting antibodies are produced by either long-lived plasma cells or long memory B cells [54, 55]. Accordingly, in this study, in contrast to those over 15 years of age, prevalence and seroprevalence were closely related in children under 15 years of age. It was also reported that the occurrence of a clinical episode corresponds to the emergence of a new genotype [56] and that the genetic characteristics of the parasite populations detected during phases of asymptomatic carriage differed from those causing a clinical episode [57].

One possible mechanism for parasite tolerance could be through clonal selection in immune adults which has been reported by Ntoumi et al. [58], who have showed that the number of genotypes and allelic families per positive sample is significantly reduced around the age of 15 years in endemic areas. The present study showed that submicroscopic *P. falciparum* infection was associated with a low COI (2.4) confirming those obtained by A-Elbasit et al. (COI=1.0 with *msh-2* marker) and Gueye et al. (COI=1.4 with *msh-1* marker) [62, 63]. Among the two types of antigens tested, the crude antigen was more sensitive than the MSP-3 recombinant antigen [33]. The results pointed out the limitations of the ELISA test for analysis of seroprevalence, based on the recombinant antigen, in the context of low parasite densities with substantially reduced response amplitudes.

CONCLUSION

The study showed that asymptomatic submicroscopic *P. falciparum* carriage is associated with immune tolerance reflected by a decrease in IgG antibody responses for adult parasite carriers over 15 years of age. The study therefore underlines the particular attention to be paid to asymptomatic submicroscopic malaria in adults as a stable parasite reservoir in a context of malaria pre-elimination. Since the immune system is tolerant to parasites at the submicroscopic level, molecular detection followed by treatment could be a valuable method for achieving elimination.

Abbreviations

IRS: Indoor Residual Spraying

ACT: Artemisinin-based Combination Therapies

ITN: Insecticide-Treated Nets

LLIN: Long-Lasting Insecticide-treated Nets

msp1: merozoite surface protein 1

msp2: merozoite surface protein 2

EIR: Entomological Inoculation Rate

DNA: deoxyribonucleic acid

qPCR: quantitative Polymerase Chain Reaction

UV: ultraviolet

COI: Complexity Of Infection

MOI: Multiplicity Of Infection

MI: Multiple Infections

bp: base pairs

HE: Expected Heterozygosity

P. falciparum: *Plasmodium falciparum*

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The study protocol was approved by the National Ethics Committee for Health Research of Senegal (CNERES). Written informed consent was obtained from parents or guardians of the children prior to recruitment. For those who were not literate, the protocol was translated into the local language, and consent was obtained in the presence of an independent witness.

Consent for publication

“Not applicable”

Availability of data and material

The datasets analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests

Funding

This study was supported by Foundation Institut Pasteur de Dakar.

Authors' contributions

BD conceived the study, contributed to the fieldwork, performed laboratory experiments and data analysis, and drafted the manuscript. MN participated in the design of the study, and contributed to the fieldwork and the conduct of the molecular biology assays. ATB coordinated the study and contributed to the study design. FD, YD, AT, ID, and IVW contributed to data analysis and the revision of the manuscript. AFM contributed to the laboratory experiments. RP contributed to the methodology, contributed to drafting and revising the manuscript. CT participated in the statistical analysis. FDS and JF coordinated the fieldwork and the collection of samples, and managed the database. MS contributed to the methodology, participated in revising the manuscript and approved the final version. All authors contributed to the revision of the manuscript, read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors would like to thank all the stakeholders involved in this study, and particularly PD staff Dr Ndeye Sakha BoB and Dr Oumar Faye for contributing with reagents, the inhabitants of Ndiop village, the local health workers and authorities. The authors gratefully acknowledge the Foundation Institut Pasteur de Dakar, the National Health Ministry and Cheikh Anta Diop University.

BIBLIOGRAPHY

1. WHO. World malaria report 2019. Geneva: World Health Organization; 2019.
2. Gething PW, Casey DC, Weiss DJ, Bisanzio D, Bhatt S, Cameron E, et al. Mapping *Plasmodium falciparum* mortality in Africa between 1990 and 2015. *N Engl J Med*. 2016;375:2435–45.
3. Bhatt S, Weiss DJ, Cameron E, Bisanzio D, Mappin B, Dalrymple U, et al. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature*. 2015;526:207–11.
4. Hemingway J, Ranson H, Magill A, Kolaczinski J, Fornadel C, Gimnig J, et al. Averting a malaria disaster: will insecticide resistance derail malaria control? *Lancet*. 2016;387:1785–8.
5. Beier JC, Killeen G, Githure JJ. Entomologic inoculation rates and *Plasmodium falciparum* malaria prevalence in Africa. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;61:109–13.
6. Kelly-Hope LA, McKenzie FE. The multiplicity of malaria transmission: a review of entomological inoculation rate measurements and methods across sub-Saharan Africa. *Malar J*. 2009;8:19.
7. Fontenille D, Lochouart L, Diagne N, Sokhna C, Lemasson JJ, Diatta M, et al. High annual and seasonal variations in malaria transmission by anophelines and vector species composition in Dielmo, a holoendemic area in Senegal. *Am J Trop Med Hyg*. 1997;56:247–53.
8. Robert V, Macintyre K, Keating J, Trape JF, Duchemin JB, Warren M, et al. Malaria transmission in urban sub-Saharan Africa. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;68:169–76.

9. Elissa N, Migot-Nabias F, Luty A, Renaut A, Touré F, Vaillant M, et al. Relationship between entomological inoculation rate, *Plasmodium falciparum* prevalence rate, and incidence of malaria attack in rural Gabon. *Acta Trop*. 2003;85:355–61.
10. Drakeley CJ, Corran PH, Coleman PG, Tongren JE, McDonald SLR, Carneiro I, et al. Estimating medium- and long-term trends in malaria transmission by using serological markers of malaria exposure. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:5108–13.
11. Stewart L, Gosling R, Griffin J, Gesase S, Campo J, Hashim R, et al. Rapid assessment of malaria transmission using age-specific sero-conversion rates. *PLoS ONE*. 2009;4:e6083.
12. Cornille-Brögger R, Mathews HM, Storey J, Ashkar TS, Brögger S, Molineaux L: Changing patterns in the humoral immune response to malaria before, during, and after the application of control measures: a longitudinal study in the West African savanna. *Bull World Health Organ*. 1978, 56: 579-600.
13. Cook J, Kleinschmidt I, Schwabe C, Nseng G, Bousema T, Corran PH, et al. Serological markers suggest heterogeneity of effectiveness of malaria control interventions on Bioko Island, equatorial Guinea. *PLoS ONE*. 2011;6:e25137.
14. Esposito F, Lombardi S, Modiano D, Zavala F, Reeme J, Lamizana L, Coluzzi M, Nussenzweig RS. Prevalence and levels of antibodies to the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* in an endemic area and their relationship to resistance against malaria infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1988;82: 827-832.
15. Ramasamy R, Nagendran K, Ramasamy MS: Antibodies to epitopes on merozoite and sporozoite surface antigens as serologic markers of malaria transmission: studies at a site in the dry zone of Sri Lanka. *Am J Trop Med Hyg*. 1994, 50: 537-547.
16. Sharp BL, Kleinschmidt I, Streat E, Maharaj R, Barnes KI, Durrheim DN, et al. Seven years of regional malaria control collaboration—Mozambique, South Africa, and Swaziland. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;76:42–7.
17. Baum E, Sattabongkot J, Sirichaisinthop J, Kiattibutr K, Jain A, Taghavian O, et al. Common asymptomatic and submicroscopic malaria infections in Western Thailand revealed in longitudinal molecular and serological studies: a challenge to malaria elimination. *Malar J*. 2016;15:333.

18. Katrak S, Nayebare P, Rek J, Ariaitwe E, Nankabirwa J, Kanya M, et al. Clinical consequences of submicroscopic malaria parasitaemia in Uganda. *Malar J*. 2018;17:67.
19. Chiu CY, Hodder AN, Lin CS, Hill DL, Li Wai Suen CS, Schofield L, et al. Antibodies to the *Plasmodium falciparum* proteins MSPDBL1 and MSPDBL2 opsonize merozoites, inhibit parasite growth, and predict protection from clinical malaria. *J Infect Dis*. 2015;212:406–15.
20. Kana IH, Garcia-Senosiain A, Singh SK, Tiendrebeogo RW, Chourasia BK, Malhotra P, et al. Cytophilic antibodies against key *Plasmodium falciparum* blood stage antigens contribute to protection against clinical malaria in a high transmission region of Eastern India. *J Infect Dis*. 2018;218:956–65.
21. Irani V, Ramsland PA, Guy AJ, Siba PM, Mueller I, Richards JS, et al. Acquisition of functional antibodies that block the binding of Erythrocyte-Binding Antigen 175 and protection against *Plasmodium falciparum* malaria in children. *Clin Infect Dis*. 2015;61:1244–52.
22. Hill DL, Wilson DW, Sampaio NG, Eriksson EM, Ryg-Cornejo V, Harrison GLA, et al. Merozoite antigens of *Plasmodium falciparum* elicit strain-transcending opsonizing immunity. *Infect Immun*. 2016;84:2175–84.
23. Reiling L, Boyle MJ, White MT, Wilson DW, Feng G, Weaver R, et al. Targets of complement-fixing antibodies in protective immunity against malaria in children. *Nat Commun*. 2019;10:610.
24. O’Flaherty K, Maguire J, Simpson JA, Fowkes FJI. Immunity as a predictor of anti-malarial treatment failure: a systematic review. *Malar J*. 2017;16:158.
25. Elliott SR, Fowkes FJ, Richards JS, Reiling L, Drew DR, Beeson JG. Research priorities for the development and implementation of serological tools for malaria surveillance. *F1000Prime Rep*. 2014;6:100.
26. King CL, Davies DH, Felgner P, Baum E, Jain A, Randall A, et al. Biosignatures of exposure/transmission and immunity. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;93:15–37.

27. Riley EM, Stewart VA. Immune mechanisms in malaria: new insights in vaccine development. *Nat Med.* 2013;19:168–78.
28. Miller LH, Ackerman HC, Su XZ, Wellems TE. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nat Med.* 2013;19:156–67.
29. Trape JF, Rogier C, Konate L, Diagne N, Bouganali H, Canque B, 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;51:123–37.
30. Rogier C, Trape JF. Study of premunition development in holo- and meso-endemic malaria areas in Dielmo and Ndiop (Senegal): preliminary results, 1990–1994. *Med Trop.* 1995;55:71–6
31. Trape JF, Tall A, Sokhna C, Ly AB, Diagne N, Ndiath O, et al. The rise and fall of malaria in a West African rural community, Dielmo, Senegal, from 1990 to 2012: a 22 year longitudinal study. *Lancet Infect Dis.* 2014;4:476–88.
32. Trape JF, Rogier C. Combating malaria morbidity and mortality by reducing transmission. *Parasitol Today.* 1996;12:236–40.
33. Diop F, Richard V, Diouf B, Sokhna C, Diagne N, Trape JF, et al. Dramatic declines in seropositivity as determined with crude extracts of *Plasmodium falciparum* schizonts between 2000 and 2010 in Dielmo and Ndiop, Senegal. *Malar J.* 2014;13:83.
34. Niang M, Thiam LG, Sane R, Diagne N, Talla C, Doucoure S, et al. Substantial asymptomatic submicroscopic Plasmodium carriage during dry season in low transmission areas in Senegal: implications for malaria control and elimination. *PLoS ONE.* 2017;12:e0182189.
35. Trape JF, Rogier C, Konate L, Diagne N, Bouganali H, Canque B, 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;51:123–37.

36. Canier L, Khim N, Kim S, Sluydts V, Heng S, Dourng D, et al. An innovative tool for moving malaria PCR detection of parasite reservoir into the field. *Malar J*. 2013;12:405.
37. Zhou X, Huang J-L, Njuabe MT, Li S-G, Chen J-H, Zhou X-N. A molecular survey of febrile cases in malaria-endemic areas along China-Myanmar border in Yunnan province, People's Republic of China. *Parasite*. 2014;21:27.
38. Snounou G, Zhu X, Siripoon N, Jarra W, Thaithong S, Brown KN, et al. Biased distribution of msp1 and msp2 allelic variants in *Plasmodium falciparum* populations in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1999;93:369–74.
39. Diouf B, Diop F, Dieye Y, Loucoubar C, Dia I, Faye J, et al. Association of high *Plasmodium falciparum* parasite densities with polyclonal microscopic infections in asymptomatic children from Toubacouta, Senegal. *Malaria journal*. 2019;18:48.
40. Aribot G, Rogier C, Sarthou JL, Trape JF, Balde AT, Druilhe P, et al. Pattern of immunoglobulin isotype response to *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens in individuals living in a holoendemic area of Senegal (Dielmo, West Africa). *Am J Trop Med Hyg*. 1996;54:449–57.
41. Jensen JB, Trager W. *Plasmodium falciparum* in culture: use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method. *J Parasitol*. 1977;63:883–6
42. Bei AK, Patel SD, Volkman SK, Ahouidi AD, Ndiaye D, Mboup S, et al. An adjustable gas-mixing device to increase feasibility of in vitro culture of *Plasmodium falciparum* parasites in the field. *PLoS One*. 2014; 9:e90928.
43. Perraut R, Guillotte M, Drame I, Diouf B, Molez JF, Tall A, et al. Evaluation of anti-*Plasmodium falciparum* antibodies in Senegalese adults using different types of crude extracts from various strains of parasite. *Microbes Infect*. 2002;4:31–5.
44. Mbengue B, Fall MM, Varela ML, Loucoubar C, Joos C, Fall B, et al. Analysis of antibody responses to selected *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigens in mild and cerebral malaria and associations with clinical outcomes. *Clin Exp Immunol*. 2019;196:86-96.

45. Sinton JA. Immunity or Tolerance in Malarial Infections: (Section of Comparative Medicine) Proc R Soc Med. 1938;31:1298–302.
46. Marsh K, Kinyanjui S. Immune effector mechanisms in malaria. Parasite Immunol. 2006;28:51-60.
47. Ademolue TW, Aniweh Y, Kusi KA, Awandare GA. Patterns of inflammatory responses and parasite tolerance vary with malaria transmission intensity. Malar J. 2017;16:145.
48. Schofield L, Grau GER. Immunological processes in malaria pathogenesis. Nat Rev Immunol. 2005;5:722–35.
49. Collins WE, Jeffery GM. A retrospective examination of secondary sporozoite-and trophozoite-induced infections with *Plasmodium falciparum*: development of parasitologic and clinical immunity following secondary infection. Am J Trop Med Hyg. 1999;61:20-35.
50. Shanks GD. Tolerance may be more appropriate than immunity when describing chronic malaria infections. Am J Trop Med Hyg. 2019;100: 497–500.
51. Chan JA, Stanisic DI, Duffy MF, Robinson LJ, Lin E, Kazura JW, et al. Patterns of protective associations differ for antibodies to *P. falciparum*-infected erythrocytes and merozoites in immunity against malaria in children. Eur J Immunol. 2017;47:2124-2136.
52. Yman V, White MT, Asghar M, Sundling C, Sondén K, Draper SJ, et al. Antibody responses to merozoite antigens after natural *Plasmodium falciparum* infection: kinetics and longevity in absence of re-exposure. BMC Med. 2019;17:22.
53. McCallum FJ, Persson KEM, Fowkes FJI, Reiling L, Mugenyi CK, Richards JS, et al. Differing rates of antibody acquisition to merozoite antigens in malaria: implications for immunity and surveillance. J Leukoc Biol. 2017;14:913–25.
54. Akpogheneta OJ, Duah NO, Tetteh KKA, Dunyo S, Lanar DE, Pinder M, et al. Duration of naturally acquired antibody responses to blood-stage *Plasmodium falciparum* is age dependent and antigen specific. Infect Immun. 2008;76:1748–55.

55. Ndungu FM, Lundblom K, Rono J, Illingworth J, Eriksson S, Farnert A. Long-lived *Plasmodium falciparum* specific memory B cells in naturally exposed Swedish travelers. *Eur J Immunol.* 2013;43:2919–29
56. Roper C, Richardson W, Elhassan IM, Giha H, Hviid L, Satti GMH, et al. Seasonal changes in the *Plasmodium falciparum* population in individuals and their relationship to clinical malaria: a longitudinal study in a Sudanese village. *Parasitology.* 1998;116:501-510.
57. Contamin, H. et al. Different genetic characteristics of *Plasmodium falciparum* isolates collected during successive clinical malaria episodes in Senegalese children. *Am J Trop Med Hyg* 54, 632–643 (1996).
58. Ntoumi F, Contamin H, Rogier C, Bonnefoy S, Trope JF, Mercereau-Puijalon O. Age dependent carriage of multiple *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 alleles in asymptomatic malaria infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1995;52:81–8.
59. Warimwe GM, Recker M, Kiragu EW, Buckee CO, Wambua J, Musyoki JN, et al. *Plasmodium falciparum* var gene expression homogeneity as a marker of the host-parasite relationship under different levels of naturally acquired immunity to malaria. *PLoS ONE.* 2013;8:e70467.
60. Wang CW, Hermsen CC, Sauerwein RW, Arnot DE, Theander TG, Lavstsen T. The *Plasmodium falciparum* var gene transcription strategy at the onset of blood stage infection in a human volunteer. *Parasitol Int.* 2009;58:478–80.
61. Bachmann A, Bruske E, Krumkamp R, Turner L, Wichers JS, Petter M, et al. Controlled human malaria infection with *Plasmodium falciparum* demonstrates impact of naturally acquired immunity on virulence gene expression. *PLoS Pathog.* 2019;15:e1007906.
62. A-Elbasit IE, ElGhazali G, A-Elgadir TM, Hamad AA, Babiker HA, Elbashir MI, et al. Allelic polymorphism of MSP2 gene in severe *P. falciparum* malaria in an area of low and seasonal transmission. *Parasitol Res.* 2007;102:29–34.
63. *Plasmodium falciparum* merozoite protein-1 genetic diversity and multiplicity of infection in isolates from Congolese children consulting in a pediatric hospital in Brazzaville. *Acta Trop.* 2018;183:78–83.



**CONCLUSION ET
PERSPECTIVES**

L'objectif principal de cette thèse était d'étudier, dans un contexte de faible prévalence du paludisme, la diversité génétique associée à l'infection asymptomatique à *P. falciparum* autant au niveau microscopique que submicroscopique. Comme objectif secondaire, nous avons étudié l'impact du polymorphisme associé à l'infection asymptomatique microscopique (AM) sur la parasitémie et l'impact du polymorphisme associé à l'infection asymptomatique submicroscopique (ASM) sur la réponse immune.

Pour ce qui concerne le polymorphisme, nous avons montré qu'avec l'infection AM, on observait une importante diversité génétique en accord avec les résultats antérieurs sur des enfants asymptomatiques dans les sites mésoendémiques de Niakhar en 2008 et de Ndiop en 1994. Si on considère qu'il y a une différence de 12 fois entre les niveaux de transmission à Ndiop entre 1994 et notre période étude, on en déduit que la diversité génétique ne dépend pas uniquement de la transmission. Ainsi, nos résultats confirment, comme cela a été suggéré, que dans les infections asymptomatiques, le profil génotypique pouvait changer en quelques heures ou quelques jours même en l'absence d'une nouvelle infection.

Par contre, une diversité génétique modérée est associée à l'infection ASM avec un nombre de génotypes limité et une COI plus faible comparativement à l'infection AM. Nous avons également montré que les fréquences des familles ou combinaisons de familles alléliques étaient influencées par l'âge au cours de l'infection ASM. En effet les fréquences des familles alléliques monomorphes FC27 et 3D7 et des infections monoclonales augmentent avec l'âge contrairement à celles de la combinaison de familles alléliques FC27/3D7 et des infections polyclonales qui diminuent avec l'âge. Ces résultats conformes à la stratification du nombre de génotypes en fonction de l'âge décrite en zone endémique diffèrent de ceux obtenus en zone mésoendémique sur les infections AM, montrant l'absence d'influence de l'âge sur la diversité génétique.

L'étude de l'impact du polymorphisme associé à l'infection AM sur la parasitémie a montré que l'infection AM polyclonale est significativement associée à une parasitémie élevée comme cela a été rapporté par d'autres études. Cependant, nos résultats ont fourni des informations très utiles en montrant une corrélation significativement positive entre la fréquence des infections trimorphes K1/MAD20/RO33 du gène *msp-1* et la parasitémie. Ce qui soutient ainsi la pertinence de candidats vaccins multivalents pour surmonter la diversité antigénique.

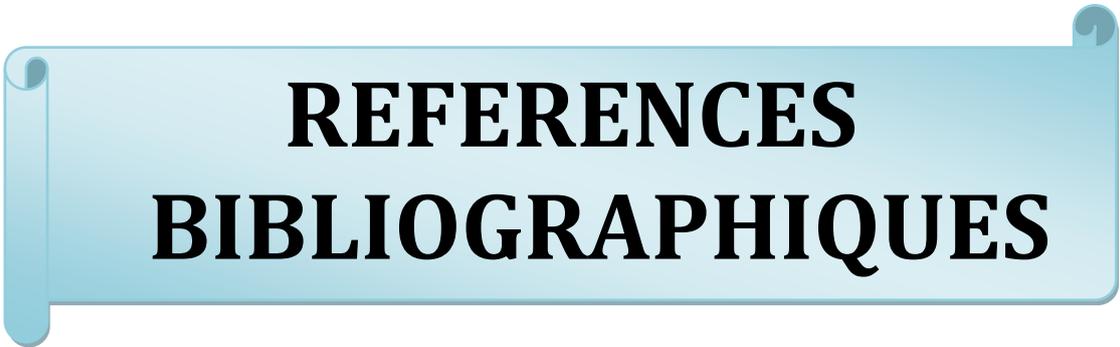
En dernier lieu, l'étude de l'impact ou la contribution du portage ASM sur la réponse immune a mis en évidence une baisse significative des taux d'anticorps chez les porteurs de *P. falciparum* âgés de plus de 15 ans par rapport aux non porteurs de la même classe d'âge. Pour

les classes d'âge de moins de 10 ans, et de 10 à 15 ans, les taux d'anticorps n'étaient différents que pour les IgM chez les porteurs de moins de 10 ans, ce qui pourrait indiquer que ces sujets sont plus sensibles à l'infection primaire. Si on superpose ce résultat avec la baisse de la diversité génétique de l'infection ASM avec l'âge, on pourrait en déduire qu'on serait en présence d'une sélection de clones induisant une tolérance qui se traduit par une baisse de la réponse anticorps. Cette idée de tolérance immune chez l'individu immun a été évoquée très tôt au sujet de physiopathologie du paludisme. Parmi les arguments en faveur de la tolérance immune nous avons la différence des manifestations cliniques et des niveaux de cytokines pro-inflammatoires entre les individus naïfs et immuns.

Perspectives

La présente thèse ouvre différentes perspectives à savoir :

- Confirmer la stratification des familles alléliques en fonction de l'âge dans les infections asymptomatiques submicroscopiques, en augmentant la cohorte de sujets génotypés ou en améliorant la technique de génotypage (séquençage, PCR capillaire...).
- Etudier le polymorphisme et l'immunité associés au portage des gamétocytes
- Mettre au point des outils de sérodiagnostic plus sensibles et adaptés aux études de terrains dans le contexte de faible prévalence palustre.



**REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

- Ademolue TW, Aniwah Y, Kusi KA, Awandare GA.** Patterns of inflammatory responses and parasite tolerance vary with malaria transmission intensity. *Malar J.* 2017 Apr 11; 16 (1):145.
- A-Elbasit IE, ElGhazali G, A-Elgadir TM, Hamad AA, Babiker HA, Elbashir MI, Giha HA.** Allelic polymorphism of MSP2 gene in severe *P. falciparum* malaria in an area of low and seasonal transmission. *Parasitol Res.* 2007 Dec; 102(1):29-34.
- Agence Nationale de la Statistique et de la Démographie (ANSD) [Sénégal], et ICF.** 2018. Sénégal : Enquête Démographique et de Santé Continue (EDS-Continue 2017). Rockville, Maryland, USA : ANSD et ICF.
- Agence Nationale de la Statistique et de la Démographie (ANSD) [Sénégal], et ICF International.** 2012. Enquête Démographique et de Santé Continue (EDS-Continue 2012-2013). Calverton, Maryland, USA: ANSD et ICF International.
- Agence Nationale de la Statistique et de la Démographie (ANSD) [Sénégal], et ICF.** 2017. Sénégal : Enquête Démographique et de Santé Continue (EDS-Continue 2016). Rockville, Maryland, USA : ANSD et ICF.
- Alanine DGW, Quinkert D, Kumarasingha R, Mehmood S, Donnellan FR, Minkah NK, Dadonaite B, Diouf A, Galaway F, Silk SE, Jamwal A, Marshall JM, Miura K, Foquet L, Elias SC, Labbé GM, Douglas AD, Jin J, Payne RO, Illingworth JJ, Pattinson DJ, Pulido D, Williams BG, de Jongh WA, Wright GJ, Kappe SHI, Robinson CV, Long CA, Crabb BS, Gilson PR, Higgins MK, Draper SJ.** Human Antibodies that Slow Erythrocyte Invasion Potentiate Malaria-Neutralizing Antibodies. *Cell.* 2019 Jun 27; 178(1):216-228.e21.
- Alaro JR, Partridge A, Miura K, Diouf A, Lopez AM, Angov E, Long CA, Burns JM Jr.** A chimeric *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein vaccine induces high titers of parasite growth inhibitory antibodies. *Infect Immun.* 2013 Oct;81(10):3843-54.
- Alves FP, Gil LH, Marrelli MT, Ribolla PE, Camargo EP, Da Silva LH.** Asymptomatic carriers of *Plasmodium* spp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. *J Med Entomol.* 2005 Sep; 42(5):777-9.

- al-Yaman F, Genton B, Taraika J, Anders R, Alpers MP.** Cellular immunity to merozoite surface protein 2 (FC27 and 3D7) in Papua New Guinean children. Temporal variation and relation to clinical and parasitological status. *Parasite Immunol.* 1997 May; 19(5):207-14.
- Amaral LC, Robortella DR, Guimarães LFF, Limongi JE, Fontes CJF, Pereira DB, de Brito CFA, Kano FS, de Sousa TN, Carvalho LH.** Ribosomal and non-ribosomal PCR targets for the detection of low-density and mixed malaria infections. *Malar J.* 2019 Apr 30; 18(1):154.
- Anders RF, Brown GV, Coppel RL, Kemp DJ.** Repeat structures in malaria antigens. *P N G Med J.* 1986 Mar; 29(1):87-93.
- Anders RF, Smythe JA.** Polymorphic antigens in *Plasmodium falciparum*. *Blood.* 1989 Nov 1; 74(6):1865-75.
- Aribot G, Rogier C, Sarthou JL, Trape JF, Balde AT, Druilhe P, Roussilhon C.** Pattern of immunoglobulin isotype response to *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens in individuals living in a holoendemic area of Senegal (Dielmo, west Africa). *Am J Trop Med Hyg.* 1996 May; 54(5):449-57.
- Audran R, Cachat M, Lurati F, Soe S, Leroy O, Corradin G, Druilhe P, Spertini F.** Phase I malaria vaccine trial with a long synthetic peptide derived from the merozoite surface protein 3 antigen. *Infect Immun.* 2005 Dec; 73(12):8017-26.
- Babiker HA, Charlwood JD, Smith T, Walliker D.** Gene flow and cross-mating in *Plasmodium falciparum* in households in a Tanzanian village. *Parasitology.* 1995 Nov; 111 (Pt 4):433-42
- Bachmann A, Bruske E, Krumkamp R, Turner L, Wichers JS, Petter M, Held J, Duffy MF, Sim BKL, Hoffman SL, Kremsner PG, Lell B, Lavstsen T, Frank M, Mordmüller B, Tannich E.** Controlled human malaria infection with *Plasmodium falciparum* demonstrates impact of naturally acquired immunity on virulence gene expression. *PLoS Pathog.* 2019 Jul 11; 15(7):e1007906

- Balam S, Olugbile S, Servis C, Diakité M, D'Alessandro A, Frank G, Moret R, Nebie I, Tanner M, Felger I, Smith T, Kajava AV, Spertini F, Corradin G.** Plasmodium falciparum merozoite surface protein 2: epitope mapping and fine specificity of human antibody response against non-polymorphic domains. *Malar J.* 2014 Dec 19;13:510.
- Baldwin MR, Li X, Hanada T, Liu SC, Chishti AH.** Merozoite surface protein 1 recognition of host glycophorin A mediates malaria parasite invasion of red blood cells. *Blood.* 2015 Apr 23;125(17):2704-11. 2704-2711.
- Bartoloni A, Zammarchi L.** Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2012; 4(1):e2012026.
- Beadle C, McElroy PD, Oster CN, Beier JC, Oloo AJ, Onyango FK, Chumo DK, Bales JD, Sherwood JA, Hoffman SL.** Impact of transmission intensity and age on Plasmodium falciparum density and associated fever: implications for malaria vaccine trial design. *J Infect Dis.* 1995 Oct; 172(4):1047-54. Erratum in: *J Infect Dis* 1995 Nov; 172(5):1424.
- Beare NA, Taylor TE, Harding SP, Lewallen S, Molyneux ME.** Malarial retinopathy: a newly established diagnostic sign in severe malaria. *Am J Trop Med Hyg.*(2006) 75:790–7. 10.4269/ajtmh.2006.75.790.
- Bediako Y, Adams R, Reid AJ, Valletta JJ, Ndungu FM, Sodenkamp J, Mwacharo J, Ngoi JM, Kimani D, Kai O, Wambua J, Nyangweso G, de Villiers EP, Sanders M, Lotkowska ME, Lin JW, Manni S, Addy JWG, Recker M, Newbold C, Berriman M, Bejon P, Marsh K, Langhorne J.** Repeated clinical malaria episodes are associated with modification of the immune system in children. *BMC Med.* 2019 Mar 13; 17(1):60.
- Bediako Y, Ngoi JM, Nyangweso G, Wambua J, Opiyo M, Nduati EW, Bejon P, Marsh K, Ndungu FM.** The effect of declining exposure on T cell-mediated immunity to Plasmodium falciparum - an epidemiological "natural experiment". *BMC Med.* 2016 Sep 22; 14(1):143.
- Bei AK, Patel SD, Volkman SK, Ahouidi AD, Ndiaye D, Mboup S, Wirth DF.** An adjustable gas-mixing device to increase feasibility of in vitro culture of Plasmodium falciparum parasites in the field. *PLoS One.* 2014 Mar 6; 9(3):e90928.

- Bertschi NL, Toenhake CG, Zou A, Niederwieser I, Henderson R, Moes S, Jenoe P, Parkinson J, Bartfai R, Voss TS.** Malaria parasites possess a telomere repeat-binding protein that shares ancestry with transcription factor IIIA. *Nature microbiology*. 2017 Jun; 2(6):17033.
- Bhatt S, Weiss DJ, Cameron E, Bisanzio D, Mappin B, Dalrymple U, Battle K, Moyes CL, Henry A, Eckhoff PA, Wenger EA, Briët O, Penny MA, Smith TA, Bennett A, Yukich J, Eisele TP, Griffin JT, Fergus CA, Lynch M, Lindgren F, Cohen JM, Murray CLJ, Smith DL, Hay SI, Cibulskis RE, Gething PW.** The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature*. 2015 Oct 8; 526(7572):207-211.
- Biggs J, Raman J, Cook J, Hlongwana K, Drakeley C, Morris N, Serocharan I, Agubuzo E, Kruger P, Mabuza A, Zitha A, Machaba E, Coetzee M, Kleinschmidt I.** Serology reveals heterogeneity of *Plasmodium falciparum* transmission in northeastern South Africa: implications for malaria elimination. *Malar J*. 2017 Jan 26; 16(1):48.
- Bin Dajem SM.** Molecular investigation of mixed malaria infections in southwest Saudi Arabia. *Saudi Med J*. 2015 Feb; 36 (2):248-51.
- Boivin MJ, Bangirana P, Byarugaba J, Opoka RO, Idro R, Jurek AM, John CC.** Cognitive impairment after cerebral malaria in children: a prospective study. *Pediatrics*. 2007 Feb; 119(2):e360-6.
- Bousema T, Dinglasan RR, Morlais I, Gouagna LC, van Warmerdam T, Awono-Ambene PH, Bonnet S, Diallo M, Coulibaly M, Tchuinkam T, Mulder B, Targett G, Drakeley C, Sutherland C, Robert V, Doumbo O, Touré Y, Graves PM, Roeffen W, Sauerwein R, Birkett A, Locke E, Morin M, Wu Y, Churcher TS.** Mosquito feeding assays to determine the infectiousness of naturally infected *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers. *PLoS One*. 2012; 7(8):e42821.
- Boyle MJ, Langer C, Chan JA, Hodder AN, Coppel RL, Anders RF, Beeson JG.** Sequential processing of merozoite surface proteins during and after erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun*. 2014 Mar; 82(3):924-36.

- Bschoff E, Vaquero C.** In silico and biological survey of transcription-associated proteins implicated in the transcriptional machinery during the erythrocytic development of *Plasmodium falciparum*. *BMC genomics*. 2010 Dec; 11(1):34.
- Bustamante LY, Bartholdson SJ, Crosnier C, Campos MG, Wanaguru M, Nguon C, Kwiatkowski DP, Wright GJ, Rayner JC.** A full-length recombinant *Plasmodium falciparum* PfRH5 protein induces inhibitory antibodies that are effective across common PfrH5 genetic variants. *Vaccine*. 2013 Jan 2; 31(2):373-9.
- Bynum WF, Ovary C:** *The Beast in the Mosquito: The Correspondence of Ronald Ross and Patrick Manson*. Amsterdam. Edited by: Rodopi BV. 1998
- Canier L, Khim N, Kim S, Sluydts V, Heng S, Dourng D, Eam R, Chy S, Khean C, Loch K, Ken M, Lim H, Siv S, Tho S, Masse-Navette P, Gryseels C, Uk S, Van RoeyK, Grietens KP, Sokny M, Thavrin B, Chuor CM, Deubel V, Durnez L, Coosemans M, Ménard D.** An innovative tool for moving malaria PCR detection of parasite reservoir into the field. *Malar J*. 2013 Nov 9;12: 405.
- Carneiro I, Roca-Feltrer A, Griffin JT, Smith L, Tanner M, Schellenberg JA, Greenwood B, Schellenberg D.** Age-patterns of malaria vary with severity, transmission intensity and seasonality in sub-Saharan Africa: a systematic review and pooled analysis. *PLoS One*. 2010 Feb 1; 5(2):e8988.
- Chan JA, Stanisic DI, Duffy MF, Robinson LJ, Lin E, Kazura JW, King CL, SibaPM, Fowkes FJ, Mueller I, Beeson JG.** Patterns of protective associations differ for antibodies to *P. falciparum*-infected erythrocytes and merozoites in immunity against malaria in children. *Eur J Immunol*. 2017 Dec; 47(12):2124-2136
- Chen CS, Zhu H.** Protein microarrays. *Biotechniques*. 2006 Apr;40(4):423, 425,427 passim.
- Chen Q.** The naturally acquired immunity in severe malaria and its implication for a PfEMP-1 based vaccine. *Microbes Infect*. 2007 May; 9(6):777-83.
- Churcher TS, Sinden RE, Edwards NJ, Poulton ID, Rampling TW, Brock PM, Griffin JT, Upton LM, Zakutansky SE, Sala KA, Angrisano F, Hill AV, Blagborough AM.** Probability of Transmission of Malaria from Mosquito to Human Is Regulated by Mosquito Parasite Density in Naïve and Vaccinated Hosts. *PLoS Pathog*. 2017 Jan12; 13(1):e1006108.

- Clark IA, Cowden WB.** The pathophysiology of falciparum malaria. *Pharmacol Ther.* 2003 Aug; 99(2):221-60.
- Coelho CH, Doritchamou JYA, Zaidi I, Duffy PE.** Advances in malaria vaccine development: report from the 2017 malaria vaccine symposium. *NPJ Vaccines.* 2017 Nov 30; 2:34.
- Collins KA, Snaith R, Cottingham MG, Gilbert SC, Hill AVS.** Enhancing protective immunity to malaria with a highly immunogenic virus-like particle vaccine. *Sci Rep.* 2017 Apr 19; 7: 46621.
- Collins WE, Jeffery GM.** A retrospective examination of secondary sporozoite and trophozoite induced infections with *Plasmodium falciparum*: development of parasitologic and clinical immunity following secondary infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1999 Jul; 61(1 Suppl):20-35.
- Contamin H, Fandeur T, Rogier C, Bonnefoy S, Konate L, Trape JF, Mercereau-Puijalon O.** Different genetic characteristics of *Plasmodium falciparum* isolates collected during successive clinical malaria episodes in Senegalese children. *Am J Trop Med Hyg.* 1996 Jun; 54(6):632-43
- Conway DJ, Cavanagh DR, Tanabe K, Roper C, Mikes ZS, Sakihama N, Bojang KA, Oduola AM, Kremsner PG, Arnot DE, Greenwood BM, McBride JS.** A principal target of human immunity to malaria identified by molecular population genetic and immunological analyses. *Nat Med.* 2000 Jun;6(6):689-92
- Conway DJ, Fanello C, Lloyd JM, Ban MS, Baloch AH, Somanath SD, Roper C, Oduola AM, Mulder B, Pova MM, Singh B.** Origin of *Plasmodium falciparum* malaria is traced by mitochondrial DNA. *Molecular and biochemical parasitology.* 2000 Nov 1; 111(1):163-71.
- Corcoran LM, Thompson JK, Walliker D, Kemp DJ.** Homologous recombination within subtelomeric repeat sequences generates chromosome size polymorphisms in *P. falciparum*. *Cell.* 1988 Jun 3; 53(5):807-13.
- Cordray MS, Richards-Kortum RR.** Emerging nucleic acid-based tests for point-of-care detection of malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2012 Aug; 87(2):223-230.

- Corran P, Coleman P, Riley E, Drakeley C.** Serology: a robust indicator of malaria transmission intensity? *Trends Parasitol.* 2007 Dec; 23(12):575-82.
- Cortés A, Mellombo M, Benet A, Lorry K, Rare L, Reeder JC.** Plasmodium falciparum: distribution of msp2 genotypes among symptomatic and asymptomatic individuals from the Wosera region of Papua New Guinea. *Exp Parasitol.* 2004 Jan-Feb;106 (1-2):22-9.
- Cowan GJ, Bockau U, Eleni-Muus J, Aldag I, Samuel K, Creasey AM, Hartmann MW, Cavanagh DR.** A novel malaria vaccine candidate antigen expressed in Tetrahymena thermophila. *PLoS One.* 2014 Jan 29;9(1):e87198.
- Cox FE.** History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasit Vectors.* 2010 Feb 1;3(1):5
- Cox MJ, Kum DE, Tavul L, Narara A, Raiko A, Baisor M, Alpers MP, Medley GF, Day KP.** Dynamics of malaria parasitaemia associated with febrile illness in children from a rural area of Madang, Papua New Guinea. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1994 Mar-Apr; 88(2):191-7.
- Crosnier C, Bustamante LY, Bartholdson SJ, Bei AK, Theron M, Uchikawa M, Mboup S, Ndir O, Kwiatkowski DP, Duraisingh MT, Rayner JC, Wright GJ.** Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by Plasmodium falciparum. *Nature.* 2011 Nov 9; 480(7378):534-7.
- Cui L, Miao J, Furuya T, Fan Q, Li X, Rathod PK, Su XZ, Cui L.** Histone acetyltransferase inhibitor anacardic acid causes changes in global gene expression during in vitro Plasmodium falciparum development. *Eukaryot Cell.* 2008 Jul; 7(7):1200-10.
- De Mendonça VR, Goncalves MS, Barral-Netto M.** The host genetic diversity in malaria infection. *J Trop Med.* 2012; 2012:940616.
- Demas A, Oberstaller J, DeBarry J, Lucchi NW, Srinivasamoorthy G, Sumari D, Kabanywany AM, Villegas L, Escalante AA, Kachur SP, Barnwell JW, Peterson DS, Udhayakumar V, Kissinger JC.** Applied genomics: data mining reveals species-specific malaria diagnostic targets more sensitive than 18S rRNA. *J Clin Microbiol.* 2011 Jul; 49(7):2411-8.

- Deo VK, Inagaki Y, Murhandarwati EH, Asmara W, Miyazaki T, Kato T, Park EY.** Sero-diagnostic potential of Plasmodium falciparum recombinant merozoite surface protein (MSP)-3 expressed in silkworm. *Parasitol Int.* 2019 Oct; 72:101938.
- Diallo M, Aldebert D, Moreau JC, Ndiaye M, Jambou R.** Decrease of lymphoid dendritic cells in blood from malaria-infected pregnant women. *Int J Parasitol.* 2008 Nov; 38(13):1557-65.
- Diop F, Richard V, Diouf B, Sokhna C, Diagne N, Trape JF, Faye MM, Tall A, Diop G, Balde AT.** Dramatic declines in seropositivity as determined with crude extracts of Plasmodium falciparum schizonts between 2000 and 2010 in Dielmo and Ndiop, Senegal. *Malar J.* 2014 Mar 6; 13:83.
- Dokunmu TM, Adjekukor CU, Yakubu OF, Bello AO, Adekoya JO, Akinola O, Amoo EO, Adebayo AH.** Asymptomatic malaria infections and Pfmldr1 mutations in an endemic area of Nigeria. *Malar J.* 2019 Jun 27; 18 (1):218.
- Doolan DL, Dobaño C, Baird JK.** Acquired immunity to malaria. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Jan; 22(1):13-36.
- Doucoure S, Sokhna C.** The Impact of Periodic Distribution Campaigns of Long-Lasting Insecticidal-Treated Bed Nets on Malaria Vector Dynamics and Human Exposure in Dielmo, Senegal. *Am J Trop Med Hyg.* 2018 May; 98(5):1343-1352.
- Elliott SR, Fowkes FJ, Richards JS, Reiling L, Drew DR, Beeson JG.** Research priorities for the development and implementation of serological tools for malaria surveillance. *F1000Prime Rep.* 2014 Nov 4; 6:100.
- Engelbrecht F, Felger I, Genton B, Alpers M, Beck HP.** Plasmodium falciparum: malaria morbidity is associated with specific merozoite surface antigen 2 genotypes. *Exp Parasitol.* 1995 Aug; 81(1):90-6.
- Espié E, Diene Sarr F, Diop F, Faye J, Richard V, Tall A, Touré Baldé A.** Spatio-Temporal Variations in Malaria Incidence in Children Less than 10 Years Old, Health District of Sokone, Senegal, 2010-2013. *PLoS One.* 2015 Sep 18; 10 (9):e0137737.
- Färnert A, Lebbad M, Faraja L, Rooth I.** Extensive dynamics of Plasmodium falciparum densities, stages and genotyping profiles. *Malar J.* 2008 Nov 21; 7:241.

- Faye O, Konate L, Gaye O, Fontenille D, Sy N, Diop A, Diagne M, Molez JF.** [Impact of the use of permethrin pre-impregnated mosquito nets on malaria transmission in a hyperendemic village of Senegal]. *Med Trop (Mars)*.1998; 58(4):355-60.
- Felger I, Maire M, Bretscher MT, Falk N, Tiaden A, Sama W, Beck HP, Owusu-Agyei S, Smith TA.**The dynamics of natural *Plasmodium falciparum* infections.*PLoS One*. 2012; 7(9):e45542.
- Fontenille D, Lochouarn L, Diatta M, Sokhna C, Dia I, Diagne N, Lemasson JJ, Ba K, Tall A, Rogier C, Trape JF.**Four years' entomological study of the transmission of seasonal malaria in Senegal and the bionomics of *Anopheles gambiae* and *A. arabiensis*.*Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1997 Nov-Dec; 91(6):647-52.
- Franks S, Baton L, Tetteh K, Tongren E, Dewin D, Akanmori BD, Koram KA, Ranford-Cartwright L, Riley EM.** Genetic diversity and antigenic polymorphism in *Plasmodium falciparum*: extensive serological cross-reactivity between allelic variants of merozoite surface protein 2. *Infect Immun*. 2003 Jun; 71(6):3485-95.
- Fried M, Muehlenbachs A, Duffy PE.**Diagnosing malaria in pregnancy: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012 Oct;10(10):1177-87.
- Garcia BA, Hake SB, Diaz RL, Kauer M, Morris SA, Recht J, Shabanowitz J, Mishra N, Strahl BD, Allis CD, Hunt DF.** Organismal differences in post-translational modifications in histones H3 and H4. *Journal of Biological Chemistry*. 2007 Mar 9; 282(10):7641-55.
- Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, Carlton JM, Pain A, Nelson KE, Bowman S, Paulsen IT.** Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*.*Nature*. 2002 Oct; 419(6906):498.
- Gething PW, Casey DC, Weiss DJ, Bisanzio D, Bhatt S, Cameron E, Battle KE, Dalrymple U, Rozier J, Rao PC, Kutz MJ, Barber RM, Huynh C, Shackelford KA, Coates MM, Nguyen G, Fraser MS, Kulikoff R, Wang H, Naghavi M, Smith DL, Murray CJ, Hay SI, Lim SS.** Mapping *Plasmodium falciparum* Mortality in Africa between 1990 and 2015. *N Engl J Med*. 2016 Dec 22; 375(25):2435-2445.
- Ghazanfari N, Mueller SN, Heath WR.**Cerebral malaria in mouse and man.*Frontiers in immunology*.2018; 9.

- Gissot M, Briquet S, Refour P, Boschet C, Vaquero C.** PfMyb1, a Plasmodium falciparum transcription factor, is required for intra-erythrocytic growth and controls key genes for cell cycle regulation. *Journal of molecular biology*. 2005 Feb 11; 346(1):29-42.
- Gnagne AP, Konate A, Bedia-Tanoh AV, Amiah-Droh M, Menan HIE, N'Guetta AS, Yavo W.** Dynamics of Plasmodium falciparum genetic diversity among asymptomatic and symptomatic children in three epidemiological areas in Cote d'Ivoire. *Pathog Glob Health*. 2019 May; 113(3):133-142.
- Grassi B:** Studi di uno Zoologo Sulla Malaria. Rome. 1900
- Gupta S, Day KP.**A strain theory of malaria transmission. *Parasitol Today*. 1994 Dec; 10(12):476-81.
- Gwamaka M, Kurtis JD, Sorensen BE, Holte S, Morrison R, Mutabingwa TK, Fried M, Duffy PE.** Iron deficiency protects against severe Plasmodium falciparum malaria and death in young children. *Clin Infect Dis*. 2012 Apr; 54(8):1137-44.
- Habib AG, Singh KS.**Respiratory distress in nonimmune adults with imported malaria.*Infection*. 2004 Dec; 32(6):356-9.
- Hansen DS, Obeng-Adjei N, Ly A, Ioannidis LJ, Crompton PD.** Emerging concepts in T follicular helper cell responses to malaria. *Int J Parasitol*. 2017 Feb; 47(2-3):105-110.
- Hawkes M, Elphinstone RE, Conroy AL, Kain KC.** Contrasting pediatric and adult cerebral malaria: the role of the endothelial barrier.*Virulence*. 2013 Aug 15; 4(6):543-55.
- Healer J, Murphy V, Hodder AN, Masciantonio R, Gemmill AW, Anders RF, Cowman AF, Batchelor A.** Allelic polymorphisms in apical membrane antigen-1 are responsible for evasion of antibody-mediated inhibition in Plasmodium falciparum. *Mol Microbiol*. 2004 Apr;52(1):159-68.
- Heddi A, Pettersson F, Kai O, Shafi J, Obiero J, Chen Q, Barragan A, Wahlgren M, Marsh K.** Fresh isolates from children with severe Plasmodium falciparum malaria bind to multiple receptors. *Infect Immun*. 2001 Sep; 69(9):5849-56.

- Hemingway J, Shretta R, Wells TN, Bell D, Djimdé AA, Achee N, Qi G.** Tools and Strategies for Malaria Control and Elimination: What Do We Need to Achieve a Grand Convergence in Malaria? *PLoS Biol.* 2016 Mar 2;14(3):e1002380.
- Hinterberg KA, Mattei DE, Wellems TE, Scherf A.** Interchromosomal exchange of a large subtelomeric segment in a *Plasmodium falciparum* cross. *The EMBO journal.* 1994 Sep; 13(17):4174-80
- Hisaeda H, Saul A, Reece JJ, Kennedy MC, Long CA, Miller LH, Stowers AW.** Merozoite surface protein 3 and protection against malaria in *Aotus nancymai* monkeys. *J Infect Dis.* 2002 Mar 1; 185(5):657-64.
- Ho M, Webster HK, Looareesuwan S, Supanaranond W, Phillips RE, Chanthavanich P, Warrell DA.** Antigen-specific immunosuppression in human malaria due to *Plasmodium falciparum*. *J Infect Dis.* 1986 Apr; 153(4):763-71.
- Hoeijmakers WA, Salcedo-Amaya AM, Smits AH, François KJ, Treck M, Gilberger TW, Stunnenberg HG, Bártfai R. H 2 A. Z/H 2 B. Z** double-variant nucleosomes inhabit the AT-rich promoter regions of the *Plasmodium falciparum* genome. *Molecular microbiology.* 2013 Mar; 87(5):1061-73.
- Hofmann N, Mwingira F, Shekalaghe S, Robinson LJ, Mueller I, Felger I.** Ultra-sensitive detection of *Plasmodium falciparum* by amplification of multi-copy subtelomeric targets. *PLoS Med.* 2015 Mar 3; 12(3):e1001788.
- Hofmann NE, Gruenberg M, Nate E, Ura A, Rodriguez-Rodriguez D, Salib M, Mueller I, Smith TA, Laman M, Robinson LJ, Felger I.** Assessment of ultra-sensitive malaria diagnosis versus standard molecular diagnostics for malaria elimination: an in-depth molecular community cross-sectional study. *Lancet Infect Dis.* 2018 Oct; 18(10):1108-1116.
- Hofmann NE, Karl S, Wampfler R, Kiniboro B, Teliki A, Iga J, Waltmann A, Betuela I, Felger I, Robinson LJ, Mueller I.** The complex relationship of exposure to new *Plasmodium* infections and incidence of clinical malaria in Papua New Guinea. *Elife.* 2017 Sep 1; 6.pii: e23708.

- Hviid L, Kurtzhals JA, Adabayeri V, Loizon S, Kemp K, Goka BQ, Lim A, Mercereau-Puijalon O, Akanmori BD, Behr C.** Perturbation and proinflammatory type activation of V delta 1(+) gamma delta T cells in African children with Plasmodium falciparum malaria. *Infect Immun.* 2001 May; 69(5):3190-6.
- Hyman RW, Fung E, Conway A, Kurdi O, Mao J, Miranda M, Nakao B, Rowley D, Tamaki T, Wang F, Davis RW.** Sequence of Plasmodium falciparum chromosome 12. *Nature.* 2002 Oct; 419(6906):534.
- Idris ZM, Chan CW, Mohammed M, Kalkoa M, Taleo G, Junker K, Arcà B, Drakeley C, Kaneko A.** Serological measures to assess the efficacy of malaria control programme on Ambae Island, Vanuatu. *Parasit Vectors.* 2017 Apr 26; 10(1):204.
- Imai K, Tarumoto N, Misawa K, Runtuwene LR, Sakai J, Hayashida K, Eshita Y, Maeda R, Tuda J, Murakami T, Maesaki S, Suzuki Y, Yamagishi J, Maeda T.** A novel diagnostic method for malaria using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and MinION™ nanopore sequencer. *BMC Infect Dis.* 2017 Sep 13; 17(1):621.
- Inoue S, Niikura M, Mineo S, Kobayashi F.** Roles of IFN- γ and $\gamma\delta$ T Cells in Protective Immunity Against Blood-Stage Malaria. *Front Immunol.* 2013 Aug 29; 4: 258.
- Inoue SI, Niikura M, Asahi H, Iwakura Y, Kawakami Y, Kobayashi F.** Preferentially expanding V γ 1(+) $\gamma\delta$ T cells are associated with protective immunity against Plasmodium infection in mice. *Eur J Immunol.* 2017 Apr; 47(4):685-691.
- Ippolito MM, Denny JE, Langelier C, Sears CL, Schmidt NW.** Malaria and the Microbiome: A Systematic Review. *Clin Infect Dis.* 2018; 67(12):1831-1839.
- Jensen JB, Trager W.** Plasmodium falciparum in culture: use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method. *J Parasitol.* 1977 Oct; 63(5):883-6.
- Jensen JB, Trager W.** Plasmodium falciparum in culture: use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method. *J Parasitol.* 1977 Oct; 63(5):883-6.
- Kamau E, Alemayehu S, Feghali KC, Saunders D, Ockenhouse CF.** Multiplex qPCR for detection and absolute quantification of malaria. *PLoS One.* 2013 Aug 29; 8(8):e71539.

- Kamuyu G, Tuju J, Kimathi R, Mwai K, Mburu J, Kibinge N, Chong Kwan M, Hawkings S, Yaa R, Chepsat E, Njunge JM, Chege T, Guleid F, Rosenkranz M, Kariuki CK, Frank R, Kinyanjui SM, Murungi LM, Bejon P, Färnert A, Tetteh KKA, Beeson JG, Conway DJ, Marsh K, Rayner JC, Osier FHA. KILchip v1.0: A Novel Plasmodium falciparum Merozoite Protein Microarray to Facilitate Malaria Vaccine Candidate Prioritization. Front Immunol. 2018 Dec 11; 9: 2866.**
- Kapulu MC, Da DF, Miura K, Li Y, Blagborough AM, Churcher TS, Nikolaeva D, Williams AR, Goodman AL, Sangare I, Turner AV, Cottingham MG, Nicosia A, Straschil U, Tsuboi T, Gilbert SC, Long CA, Sinden RE, Draper SJ, Hill AV, Cohuet A, Biswas S. Comparative assessment of transmission-blocking vaccine candidates against Plasmodium falciparum. Sci Rep. 2015 Jun 11; 5:11193.**
- Kasumba IN, Nalunkuma AJ, Mujuzi G, Kitaka FS, Byaruhanga R, Okong P, Egwang TG. Low birthweight associated with maternal anaemia and Plasmodium falciparum infection during pregnancy, in a peri-urban/urban area of low endemicity in Uganda. Annals of Tropical Medicine & Parasitology. 2000 Jan 1; 94(1):7-13.**
- Kidima W, Nkwengulila G. Plasmodium falciparum msp2 Genotypes and Multiplicity of Infections among Children under Five Years with Uncomplicated Malaria in Kibaha, Tanzania. J Parasitol Res. 2015;2015:721201.**
- Konaté L, Zwetyenga J, Rogier C, Bischoff E, Fontenille D, Tall A, Spiegel A, Trape JF, Mercereau-Puijalon O. Variation of Plasmodium falciparum msp1 block 2 and msp2 allele prevalence and of infection complexity in two neighbouring Senegalese villages with different transmission conditions. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1999 Feb; 93 Suppl 1:21-8.**
- Kraemer, S.M. and J.D. Smith, A family affair: var genes, PfEMP1 binding, and malaria disease. Curr Opin Microbiol, 2006. 9(4): p. 374-80.**
- Kun JF, Missinou MA, Lell B, Sovric M, Knoop H, Bojowald B, Dangelmaier O, Kremsner PG. New emerging Plasmodium falciparum genotypes in children during the transition phase from asymptomatic parasitemia to malaria. Am J Trop Med Hyg. 2002 Jun;66(6):653-8.**

- Laban NM, Kobayashi T, Hamapumbu H, Sullivan D, Mharakurwa S, Thuma PE, Shiff CJ, Moss WJ; Southern Africa International Centers of Excellence for Malaria Research.** Comparison of a PfHRP2-based rapid diagnostic test and PCR for malaria in a low prevalence setting in rural southern Zambia: implications for elimination. *Malar J.* 2015 Jan 28; 14: 25.
- LAMP: A Robust Molecular Diagnostic Tool for Malaria Parasites.** *Sci Rep.* 2016 Nov
- Landier J, Kajechiwa L, Thwin MM, Parker DM, Chaumeau V, Wiladphaingern J, Imwong M, Miotto O, Patumrat K, Duanguppama J, Cerqueira D, Malleret B, Rénia L, Nosten S, von Seidlein L, Ling C, Proux S, Corbel V, Simpson JA, Dondorp AM, White NJ, Nosten FH.** Safety and effectiveness of mass drug administration to accelerate elimination of artemisinin-resistant falciparum malaria: A pilot trial in four villages of Eastern Myanmar. *Wellcome Open Res.* 2017 Sep 6; 2: 81.
- Langhorne J, Ndungu FM, Sponaas AM, Marsh K.** Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat Immunol.* 2008 Jul; 9(7):725-32.
- Lau YL, Lai MY, Fong MY, Jelip J, Mahmud R.** Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Identification of Five Human Plasmodium Species in Malaysia. *Am J Trop Med Hyg.* 2016 Feb; 94(2):336-339.
- Laveran, Alphonse.** *Traité des fièvres palustres.* Octave Doin, 1884.
- Le Ralph SA, Van Dooren GG, Waller RF, Crawford MJ, Fraunholz MJ, Foth BJ, Tonkin CJ, Roos DS, McFadden GI.** Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the Plasmodium falciparum apicoplast. *Nature Reviews Microbiology.* 2004 Mar; 2(3):203.
- Looareesuwan S, Davis TM, Pukrittayakamee S, Supanaranond W, Desakorn V, Silamut K, Krishna S, Boonamrung S, White NJ.** Erythrocyte survival in severe falciparum malaria. *Acta Trop.* 1991 Feb; 48(4):263-70.
- López C, Yepes-Pérez Y, Díaz-Arévalo D, Patarroyo ME, Patarroyo MA.** The in Vitro Antigenicity of Plasmodium vivax Rhoptry Neck Protein 2 (PvRON2) B- and T-Epitopes Selected by HLA-DRB1 Binding Profile. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018 May 15; 8:156.

Lucchi NW, Gaye M, Diallo MA, Goldman IF, Ljolje D, Deme AB, Badiane A, Ndiaye

Lyke KE, Ishizuka AS, Berry AA, Chakravarty S, DeZure A, Enama ME, James ER, Billingsley PF, Gunasekera A, Manoj A, Li M, Ruben AJ, Li T, Eappen AG, Stafford RE, Kc N, Murshedkar T, Mendoza FH, Gordon IJ, Zephir KL, Holman LA, Plummer SH, Hendel CS, Novik L, Costner PJ, Saunders JG, Berkowitz NM, Flynn BJ, Nason MC, Garver LS, Laurens MB, Plowe CV, Richie TL, Graham BS, Roederer M, Sim BK, Ledgerwood JE, Hoffman SL, Seder RA. Attenuated PfSPZ Vaccine induces strain-transcending T cells and durable protection against heterologous controlled human malaria infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Mar 7; 114(10):2711-2716.

MacBeath G, Schreiber SL. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science.* 2000 Sep 8; 289(5485):1760-3.

MacCallum WG: On the haematozoan infections of birds. *J Exp Med.* 1898, 3: 117-136. 10.1084/jem.3.1.117

Males S, Gaye O, Garcia A. Long-term asymptomatic carriage of *Plasmodium falciparum* protects from malaria attacks: a prospective study among Senegalese children. *Clin Infect Dis.* 2008 Feb 15; 46(4):516-22.

Marsh K, Forster D, Waruiru C, Mwangi I, Winstanley M, Marsh V, Newton C, Winstanley P, Warn P, Peshu N, Pasvol G. Indicators of life-threatening malaria in African children. *New England journal of medicine.* 1995 May 25;332(21):1399-404.

Marsh K, Howard RJ. Antigens induced on erythrocytes by *P. falciparum*: expression of diverse and conserved determinants. *Science.* 1986 Jan 10;231(4734):150-3.

Marsh K, Kinyanjui S. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol.* 2006 Jan-Feb; 28(1-2):51-60.

Mayengue PI, Ndounga M, Malonga FV, Bitemo M, Ntoumi F. Genetic polymorphism of merozoite surface protein-1 and merozoite surface protein-2 in *Plasmodium falciparum* isolates from Brazzaville, Republic of Congo. *Malar J.* 2011; 10:276.

- Mayor A, Saute F, Aponte JJ, Almeda J, Gómez-Olivé FX, Dgedge M, Alonso PL.** Plasmodium falciparum multiple infections in Mozambique, its relation to other malariological indices and to prospective risk of malaria morbidity. Trop Med Int Health. 2003 Jan; 8(1):3-11.
- Mbengue B, Fall MM, Varela ML, Loucoubar C, Joos C, Fall B, Niang MS, Niang B, Mbow M, Dieye A, Perraut R.** Analysis of antibody responses to selected Plasmodium falciparum merozoite surface antigens in mild and cerebral malaria and associations with clinical outcomes. Clin Exp Immunol. 2019 Apr; 196(1):86-96.
- McCormick CJ, Craig A, Roberts D, Newbold CI, Berendt AR.** Intercellular adhesion molecule-1 and CD36 synergize to mediate adherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to cultured human microvascular endothelial cells. J Clin Invest. 1997 Nov 15; 100(10):2521-9.
- McElroy PD, Beier JC, Oster CN, Beadle C, Sherwood JA, Oloo AJ, Hoffman SL.** Predicting outcome in malaria: correlation between rate of exposure to infected mosquitoes and level of Plasmodium falciparum parasitemia. Am J Trop Med Hyg. 1994 Nov; 51(5):523-32.
- McGregor, I. A., S. P. Carrington, and S. Cohen.** "Treatment of East African P. falciparum malaria with West African human γ -globulin." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 57.3 (1963): 170-175.
- Menendez C, Ordi J, Ismail MR, Ventura PJ, Aponte JJ, Kahigwa E, Font F, Alonso PL.** The impact of placental malaria on gestational age and birth weight. The Journal of infectious diseases. 2000 May 1; 181(5):1740-5.
- Mercereau-Puijalon O, Barale JC, Bischoff E.** Three multigene families in Plasmodium parasites: facts and questions. Int J Parasitol. 2002 Oct; 32(11):1323-44.
- Meshnick, Steven R., and Mary J. Dobson.** "The history of antimalarial drugs." *Antimalarial chemotherapy*. Humana Press, Totowa, NJ, 2001. 15-25
- Miuro GM, Oukem-Boyer OO, Sarr O, Rahmani M, Ntoumi F, Dheda K, Pym A, Mboup S, Kaleebu P; NoEs' programme.** EDCTP regional networks of excellence: initial merits for planned clinical trials in Africa. BMC Public Health. 2013 Mar 22; 13:258.

- Miller LH, Ackerman HC, Su XZ, Wellems TE.** Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nat Med.* 2013; 19:156–67
- Millington OR, Di Lorenzo C, Phillips RS, Garside P, Brewer JM.** Suppression of adaptive immunity to heterologous antigens during Plasmodium infection through hemozoin-induced failure of dendritic cell function. *J Biol.* 2006; 5(2):5.
- Ministère de la Santé, de la Prévention et de l'Hygiène Publique, Centre de Recherche pour le Développement Humain (CRDH) (2009) ENPS-II.** Enquête Nationale sur le Paludisme au Sénégal 2008-2009 Dakar, Sénégal, 132 p.
- Moncunill G, Mayor A, Bardají A, Puyol L, Nhabomba A, Barrios D, Aguilar R, Pinazo MJ, Almirall M, Soler C, Muñoz J, Gascón J, Dobaño C.** Cytokine profiling in immigrants with clinical malaria after extended periods of interrupted exposure to Plasmodium falciparum. *PLoS One.* 2013 Aug 14; 8(8):e73360.
- Montes de Oca M, Kumar R, Rivera FL, Amante FH, Sheel M, Faleiro RJ, Bunn PT, Best SE, Beattie L, Ng SS, Edwards CL, Boyle GM, Price RN, Anstey NM, Loughland JR, Burel J, Doolan DL, Haque A, McCarthy JS, Engwerda CR.** Type I Interferons Regulate Immune Responses in Humans with Blood-Stage Plasmodium falciparum Infection. *Cell Rep.* 2016 Oct 4; 17(2):399-412.
- Mouchet, J. (2004).** Biodiversité du paludisme dans le monde. John Libbey Eurotext.
- Müller I, Genton B, Rare L, Kiniboro B, Kastens W, Zimmerman P, Kazura J, Alpers M, Smith TA.** Three different Plasmodium species show similar patterns of clinical tolerance of malaria infection. *Malar J.* 2009 Jul 14; 8:158.
- Murungi LM, Kimathi RK, Tuju J, Kamuyu G, Osier FHA.** Serological Profiling for Malaria Surveillance Using a Standard ELISA Protocol. *Methods Mol Biol.* 2019; 2013:83-90.

Neafsey DE, Juraska M, Bedford T, Benkeser D, Valim C, Griggs A, Lievens M, Abdulla S, Adjei S, Agbenyega T, Agnandji ST, Aide P, Anderson S, Ansong D, Aponte JJ, Asante KP, Bejon P, Birkett AJ, Bruls M, Connolly KM, D'Alessandro U, Dobaño C, Gesase S, Greenwood B, Grimsby J, Tinto H, Hamel MJ, Hoffman I, Kamthunzi P, Kariuki S, Kremsner PG, Leach A, Lell B, Lennon NJ, Lusingu J, Marsh K, Martinson F, Molel JT, Moss EL, Njuguna P, Ockenhouse CF, Ogutu BR, Otieno W, Otieno L, Otieno K, Owusu-Agyei S, Park DJ, Pellé K, Robbins D, Russ C, Ryan EM, Sacarlal J, Sogoloff B, Sorgho H, Tanner M, Theander T, Valea I, Volkman SK, Yu Q, Lapierre D, Birren BW, Gilbert PB, Wirth DF. Genetic Diversity and Protective Efficacy of the RTS, S/AS01 Malaria Vaccine. *N Engl J Med.* 2015 Nov 19; 373(21):2025-2037.

Newton CR, Taylor TE, Whitten RO. Pathophysiology of fatal falciparum malaria in African children. *Am J Trop Med Hyg.* 1998 May; 58(5):673-83.

Ngom el HM, Ndione JA, Ba Y, Konaté L, Faye O, Diallo M, Dia I. Spatio-temporal analysis of host preferences and feeding patterns of malaria vectors in the sylvo-pastoral area of Senegal: impact of landscape classes. *Parasit Vectors.* 2013 Nov 19; 6(1):332.

Nguyen TN, von Seidlein L, Nguyen TV, Truong PN, Hung SD, Pham HT, Nguyen TU, Le TD, Dao VH, Mukaka M, Day NP, White NJ, Dondorp AM, Thwaites GE, Hien TT. The persistence and oscillations of submicroscopic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections over time in Vietnam: an open cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2018 May; 18(5):565-572.

Niang el HA, Touré A, Ngom el HM, Konaté L, Faye O, Diallo M, Dia I. Malaria transmission pattern in an area selected for clinical trials in the sudanian area of Senegal (West Africa). *J Trop Med.* 2013; 2013:907375.

Niang M, Thiam LG, Sane R, Diagne N, Talla C, Doucoure S, Faye J, Diop F, Badiane A, Diouf B, Camara D, Diene-Sarr F, Sokhna C, Richard V, Toure-Balde A. Substantial asymptomatic submicroscopic *Plasmodium* carriage during dry season in low transmission areas in Senegal: Implications for malaria control and elimination. *PLoS One.* 2017 Aug 3; 12(8):e0182189.

Nilsson SK, Childs LM, Buckee C, Marti M. Targeting Human Transmission Biology for Malaria Elimination. *PLoS Pathog.* 2015 Jun 18; 11(6):e1004871.

- Noor AM, Kinyoki DK, Mundia CW, Kabaria CW, Mutua JW, Alegana VA, Fall IS, Snow RW.** The changing risk of Plasmodium falciparum malaria infection in Africa: 2000-10: a spatial and temporal analysis of transmission intensity. *Lancet*. 2014 May 17; 383(9930):1739-47.
- Nora EP, Dekker J, Heard E.** Segmental folding of chromosomes: a basis for structural and regulatory chromosomal neighborhoods. *Bioessays*. 2013 Sep; 35(9):818-28.
- Nosten F, ter Kuile F, Maelankirri L, Decludt B, White NJ.** Malaria during pregnancy in an area of unstable endemicity. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1991 Jul-Aug; 85(4):424-9.
- Ntoumi F, Contamin H, Rogier C, Bonnefoy S, Trape JF, Mercereau-Puijalon O.** Age-dependent carriage of multiple Plasmodium falciparum merozoite surface antigen-2 alleles in asymptomatic malaria infections. *Am J Trop Med Hyg*. 1995 Jan; 52(1):81-8.
- Oakley MS, Gerald N, McCutchan TF, Aravind L, Kumar S.** Clinical and molecular aspects of malaria fever. *Trends in parasitology*. 2011 Oct 1; 27(10):442-9.
- Obeng-Adjei N, Portugal S, Tran TM, Yazew TB, Skinner J, Li S, Jain A, Felgner PL, Doumbo OK, Kayentao K, Ongoiba A, Traore B, Crompton PD.** Circulating Th1-Cell-type Tfh Cells that Exhibit Impaired B Cell Help Are Preferentially Activated during Acute Malaria in Children. *Cell Rep*. 2015 Oct 13; 13(2):425-39.
- Oeuvray C, Bouharoun-Tayoun H, Gras-Masse H, Bottius E, Kaidoh T, Aikawa M, Filgueira MC, Tartar A, Druilhe P.** Merozoite surface protein-3: a malaria protein inducing antibodies that promote Plasmodium falciparum killing by cooperation with blood monocytes. *Blood*. 1994 Sep 1; 84(5):1594-602.
- O'Flaherty K, Maguire J, Simpson JA, Fowkes FJI.** Immunity as a predictor of anti-malarial treatment failure: a systematic review. *Malar J*. 2017 Apr 20; 16(1):158.
- Okell LC, Ghani AC, Lyons E, Drakeley CJ.** Submicroscopic infection in Plasmodium falciparum-endemic populations: a systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis*. 2009 Nov 15; 200(10):1509-17.
- Olotu A, Fegan G, Wambua J, Nyangweso G, Leach A, Lievens M, Kaslow DC, Njuguna P, Marsh K, Bejon P.** Seven-Year Efficacy of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine among Young African Children. *N Engl J Med*. 2016 Jun 30; 374(26):2519-29.

Olotu A, Urbano V, Hamad A, Eka M, Chemba M, Nyakarungu E, Raso J, Eburu E, Mandumbi DO, Hergott D, Maas CD, Ayekaba MO, Milang DN, Rivas MR, Schindler T, Embon OM, Ruben AJ, Saverino E, Abebe Y, Kc N, James ER, Murshedkar T, Manoj A, Chakravarty S, Li M, Adams M, Schwabe C, Segura JL, Daubenberger C, Tanner M, Richie TL, Billingsley PF, Lee Sim BK, Abdulla S, Hoffman SL. Advancing Global Health through Development and Clinical Trials Partnerships: A Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Assessment of Safety, Tolerability, and Immunogenicity of PfSPZ Vaccine for Malaria in Healthy Equatoguinean Men. *Am J Trop Med Hyg.* 2018 Jan; 98(1):308-318.

Omaki-Yasuda K, Okuwaki M, Nagata K, Kawazu SI, Kano S. Identification of a novel and unique transcription factor in the intraerythrocytic stage of *Plasmodium falciparum*. *PloS one.* 2013 Sep 5; 8(9): e74701.

OMS. Terminologie OMS du paludisme 2017. Genève: Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Pérez-Mazliah D, Ng DH, Freitas do Rosário AP, McLaughlin S, Mastelic-Gavillet B, Sodenkamp J, Kushinga G, Langhorne J. Disruption of IL-21 signaling affects T cell-B cell interactions and abrogates protective humoral immunity to malaria. *PLoS Pathog.* 2015 Mar 12; 11(3):e1004715.

Perraut R, Guillotte M, Drame I, Diouf B, Molez JF, Tall A, Trape JF, Mercereau-Puijalon O, Spiegel A, Garraud O. Evaluation of anti-*Plasmodium falciparum* antibodies in Senegalese adults using different types of crude extracts from various strains of parasite. *Microbes Infect.* 2002 Jan;4(1):31-5.

Peyerl-Hoffmann G, Jelinek T, Kilian A, Kabagambe G, Metzger WG, Von Sonnenburg F. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* and its relationship to parasite density in an area with different malaria endemicities in West Uganda. *Trop Med Int Health.* 2001; 6:607–13.

Phyo AP, Ashley EA, Anderson TJC, Bozdech Z, Carrara VI, Sriprawat K, Nair S, White MM, Dziekan J, Ling C, Proux S, Konghahong K, Jeeyapant A, Woodrow CJ, Imwong M, McGready R, Lwin KM, Day NPJ, White NJ, Nosten F. Declining Efficacy of Artemisinin Combination Therapy Against *P. Falciparum* Malaria on the Thai-Myanmar Border (2003-2013): The Role of Parasite Genetic Factors. *Clin Infect Dis.* 2016 Sep 15;63(6):784-791.

PNLP. Bulletin Epidemiologique Annuel du Paludisme au Senegal. Dakar: Programme National de Lutte contre le Paludisme; 2017.

Ponce C, Kaczorowski F, Perpoint T, Miallhes P, Sigal A, Javouhey E, Gillet Y, Jacquin L, Douplat M, Tazarourte K, Potinet V, Simon B, Lavoignat A, Bonnot G, Sow F, Bienvenu AL, Picot S. Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for screening patients with imported malaria in a non-endemic setting. *Parasite*.2017; 24:53.

Recker M, Bull PC, Buckee CO. Recent advances in the molecular epidemiology of clinical malaria. *F1000Res*. 2018 Jul 30; 7.pii: F1000 Faculty Rev-1159.

Richards JS, Beeson JG.The future for blood-stage vaccines against malaria. *Immunol Cell Biol*. 2009 Jul;87(5):377-90). L'immunité antipalustre est quant à elle associée à une réduction de l'échec du traitement antipaludique chez les populations endémiques (

Riley EM, Allen SJ, Wheeler JG, Blackman MJ, Bennett S, Takacs B, Schönfeld HJ, Holder AA, Greenwood BM. 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 May; 14(3):321-37.

Riley EM, Stewart VA. Immune mechanisms in malaria: new insights in vaccine development. *Nat Med*. 2013 Feb; 19(2):168-78.

Rodriguez-Barraquer I, Arinaitwe E, Jagannathan P, Kanya MR, Rosenthal PJ, Rek J, Dorsey G, Nankabirwa J, Staedke SG, Kilama M, Drakeley C, Ssewanyana I, Smith DL, Greenhouse B. Quantification of anti-parasite and anti-disease immunity to malaria as a function of age and exposure. *Elife*.2018 Jul 25; 7.

Rogier C, Commenges D, Trape JF.Evidence for an age-dependent pyrogenic threshold of *Plasmodium falciparum* parasitemia in highly endemic populations. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*.1996; 54:613-619.

Roper C, Richardson W, Elhassan IM, Giha H, Hviid L, Satti GM, Theander TG, Arnot DE. Seasonal changes in the *Plasmodium falciparum* population in individuals and their relationship to clinical malaria: a longitudinal study in a Sudanese village. *Parasitology*. 1998 Jun; 116 (Pt 6):501-10.

- Rowe JA, Rogerson SJ, Raza A, Moulds JM, Kazatchkine MD, Marsh K, Newbold CI, Atkinson JP, Miller LH.** Mapping of the region of complement receptor (CR) 1 required for Plasmodium falciparum rosetting and demonstration of the importance of CR1 in rosetting in field isolates. *J Immunol.* 2000 Dec 1; 165(11):6341-6.
- RTS, S Clinical Trials Partnership.** Efficacy and safety of RTS, S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *Lancet.* 2015 Jul 4; 386(9988):31-45.
- Ryg-Cornejo V, Ioannidis LJ, Ly A, Chiu CY, Tellier J, Hill DL, Preston SP, Pellegrini M, Yu D, Nutt SL, Kallies A, Hansen DS.** Severe Malaria Infections Impair Germinal Center Responses by Inhibiting T Follicular Helper Cell Differentiation. *Cell Rep.* 2016 Jan 5; 14(1):68-81.
- Sabchareon A, Burnouf T, Ouattara D, Attanath P, Bouharoun-Tayoun H, Chantavanich P, Foucault C, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P.** Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1991 Sep; 45(3):297-308.
- Saidani, N. (2008).** Etude exploratoire de la synthèse des galactolipides chez Plasmodium falciparum (Doctoral dissertation).
- Schantz-Dunn J, Nour NM.** Malaria and pregnancy: a global health perspective. *Reviews in obstetrics and gynecology.* 2009; 2(3):186
- Scherf A, Figueiredo LM, Freitas-Junior LH.** Plasmodium telomeres: a pathogen's perspective. *Current opinion in microbiology.* 2001 Aug 1; 4(4):409-14.
- Schneider DS, Ayres JS.** Two ways to survive infection: what resistance and tolerance can teach us about treating infectious diseases. *Nat Rev Immunol.* 2008 Nov; 8(11):889-95.
- Schofield L, Grau GE.** Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol.* 2005 Sep; 5(9):722-35.

- Searle KM, Katowa B, Kobayashi T, Siame MNS, Mharakurwa S, Carpi G, Norris DE, Stevenson JC, Thuma PE, Moss WJ; Southern Africa International Centers of Excellence for Malaria Research.** Distinct parasite populations infect individuals identified through passive and active case detection in a region of declining malaria transmission in southern Zambia. *Malar J.* 2017 Apr 19; 16(1):154.
- Seder RA, Chang LJ, Enama ME, Zephir KL, Sarwar UN, Gordon IJ, Holman LA, James ER, Billingsley PF, Gunasekera A, Richman A, Chakravarty S, Manoj A, Velmurugan S, Li M, Ruben AJ, Li T, Eappen AG, Stafford RE, Plummer SH, Hendel CS, Novik L, Costner PJ, Mendoza FH, Saunders JG, Nason MC, Richardson JH, Murphy J, Davidson SA, Richie TL, Sedegah M, Sutamihardja A, Fahle GA, Lyke KE, Laurens MB, Roederer M, Tewari K, Epstein JE, Sim BK, Ledgerwood JE, Graham BS, Hoffman SL; VRC 312 Study Team.** Protection against malaria by intravenous immunization with a nonreplicating sporozoite vaccine. *Science.* 2013 Sep 20; 341(6152):1359-65.
- Seow J, Morales RA, MacRaild CA, Krishnarjuna B, McGowan S, Dingjan T, Jaipuria G, Rouet R, Wilde KL, Atreya HS, Richards JS, Anders RF, Christ D, Drinkwater N, Norton RS.** Structure and Characterisation of a Key Epitope in the Conserved C-Terminal Domain of the Malaria Vaccine Candidate MSP2. *J Mol Biol.* 2017 Mar 24; 29(6):836-846.
- Shanks GD.** Tolerance May Be More Appropriate Than Immunity When Describing Chronic Malaria Infections. *Am J Trop Med Hyg.* 2019 Mar; 100(3):497-500. doi:10.4269/ajtmh.18-0906.
- Shortt HE, Garnham PCC:** Pre-erythrocytic stages in mammalian malaria parasites. *Nature.* 1948, 161: 126-10.1038/161126a0
- Singh N, Shukla MM, Sharma VP.** Epidemiology of malaria in pregnancy in central India. *Bull World Health Organ.* 1999; 77(7):567-72.
- Sinton JA.** Immunity or Tolerance in Malarial Infections: (Section of Comparative Medicine) *Proc R Soc Med.* 1938; 31:1298–302.

- Sirima SB, Durier C, Kara L, Houard S, Gansane A, Loulergue P, Bahuaud M, Benhamouda N, Nebié I, Faber B, Remarque E, Launay O; AMA1-DiCo Study Group.** Safety and immunogenicity of a recombinant *Plasmodium falciparum* AMA1-DiCo malaria vaccine adjuvanted with GLA-SE or Alhydrogel® in European and African adults: A phase 1a/1b, randomized, double-blind multi-centre trial. *Vaccine*. 2017 Oct 27; 35(45):6218-6227.
- Sissoko MS, Healy SA, Katile A, Omaswa F, Zaidi I, Gabriel EE, Kamate B, Samake Y, Guindo MA, Dolo A, Niangaly A, Niaré K, Zeguime A, Sissoko K, Diallo H, Thera I, Ding K, Fay MP, O'Connell EM, Nutman TB, Wong-Madden S, Murshedkar T, Ruben AJ, Li M, Abebe Y, Manoj A, Gunasekera A, Chakravarty S, Sim BKL, Billingsley PF, James ER, Walther M, Richie TL, Hoffman SL, Doumbo O, Duffy PE.** Safety and efficacy of PfSPZ Vaccine against *Plasmodium falciparum* via direct venous inoculation in healthy malaria-exposed adults in Mali: a randomised, double-blind phase 1 trial. *Lancet Infect Dis*. 2017 May; 17(5):498-509.
- Smith JD, Subramanian G, Gamain B, Baruch DI, Miller LH.** Classification of adhesive domains in the *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 family. *Mol Biochem Parasitol*. 2000 Oct; 110(2):293-310.
- Snounou G, Singh B.** Nested PCR analysis of *Plasmodium* parasites. *Methods Mol Med*. 2002; 72:189-203. PubMed PMID: 12125116. Snounou G, Singh B (2002) Nested PCR analysis of *Plasmodium* parasites. *Methods Mol Med* 72:189–203
- Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, Thaithong S, Brown KN.** High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol*. 1993 Oct; 61(2):315-20.
- Soares MP, Teixeira L, Moita LF.** Disease tolerance and immunity in host protection against infection. *Nat Rev Immunol*. 2017 Feb; 17(2):83-96.
- Sondén K, Doumbo S, Hammar U, Vafa Homann M, Ongoiba A, Traoré B, Bottai M, Crompton PD, Färnert A.** Asymptomatic Multiclonal *Plasmodium falciparum* Infections Carried Through the Dry Season Predict Protection Against Subsequent Clinical Malaria. *J Infect Dis*. 2015 Aug 15; 212(4):608-16.

- Sondén K, Doumbo S, Hammar U, Vafa Homann M, Ongoiba A, Traoré B, Bottai M, Crompton PD, Färnert A.** Asymptomatic Multiclonal Plasmodium falciparum Infections Carried Through the Dry Season Predict Protection Against Subsequent Clinical Malaria. *J Infect Dis.* 2015 Aug 15; 212(4):608-16.
- Sondén K, Doumbo S, Hammar U, Vafa Homann M, Ongoiba A, Traoré B, Bottai M, Crompton PD, Färnert A.** Asymptomatic Multiclonal Plasmodium falciparum Infections Carried Through the Dry Season Predict Protection Against Subsequent Clinical Malaria. *J Infect Dis.* 2015 Aug 15; 212(4):608-16.
- Stanisic DI, Richards JS, McCallum FJ, Michon P, King CL, Schoepflin S, Gilson PR, Murphy VJ, Anders RF, Mueller I, Beeson JG.** Immunoglobulin G subclass-specific responses against Plasmodium falciparum merozoite antigens are associated with control of parasitemia and protection from symptomatic illness. *Infect Immun.* 2009 Mar;77(3):1165-74.
- Takala SL, Plowe CV.** Genetic diversity and malaria vaccine design, testing and efficacy: preventing and overcoming 'vaccine resistant malaria'. *Parasite Immunol.* 2009 Sep; 31(9):560-73.
- Tanabe K, Sakihama N, Kaneko O, Saito-Ito A, Kimura M.** A PCR method for molecular epidemiology of Plasmodium falciparum Msp-1. *Tokai J Exp Clin Med.* 1998 Dec; 23(6):375-81.
- Taylor SM, Parobek CM, Fairhurst RM.** Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2012 Jun; 12(6):457-68.
- Thera MA, Doumbo OK, Coulibaly D, Laurens MB, Ouattara A, Kone AK, Guindo AB, Traore K, Traore I, Kouriba B, Diallo DA, Diarra I, Daou M, Dolo A, Tolo Y, Sissoko MS, Niangaly A, Sissoko M, Takala-Harrison S, Lyke KE, Wu Y, Blackwelder WC, Godeaux O, Vekemans J, Dubois MC, Ballou WR, Cohen J, Thompson D, Dube T, Soisson L, Diggs CL, House B, Lanar DE, Dutta S, Heppner DG Jr, Plowe CV.** A field trial to assess a blood-stage malaria vaccine. *N Engl J Med.* 2011 Sep 15; 365(11):1004-13.

- Toenhake CG, Bártfai R.** What functional genomics has taught us about transcriptional regulation in malaria parasites. *Brief Funct Genomics*. 2019 Apr 26.pii: elz004.
- Trampuz A, Jereb M, Muzlovic I, Prabhu RM.** Clinical review: Severe malaria. *Crit Care* 2003; 7(4): 315-23.
- Trape JF, Rogier C, Konate L, Diagne N, Bouganali H, Canque B, Legros F, Badji A, Ndiaye G, Ndiaye P.** 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 Aug; 51(2):123-37.
- Trape JF, Rogier C.** Combating malaria morbidity and mortality by reducing transmission. *Parasitol Today*. 1996 Jun; 12(6):236-40.
- Tripura R, Peto TJ, Chalk J, Lee SJ, Sirithiranont P, Nguon C, Dhorda M, von Seidlein L, Maude RJ, Day NP, Imwong M, White NJ, Dondorp AM.** Persistent Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax infections in a western Cambodian population: implications for prevention, treatment and elimination strategies. *Malar J*. 2016 Mar 24; 15: 181.
- Tu Y.** Artemisinin-A Gift from Traditional Chinese Medicine to the World (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*. 2016 Aug 22; 55(35):10210-26.
- Turner L, Lavstsen T, Berger SS, Wang CW, Petersen JE, Avril M, Brazier AJ, Freeth J, Jespersen JS, Nielsen MA, Magistrado P.** Severe malaria is associated with parasite binding to endothelial protein C receptor. *Nature*. 2013 Jun; 498(7455):502.
- Vafa M, Troye-Blomberg M, Anchang J, Garcia A, Migot-Nabias F.** Multiplicity of Plasmodium falciparum infection in asymptomatic children in Senegal: relation to transmission, age and erythrocyte variants. *Malar J*. 2008 Jan 23; 7:17.
- Wang CW, Hermsen CC, Sauerwein RW, Arnot DE, Theander TG, Lavstsen T.**The Plasmodium falciparum var gene transcription strategy at the onset of blood stage infection in a human volunteer. *Parasitol Int*. 2009 Dec; 58(4):478-80.
- Wanja EW, Kuya N, Moranga C, Hickman M, Johnson JD, Moseti C, Anova L, Ogutu B, Ohrt C.** Field evaluation of diagnostic performance of malaria rapid diagnostic tests in western Kenya. *Malar J*. 2016 Sep 7; 15:456.

- Warimwe GM, Recker M, Kiragu EW, Buckee CO, Wambua J, Musyoki JN, Marsh K, Bull PC.** Plasmodium falciparum var gene expression homogeneity as a marker of the host-parasite relationship under different levels of naturally acquired immunity to malaria. *PLoS One*. 2013 Jul 29; 8(7):e70467.
- Wassmer SC, Taylor TE, Rathod PK, Mishra SK, Mohanty S, Arevalo-Herrera M, Duraisingh MT, Smith JD.** Investigating the Pathogenesis of Severe Malaria: A Multidisciplinary and Cross-Geographical Approach. *Am J Trop Med Hyg*. 2015 Sep; 93(3 Suppl):42-56.
- White M, Watson J.** Age, exposure and immunity. *Elife*. 2018 Aug 21; 7.pii: e40150.
- White NJ.** Anaemia and malaria. *Malar J*. 2018 Oct 19;17(1):371.
- WHO 2000,** severe falciparum malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94, supplement 1
- WHO.** WHO World Malaria Report 2014. Geneva: World Health Organization; 2014.
- WHO.** World Malaria Report 2015. Geneva: World Health Organization; 2015.
- WHO.** World Malaria Report 2017. Geneva: World Health Organization; 2017.
- WHO.** World Malaria Report 2019. Geneva: World Health Organization; 2019.
- Wongsrichanalai C, Barcus MJ, Muth S, Sutamihardja A, Wernsdorfer WH.** A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *Am J Trop Med Hyg*. 2007 Dec; 77(6 Suppl):119-27.
- World Health Organization.** Malaria rapid diagnostic test performance: results of WHO product testing of malaria RDTs: round 7 (2015–2016). Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2017.
- World Health Organization.** (2019). *Response plan to pfhrp2 gene deletions* (No. WHO/CDS/GMP/2019.02). World Health Organization.
- Wu L, van den Hoogen LL, Slater H, Walker PG, Ghani AC, Drakeley CJ, Okell LC.** Comparison of diagnostics for the detection of asymptomatic Plasmodium falciparum infections to inform control and elimination strategies. *Nature*. 2015 Dec 3; 528(7580):S86-93.

- Yap XZ, Lundie RJ, Beeson JG, O'Keeffe M.** Dendritic Cell Responses and Function in Malaria. *Front Immunol.* 2019 Mar 4; 10:357.
- YD, Barnwell JW, Udhayakumar V, Ndiaye D.** Evaluation of the Illumigene Malaria
- Yman V, White MT, Asghar M, Sundling C, Sondén K, Draper SJ, Osier FHA, Färnert A.** Antibody responses to merozoite antigens after natural *Plasmodium falciparum* infection: kinetics and longevity in absence of re-exposure. *BMC Med.* 2019 Jan 30; 17(1):22.
- Yu X, Du Y, Cai C, Cai B, Zhu M, Xing C, Tan P, Lin M, Wu J, Li J, Wang M, Wang HY, Su XZ, Wang RF.** Inflammasome activation negatively regulates MyD88-IRF7 type I IFN signaling and anti-malaria immunity. *Nat Commun.* 2018 Nov 23; 9(1):4964.
- Zhou X, Huang JL, Njuabe MT, Li SG, Chen JH, Zhou XN.** A molecular survey of febrile cases in malaria-endemic areas along China-Myanmar border in Yunnan province, People's Republic of China. *Parasite.* 2014; 21 27.
- Zwetyenga J, Rogier C, Tall A, Fontenille D, Snounou G, Trape JF, Mercereau-Puijalon O.** No influence of age on infection complexity and allelic distribution in *Plasmodium falciparum* infections in Ndiop, a Senegalese village with seasonal, mesoendemic malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1998 Nov; 59(5):726-35.



ANNEXES

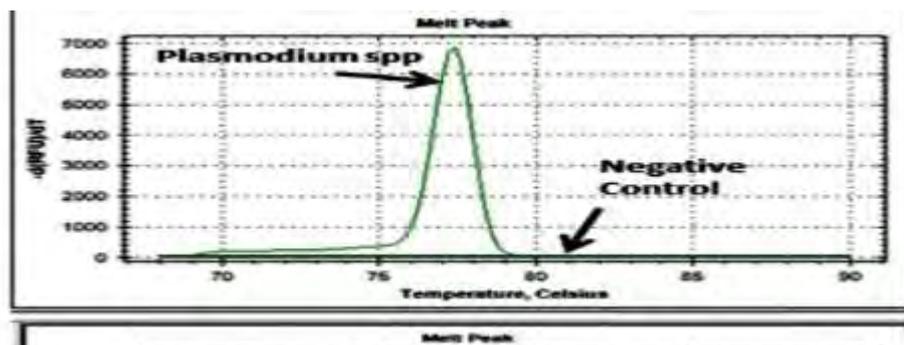
A1 : Protocole d'extraction de l'ADN parasite par la technique QIAGEN

- 1-Dans un tube eppendorf de 1,5 ml, mettre 20 µl de protéinase K, 80 µl de PBS, 200 µl de culot globulaire pour les asymptomatiques submicroscopiques ou 100 µl pour les asymptomatiques microscopiques. Bien homogénéiser au Vortex, centrifuger 3s à 13000t/mn. Incuber ensuite à 55°C pendant 1heure.
- 2-Ajouter ensuite 200 µl de tampon A1, mélanger immédiatement au Vortex et incuber 10 mn à 70°C. A la fin de l'incubation, centrifuger 10-15s à 13000t/mn et centrifuger 1 mn à 13000t/mn ;
- 3-Ajouter avec 200 µl d'éthanol (96-100%) et centrifuger 3s à 13000t/mn ;
- 4-Transvaser le mélange sur une colonne QIAamp (fournie par le fabricant du Kit) et centrifuger 1 mn à 13000t/mn et éliminer le filtrat ;
- 5-Ajouter avec 500 µl de tampon AWA1 et centrifuger 1 mn à 13000t/mn ;
- 6-Ajouter avec 500 µl de tampon AWA2 et centrifuger 3 mn à 13000t/mn ;
- 7-Eluer avec 50 µl de tampon AE dans un tube eppendorf ;
- 8-Conservé à -20°C jusqu'à son utilisation

A2:Mixde la PCRen temps réel pour la detection des parasites

Reactifs	*CC initiale	Volume pour une réaction	CC finale	Volume pour 100 réactions
H2O		10,4 µl		1040µl
5x Evagreen qPCR mix	5x	4 µl	1x	400µl
RTPCR Screening 2-F	10 µM	0,3 µl	0,15µM	30µl
RTPCR Screening 2-R	10 µM	0,3 µl	0,15µM	30µl
ADN		5 µl		
Volume total		20µl		

*CC : concentration



A3 : Courbes de fusion d'un prélèvement PCR en temps réel positif(Niang *et al.*, 2017)

A4 : Mix du génotypage par PCR nichée pour la caractérisation des espèces de *Plasmodium*

	Reagent	Initial Concentration	Vol (1 reaction)
Primary	H2O		3,25 µl
PCR 18S	GoTaq GMM	2X	6,25 µl
	Primer 18S F	10 µM	1 µl
	Primer 18S R	10 µM	1 µl
Total Volume			11,5 µl (+1 µl DNA)= 12,5 µl
	Reagent	Initial Concentration	Vol (1 reaction)
Nested	H2O		6,5 µl
PCR Plasmodium sp	GoTaq GMM	2X	12,5 µl
	Primer Plasmo sp F	10 µM	2,5 µl
	Primer Plasmo sp R	10 µM	2,5 µl
Total Volume			24 µl (+1 µl *DNAP)= 25 µl

*DNAP: Amplified DNA from the Primary 18S PCR

A5 : Tableau des séquences des primers et des conditions de PCR nichée pour la caractérisation des espèces de *Plasmodium*

Nested PCR Genre	Première PCR		primer	Séquences des primer 5' 3'
			rPLU1	TCAAAGATTAAGCCATGCAAGTGA
			rPLU5	CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC
				Conditions de PCR
				Etape 1 : 94°C pour 4 min; étape 2 : dénaturation à 94°C pour 30 sec; étape 3 : hybridation à 55°C pour 1 min; étape 4 : élongation à 72°C pour 1 min; répéter les étapes 2–4 (35 fois), et étape pour 4 min.
Nested PCR Espèces	Deuxième PCR	<i>P. falciparum</i>	rFAL1	TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATA TT
			rFAL2	ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCG TC'
		<i>P. vivax</i>	rVIV1	CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGAT AC
			rVIV2	ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCC TTA
		<i>P. malariae</i>	rMAL1	ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACC CC
			rMAL2	AAAATTCCCATGCATAAAAATTATACAA A
		<i>P. ovale</i>	rOVA1	ATCTCTTTTGCTATTTTTTAGTATTGGAG A
			rPLU2	ATCTAAGAATTTACCTCTGACATCTG
				Conditions de PCR
				Etape 1 : 94°C pour 4 min; étape 2 : dénaturation à 94°C pour 30 sec; étape 3 : hybridation à 58°C pour 1 min; étape 4 : élongation à 72°C pour 1 min; répéter les étapes 2–4 (35 fois), et étape pour 4 min.

A6 : Mix du génotypage par PCR nichée

PCR1 Mix Genotypage par PCR nichée		PCR2	
GMM 2X	12,5 μ l	GMM 2X	12,5 μ l
F- sens 10 μ M	1 μ l	F- sens 10 μ M	1 μ l
R-antisens 10 μ M	1 μ l	R-antisens 10 μ M	1 μ l
DNA*	2 μ l	DNA*	2 μ l
H ₂ O	8,5 μ l	H ₂ O	8,5 μ l
Volume total (VT)	25 μ l	Volume total (VT)	25 μ l

*Go Taq Green Master Mix

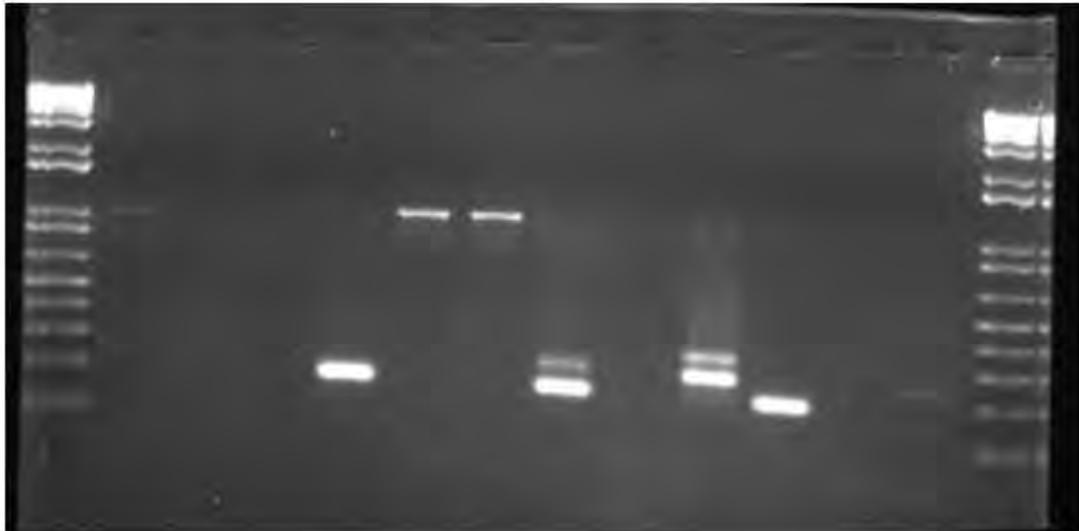
*2 μ l de DNA pour les prélèvements asymptomatiques microscopiques

ou 5 μ l de DNA pour les prélèvements asymptomatiques submicroscopiques

A7 : Tableau des séquences des primers et conditions de PCR pour le génotypage *msp-1* et *msp-2*

Première PCR		primer	Séquences des primers	Famille allélique
	<i>msp-1</i>	M1-OF	5'CTAGAAGCTTTAGAAGATGCAGTATTG 3'	
		M1-OR	5'CTTAAATAGTATTCTAATTCAAGTGGATCA3'	
		Conditions de PCR		
		Dénaturation initiale: 94°C pour 2 min; PCR: 30 cycles de 94°C pour 30 s, 54°C pour 1 mn, 72°C pour 1 mn; élongation finale de 72°C pour 5 mn; hold à 15°C		
	<i>msp-2</i>	M2-OF	5'ATGAAGGTAATTAACATTGTCTATT ATA3'	
		M2-OR	5'ATGAAGGTAATTAACATTGTCTATT ATA3'	
		Conditions de PCR		
		Dénaturation initiale : 94°C pour 5 min; PCR: 30 cycles de 94°C pour 1 mn, 60°C pour 1 mn, 72°C pour 2 mn; élongation finale de 72°C pour 5 mn; hold à 15°C		
Seconde PCR	<i>msp-1</i>	M1-KF	5'AAATAGAGAAGAAATTACTACAAAAGGTGC3'	K1
		M1-KR	5'GCTTGCATCAGCTGGAGGGCTTGCACCAGA3'	
		M1-MF	5'AAATGAAGGAACAAGTGGAACAGCTGTTAC3'	MAD20
		M1-MR	5'ATCTGAAGGATTTGTACGCTTTGAATTACC3'	
		M1-RF	5'TAAAGGATGGAGCAAATACTCAAGTTGTTG3'	RO33
		M1-RR	5'CAAGTAATTTGAACCTATGTTTAAATCAGCGTA3'	
		Conditions de PCR		
		Dénaturation initiale : 94°C pour 2 min; PCR: 30 cycles de 94°C pour 30 s, 59°C pour 1 mn, 72°C pour 1 mn; élongation finale de 72°C pour 5 mn; hold à 15°C		
	<i>msp-2</i>	M2-1CF	5'GCAGAAAGTAAGCCTTCTACTGGTGCT3'	3D7
		M2-1CR	5'CTGAAGAGGTAAGTACTGGTAG3'	
M2-FCF		5'GCAAATGAAGGTTCTAATACTAATAG3'	FC27	
M2-FCR		5'GCATTGCCAGAATTGAA3'		
	Conditions de PCR			
	Dénaturation initiale : 94°C pour 5 min; PCR: 30 cycles de 94°C pour 1 mn, 60°C pour 1 mn, 72°C pour 2 mn; élongation finale de 72°C pour 5 mn; hold à 15°C			

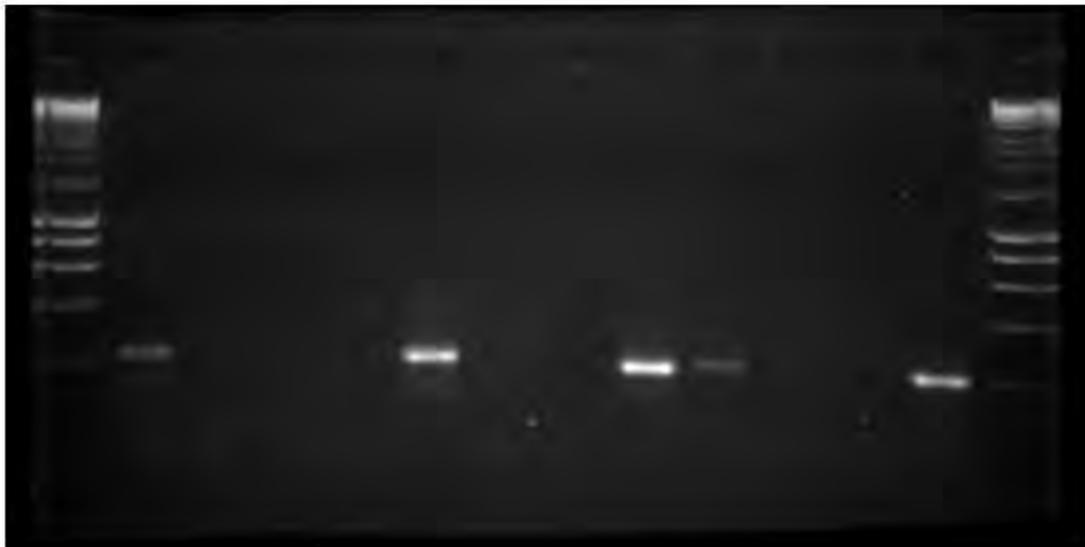
S S S S S S S S S N P PM



K1 allelic family (*msp-1*)

PM: DNA ladder (HyperLadder 1kb 100 lanes, Bioline); P: positive control;
N: negative control, S: sample

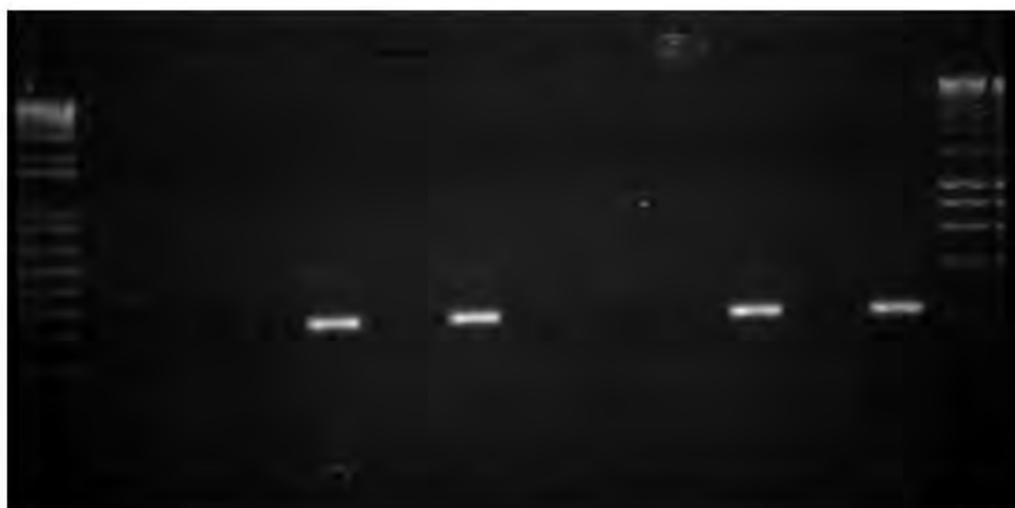
S S S S S S S S S N P PM



MAD20 allelic family (*msp-1*)

PM: DNA ladder (HyperLadder 1kb 100 lanes, Bioline); P: positive control;
N: negative control, S: sample

S S S S S S S S S N P PM

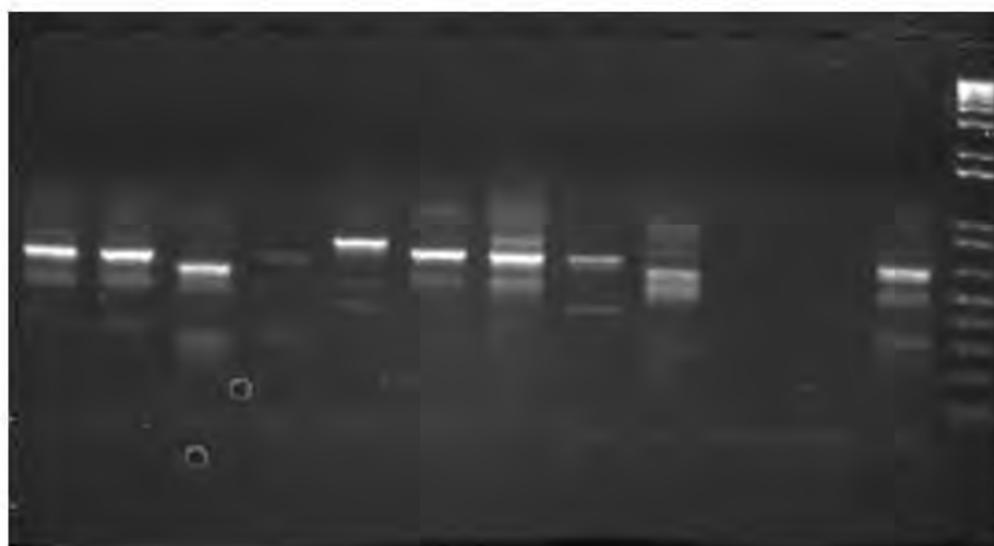


RO33 allelic family (*msp-1*)

PM: DNA ladder (HyperLadder 1kb 100 lanes, Bioline); P: positive control;

N: negative control, S: sample

S S S S S S S S S N P PM

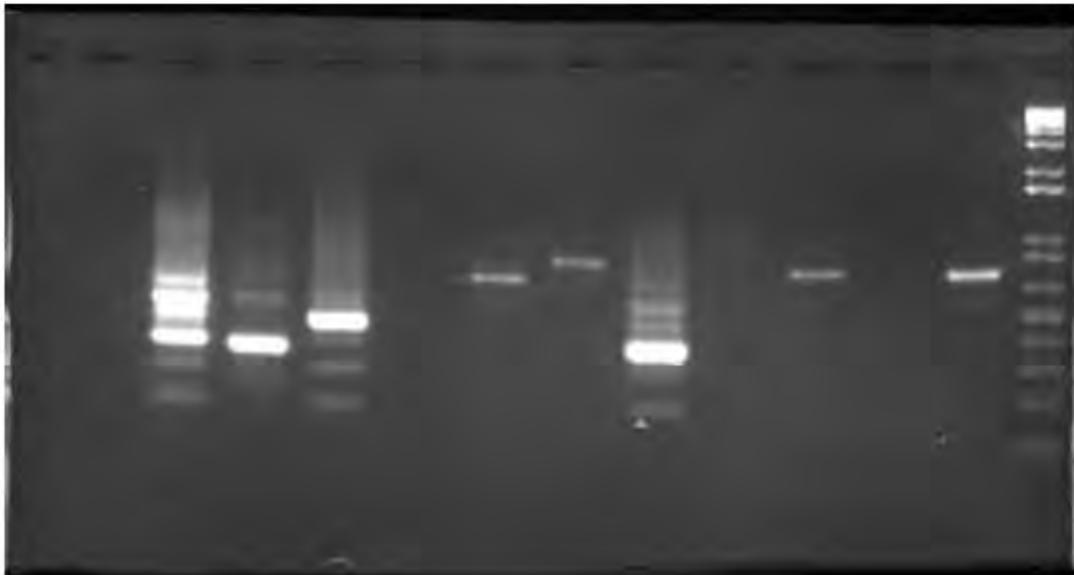


3D7 allelic family (*msp-2*)

PM: DNA ladder (HyperLadder 1kb 100 lanes, Bioline); P: positive control;

N: negative control, S: sample

S S S S S S S S S S N P PM



FC27 3D7 allelic family (*msp-2*)

PM: DNA ladder (HyperLadder 1kb 100 lanes, Bioline); P: positive control;

N: negative control, S: sample

A8 : Profils de migration des différentes familles alléliques de *msp-1* et *msp-2*, PM : poids moléculaire de 100 pb, P : témoin positif, N : témoin négatif, S : différents isolats

Auteur: Babacar Diouf

Paramètres génétiques et immunologiques de l'infection asymptomatique à *Plasmodium falciparum* dans un contexte de faible prévalence du paludisme.

RESUME

Le paludisme reste encore de nos jours un grave problème de santé publique. Le nombre de cas est estimé à 228 millions tandis que la mortalité est approximativement de 405 000 cas en 2018. Les efforts déployés au cours de ces dernières années dans la lutte contre le paludisme ont permis de faire chuter la mortalité au niveau mondial. En Afrique sub-Saharienne cette baisse est estimée à 57% entre 2000 et 2015. Au-delà de ces résultats, une des conséquences directes a été la modification de l'épidémiologie du paludisme avec de nombreuses zones endémiques qui sont devenues des zones à faible prévalence avec des infections qui sont devenues asymptomatiques. Dans un tel contexte, il était devenu indispensable de disposer de connaissances approfondies sur les paramètres génétiques et immunologiques associés à ce type d'infection et leur impact dans la transmission afin de mettre en place des stratégies appropriées pour atteindre l'élimination du paludisme.

La présente étude a été conduite avec comme objectif majeur de déterminer le niveau de polymorphisme associé à l'infection asymptomatique à *P. falciparum* à l'échelle microscopique et submicroscopique. Comme objectif secondaire, il s'agissait d'étudier : i) l'impact du polymorphisme associé à l'infection asymptomatique microscopique sur la parasitémie d'une part, ii) d'autre part celui du polymorphisme associé à l'infection asymptomatique submicroscopique sur la réponse immune.

Deux cohortes ont été utilisées dans ce travail. Une cohorte issue des sites du projet EDCTP/WANETAM comprenant de 1316 échantillons dont 87 asymptomatiques microscopiques à *P. falciparum*. La deuxième cohorte est issue du site de NDIOP, de 353 échantillons dont 55 asymptomatiques submicroscopiques à *P. falciparum* par la méthode de diagnostic PCR en temps réel (qPCR).

Nos résultats ont montré que les infections asymptomatiques microscopiques sont associées à une forte diversité génétique qui ne semble pas être liée au niveau de transmission. Par contre, la diversité génétique a été modérée dans le cas des infections asymptomatiques sub-microscopiques.

L'étude de l'impact du polymorphisme associé aux infections asymptomatiques microscopiques sur la parasitémie a montré que les infections polyclonales sont significativement associées à des parasitémies élevées avec une corrélation significativement positive entre la fréquence des infections multiples du gène *msp-1* et la parasitémie, ce qui soutient ainsi la pertinence de candidats vaccins multivalents pour surmonter la diversité antigénique.

Quant à l'étude de la contribution du portage asymptomatique sub-microscopiques sur la réponse immune, elle a mis en évidence une baisse significative des taux d'anticorps chez les porteurs de *P. falciparum* âgés de plus de 15 ans par rapport aux non porteurs. Pour les enfants moins de 10 ans et ceux entre 10 et 15 ans, les taux d'anticorps n'étaient différents que pour les IgM chez les porteurs de moins de 10 ans, ce qui met en évidence qu'ils sont plus sensibles à l'infection primaire. La baisse de la réponse anticorps chez les adultes suggère ainsi qu'il existerait une sélection de clones qui induit une tolérance immune à l'origine de la baisse des taux d'anticorps.

Summary

Malaria remains a serious public health problem today. The number of cases is estimated at 228 million while mortality is approximately 405,000 in 2018. Efforts in recent years to fight malaria have resulted in a decrease in global mortality. In sub-Saharan Africa this decline is estimated at 57% between 2000 and 2015. Beyond these results, one of the direct consequences has been the modification of malaria epidemiology with many endemic areas becoming low prevalence areas with infections that have become asymptomatic. In such a context, it had become essential to have an in-depth knowledge of the genetic and immunological parameters associated with this type of infection and their impact on transmission in order to put in place appropriate strategies to achieve malaria elimination.

The main objective of this study was to determine the level of polymorphism associated with asymptomatic *P. falciparum* infection at the microscopic and submicroscopic level. The secondary objective was to study: (i) the impact of polymorphism associated with microscopic asymptomatic infection on parasitaemia and (ii) the impact of polymorphism associated with submicroscopic asymptomatic infection on the immune response.

Two cohorts were used in this work. A cohort from the EDCTP/WANETAM project sites comprising 1316 samples including 87 microscopic asymptomatic *P. falciparum* samples. The second cohort was obtained from the NDIOP site, from 353 samples, of which 55 were asymptomatic submicroscopic *P. falciparum* samples by the real time PCR (qPCR) diagnostic method.

Our results demonstrated that asymptomatic microscopic infections are associated with high genetic diversity that does not seem to be related to the level of transmission. In contrast, diversity was moderate for asymptomatic sub-microscopic infections.

The impact of polymorphism associated with asymptomatic microscopic infections on parasitaemia was studied, showing that polyclonal infections are significantly associated with high parasitaemia with a significantly positive correlation between the frequency of multiple *msp-1* gene infections and parasitaemia, thus supporting the relevance of multivalent vaccine candidates to overcome antigenic diversity.

For the investigation of the contribution of asymptomatic sub-microscopic carriage to the immune response, it showed a significant decrease in antibody levels in *P. falciparum* carriers over 15 years of age when compared to non carriers. For age groups (children under 10 years of age, and between 10 and 15 years of age), antibody levels were different for IgM only in carriers under 10 years of age, which shows here that they are more sensitive to primary infection. The decrease in antibody level in adults thus suggests a clonal selection that induces immune tolerance that results in a decline in antibody response.

Keywords: asymptomatic malaria, sub-microscopic malaria, genetic diversity, immune response, *P. falciparum*
