

# SIGLES ET ABREVIATIONS

<b>°C</b>	: Degré Celsius
<b>µl</b>	: Microlitre
<b>Ac</b>	: Anticorps.
<b>ADCC</b>	: Antibody Dependent Cell Cytotoxicity
<b>ADCI</b>	: Antibody Dependent Cellular Inhibition.
<b>ADN</b>	: Acide désoxyribonucléique
<b>Ag</b>	: Antigène
<b>AMA1</b>	: Apical Membrane Antigen-1
<b>BSA (ou SAB)</b>	: Bovine Serum Albumin
<b>CD</b>	: Cluster of Differentiation ou Classe de différenciation
<b>CHNED</b>	: Centre hospitalier national d'enfants de Diamniadio
<b>CHRASML</b>	: Centre hospitalier régional Amadou Sakhir Mbaye de Louga
<b>CHRSL</b>	: Centre hospitalier régional de Saint Louis
<b>CHRTc</b>	: Centre hospitalier régional de Tambacounda
<b>CIVD</b>	: Coagulation Intra Vasculaire Disséminée
<b>CMH</b>	: Complexe majeur d'histocompatibilité
<b>CPA</b>	: Cellule Présentatrice d'Antigène
<b>CR1</b>	: Récepteur du complément 1
<b>CRP</b>	: C Reactive Protein
<b>CSA</b>	: Chondroïtine sulfate A
<b>CSP</b>	: circum Sporozoite protein
<b>CTL</b>	: Cytotoxic T Lymphocyte
<b>Cyt</b>	: Domaine cytoplasmique
<b>DBL1α</b>	: Domain Binding Like α
<b>DI</b>	: Domaine I
<b>DII</b>	: Domaine II
<b>DIII</b>	: Domaine III

<b>DO</b>	: Densité Optique
<b>EDTA</b>	: Ethylène Diamine Tétracétate
<b>EGF-like</b>	: Epidermal Growth Factor-like
<b>ELISA</b>	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<b>Fab</b>	: Fragment antigen binding
<b>Fc</b>	: Fragment de cristallisation
<b>FS</b>	: Frottis sanguin
<b>GE</b>	: Goutte épaisse
<b>GLURP</b>	: Glutamate Rich Protein
<b>GM-CSF</b>	: Granulocyte macrophage- colony stimulating factor
<b>GRp</b>	: Globules Rouges parasités
<b>Hb</b>	: Hémoglobine
<b>HLA</b>	: Human Leucocyte Antigen
<b>ICAM-1</b>	: Intercellular Adhesion Molecule-1
<b>IFN</b>	: Interféron
<b>Ig</b>	: Immunoglobuline
<b>IL</b>	: Interleukine
<b>IPD</b>	: Institut Pasteur de Dakar.
<b>kDa</b>	: kilodalton
<b>Ly B</b>	: lymphocyte B
<b>MGG</b>	: May Grunwald Giemsa
<b>MSP</b>	: Merozoite Surface Protein
<b>NFS</b>	: numération formule sanguine
<b>NK</b>	: Natural Killer
<b>NO</b>	: Oxyde Nitrique
<b>OMS</b>	: Organisation Mondiale de la Santé.
<b>p</b>	: p-value
<b>PBMC</b>	: Peripheral Blood Mononuclear Cells

<b>PBS</b>	: Phosphate Buffer Saline.
<b><i>Pf</i></b>	: <i>Plasmodium falciparum</i> .
<b><i>Pf</i>EMP</b>	: <i>P. falciparum</i> Erythrocyte Membrane Protein
<b><i>pf</i>GPI</b>	: Glycosyl Phosphatidyl Inositol
<b>PNLP</b>	: Programme National de Lutte contre le Paludisme
<b>PRR</b>	: Pattern Recognition Receptor
<b>PS</b>	: Paludisme simple
<b>RESA</b>	: Ring-Infected Erythrocyte Surface Antigen
<b>RPMI</b>	: Milieu de culture cellulaire
<b>SHI</b>	: S�rum hyper-immun
<b>SUB</b>	: Subtilisine
<b>TGF-�</b>	: Transforming growth factor
<b>Th</b>	: Cellule T helper
<b>TLR</b>	: Toll like receptor
<b>TM</b>	: Domaine transmembranaire ;
<b>TMB</b>	: 3,3',5,5' Tétraméthylbenzidine
<b>TNF�</b>	: Tumor Necrosis Factor � (facteur de nécrose tumorale).
<b>TPI</b>	: Traitement Préventif Intermittent
<b>Treg</b>	: Cellule T régulatrice
<b>T��</b>	: Cellule T ��
<b>VCAM-1</b>	: Vascular Cell Adhesion Molecule-1

# LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Répartition du paludisme dans le monde.....	7
Figure 2 : Evolution morbidité, mortalité proportionnelle tous groupes de 2008 à 2014.....	8
Figure 3 : Cycle de développement de <i>P. falciparum</i> .....	13
Figure 4 : Molécules du parasite et de l'hôte impliqués dans la séquestration du globule rouge infecté par <i>P. falciparum</i> .....	16
Figure 5 : Rôle des cellules effectrices et des cytokines dans l'immunité contre les stades sanguins de <i>P. falciparum</i> .....	26
Figure 6 : Représentation schématique du gène et des différents fragments de MSP1 de <i>P. falciparum</i> .....	33
Figure 7 : Formation des différents fragments de MSP1 au cours du cycle sanguin de <i>P. falciparum</i> .....	34
Figure 8 : Représentation schématique d'AMA1.....	36
Figure 9 : Localisation des sites de l'étude.....	40
Figure 10 : Principales étapes du dosage d'anticorps sériques par ELISA.....	48
Figure 11 : Variations des densités parasitaires entre les différentes localités (a) et entre les adultes et les enfants (b) .....	51
Figure 12 : Comparaison globale des niveaux de réponses en IgG contre les antigènes étudiés.....	53
Figure 13 : Interrelations entre les niveaux de réponses Ac contre les antigènes testés : RESA/MSP1 (a) AMA1/MSP1 (b) et RESA/AMA1 (c). .....	54
Figure 14 : Comparaison des niveaux de réponses en IgG entre les différentes localités.....	55
Figure 15 : Evolution des niveaux d'IgG suivant l'âge à Tambacounda.....	56

# **LISTE DE TABLEAUX**

**Tableau I : Données générales de la population d'étude..... 50**

**Tableau II : Prévalences de répondeurs dans la population globale..... 53**

# SOMMAIRE

INTRODUCTION .....	1
PREMIERE PARTIE.....	4
1. DEFINITION ET HISTORIQUE DU PALUDISME.....	5
1.1. Définition.....	5
1.2. Historique .....	5
2. EPIDEMIOLOGIE DU PALUDISME .....	6
2.1. Paludisme dans le monde .....	6
2.2. Paludisme au Sénégal.....	8
3. BIOLOGIE DU PARASITE .....	10
3.1. Agent pathogène.....	10
3.2. Vecteurs.....	10
3.3. Cycle de vie de Plasmodium .....	11
3.3.1. Cycle sexué chez le moustique : sporogonie .....	12
3.3.2. Cycle asexué chez l'homme : schizogonie .....	12
4. PATHOLOGIE DE L'INFECTION PALUSTRE .....	14
4.1. Caractéristiques cliniques.....	14
4.1.1. Accès palustre simple.....	14
4.1.2. Formes graves du paludisme.....	15
4.2. Pathogénèse du Plasmodium.....	16
4.2.1. Hypothèse de la séquestration.....	16
4.2.2. Phénomène du « rosetting ».....	17
4.2.3. Variation antigénique.....	17
5. REponse IMMUNE .....	18
5.1. Notion de prémunition .....	18
5.1.1. Mécanismes effecteurs de protection contre le paludisme .....	19
5.1.2. Immunité contre les stades pré-érythrocytaires .....	19
5.1.3. Immunité contre les stades érythrocytaires.....	20

5.2. Rôles des cellules immunitaires .....	22
5.2.1. Rôle des lymphocytes .....	22
5.2.2. Rôle des monocytes / macrophages .....	23
5.2.3. Rôles des polynucléaires neutrophiles et des cellules Natural killer ...	24
5.2.4. Effets immunoprotecteurs des cytokines .....	26
5.3. Rôles des anticorps .....	29
5.3.1. Fonctions anti-parasites des anticorps .....	29
5.3.1.1. Actions directes des anticorps sur le parasite .....	29
5.3.1.2. Coopération avec les cellules immunitaires .....	30
5.3.2. Inhibition de mécanisme de pathogenèse .....	30
5.3.2.1. Inhibition de la cytoadhérence et du « rosetting » .....	31
5.3.2.2. Fonction antitoxique des anticorps .....	31
5.4. Antigènes de surface de <i>P. falciparum</i> .....	33
5.4.1. Antigène de surface du mérozoïte 1 (MSP1) .....	33
5.4.2. Apical membrane Antigen-1 (AMA1) .....	36
5.4.3. RESA .....	37
5.5. Hypothèse et objectifs de l'étude .....	38
DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE .....	39
1. SITES ET CADRE D'ETUDES .....	40
1.1. Sites de recrutement .....	40
1.1.1. Louga .....	40
1.1.2. Tambacounda .....	41
1.1.3. Diamniadio .....	42
1.1.4. Saint-Louis .....	42
1.2. Cadre de l'étude .....	43
2. MATERIELS ET METHODES .....	43
2.1. Matériels .....	43
2.1.1. Matériels de laboratoire .....	43
2.1.2. Tampons et réactifs chimiques .....	44
2.1.3. Sérums témoins .....	45

2.1.4. Echantillons étudiés .....	45
2.1.5. Antigènes étudiés .....	46
2.2. Méthodologie.....	46
2.2.1. Détermination des densités parasitaires .....	46
2.2.2. Conservation et transport des échantillons .....	47
2.2.3. Détermination des taux d'anticorps.....	47
2.2.3.1. Principe.....	47
2.2.3.2. Mode opératoire.....	48
2.2.4. Analyses statistiques .....	49
3. RESULTATS.....	50
3.1. Caractéristiques de la population d'étude .....	50
3.1.1. Caractéristiques épidémiologiques .....	50
3.1.2. Caractéristiques clinico-biologiques.....	51
3.2. Analyse des réponses anticorps contre les antigènes étudiés.....	52
3.2.1. Comparaison des prévalences et niveaux d'IgG dans la population d'étude .....	52
3.2.2. Corrélations entre les niveaux d'IgG contre les différents antigènes dans la population globale .....	54
3.2.3. Comparaison des niveaux de réponses en anticorps entre les localités	55
3.2.4. Comparaison des niveaux de réponses en IgG à Tamba suivant l'âge.... .....	56
4. DISCUSSION.....	57
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	61
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	63

# INTRODUCTION

Le paludisme est une érythrocytopathie hémolysante et fébrile due à la présence et au développement dans le sang d'un protozoaire du genre *Plasmodium* transmis à l'homme par la piqure infectante de l'anophèle femelle.

Environ 212 millions de cas cliniques et 429 000 décès sont enregistrés annuellement à travers le monde. Ces décès sont surtout notés chez les enfants âgés de moins de cinq et les femmes enceintes, en Afrique sub-saharienne [2].

Au Sénégal, le paludisme constitue la première cause de morbidité et de mortalité. Des progrès majeurs ont été accomplis ces dernières années dans le domaine de la lutte contre cette maladie. En effet, entre 2000 et 2013, la mortalité a diminué de 26% dans le monde et dans certaines régions, cette baisse avoisine les 35% [2]. Ce résultat est le fruit d'une application plus large des stratégies de lutte contre la maladie et d'une amélioration de la prise en charge des cas qui demeure encore difficile particulièrement en Afrique.

En raison des résistances grandissantes du parasite aux antimalariques et du vecteur aux insecticides classiques, la mise au point d'un vaccin ne peut être que bénéfique [3]. Après plus de 40 années d'intenses investigations en vaccinologie, aucun vaccin antipalustre permettant de prévenir la maladie n'est disponible. Le développement d'un vaccin antipalustre se heurte à la complexité du cycle parasitaire, au polymorphisme et la variation antigénique mis en place par le pathogène pour échapper à la réponse immunitaire [4].

Il a été démontré que le parasite induit chez l'hôte des réponses immunitaires humorales et cellulaires. Ces réponses dirigées contre des antigènes du parasite dont certains candidats vaccins sont partiellement protectrices. Elles nécessitent l'intervention des composantes innée et adaptative de l'immunité. La majorité des études rapportées sur le sujet ont été faites dans les zones rurales et rares sont les données émanant de structures hospitalières localisées dans ces zones. Face à l'existence de différences de transmission du paludisme entre les zones rurales et les centres urbains, il est nécessaire

d'évaluer les réponses immunitaires de l'hôte suivant l'endémicité palustre, afin de permettre l'élaboration de stratégies vaccinales généralisées et adaptées à ces différents milieux pour ce qui est de la biologie du parasite et de son vecteur. Ces études doivent cependant prendre en compte les diverses formes cliniques du paludisme hospitalier mais surtout les données épidémiologiques émanant des sites. Des travaux antérieurs ainsi que les récentes données rapportées par le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP), soulignent la possibilité d'une élimination de la maladie dans certaines régions du Sénégal. Seule une meilleure compréhension de la physiopathologie des accès palustres permettra d'identifier ces cibles thérapeutiques adaptées et de développer des approches innovantes pour réduire la mortalité palustre.

Ce présent travail entre dans ce cadre et a été réalisé en milieu hospitalier dans quatre régions d'endémicité variable au Sénégal. Notre objectif principal a été d'analyser les aspects de la réponse immunitaire en IgG spécifiquement dirigées contre trois antigènes candidats vaccins (AMA-1, MSP1p19 et RESA) associés au stade sanguin de *P falciparum*, dans le paludisme clinique. Secondairement, nous avons recherché les variations des taux d'IgG entre les divers sites d'étude, en tenant compte de l'âge.

# **PREMIERE PARTIE**

# 1. DEFINITION ET HISTORIQUE DU PALUDISME

## 1.1. Définition

Le Paludisme ou Malaria est maladie parasitaire due à un hématozoaire du genre *Plasmodium*, qui se développe et se multiplie dans le foie puis dans les hématies, il est transmis surtout à l'Homme par la piqure d'un moustique femelle du genre *Anopheles* [5].

## 1.2. Historique

Le paludisme est une maladie très ancienne. En 3000 avant JC, il a été décrit en Egypte ancienne. Cette certitude est issue de la découverte de Plasmodies dans des momies [6].

A partir de 2700 avant JC, des cas d'accès palustres étaient décrits en Chine. Dans la mythologie chinoise, la maladie est représentée sous la forme de trois démons armés respectivement de marteau, brasero et marmite d'eau froide, illustrant les céphalées, fièvres et frissons notés au cours des accès primo-invasifs.

Cependant, il faudra attendre l'année 1630 pour voir apparaître le premier traitement à base d'écorce de Quinquina découvert par Don Francisco Lopez. Deux siècles seront encore nécessaires pour que les pharmaciens J. Pelletier et J.B. Caventou parviennent à isoler l'agent actif : la quinine.

A partir de cette époque, les recherches s'accélérent et l'agent pathogène est découvert par Alphonse Laveran en 1880.

En 1897, les moustiques *Anophèles* sont reconnus comme étant les vecteurs de la maladie et en 1922, quatre *Plasmodium* infectant l'homme ont été décrits : *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax* et *P. ovale*.

Trois espèces du paludisme sont exclusivement retrouvés chez l'Homme, ce sont *P. falciparum* (Welch, 1897); *P. vivax* (Grassi, 1890); et *P. ovale* (Stephens, 1922).

Le paludisme à *P. malariae* a été décrit aussi bien chez l'homme que chez les singes africains (Grassi, 1890). Une 5<sup>ème</sup> espèce *P. knowlesi* a été récemment décrite chez l'homme en Asie [7]. Il faudra alors près de 60 ans pour comprendre entièrement le cycle parasitaire et ses caractéristiques.

## **2. EPIDEMIOLOGIE DU PALUDISME**

Les facteurs environnementaux, l'intensité de la transmission, la virulence du parasite et les différents traits génétiques de l'hôte confèrent une complexité au paludisme [1]. Les études épidémiologiques montrent que, la sensibilité au paludisme est très variable entre les individus d'une population. Ainsi, charge parasitaire, incidence et gravité de la maladie [8]; ampleur et type de réponses immunitaires dirigées contre les antigènes du parasite diffèrent selon les individus [9].

Les manifestations cliniques du paludisme sont liées à l'âge des individus en zone endémique. Les enfants de moins de cinq ans souffrent du paludisme cérébral alors que les adultes souffrent du paludisme simple. Le risque de décès est aussi plus élevé chez les enfants que chez les adultes vivant en zone endémique [10].

### **2.1. Paludisme dans le monde**

Selon les estimations mondiales en 2016, 212 millions de cas de personnes étaient malades de paludisme et parmi elles, 429 000 personnes sont décédées de la maladie. La plupart des cas (90 %) ont été enregistrés dans la région Afrique de l'OMS, loin devant la région Asie du Sud-Est (7 %) et la région Méditerranée orientale (2 %) de l'OMS [2].

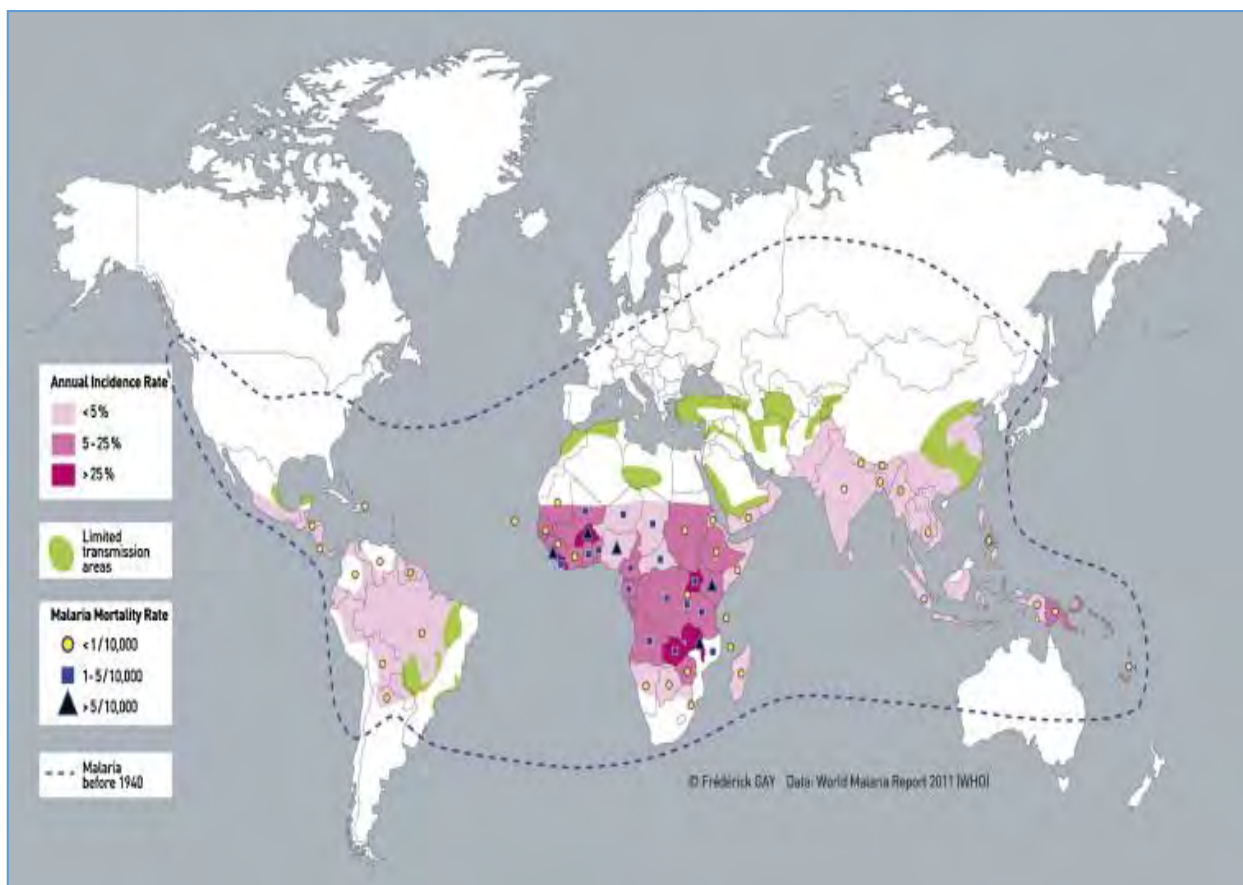
En Afrique subsaharienne, le nombre de patients atteints d'infections palustres aurait diminué de 131 millions en 2010 à 114 millions en 2015 [2].

La majorité d'épisodes cliniques à *Plasmodium falciparum* se produit en

Afrique tropicale et en Asie du Sud-est avec respectivement 70% et 25% d'épisodes cliniques [11] (**figure 1**).

Le paludisme est responsable en Afrique de 1500 décès par jour, la plupart des décès concernant les enfants de moins de cinq ans. La distribution du paludisme dans les régions endémiques du monde est définie en fonction du degré d'endémicité. Le paludisme est considéré comme endémique dans les zones où il y a une transmission constante au cours d'années successives.

Le paludisme est dit hypoendémique dans les zones où la prévalence de l'infection est inférieure à 10%, et mésoendémique dans les zones où la prévalence de l'infection se situe entre 11% et 50%. Dans les régions où la prévalence de l'infection est supérieure à 50%, les zones sont définies comme holoendémiques et hyperendémique.

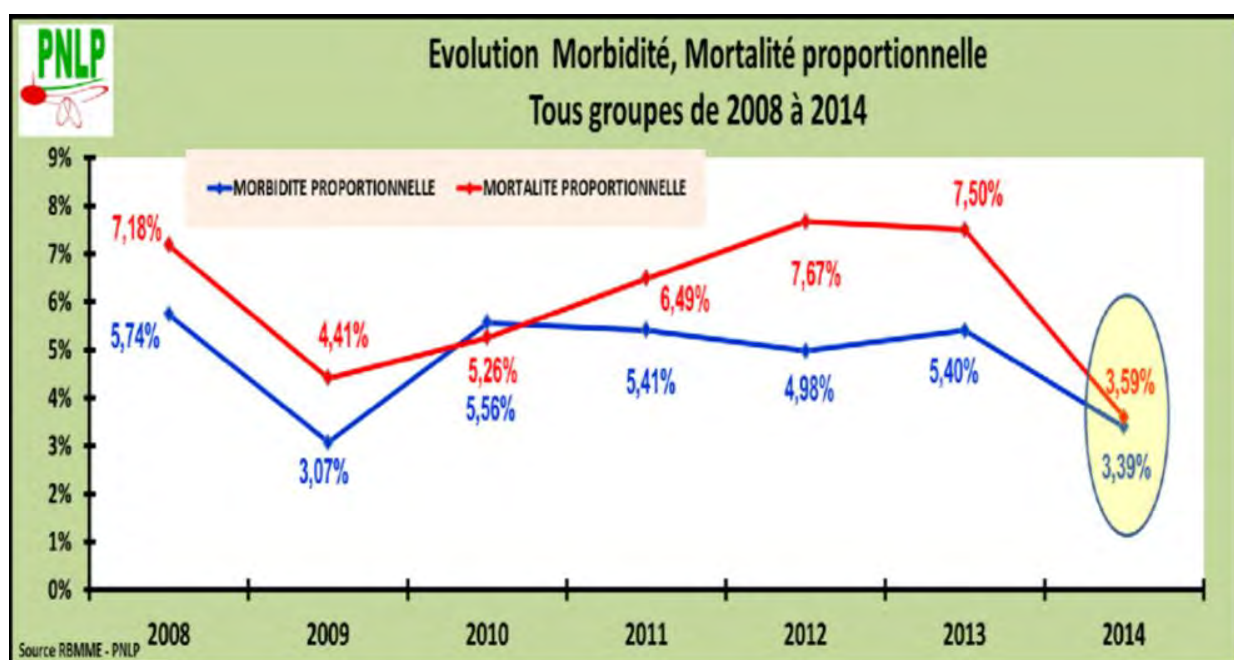


**Figure 1 : Répartition du paludisme dans le monde [12]**

## 2.2. Paludisme au Sénégal

Au Sénégal le niveau de transmission diminue en passant du sud au Nord du pays. La transmission est hypo ou mésoendémique au Nord et au Centre et hyper ou holoendémique au Sud du pays. Les programmes de lutte contre le paludisme reposant surtout sur l'utilisation de moustiquaires imprégnés d'insecticide, le diagnostic rapide et les traitements précoces combinés, ont permis une baisse importante de l'incidence de l'affection au Sénégal [13].

Mis en place dès 1995, le Programme National de Lutte contre le Paludisme a mis en œuvre des plans stratégiques. Ces derniers ont permis de réduire de façon significative la morbidité et la mortalité liées au paludisme. Le taux de morbidité proportionnelle est passé de 35,72% en 2001 à 3,07% en 2009. Pendant la même période, la mortalité proportionnelle est passée de 29,72% à 4,41 %.



**Figure 2 :** Evolution morbidité, mortalité proportionnelle tous groupes de 2008 à 2014 [14].

Le plan stratégique 2011-2015 de lutte contre le paludisme dans le pays est résolument orienté vers le contrôle du paludisme en vue de sa pré-élimination. Selon le bulletin épidémiologique annuel du paludisme, publié en Février 2015,

la morbidité proportionnelle palustre est restée basse avoisinant les 5% depuis 2008. La mortalité proportionnelle a connu les mêmes variations passant de 7,18% en 2008 à 4,41% en 2009 et de 7,50% en 2013 à 3,50% en 2014 **(Figure 2) [14]**.

En 2013, le Sénégal a enregistré 345889 cas de paludisme dont 814 décès **[15]**.

La notion de faciès épidémiologique permet de traduire la dynamique de la transmission en fonction des variations du biotope. Elle est définie comme un ensemble de zones dans lesquelles l'infection palustre présente les mêmes caractéristiques de transmission **[16]**. Bien que le paludisme soit endémique dans tout le pays, le niveau de transmission augmente en passant du Nord au Sud **[17]**.

Il existe deux faciès épidémiologiques au Sénégal :

- Le faciès tropical au Sud où 30 à 35% de l'ensemble de la pathologie fébrile est due au paludisme. Ce taux peut passer de 10% en saison sèche à 80 % en saison pluvieuse. Dans ces régions, il existe une prémunition solide au-delà de l'âge de 10 ans. Ce faciès est retrouvé dans les régions de Ziguinchor (hors de la mangrove), de Kolda, de Tambacounda et les parties méridionales des régions de Fatick et Kaolack où l'essentiel de la transmission s'effectue de juillet à décembre **[18]**.
- Le faciès sahélien est retrouvé surtout dans les régions du centre (Kaolack, Fatick, Diourbel, Dakar et Thiès) et au Nord du pays, dans le Ferlo et la vallée du fleuve Sénégal (Louga, Saint Louis et Matam) où l'essentiel de la transmission s'effectue entre Août et Octobre **[18]**. Dans cette zone, au fur et à mesure que l'on remonte vers le Nord, la prémunition diminue et le caractère instable du paludisme s'accroît.

On y observe des épisodes épidémiques au cours des années de forte pluviométrie et les tranches d'âge touchées sont plus larges **[17]**.

### 3. BIOLOGIE DU PARASITE

#### 3.1. Agent pathogène

Les parasites hématozoaires responsables du paludisme appartiennent à l'embranchement des *Sporozoaires* ou *Apicomplexa*, à la classe des *Sporozoa*, à l'ordre des *Eucoccidiida*, à la Famille des *Plasmodiidae* et au Genre *Plasmodium* [19].

Cent quarante-six espèces du genre de *Plasmodium* ont été répertoriées. Ils sont capables d'infecter divers hôtes : homme, singe, oiseaux et rongeurs. Chez l'homme seules quatre espèces sont communément reconnues comme étant responsables du paludisme : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* ; auxquelles s'ajoute maintenant *P. knowlesi*. C'est une espèce zoonotique du singe macaque responsable d'un nombre important d'infection humaine en Asie du Sud-Est [7].

#### 3.2. Vecteurs

Au niveau taxonomique, les vecteurs de *Plasmodium* sont des insectes diptères appartenant à la famille des *Culicidae* et à la sous-famille des *Anophelinae*. On dénombre environ 500 espèces d'anophèles dans le monde, parmi lesquelles une cinquantaine est capable de transmettre le paludisme à l'homme [20].

En Afrique, une douzaine d'espèces est impliquée dans la transmission. Ces vecteurs du paludisme en Afrique tropicale sont répartis en divers grands groupes :

- **le groupe gambiae** avec sept espèces dont deux seulement sont vectrices : *An. gambiae s.s.* et *An. arabiensis*,
- **le groupe funestus** qui renferme neuf espèces dont deux vectrices : *An. funestus s.s.* et *An. rivulorum* assurent la transmission du paludisme,

- **le groupe nili** contenant quatre espèces dont trois vectrices : *An. nili* s.s. *An. carnevalei* et *An. Ovengensis* [21].

Seuls les deux premiers groupes de vecteurs sont impliqués dans la transmission palustre en Afrique. Chacune de ces espèces a des préférences pour des biotopes particuliers. Ces espèces présentent une grande capacité vectorielle, expliquant la forte endémicité palustre en Afrique [22].

Seule l'anophèle femelle est hématophage. Elle a une activité nocturne son vol est silencieux et sa piquûre décrite comme indolore par opposition aux piquûres beaucoup plus prurigineuses des autres genres de moustiques [23].

### 3.3. Cycle de vie de Plasmodium

Tous les parasites du paludisme ont besoin de deux hôtes dans leur cycle de vie : l'hôte définitif où a lieu le développement sexuel (anophèle femelle) et l'hôte intermédiaire (l'homme par exemple) où se produit le développement asexuel (**Figure 3**). Le *Plasmodium*, parasite haploïde adopte trois stratégies au cours de son cycle de vie pour proliférer. La première stratégie est sa capacité de croissance et de réplication intensive, réalisée grâce à trois stades différents.

Le premier stade est l'oocyste qui se produit chez le moustique dans un processus appelé sporogonie.

Le deuxième stade est la schizogonie pré-érythrocytaire (ou exo-érythrocytaire ou hépatique) et le troisième stade est la schizogonie érythrocytaire qui se produit tous les deux chez l'hôte intermédiaire.

La deuxième stratégie adoptée par le parasite est la dispersion et l'invasion des cellules hôtes. Cette stratégie inclut : les stades mérozoïte, sporozoïte et ookinète du parasite.

La troisième stratégie est la reproduction sexuée impliquant la formation des gamétocytes chez l'hôte vertébré, elle est complétée lors de la formation de l'ookinète chez l'anophèle femelle après un repas sanguin.

Les trois stratégies du parasite sont indiquées dans le cycle de vie ci-dessous chez le moustique et chez l'hôte humain (**Figure 3**).

### 3.3.1. Cycle sexué chez le moustique : sporogonie

Un repas sanguin sur un hôte humain infecté est nécessaire à l'*Anophèle* femelle pour ingérer le parasite sous forme de gamétocytes mâles et femelles. Le moustique se révèle alors infecté et le cycle sexué de reproduction du parasite peut commencer.

Les gamétocytes se transforment en gamètes qui, après fécondation, aboutissent à la formation d'oocystes, et cela moins de 24h après le repas sanguin. Chaque oocyste formé se divise et se multiplie afin de libérer, 4 à 15 jours après le repas sanguin, plusieurs milliers de sporozoïtes qui iront coloniser les glandes salivaires. C'est à partir de ce moment que le moustique est infectieux pour l'homme. En effet, tout nouveau repas sanguin sera accompagné d'une libération des sporozoïtes chez l'hôte humain via les sécrétions salivaires.

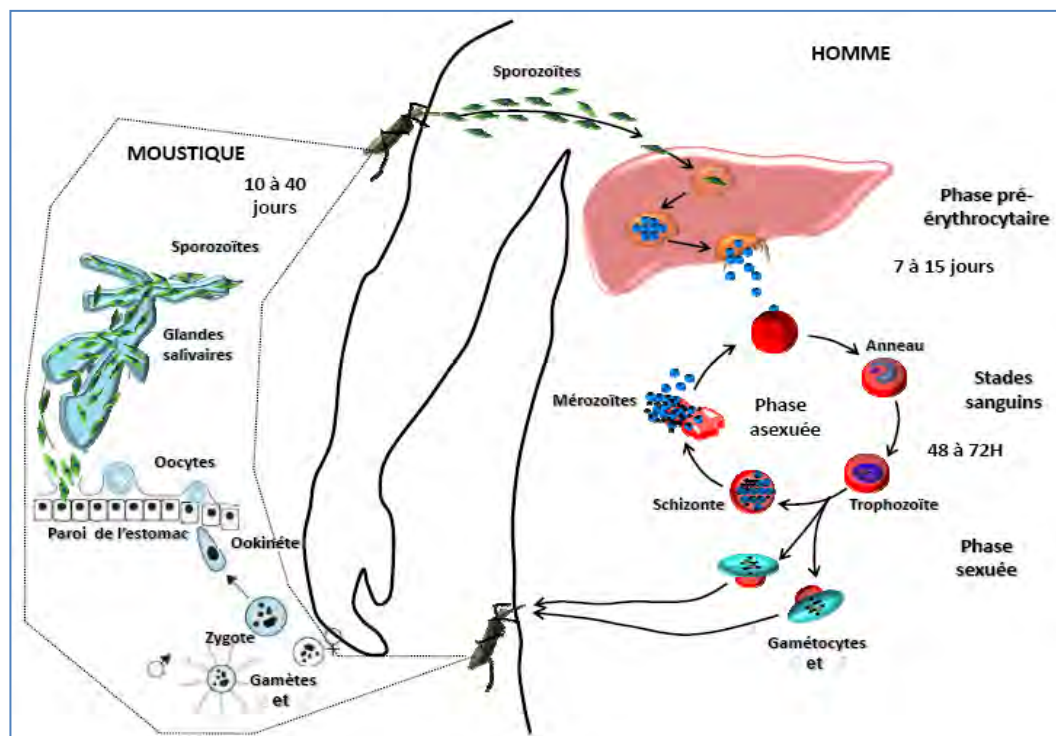
### 3.3.2. Cycle asexué chez l'homme : schizogonie

Après une piqûre infectante, les sporozoïtes injectés dans les capillaires cutanés atteignent le foie. Seuls ceux ayant réussi à pénétrer dans les hépatocytes pourront continuer leur développement. C'est la phase de réplication intra-hépatique (**figure 3**). Elle est totalement asymptomatique et dure six à quinze jours. Elle se termine par l'éclatement des hépatocytes infectés qui permet la libération d'un grand nombre de mérozoïtes dans la circulation sanguine. A la différence des autres espèces, *P. falciparum* présente une particularité importante lors de cette phase. Elle ne donne pas les formes de persistance hépatique appelées hypnozoïtes. Pour les autres espèces plasmodiales comme *P. vivax* et *P. ovale*, cette caractéristique explique les rechutes. Libérés dans le sang, les mérozoïtes envahissent des GR, pour initier le cycle de réplication intra-érythrocytaire (**figure 3**). C'est un processus cyclique,

allant de l'invasion d'un GR à son éclatement, permettant ainsi la libération d'une trentaine de nouveaux mérozoïtes qui pourront coloniser d'autres GR.

Cette phase du cycle dure 48h pour *P. falciparum* et le parasite initialement présent sous la forme d'un mérozoïte libre passe après invasion par différentes stades : anneau, trophozoïte, schizonte et rosace. Ces formes asexuées du cycle érythrocytaire sont donc responsables de la morbidité et mortalité.

La rosace est le stade de maturation ultime qui correspond à un schizonte sur le point d'éclater pour libérer de nouveaux mérozoïtes. L'éclatement des GR, provoquant l'anémie, est à l'origine des nombreux symptômes cliniques du paludisme. Pour alimenter le cycle hôte-vecteur, certains anneaux vont se différencier en gamétocytes mâles et femelles. Ces formes non pathogènes pour l'homme pourront circuler dans le sang pendant plusieurs semaines après la fin de l'infection. Elles pourront être ingérées par un vecteur compétent lors d'un repas sanguin, infectant alors l'*Anophèle* et permettant ainsi la propagation de la maladie.



**Figure 3 :** Cycle de développement de *P. falciparum* [24]

## 4. PATHOLOGIE DE L'INFECTION PALUSTRE

### 4.1. Caractéristiques cliniques

*P. falciparum* est responsable de deux formes de paludisme : l'accès palustre simple et les formes graves.

Dans les zones endémiques, le paludisme simple se produit chez les personnes semi-immunes alors que le paludisme grave et celui associé à la grossesse affectent les personnes non-immunes et notamment les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes [25].

#### 4.1.1. Accès palustre simple

La primo invasion apparaît chez un sujet non immun et le temps d'incubation est de 7 à 21 jours et parfois plusieurs mois. Elle est cliniquement muette. Lors de la phase d'état, la fièvre est la manifestation classique. Elle est observée au cours de l'étape sanguin du cycle parasitaire. Avec l'éclatement des schizontes intra-érythrocytaires, il y a une libération des mérozoïtes, d'un pigment plasmodiale appelé hémozoïne et de différentes endotoxines aux propriétés pyrogènes comme la *PfGPI*. Ces substances sont à l'origine d'une inflammation et d'une fièvre [26]. La crise débute brutalement par des frissons intenses et des tremblements. La fièvre atteint 40 à 41°C dans le paludisme à *P. falciparum* et persiste généralement pendant 2 à 4h. Elle est suivie d'une hypersudation.

Ces accès de frissons et de fièvre intermittents sont observés et ils peuvent devenir périodiques survenant toutes les 48h pour les infections dues à *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale* (fièvre tierce), tandis que pour celles causées par *P. malariae* l'intervalle entre les crises de 72h (fièvre quarte).

En dehors de la fièvre, on peut observer des céphalées, des douleurs articulaires, des myalgies, une anémie et même un ictère, accompagné souvent de nausées et de vomissements.

Un accès dû à *P. falciparum* peut à tout moment se transformer en une forme grave surtout chez les enfants et les personnes non immunes [27].

#### **4.1.2. Formes graves du paludisme**

Les formes graves du paludisme grave résultent probablement d'une combinaison de facteurs spécifiques du parasite: adhérence, séquestration dans le système vasculaire et libération de molécules bioactives ; mais aussi de la réponse inflammatoire de l'hôte avec notamment la production de cytokines, chémokines et d'infiltrats cellulaires [1].

Deux formes majeures caractérisent le paludisme sévère : l'anémie sévère et le paludisme cérébral ou neuropaludisme.

La pathogénie du paludisme cérébral est attribuée à la cytoadhérence des érythrocytes infectés aux cellules endothéliales des micro-vaisseaux du cerveau entraînant l'obstruction puis la rupture vasculaire. Un des mécanismes de la pathogenèse du paludisme grave est l'acidose métabolique qui entraîne la détresse respiratoire. Différentes études ont montré que l'acidose métabolique est un bon facteur prédictif de la mortalité due au paludisme sévère [28]. La pathogénie de l'acidose métabolique est mal connue.

Les cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle central dans les manifestations cliniques du paludisme cérébral. L'IL-10 aurait un rôle protecteur dans le paludisme cérébral [29]. Par contre, une cytokine comme le TNF- $\alpha$  est plutôt associée à une susceptibilité au neuropaludisme [30]. Le rôle d'IFN- $\gamma$  est ambigu. Cette cytokine est associée à la fois à la pathogenèse et à la protection contre le paludisme chez l'homme [31].

Un autre mécanisme impliqué dans la pathogenèse du paludisme cérébral est l'induction du monoxyde d'azote (NO), qui serait responsable d'une hypotension intracrânienne liée à une dilatation excessive des vaisseaux sanguins (vasodilatation) mais aussi à une neurotransmission aberrante [32].

## 4.2. Pathogénèse du *Plasmodium*

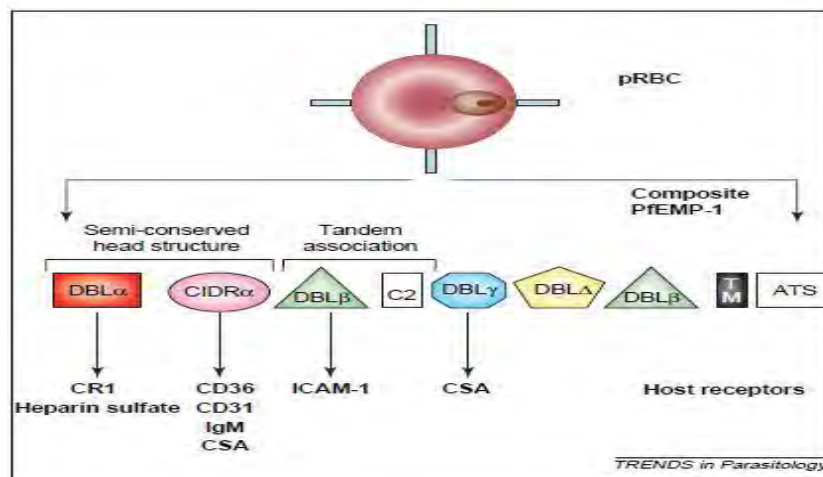
Chez l'homme, le parasite a besoin de proliférer et de survivre sans être détruit par la réponse immunitaire de l'hôte. Il utilise ainsi différents mécanismes lui permettant de contourner le système immunitaire de l'hôte et cela aboutit à l'apparition des signes cliniques de la maladie.

Les mécanismes les mieux connues incluent notamment la cytoadhérence ou la séquestration, la formation de rosettes et la variation antigénique.

### 4.2.1. Hypothèse de la séquestration

La séquestration consiste au mécanisme par lequel les globules rouges infectés se lient à l'endothélium des veinules post-capillaires de tissus profonds comme le cerveau, le foie, le rein.... La surface du globule rouge infecté est recouverte d'excroissances appelées Knobs qui sont le point de contact avec les cellules hôtes. Une protéine du parasite, *PfEMP1* assure sa liaison avec divers récepteurs [33]. Elle est codée par la famille des gènes variables *var*, comprenant environ 60 loci polymorphes du génome de *P. falciparum* [34].

Cette séquestration du globule rouge infecté dans la micro vascularisation des organes vitaux est caractéristique du paludisme à *P. falciparum*. Lorsqu'elle a lieu dans le cerveau, elle entraîne un coma souvent mortel [35]. L'adhérence des GRp dans le cerveau impliquerait des récepteurs de l'hôte tels que le CD36 et l'ICAM1 (**Figure 4**)



**Figure 4 :** Molécules du parasite et de l'hôte impliqués dans la séquestration du globule rouge infecté par *P. falciparum* [1].

En outre, la séquestration des parasites dans le placenta est assurée par l'adhésion au sulfate de chondroïtine A (CSA).

#### **4.2.2. Phénomène du « rosetting »**

Les globules rouges infectés peuvent se lier à des globules non infectés pour former des rosettes. Si la liaison se fait entre globules rouges infectés, on parle d'agglutination. Agglutination et rosettes sont associées au paludisme sévère et à l'anémie [36]. Le récepteur du complément (CR1) a été identifié comme un important récepteur de PfEMP1 dans la formation des rosettes [37].

#### **4.2.3. Variation antigénique**

La variation antigénique a été découverte chez *P. knowlesi* [38]. PfEMP1 est impliquée dans la variation antigénique du paludisme à *P. falciparum*. Avec environ 60 gènes *var* codant pour PfEMP1 et un seul gène *var* dominant exprimé au stade adulte du parasite, PfEMP1 a atteint une forme de variabilité qui permet au parasite de contourner le système immunitaire de l'hôte. De plus, les fréquentes recombinaisons et remaniements génétiques au cours des processus de fusion et de division dans le moustique et les érythrocytes humains peuvent entraîner une grande diversité génétique et antigénique du parasite [39]. L'affinité d'un PfEMP1 à certains récepteurs de l'hôte pourrait déterminer la virulence du parasite [40]. Cette hypothèse est appuyée dans le cas du paludisme placentaire par le biais de DBL- $\gamma$  et  $\beta$  (Duffy Binding-Like) qui assurent l'adhésion du parasite au tissu placentaire à travers le CSA ou les immunoglobulines non-immunes. Un autre exemple appuyant la même hypothèse est l'existence chez le parasite 3D7 des domaines CIDR $\alpha$  (Cysteine-rich Inter-domain regions) qui ont une affinité pour les récepteurs CD36 [41]. Ce qui revient à dire que certains parasites peuvent être plus virulents que d'autres et des souches de parasites tels que 3D7 qui ont plus de gènes *var* conservés dans leur centromère pourraient être plus virulents [39].

## **5. REPONSE IMMUNE**

### **5.1. Notion de prémunition**

Les individus vivants dans les zones de forte endémicité développent une immunité contre le paludisme. En effet, les enfants âgés de plus de cinq ans et les adultes sont résistants au paludisme clinique et à la mortalité, tout en demeurant sensibles à l'infection [10].

Ce phénomène appelé « prémunition », a été définie en 1924 (Sergent, 1924). C'est une protection très lente à s'acquérir et qui dépend d'une pression constante du parasite. Elle se crée en 2 temps :

- acquisition d'une immunité clinique qui protège contre les symptômes graves de la maladie sans diminuer fortement la parasitémie ;
- acquisition d'une immunité antiparasite maintenant la parasitémie à un faible niveau permettant le portage asymptomatique [10].

Dans les zones de fortes endémies, on observe l'apparition d'une immunité protectrice contre les accès graves non cérébraux dès la première ou deuxième infection. Celle-ci s'instaure donc rapidement contre les formes graves mais plus lentement contre les accès simples.

En plus de la lenteur de son acquisition qui dure de 6 à 15 ans selon l'intensité de la transmission palustre, la prémunition est délétère et nécessite des piqûres infectantes régulières pour être maintenue. A cela se rajoute une spécificité d'espèces il n'y a pas d'immunité croisée entre les différentes espèces plasmodiales [42].

Cette immunité antipalustre n'est jamais totale, elle disparaît chez les adultes qui quittent la zone d'endémie palustre, suggérant que l'exposition constante aux antigènes du parasite est nécessaire pour la mise en place de la mémoire immunologique mais aussi de son entretien.

Dans les zones de faible endémie ce niveau d'immunité n'est pas atteint et quel que soit son âge, l'individu est susceptible de faire des accès sévères.

### 5.1.1. Mécanismes effecteurs de protection contre le paludisme

L'immunité antipalustre se développe contre tous les stades du cycle parasitaire et notamment ceux pré-érythrocytaire et érythrocytaire.

### 5.1.2. Immunité contre les stades pré-érythrocytaires

L'immunité anti-stades pré-érythrocytaires serait dirigée contre le sporozoïte libre et le schizonte intra-hépatique.

En zone endémique, l'exposition irrégulière aux sporozoïtes est peu probable pour que l'immunité pré-érythrocytaire soit acquise naturellement.

Chez l'homme et dans des modèles expérimentaux d'infection, il a été démontré que l'injection de sporozoïtes irradiés permet une résistance complète contre l'infection [43]. Cette réponse immunitaire est plus forte que l'immunité acquise naturellement. La différence pourrait s'expliquer d'abord par le grand nombre de sporozoïtes utilisés avec des centaines ou des milliers par la vaccination par rapport à 1 à 100 sporozoïtes par piqûre dans les infections naturelles [44] et par une persistance de sporozoïtes atténués dans le foie [45] .

L'immunité dirigée contre les stades pré-érythrocytaires est médiée par les anticorps. En effet, les anticorps anti-sporozoïtes agiraient, par le mécanisme d'opsonisation éliminant le parasite avant qu'il n'atteigne l'hépatocyte ou en bloquant l'invasion de ces hépatocytes. Une réponse immunitaire à médiation cellulaire a été également décrite [46].

Les modèles murins ont permis une meilleure compréhension des mécanismes effecteurs mis en jeu, pendant cette phase **Doolan et Hoffman** ont montré au moins cinq mécanismes de protection distincts avec les lignées de souris consanguines [47].

Chez les souris C57BL/6, la protection contre la maladie dépendrait des cellules TCD4<sup>+</sup> et NK. Les cellules CD8<sup>+</sup> seraient aussi impliquées. Elles agiraient via l'induction de cascades cellulaires et cytokiniques incluant :

les cellules T CD4<sup>+</sup>, les cellules NK, des cytokines comme IL-12 et IFN- $\gamma$  et des substances telles que le NO.

La complexité de la réponse cellulaire décrite chez les souris existe aussi chez l'homme, avec un mécanisme de protection différent. Dans une étude faite en Gambie, **Reece *et al*** ont montré que la sécrétion de l'IFN- $\gamma$  par les cellules T CD4<sup>+</sup> en réponse à une stimulation par une séquence conservée de CSP, était associée à la fois à la protection contre l'infection et contre la maladie [48].

### 5.1.3. Immunité contre les stades érythrocytaires

Le stade érythrocytaire du parasite est marqué par l'invasion des globules rouges. C'est une étape clé de l'infection palustre. Elle est susceptible d'être aussi une importante cible pour les réponses immunes protectrices. La preuve du rôle de médiateurs des anticorps dans l'immunité antipalustre provient d'études de transfert passif d'immunoglobulines contenues dans les sérums d'adultes immuns utilisés avec succès pour traiter les patients atteints de paludisme grave [49].

Les anticorps pourraient empêcher l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes par différents mécanismes : opsonisation favorisant leur phagocytose par les macrophages, destruction par le complément, inhibition du processing des protéines d'invasion ou blocage de leurs sites de liaison sur les érythrocytes.

Chez l'homme, les anticorps cytophiliques (IgG<sub>1</sub> et IgG<sub>3</sub>) peuvent en collaboration avec les monocytes détruire les globules rouges infectés par le mécanisme d'immunité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCI).

**Osier *et al*** ont montré qu'une forte réponse humorale qui était associée à la protection contre le paludisme et que les associations les plus fortes étaient obtenues en combinant les réponses dirigées contre MSP2 et MSP3 [50]. Le rôle des anticorps dirigés contre les antigènes du mérozoïte dans la protection contre le paludisme demeure controversé. En effet, certaines études suggèrent que les anticorps dirigés contre des épitopes des protéines telles que MSP1, MSP2 et

AMA1 [51] mesurées par ELISA peuvent être des marqueurs de la protection contre le paludisme clinique, d'autres études ne corroborent pas ces résultats [52].

Les mérozoïtes libres et les hématies infectées, n'exprimant pas à leurs surfaces de molécules HLA, sont souvent négligés comme cibles pour des réponses immunes protectrices à médiation cellulaire. Cependant l'un des résultats les plus étonnants sur le rôle de l'immunité à médiation cellulaire dans la protection contre le paludisme a été la démonstration faite par **Pombo et al** que les personnes non immunes infectées à plusieurs reprises par des doses ultra faibles de parasites au stade sanguin puis traités, développent une immunité subséquente en l'absence de réponse anticorps détectable [53]. Dans cette étude, les personnes protégées présentaient de fortes proliférations lymphocytaires T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup>, une réponse cytokinique composée d'IFN- $\gamma$ , mais une absence d'IL-4 ou d'IL-10 et la production de fortes concentrations de NO par les cellules mononuclées du sang [53].

Le rôle des cellules T spécifiques de *Plasmodium* a été mis en évidence grâce au transfert adoptif de la protection en absence de réponse humorale détectable [54]. En outre, les cellules T ont la capacité d'inhiber la croissance du parasite *in vitro*.

La réponse immune cellulaire débute par l'activation des cellules T CD4<sup>+</sup> dans la rate, après la présentation antigénique par les Cellules dendritiques. L'immunité cellulaire T est régulée par l'IL-12 et fait intervenir IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  qui, induisent la phagocytose des globules rouges infectés ainsi que la mort des parasites intracellulaires via la synthèse de NO et des radicaux oxygénés produits les neutrophiles et les macrophages. La destruction des parasites a lieu essentiellement dans la rate [55].

L'IFN- $\gamma$  sécrétée par les cellules T peut également contribuer à produire des anticorps cytophiliques intervenant dans l'immunité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCI) [56].

La contribution relative de l'immunité humorale et cellulaire dépend à la fois du parasite, de l'hôte et de la complexité de la relation hôte parasite.

Chez les souris, l'immunité chez *P. yoelii* est principalement assurée par les anticorps alors que chez *P. chabaudi*, elle est essentiellement à médiation cellulaire. Il est probable que les humains diffèrent entre eux par le type de mécanisme effecteur mis en jeu dans la réponse immune protectrice contre le parasite. Il est possible que différents mécanismes effecteurs opèrent pour différentes souches de parasites [57].

## **5.2. Rôles des cellules immunitaires**

### **5.2.1. Rôle des lymphocytes**

Leur rôle dans le contrôle de la parasitémie et de la maladie n'est pas totalement compris. Il semble qu'ils y interviennent soit directement par une activité cytotoxique surtout sur les formes intra-hépatiques (cellules T CD8<sup>+</sup>), soit indirectement par le contrôle et l'activation d'autres cellules effectrices via les lymphokines (cellules T CD4<sup>+</sup>).

Cette dernière action concerne la régulation de la production des Ac. Mais, la réponse des lymphocytes T varie considérablement en fonction des fluctuations du niveau de transmission.

Chez les enfants vivant en zone d'endémie, il a été démontré une augmentation de l'expression de marqueurs solubles d'activation des lymphocytes T qui serait plus prononcée chez les individus ayant eu précédemment le moins de contact avec le parasite.

Paradoxalement, l'infection à *Plasmodium* est associée à une réduction de la prolifération *in vitro* des cellules T périphériques sensibilisées aux Ag malariques [58]. Cette anergie peut s'expliquer par une augmentation de l'apoptose des lymphocytes T chez les sujets infectés [59] et/ou par une

déplétion des clones de lymphocytes compétents du sang périphérique proportionnellement à la sévérité de la maladie [60].

Seule une partie des cellules T serait activée, les cellules T auxiliaires CD4<sup>+</sup> ayant un rôle fondamental dans la commutation isotypique [61].

Il existe deux principales sous populations de lymphocytes T auxiliaires CD4<sup>+</sup> : Th1 et Th2 spécifiques d'Ag de *Plasmodium* identifiées chez la souris et chez l'homme à travers leur profil de sécrétion des cytokines, différent. Elles sont mutuellement exclusives car chacune inhibe la différenciation et la prolifération de l'autre (balance Th1/Th2) par un contrôle sur la production de cytokines et sur l'expression des molécules du CMH de classe II à la surface de cellules présentatrices de l'antigène [61].

Cette distinction est importante, car l'engagement de la réponse immunitaire dans l'une ou l'autre de ces voies détermine la capacité de résistance d'un organisme à un pathogène comme *Plasmodium*.

L'implication de ces deux sous populations dans l'immunité antipalustre chez l'Homme n'est pas clairement définie. Les lymphocytes Th1 seraient impliqués dans la réponse immunitaire dirigée contre les stades pré-érythrocytaires et érythrocytaires [62].

Lorsqu'elles sont activées par les Ag parasitaires, elles secrètent entre autres des médiateurs comme l'IL-2, l'IFN- $\gamma$ , la lymphotoxine ou TNF- $\beta$  et l'IL-3.

Les cytokines produites par les lymphocytes Th2 sont l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 et l'IL-13 qui favorisent la production d'Ac. Certaines cytokines peuvent être produites à la fois par les Th1 et les Th2 : l'IL-3, le GM-CSF et le TNF $\alpha$ .

### **5.2.2. Rôle des monocytes / macrophages**

De même que les lymphocytes T, les cellules de la lignée monocyte/macrophage peuvent interagir avec le développement du parasite par une activité phagocytaire directe, par la phagocytose immune via les Ac ou par le relargage de médiateurs solubles cytotoxiques et de cytokines comme le TNF- $\alpha$  [63].

L'activité phagocytaire directe concerne surtout les parasites libres, elle permet aux macrophages et aux cellules dendritiques de présenter les Ag parasitaires aux cellules T via les molécules du CMH. Ces cellules activent préférentiellement les Th1 [63].

La rupture des GRp constitue un puissant stimulus à travers les toxines parasitaires libérées qui activent les monocytes/macrophages.

Ces derniers produisent trois composés dérivés de l'oxygène et cytotoxiques pour différents micro-organismes: l'ion superoxyde, de l'eau oxygénée et des radicaux hydroxylés.

Ce sont des médiateurs de l'immunité non spécifique et ils endommagent les formes intra-érythrocytaires de *Plasmodium*. Cet effet serait amplifié lorsque les cellules sont traitées avec de l'IFN- $\gamma$ , qui active et augmente la synthèse des radicaux libres [64]. En outre, les macrophages libèrent du monoxyde d'azote, un effecteur cellulaire produit à partir de l'arginine par une réaction enzymatique catalysée par la Nitric Oxide Synthase. Cette enzyme possède trois iso-formes dont deux constitutives et une inductible.

Le monoxyde d'azote produit par les deux enzymes constitutives jouerait un rôle de messenger secondaire du système nerveux [65] tandis le monoxyde provenant de l'action de la Nitric Oxide Synthase Inductible aurait, comme dans le paludisme, un rôle dans les mécanismes de défenses immunitaires non spécifiques (activité parasiticide pour les stades hépatiques) [66].

L'opsonisation des GRp ou des mérozoïtes par des Ac, suivie par leur phagocytose par les monocytes ou les PNN a été proposée comme mécanisme protecteur contre le paludisme humain [67].

### **5.2.3. Rôles des polynucléaires neutrophiles et des cellules Natural killer**

Les PNN peuvent intervenir dans le contrôle de la parasitémie par une activité phagocytaire pouvant être directe ou médiée par des Ac ; ils élaborent aussi des radicaux cytotoxiques comme les monocytes/macrophages.

En culture, les neutrophiles peuvent phagocyter des débris de globules rouges sans aucun effet sur la parasitémie. Ce n'est que lors de la libération des mérozoïtes qu'ils sont stimulés et qu'ils altèrent le développement des jeunes anneaux.

Il est rapporté que les mérozoïtes libres augmentent les signaux de chimioluminescence produits par les PNN, traduisant une hausse de l'activité phagocytaire. L'utilisation de sérums hyper-immuns ainsi que le prétraitement des cellules par l'IFN- $\gamma$  amplifie l'intensité de phagocytose [68].

La stimulation des PNN par cette cytokine active leur dégranulation ; la production d'acides arachidoniques, de leucotriènes et de radicaux oxygénés potentialise cet effet en augmentant leur activité phagocytaire immune.

Les lymphocytes NK ou « *Natural Killer* » constituent un groupe cellulaire très hétérogène avec un rôle potentiel comme ligne de défense contre l'infection, qui reste encore incertain pour *Plasmodium*. Néanmoins, certaines études indiquent que ces lymphocytes NK pourraient intervenir en tant que cellules effectrices et régulatrices de l'immunité antipalustre.

Dans les modèles murins, elles sont impliquées dans l'élimination des stades pré-érythrocytaires et érythrocytaires du parasite [69].

La production rapide d'IFN- $\gamma$  est importante pour le pronostic évolutif de la pathologie. Des études récentes suggèrent que les cellules *natural killer* (NK) pourraient être l'une des sources de cette production précoce d'IFN- $\gamma$ .

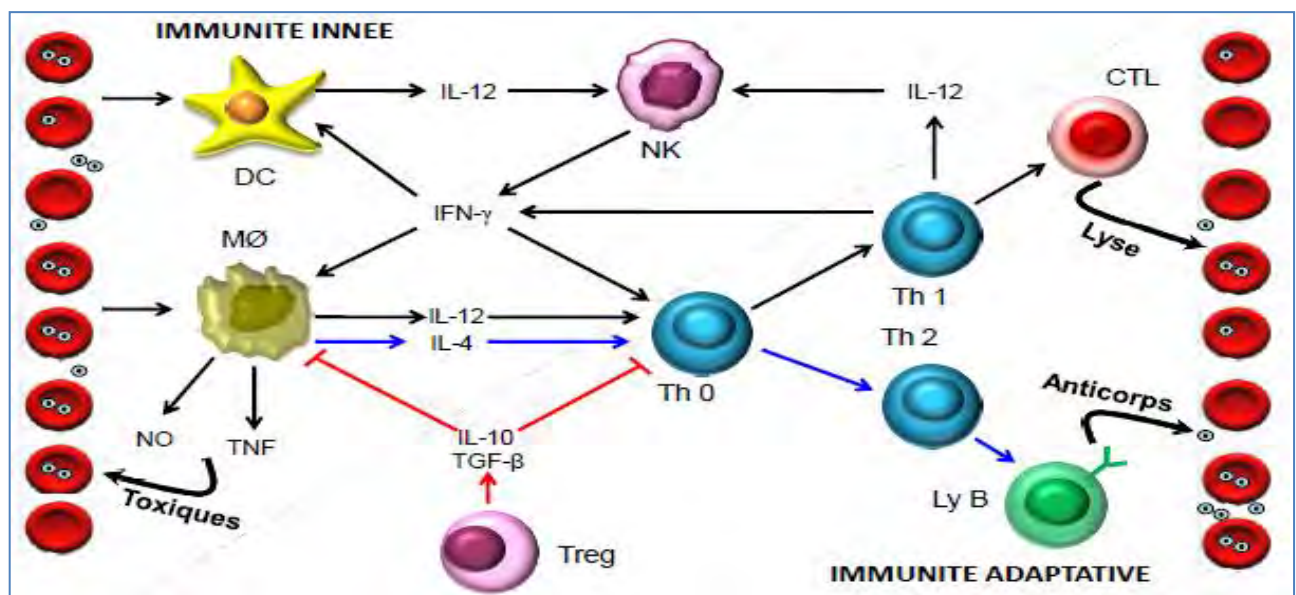
Plus connues pour leur rôle dans l'immunité anti tumorale et antivirale, les cellules NK, sembleraient jouer un rôle prépondérant dans l'immunité innée observée au cours des infections palustres précoces.

Les cellules NK augmentent particulièrement en nombre et sont capables de détruire *in vitro* les globules rouges parasités par *P. falciparum in vitro* [70].

Une récente étude vient de montrer que les cellules NK provenant du foie sont capables de détruire les cellules hépatiques parasitées par des

sporozoïtes, alors qu'elles sont incapables à détruire les globules rouges parasités par des trophozoïtes [71].

Les cellules NK sont aussi de puissantes productrices de cytokines telles que l'IFN- $\gamma$ . Cette capacité à produire l'IFN- $\gamma$ , qui conduit à l'activation parasiticide des macrophages, pourrait être de grande importance pour l'immunité innée contre le paludisme. En effet l'IFN- $\gamma$  augmente la potentialité des cellules NK à détruire les globules parasités de l'hôte [72].



**Figure 5 :** Rôle des cellules effectrices et des cytokines dans l'immunité contre les stades sanguins de *P. falciparum* [73].

#### 5.2.4. Effets immunoprotecteurs des cytokines

Dans l'infestation par *Plasmodium* la réponse inflammatoire est nécessaire pour éliminer le parasite. Cependant, elle peut conduire à des lésions tissulaires considérables.

L'activation des phagocytes pour l'élimination des parasites intracellulaires ou extracellulaires, nécessite la production des cytokines inflammatoires, ce qui peut provoquer des effets systémiques tels que l'anémie sévère ou le paludisme cérébral [74]. Le pronostic d'une infection palustre dépend d'un délicat équilibre entre une induction appropriée ou inappropriée de ces médiateurs.

L'IFN- $\gamma$  possède aussi une action antiparasitaire.

Cette action n'est pas toujours directe, mais souvent associée à l'activation des cellules effectrices. *In vitro*, il augmente l'activité des monocytes/macrophages et des neutrophiles [68], en stimulant la phagocytose et la production de NO, de radicaux oxygénés mais aussi celle du TNF- $\alpha$  (**Figure 5**). *In vivo*, l'injection d'IFN- $\gamma$  entraîne une protection partielle des modèles murins et simiens contre l'infection par respectivement les sporozoïtes de *P. berghei* et de *P. cynomolgi*, alors que chez la souris, sa déplétion inhibe la protection.

En zone endémique, l'IFN- $\gamma$  est associée à la protection contre la réinfection, ou à une diminution de l'infection. Toutefois dans d'autres études, sa production *in vitro* est associée au risque d'accès palustre simple [69].

TNF- $\alpha$  sécrétée surtout par les monocytes/macrophages activés lors de l'infection par *Plasmodium*, agit sur un grand nombre de cellules et exerce différents rôles dans la réponse immunitaire anti-plasmodiale.

Le TNF- $\alpha$  possède une action antiparasitaire directe sur les stades érythrocytaires en inhibant leur croissance *in vitro* et *in vivo*.

Il favorise l'élimination des mérozoïtes et des stades sanguins par les cellules effectrices en stimulant la phagocytose et la production de radicaux oxygénés [68]. Des doses faibles de TNF- $\alpha$ , injectées à des souris infectées par *P. chabaudi* ou *P. yoelii*, diminuent la parasitémie et empêchent l'apparition des signes de paludisme grave.

De plus, les propriétés pyrogènes du TNF- $\alpha$  peuvent aussi être impliquées dans l'inhibition de la croissance de parasite *in vivo*. Lorsque l'on considère les individus ayant des taux modérés de TNF- $\alpha$ , les taux élevés ont été associés à une diminution des niveaux d'infection [75] (**Figure 5**).

L'IL-4 intervient dans la régulation de la production de l'IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ . Elle joue probablement un rôle régulateur important dans l'immuno-protection en inhibant l'activité cytotoxique des monocytes/macrophages et des PNN[68].

En zone d'endémie, la protection clinique contre l'infection a été associée à sa production *in vitro* par les cellules mononuclées et à ses fortes concentrations sériques. Chez la souris, sa production prolongée a été associée à la protection contre l'infection par *P. yoelii* [57].

Dans le cas de l'IL-10, les souris déficientes pour cette cytokine et infectées par *P. chabaudi* présentent des signes de neuropaludisme et une mortalité accrue [76].

Chez l'Homme, l'IL-10 (comme l'IL-4) inhibe les réponses des cellules produisant de l'IFN- $\gamma$  (Th1, NK, lymphocytes  $\gamma\delta$ ) et du TNF- $\alpha$  (monocytes/macrophages). En zone endémique, la production d'IL-10 est associée à la résistance à la réinfection après un traitement curatif antimalarique. Les individus souffrant d'anémie sévère produisent moins d'IL-10 que les individus asymptomatiques [77].

D'autres cytokines semblent aussi impliquées dans la protection contre le parasite ; l'IL-3 active la cytotoxicité des macrophages en favorisant la phagocytose et l'ADCC; l'IL-5 active aussi les lymphocytes B et probablement la production d'Ac, mais c'est aussi le principal facteur d'activation des éosinophiles [78].

### **5.3. Rôles des anticorps**

#### **5.3.1. Fonctions anti-parasites des anticorps**

Outre ces actions « anti-symptômes » par des mécanismes protecteurs potentiels empêchant l'établissement d'une liaison néfaste, les Ac peuvent agir directement sur le parasite ou indirectement en coopération avec certaines cellules du système immunitaire.

##### **5.3.1.1. Actions directes des anticorps sur le parasite**

Deux modes d'actions directes des immunoglobulines sur le parasite sont décrits : l'inhibition de la ré-invasion des globules rouges en culture par les mérozoïtes et l'inhibition intracellulaire du parasite.

##### **❖ Inhibition de la ré-invasion des globules rouges**

Le stade d'invasion du globule rouge par le mérozoïte est une cible privilégiée des immunoglobulines lors de la phase érythrocytaire. Plusieurs études portent sur des Ac qui agissent soit en inhibant l'interaction des molécules du mérozoïte avec des récepteurs spécifiques localisés à la surface des hématies, soit en bloquant l'activité biochimique des Ag impliqués dans la pénétration du globule rouge soit en opsonisant les mérozoïtes pour les rendre moins infectieux [79].

Ces mécanismes ont été, pour la plupart analysés *in vitro* sur culture parasitaire à l'aide d'Ac monoclonaux ou d'immunoglobulines humaines purifiées.

Des protéines localisées à la surface du mérozoïte comme MSP1 et MSP2 ou adsorbés au niveau de sa membrane comme la Protéine S, sont retrouvées dans les complexes immuns formés et les Ac spécifiques dirigés contre elles inhibent *in vitro* l'invasion du globule rouge par les mérozoïtes et diminuent la parasitémie ainsi que ses conséquences cliniques [80]. Certains de ces Ag sont actuellement des candidats vaccins majeurs très étudiés.

Cependant, l'inhibition décrite serait spécifique de souche et tous les sérums d'individus hyper-immuns ne présentent pas d'activités inhibitrices. Certains auteurs rapportent même un effet facilitant de ces immunoglobulines purifiées [81]. La réalité de ces mécanismes n'a pas été appréciée *in vivo* chez l'homme, il reste à prouver que ces Ac y agissent effectivement par blocage de l'invasion et non par d'autres mécanismes.

#### ❖ Inhibition intracellulaire du parasite

La mise en évidence d'un canal reliant la membrane du globule rouge infecté et la vacuole parasitophore et permettant le passage de macromolécules (dont les Ac) ouvre une possibilité d'inhiber la croissance du parasite à l'intérieur de l'hématie [82]. A l'intérieur des globules rouges infectés par des formes âgées, la présence d'Ac capables d'agglutiner les mérozoïtes avant leur dispersion, a déjà été préalablement rapportée ; mais, l'existence de cette voie de transport intracellulaire est discutée [83].

#### 5.3.1.2. Coopération avec les cellules immunitaires

D'autres mécanismes d'action des Ac pouvant contribuer au contrôle de la charge parasitaire sanguine chez les individus prémunis ont été décrits, impliquant une coopération avec des cellules du système immunitaire, notamment les monocytes/macrophages et les polynucléaires.

Parmi ces mécanismes humoraux à médiation cellulaire, on note les phénomènes d'ADCC, d'ADCI et d'opsonisation puis phagocytose des GRp et des mérozoïtes.

#### 5.3.2. Inhibition de mécanisme de pathogenèse

Les Ac peuvent interagir avec l'érythrocyte parasité qui exprime à sa surface des adhésines variantes de *P. falciparum* impliquées dans les phénomènes d'agglutination des GRp, de « rosetting », de cytoadhérence et de séquestration.

Le blocage par une immunoglobuline spécifique peut aboutir à un mécanisme protecteur potentiel.

#### **5.3.2.1. Inhibition de la cytoadhérence et du « rosetting »**

La présence d'Ac reconnaissant l'adhésine de surface du globule rouge infecté a comme conséquence l'inhibition de la cytoadhérence et du rosetting, limitant ainsi l'obstruction des micro-capillaires et contribuant à l'élimination des GRp par la rate, ce qui aboutit en fin à une diminution de la charge parasitaire.

**Udeinya *et al*** ont montré que des sérums de patients hyper-immuns étaient capables d'empêcher *in vitro* l'adhérence de GRp à des cellules de mélanomes [84]. De même, **David *et al*** ont démontré que l'injection à des singes *Saimiri* infectés par *P. falciparum*, de titres importants d'Ac capables de bloquer l'adhérence *in vitro* des parasites à des cellules du mélanome, entraînait la libération des érythrocytes séquestrés [85].

Les GRp d'enfants en cours d'accès cérébral forment des rosettes contrairement aux GRp d'enfants présentant peu ou pas de symptômes neurologiques.

Ces derniers ont des Ac capables d'inhiber la formation des rosettes.

Ces Ac inhibiteurs du « rosetting » sont spécifiques de souches : les Ag parasitaires identifiés comme intervenant dans ce phénomène, ne sont pas exprimés par les souches incapables de former des rosettes, de plus, la capacité à former des rosettes (fréquence et taille) corrélé avec l'intensité des symptômes [86].

#### **5.3.2.2. Fonction antitoxique des anticorps**

L'immunité clinique ou plutôt la « tolérance clinique des fortes charges parasitaires », est dépendante de l'acquisition d'Ac dirigés contre les molécules parasitaires (toxines) responsables de l'induction des mécanismes pathologiques.

Il a été démontré que l'apparition de symptômes comme la fièvre, est lié à la rupture des schizontes qui libèrent des molécules solubles et thermorésistantes, lesquelles induisent la production de TNF- $\alpha$  par les macrophages [75].

Les concentrations sériques de cette cytokine sont globalement corrélées à la gravité de l'accès clinique et les toxines parasitaires responsables de l'induction ont été identifiées comme étant des glycolipides telles que la *Pf*GPI [87].

La réponse immune capable de bloquer l'effet de ces toxines est potentiellement protectrice.

Des sérums de sujets hyper-immuns et des antisérums issus d'une immunisation par des surnageants de culture renfermant ces molécules parasitaires, inhibent la libération accrue de TNF- $\alpha$  observée dans les accès cérébraux. De plus, une différence significative des taux d'IgM dirigées contre les groupements phosphatidyl-inositol a été démontrée entre les enfants en cours d'accès et des enfants asymptomatiques [88].

Chez des souris sensibilisées au TNF- $\alpha$  par un prétraitement à la D-galactosamine, ces molécules de GPI se comportent comme des toxines et induisent un effet létal après injection. Inversement, lorsque ces mêmes souris sont au préalable, immunisées avec des surnageants de culture, elles résistent à l'effet toxique [89].

Ce même type de résultats est trouvé pour un exo-antigène parasite purifié à partir des sérums d'individus hyper-immuns, originaires du Libéria.

L'acquisition des Ac dirigés contre cet exo-antigène atteint une prévalence maximale entre 5 et 11 ans, tranche d'âge qui correspond précisément à l'acquisition de l'immunité clinique [90].

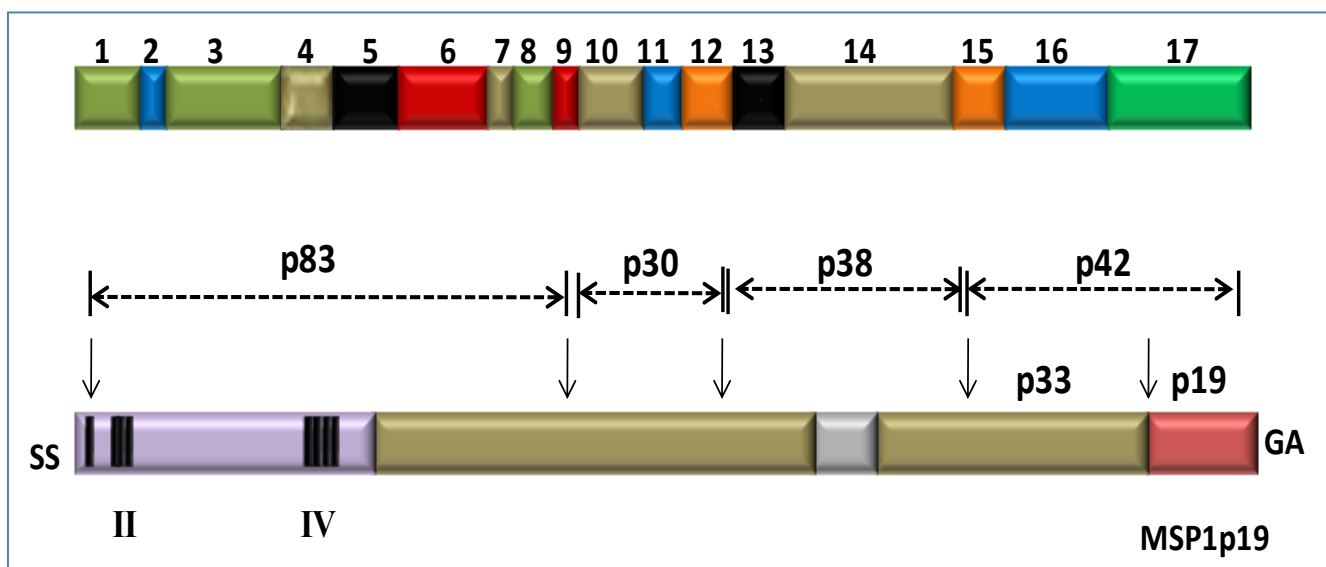
Il est donc plausible d'imaginer qu'en zone de forte endémie, ce type d'Ac participe à l'élaboration et au maintien de la tolérance clinique qui est maximale vers l'âge de 5 ans et qui diminue au fur et à mesure de l'acquisition de l'immunité antiparasitaire.

Ces Ac apparaissent de plus non spécifiques de l'espèce car ils peuvent neutraliser l'effet d'exo-antigènes de *P. yoelii* aussi bien que de *P. falciparum* et *P. vivax*[91] .

#### 5.4. Antigènes de surface de *P. falciparum*

##### 5.4.1. Antigène de surface du mérozoïte 1 (MSP1)

MSP-1 est une grosse protéine qui varie en taille et en séquence d'acides aminés dans différentes lignées parasitaires. La protéine est synthétisée au cours de la schizogonie comme un polypeptide précurseur unique d'environ 200 kDa et exprimé à la surface du parasite intracellulaire. La structure primaire de la protéine a été déduite de l'analyse des séquences des gènes de plusieurs clones de *P. falciparum* [92]. La séquence de la protéine est divisée en blocs numérotés de 1 à 17 (**figure 6**). Il existe trois types de blocs : conservés, semi-conservés et variables.

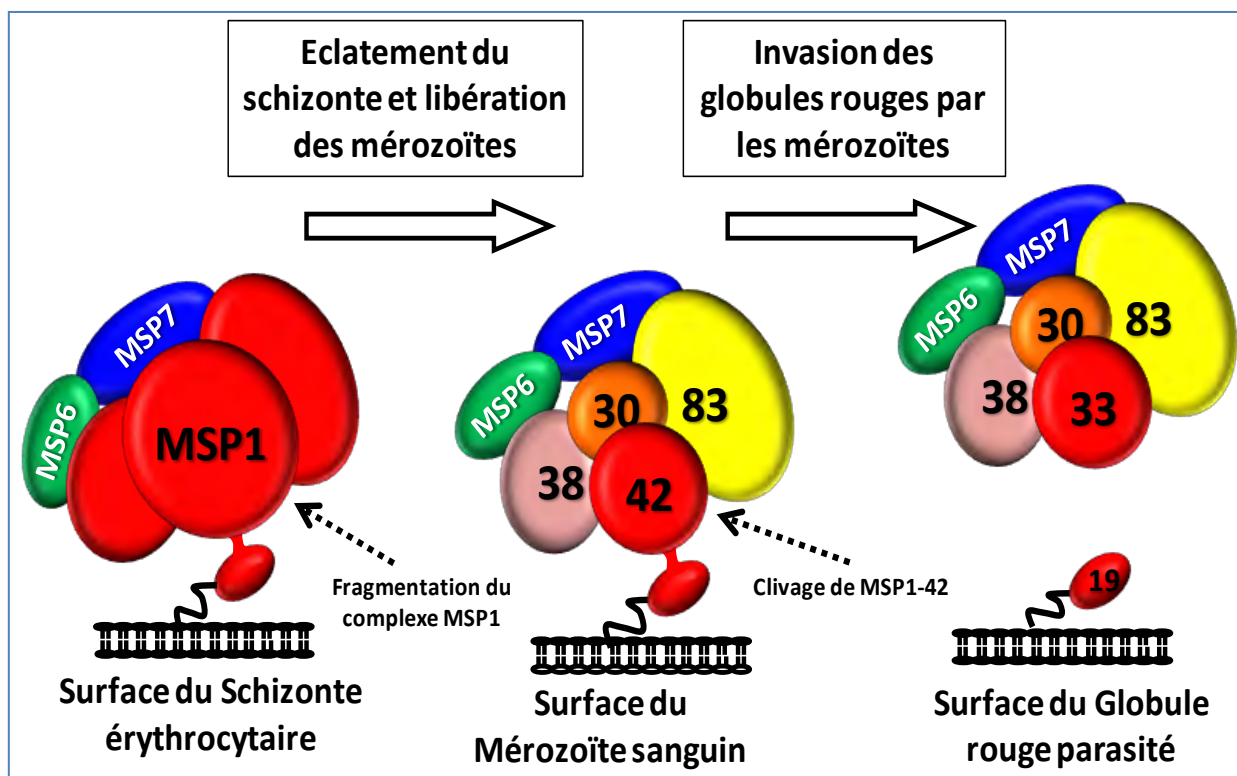


**Figure 6 :** Représentation schématique du gène et des différents fragments de MSP1 de *P. falciparum* [92].

Les blocs 1, 3, 5, 12 et 17 sont très conservés, les blocs 4, 6, 8, 10, 14 et 16 sont variables. Les blocs 7, 9, 11, 13 et 15 sont semi-conservés. Le bloc 4 est l'un des plus variables.

Après sa synthèse, MSP1 est associée à d'autres protéines, en particulier MSP6 et MSP7 à la surface du schizonte et ancrée à la membrane plasmique par le glycosylphosphatidylinositol (GPI).

La protéine subit un premier apprêtement juste avant la rupture des schizontes ; le précurseur polypeptidique de MSP1 est clivé par la protéase subtilisine SUB1 [93] en quatre fragments, 83 (MSP1/83), 30 (MSP1/30), 38 (MSP1/38) et 42 (MSP1/42) qui restent assemblés en un complexe à la surface du mérozoïte (Figure 7).



**Figure 7 :** Formation des différents fragments de MSP1 au cours du cycle sanguin de *P. falciparum* [94].

Lorsque le mérozoïte envahit un globule rouge, un second processing, initié par la subtilisine SUB2 clive le fragment 42 kDa de MSP-1 en deux fragments de 33 et 19 kDa [95]. En conséquence, le fragment MSP1/33 est libéré à la surface

avec le reste du complexe MSP-1 et MSP1/19 est retenu par son ancre GPI à la surface du parasite [96]. (Figure 7).

De nombreuses études ont montré que la région C-terminale de MSP1 est la cible des réponses immunes protectrices. Ces réponses sont médiées par des anticorps. En effet, les expériences d'immunisation dans le modèle d'infection de *P. yoelii* montrent le rôle de certains anticorps monoclonaux et polyclonaux dirigés contre l'extrémité C-terminal de MSP1 dans la protection d'un challenge par les parasites du stade sanguin [97]. Les études *in vitro* confirment que les anticorps monoclonaux ou polyclonaux spécifiques de l'extrémité C-terminal de *P. falciparum* peuvent inhiber l'invasion des érythrocytes [96].

De plus, la vaccination avec les protéines recombinantes de cette région de MSP1, induit une réponse immunitaire protectrice, dans différents modèles tels que, *P. yoelii* [98] ; *P. cynomolgi* [99] et *P. falciparum* [100].

La réponse dirigée contre MSP1 induit trois classes différentes d'anticorps monoclonaux et polyclonaux [101]: anticorps inhibiteurs, anticorps bloquants et anticorps neutres.

Alors que tous les anticorps inhibiteurs se fixent à MSP1, certains anticorps bloquants sont spécifiques d'épitopes formés à partir d'acides aminés qui sont éloignés dans la séquence primaire de la protéine [101].

La présence de ces différentes classes d'anticorps dans les sérums d'enfants développant une immunité antipalustre en zone endémique met en exergue l'importance de la compréhension de la fine spécificité de la liaison de ces anticorps [102].

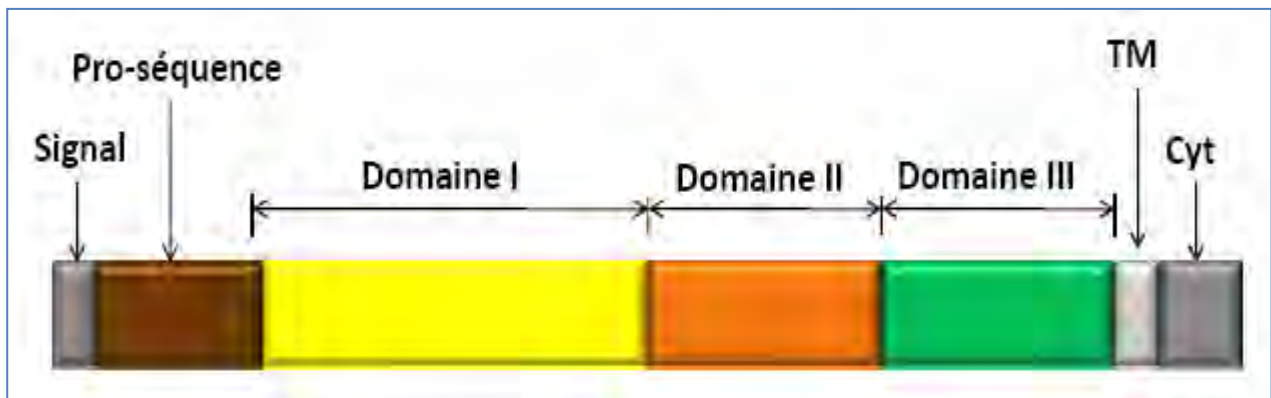
Il a été postulé que l'induction d'anticorps bloquants par *P. falciparum* représenterait un mécanisme d'évasion du système immunitaire de l'hôte [103].

#### 5.4.2. Apical membrane Antigen-1 (AMA1)

AMA1 de *P. falciparum* (PfAMA1) est localisé dans les micronèmes du mérozoïte, organe contenant des récepteurs de l'invasion, ce qui suggère qu'AMA1 pourrait jouer un rôle dans ce processing. La protéine est exprimée en fin de schizogonie au cours du développement érythrocytaire asexué.

PfAMA1 est synthétisée sous forme d'un précurseur de 83 kDa (PfAMA183) qui est converti en PfAMA166 [104]. La protéine se subdivise en trois domaines (DI, DII et DIII) sur la base des ponts disulfures [105] et de sa structure cristalline (Figure 8). La protéine est apprêtée au stade tardif du mérozoïte ou au cours de l'invasion érythrocytaire [106]. Elle jouerait un rôle lors de la réorientation du mérozoïte au cours de laquelle, les organites apicaux sont alignés sur la membrane des érythrocytes [107]. PfAMA1 pourrait également être impliqué dans l'invasion des hépatocytes [108].

PfAMA1 jouerait un rôle dans l'invasion érythrocytaire par l'intermédiaire de son domaine DIII [109]. PfAMA1 présente de nombreux polymorphismes dans ses trois domaines DI, DII et DIII.



**Figure 8 :** Représentation schématique d'AMA1 [109].

La plupart des personnes exposées au *Plasmodium* produisent des anticorps anti-AMA1, leur prévalence augmentant avec l'âge [110]. Chez les individus naturellement infectés par *P. falciparum* la réponse immunitaire humorale est caractérisée par la production d'IgG1 et une faible réponse IgG3. La production d'IgG2 et IgG4 est rarement observée. Les anticorps anti-AMA1 sont essentiellement dirigés contre les domaines DI et DII de la protéine [51] et ces anticorps réagissent avec plusieurs variants alléliques [110].

La réponse anticorps dirigée contre le domaine DIII de la protéine est généralement faible mais augmente chez les adultes. Il a été montré que les IgG dirigées contre une construction d'AMA1 contenant au moins les domaines DI et DII sont associées à un risque réduit de paludisme clinique chez les sujets présentant une parasitémie avant la saison de transmission [51]. Les anticorps anti-AMA1 purifiés de sujets immuns inhibent aussi la croissance des parasites *in vitro* [111]. Dans les populations vivant en zone d'endémie palustre les réponses immunes anti-AMA1 sont souvent beaucoup plus élevées que celles d'autres antigènes de *P. falciparum* tels que MSP1-19, GLURP, MSP3 [112].

La réponse immune cellulaire dirigée contre AMA1 fait l'objet de peu d'études. Une étude suggère que la réponse cellulaire T anti-AMA1 est de courte durée et qu'elle est associée à la protection contre l'infection [113].

#### **5.4.3. RESA**

l'antigène Ring-Infected Erythrocyte Surface Antigen (RESA) ou *Pf*-155 [114]. C'est un Ag qui est initialement localisé au niveau des micronèmes des mérozoïtes et après l'invasion du globule rouge, il est exprimé à la surface de ce dernier, en association au cytosquelette érythrocytaire [115].

La protéine RESA est constituée de trois séquences répétitives qui contiennent toutes des épitopes immunodépendants B dont les réponses en Ac sont dépendantes des cellules T [114].

Nous avons utilisé la protéine RESA exprimée sur *Escherichia coli*, et purifiée par chromatographie d'affinité. C'est un Ag non glycosylé de 155kDa [115].

### **5.5. Hypothèse et objectifs de l'étude**

Le paludisme constitue encore un problème de santé malgré la diminution de la morbidité et de la mortalité. De nombreuses substances antipalustres sont actuellement utilisées dans la prévention et le traitement de ces accès cliniques. Pour répondre aux nombreuses questions relatives à la recherche vaccinale et à l'utilisation de la réponse immunitaire comme outil de diagnostic, dans le cadre d'une approche analytique du paludisme hospitalier, il est nécessaire de se focaliser sur un certain nombre de cibles d'intérêt de *P. falciparum*. Le mérozoïte constitue une cible privilégiée de l'immunité anti-stade sanguin et de nombreux candidats vaccins y sont associés comme MSP1, AMA1 et RESA.

Notre étude a pour objectif principal de mettre en évidence des facteurs immunologiques impliqués dans la survenue des formes cliniques simple ou grave du paludisme, dans des contextes épidémiologiques variables. Cela revient de manière beaucoup plus spécifique à évaluer les variations des taux d'anticorps IgG en tenant compte de facteurs tels que la parasitémie, l'endémicité et l'âge des patients.

# **DEUXIEME PARTIE :**

## **ETUDE EXPERIMENTALE**

## 1. SITES ET CADRE D'ETUDES

### 1.1. Sites de recrutement

Les différents sites de recrutement sont représentés au niveau de la **figure 9** avec les niveaux d'endémicité.



**Figure 9 : Localisation des sites de l'étude [116]**

#### 1.1.1. Louga

Située entre les latitudes 14°70 et 16°10 Nord et les longitudes 14°27 et 16°50 Ouest, la région de Louga couvre une superficie de 24847 km<sup>2</sup>. Elle se place ainsi au troisième rang national derrière les régions de Tambacounda (59602 km<sup>2</sup>) et Matam (29424 km<sup>2</sup>).

La région de Louga fait frontière avec cinq autres régions et présente une façade maritime d'environ 50 kilomètres à l'ouest. La région de Louga est limitée par les régions de Saint-Louis au Nord ; de Diourbel et Kaolack au Sud ; de Matam à l'Est ; et de Thiès et l'Océan Atlantique à l'Ouest.

La pluviométrie est passée de 266 en 2013 à 206,9 en 2014. Durant cette dernière année, le nombre de cas de paludisme confirmé a été de 2 551 [116].

Le recrutement a été fait au niveau du Centre Hospitalier Régional Amadou Sakhir Mbaye de Louga (CHRASML). C'est un hôpital de niveau II constitué d'un Bloc administratif, des services médico-chirurgicaux (laboratoire, radiologie, accueil/urgence, médecine, chirurgie, pédiatrie, maternité, ophtalmologie, stomatologie, kinésithérapie et appareillage orthopédique), service de Maintenance, un service d'Hygiène, buanderie et stérilisation et un service de Pharmacie.

### **1.1.2. Tambacounda**

La région de Tambacounda est située entre 12°20 et 15°10 de latitude Nord et de 11°20 et 14°50 de longitude Ouest. Elle est limitée au nord par la région de Louga, de Saint-Louis et la république de Mauritanie, au sud par la république du Guinée Conakry, à l'ouest par la république du Mali et de la Mauritanie à l'ouest par les régions de Kolda, de Kaolack et de la république de Gambie.

C'est la région administrative la plus vaste du Sénégal avec une superficie de 59602 km<sup>2</sup> soit 30% du territoire national.

Le climat est du type Sahélo-Soudanien caractérisé particulièrement par l'harmattan, chaud et desséchant le jour plus frais la nuit, au sud l'influence de la Mousson se fait sentir. Quant à la pluviométrie, elle varie en conséquence du nord au sud entre 600 et 1300 mm, parfois jusqu'à 1500 mm. Elle est passée de 841,5mm en 2013 à 592,7mm en 2014. Le climat de Tambacounda est caractérisé par une saison sèche qu'on peut considérer comme fraîche de décembre à février. Une saison chaude qui va de mars en juin, durant laquelle les températures à la moyenne, s'élève régulièrement pour atteindre le maximum en mai. Le reste de l'année, particulièrement 5 mois de saisons pluies (de juin en octobre), les températures sont régulières et proches de la moyenne de 28°C.

Le régime hydrographique comprend le Sénégal, la Falémé, la Gambie et leurs influents.

Les ressources en eau proviennent des nappes phréatiques du continental terminal souvent profond et de la nappe captive du Maestrichien exploitable par des forages.

Le recrutement a été réalisé au niveau du CHRTc. C'est un hôpital de niveau II renfermant plusieurs services dont la maternité, l'orthopédie la pédiatrie la réanimation, la chirurgie générale, les urgences, la pharmacie, le laboratoire de biologie médicale (ou sont recrutés les patients).

### **1.1.3. Diamniadio**

La ville de Diamniadio fait partie de la région de Dakar plus précisément dans le département de Rufisque. La région de Dakar est située dans la presqu'île du Cap-Vert, elle est comprise entre les 17°10 et 17°32 de longitude Ouest et les 14°53 et 14°35 de latitude Nord. Diamniadio, de par sa position est une zone de transit située entre la conurbation Bargny-Rufisque-Dakar, les villes de Thiès et de Mbour

La commune de Diamniadio est localisée sur un site de plateau faiblement ondulé. Le relief et la nature imperméable des sols favorisent un ruissellement intense des eaux de pluies. Apparaissent ainsi des sols hydromorphes : ce sont les Niayes.

Le climat de la commune de Diamniadio est caractéristique du climat tropical marqué par l'alternance d'une saison sèche, longue de neuf (9) mois, et d'une saison humide ou hivernage qui dure 3 à 4 mois (Juin à Septembre). La pluviométrie moyenne annuelle entre 1992 et 2002 est de 310 mm. Elle a connu une baisse passant de 161,4mm en 2013 à 566,7mm en 2014 [116].

CHNED est situé à la sortie de Diamniadio en allant vers Thiès.

### **1.1.4. Saint-Louis**

Etendue sur une superficie de 19034km<sup>2</sup>, la région est limitée au Nord par le fleuve Sénégal qui sépare la République du Sénégal et la République

Islamique de la Mauritanie, au Sud par la Région de Louga, à l'Est par la Région de Matam et à l'Ouest par l'Océan atlantique.

La pluviométrie est passée de 366,2 en 2013 à 130,8 en 2014. Durant cette dernière année, le nombre de cas de paludisme confirmé est de 1239 [116].

CHRS� est situé dans le quartier Sud de l'île de Saint-Louis au niveau du delta du fleuve Sénégal.

## **1.2. Cadre de l'étude**

Les prélèvements ont été effectués au niveau des laboratoires de biologie médicale du CHRASML, du CHRS�, du CHNED et du CHRTc. Après centrifugation, les plasmas étaient conservés à – 20°C jusqu'à leur acheminement à Dakar.

Les analyses immunologiques ont été effectuées au niveau de l'Unité Immuno Génétique de l'Institut Pasteur de Dakar (IPD). Il s'agit d'une unité au sein de laquelle, sont menées des études relatives aux facteurs immunologiques et génétiques de l'infection palustre et de cancers notamment ceux du sein, du col de l'utérus et de l'ovaire chez la femme.

## **2. MATERIELS ET METHODES**

### **2.1. Matériels**

#### **2.1.1. Matériels de laboratoire**

- Hotte à flux laminaire vertical.....(FluFrance<sup>®</sup>, France)
- Plaques Maxisorp<sup>®</sup> .....(Nunc<sup>®</sup> Danemark)
- Plaques Immulon<sup>®</sup> .....(Dynatech, Roskilde<sup>®</sup> Danemark)
- Pipettes: 20, 200, 1000µl.....(Gilson Medical Electronics S.A., France)
- Pipettes Falcon 5ml, 10ml .....(Becton Dickinson S.A, USA)
- Pipettes multicanaux de 12 à volume ajustable.....(Costar<sup>®</sup> Cambribge, USA)
- Bac de dilution.....(Mega<sup>®</sup>)
- Autoclave .....(Lequeur<sup>®</sup>)

- Balance de précision .....(Navigator<sup>®</sup>)
- Spectrophotomètre .....(Biorad<sup>®</sup>)
- Centrifugeuse .....(Jouan<sup>®</sup> GR412)
- Etuves à 37°C .....(Napco<sup>®</sup> 6001)
- Microscope optique.....(Leica<sup>®</sup> DMBL)
- Congélateur à -20°C .....(Goldstar<sup>®</sup>)
- Réfrigérateur à -4°C .....(White-Westinghouse<sup>®</sup>)
- Tubes avec EDTA .....(Becton Dickinson S.A, Vacutainer)
- Tubes d'échantillonnage 1,8ml .....(Nunc<sup>®</sup> Denmark)
- Tubes coniques Falcon 15 ; 50 ml .....(Becton Dickinson S.A.)

### 2.1.2. Tampons et réactifs chimiques

- Tampon de “ coating ” : PBS1X

Dissoudre une pastille de PBS (Sigma<sup>®</sup>) dans 100ml d'eau distillée.

- Tampon de lavage : PBS+0,01% de Tween 20 avec pour un litre

H <sub>2</sub> O distillée.....	1000 ml
PBS.....	10 pastilles
Tween 20 (Merck <sup>®</sup> ).....	1 ml

- Tampon de saturation et de dilution des sérums et conjugués :

PBS BSA 1% Tween 1% de pour un litre

H <sub>2</sub> O distillée.....	100 ml
PBS pastille.....	1 pastille
BSA (Sigma <sup>®</sup> ).....	1 g
Tween 20.....	100 ml

- Réactif de révélation :

TMB (3,3',5,5' Tétraméthylbenzidine + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) .....(Eurobio<sup>®</sup>)

TMB peroxidase substrate et Peroxidase substrate solution B

Les deux solutions A et B sont mélangées extemporanément à volume égale

- La solution d'arrêt :

Pour un volume final de 580 ml :

Acide ortho-phosphorique H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (Sigma <sup>®</sup> ).....	20 ml
H <sub>2</sub> O distillée.....	560 ml

- Anticorps conjugués :

Anti-human IgG peroxydase conjugate (Cappel<sup>®</sup>, USA)

### 2.1.3. Sérums témoins

Ce sont des sérums préalablement testés contre les antigènes étudiés ou les extraits totaux de *P falciparum*.

- **Sérums contrôles négatifs** sont au nombre de deux :
  - o Le témoin **NA** ou « Naïf Africain » élaboré à partir de sérums d'individus vivant à Dakar et n'ayant pas une expérience récente ou ancienne d'accès clinique, connue.
  - o Le contrôle **SAB** ou Sérum AB, il s'agit d'un sérum d'humain du groupe sanguin AB connu comme négatif pour les Ac antiparasitaires.
- **Sérums contrôles positifs** sont de deux types :
  - o Le témoin **SHI** ou Sérum Hyper-immun : constitués de plasma prélevés au cours d'enquêtes immuno-épidémiologiques transversales, entreprises chez les populations des villages endémiques de Ndiop et de Dielmo. Ces villages sont situés à environ 280 Km au Sud-Est de Dakar et la transmission palustre y est pérenne avec environ 4,6 à 79 piqûres infectantes par personne et par an respectivement Ndiop et Dielmo.  
Les individus prélevés ont développé une prémunition [117].
  - o Le témoin positif **MH** ou Sérum «Marcel Hommel», il s'agit d'un pool de sérums recueillis chez des africains prémunis vivant dans une zone de forte endémicité palustre. Sa concentration en Ac totaux est estimée à 20 mg/ml et on y retrouve essentiellement des IgG dirigées contre *P falciparum*.

### 2.1.4. Echantillons étudiés

Les échantillons testés ont été obtenu grâce une collecte sur une période de 6 mois allant du mois de Septembre 2014 au mois de Février 2015. Ont été recrutés tous les malades souffrant de paludisme confirmé par la présence de *P. falciparum* dans le sang. Sur l'ensemble des patients colligés, seuls 170 patients ont été sélectionnés pour l'étude. Il s'agit de 120 patients de Tambacounda,

22 de Diamniadio, 18 de Louga et 10 de St-Louis. La présence d'antécédents ou d'infections pouvant interférer sur notre étude, a conduit à l'exclusion des patients concernés.

Pour chaque patient, une prise de sang a été faite sur un tube EDTA. La confection d'une goutte épaisse ou d'un frottis sanguin mince au moment du recrutement a permis la recherche du parasite et l'appréciation de la densité parasitaire. La deuxième fraction centrifugée à 2000 tours/mn pendant 10 mn, a permis d'isolement du plasma et son stockage à -20°C. Ces échantillons de plasmas ont été dilués à 1/100 au moment des dosages d'anticorps.

### **2.1.5. Antigènes étudiés**

Trois antigènes recombinants ont été utilisés dans cette étude. Il s'agit d'antigènes de la phase sanguine du cycle du plasmodium que sont :

- **MSP1** est la protéine utilisée, elle a été produite par génie génétique grâce au système d'expression *Adénovirus/Escherichia coli* qui reproduit la conformation tridimensionnelle de la protéine parasitaire. Nous avons utilisé l'antigène à la concentration de 1mg/ml.
- **AMA1** est une protéine produite aussi de la même façon que le MSP1. La protéine AMA-1 est utilisée aussi à la concentration de 1mg/ml au moment de la sensibilisation des plaques pour l'ELISA.
- **RESA** est une protéine exprimée sur *Escherichia coli*, et purifiée par chromatographie d'affinité. Nous avons utilisé l'antigène à la concentration de 1mg/ml.

## **2.2. Méthodologie**

### **2.2.1. Détermination des densités parasitaires**

Elles ont été obtenues par la réalisation d'une goutte épaisse, à partir d'un prélèvement au bout du doigt, ou d'un prélèvement veineux sur anticoagulant (EDTA). La goutte est séchée à l'air libre ou à l'aide d'un séchoir puis colorée

au MGG 10% après une étape d'hémolyse ou de deshémogloblinisation. Après séchage la lame est lue au microscope optique à l'objectif 100 à immersion.

La lecture se fait par rapport à 200 leucocytes et l'estimation de la densité parasitaire se fait sur les 8000 leucocytes par microlitre de sang.

Les lames sont toujours lues par deux personnes (Technicien, Interne des hôpitaux ou biologiste). La moyenne des deux densités parasitaires est considérée comme la parasitémie.

### **2.2.2. Conservation et transport des échantillons**

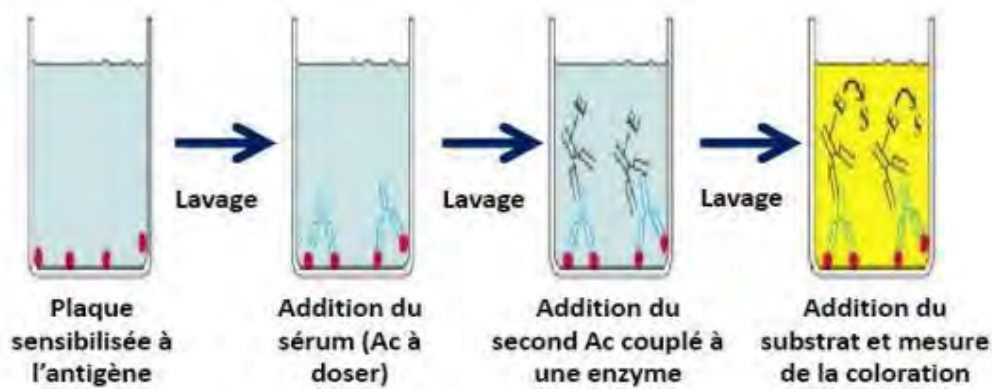
Le sang est recueilli dans des tubes EDTA. Ces derniers sont centrifugés permettant ainsi la séparation des plasmas des culots globulaires. Les plasmas sont conservés à moins 20°C dans des tubes Nunc de 1,8 ml. Le transport des échantillons entre les différents sites et l'institut Pasteur de Dakar a été réalisé à une température allant de 4 à 8°C dans des glacières contenant de la glace. Arrivés à l'IPD les échantillons sont conservés à moins 20°C jusqu'à leur utilisation.

### **2.2.3. Détermination des taux d'anticorps**

La détermination de la concentration en immunoglobulines dirigées contre les différents antigènes étudiées a été faite par la technique ELISA.

#### **2.2.3.1. Principe**

C'est une technique de dosage immunoenzymatique qui repose sur l'utilisation d'antigènes ou d'anticorps fixés sur une phase solide (généralement une plaque en plastique) et permettant de capter l'Ac ou l'Ag de la solution étudiée. L'addition d'immunoglobulines hétérologues conjuguées à une enzyme permet la transformation d'un substrat chromogène en produit coloré dont l'intensité, mesurée en densité optique (DO), est proportionnelle à la quantité d'anticorps fixés.



**Figure 10 : Principales étapes du dosage d'anticorps sériques par ELISA.**

### **2.2.3.2. Mode opératoire**

La méthode ELISA comporte différentes étapes et pour chacune d'elles certaines conditions doivent être respectées :

#### **❖ Sensibilisation des puits de plaque avec l'antigène (Coating)**

Les plaques sont sensibilisées avec 100µl par puits d'antigènes préalablement dilués dans du tampon de dilution.

Ces plaques sont ensuite incubées à 4°C pendant une nuit. La dilution effectuée est variable selon l'antigène et elle est déterminée par une calibration.

#### **❖ Saturation des plaques**

- Laver les plaques 3 fois avec le tampon de lavage et sécher en tapant contre un papier absorbant ;
- Distribuer 150 µl de la solution de blocage dans tous les puits ;
- Incuber pendant 1 heure, les plaques à 37°C.

#### **❖ Addition des premiers anticorps**

- - Laver 3 fois les plaques avec le tampon de lavage et sécher ;
- Pendant la période d'incubation du blocage, diluer les sérums témoins positifs et négatifs et les plasmas de volontaires au 1/100 dans le tampon de dilution ;

- Distribuer 100 µl des sérums et plasmas dilués dans les puits conformément au schéma de plaque ;
- Incuber pendant 1 heure les plaques à 37°C.

#### ❖ **Addition du second anticorps ou conjugué**

- Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et sécher ;
  - Distribuer dans les puits 100 µl du conjugué anti-IgG humaine de chèvre diluée à 1/5000 dans le tampon de dilution ;
- Incuber pendant 1 heure la plaque à la température du laboratoire dans une chambre humide en agitation lente.

#### ❖ **Addition de substrat (TMB)**

- Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et bien sécher.
- Distribuer 100 µl de substrat dans chaque puits.
- Incuber pendant 5 à 10 minutes à l'abri de la lumière.
- Arrêter la réaction en ajoutant 100 µl d'une solution acide ortho phosphorique 1M dans chaque puits.

#### ❖ **Lecture et expression des résultats**

Mesurer les densités optiques (DO) à l'aide d'un spectrophotomètre à 450 nm en (Biorad®).

### **2.2.4. Analyses statistiques**

Les données ont été analysées avec le logiciel Statview® version 5.1. Les comparaisons des niveaux de réponses en Ac dirigés contre les antigènes étudiés et entre les différents groupes de patients ont été effectuées grâce aux tests non paramétriques de Mann Whitney et de Wilcoxon.

La recherche de corrélation a été faite par le test des rangs de Spearman. Une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme significative.

### 3. RESULTATS

#### 3.1. Caractéristiques de la population d'étude

##### 3.1.1. Caractéristiques épidémiologiques

Le tableau I résume les données générales de la population d'étude. Le présent travail a concerné globalement 170 patients. Ces patients infectés par *Plasmodium falciparum* et présentant des signes cliniques, étaient originaires des quatre sites d'étude. Il s'agit de :

- 120 patients recrutés à Tambacounda (70,6%) ;
- 22 patients provenant de Diamniadio (12,9%) ;
- 18 patients recrutés à Louga (10,6%) ;
- 10 patients domiciliés à St-Louis (5,9%).

Les données générales recueillies au moment du recrutement ont permis de noter globalement une prédominance féminine avec 98 femmes contre 73 hommes.

Suivant les localités, cette prédominance féminine est notée chez les patients de Tambacounda et de St-Louis mais, elle disparaît pour le site de Louga (**Tableau I**).

**Tableau I : Données générales de la population d'étude**

	Population globale	Diamniadio	Louga	Tambacounda	Saint- Louis
Effectifs N (%)	170 (100)	22 (12, 9)	18 (10, 6)	120 (70, 6)	10 (5, 9)
Sex Ratio (H/F)	73/98	10/11	13/5	49/55	1/9
Age moyen (ans)	13 (0,003 - 71)	5 (0,027 - 12)	16 (4 - 51)	13 (0,003 - 71)	24 (0,5 - 35)
Adultes/Enfants	46/124	0/22	7/11	33/87	6/4

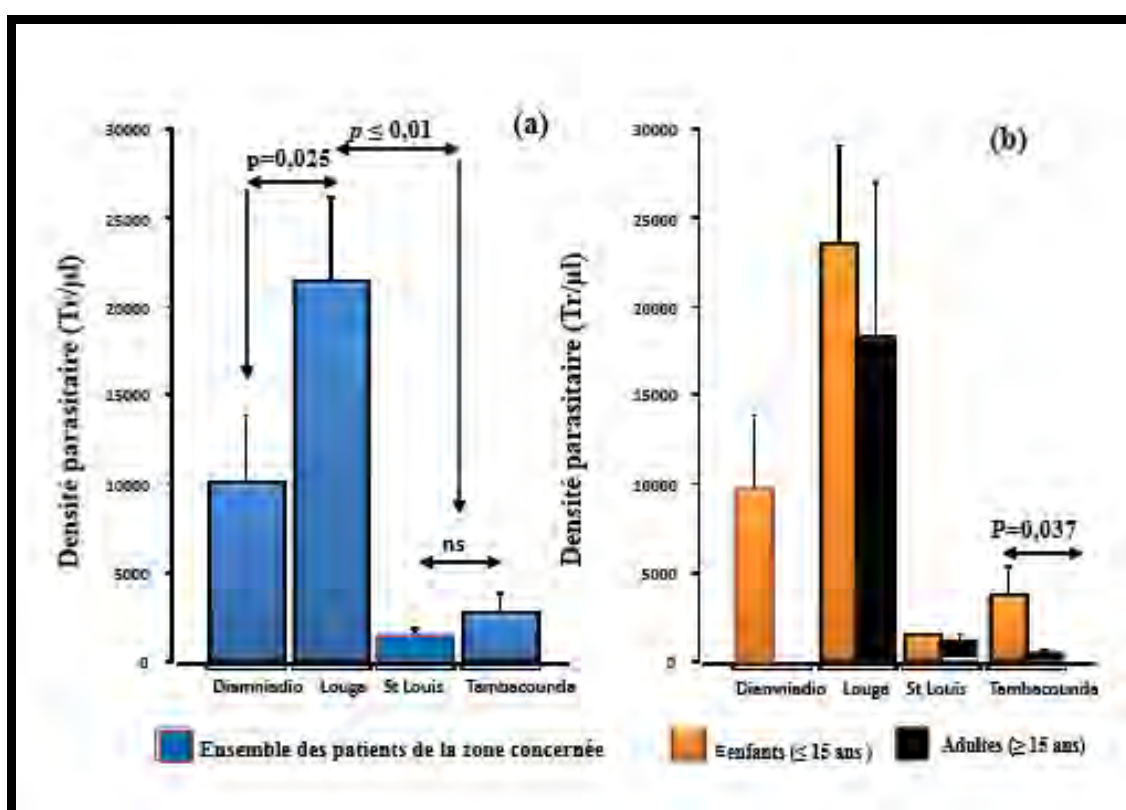
Dans la population globale, une moyenne d'âge de 13 ans a été retrouvée. Cette moyenne d'âge est similaire à celle observée chez les seuls patients recrutés à Tambacounda. En passant de Saint Louis à Louga puis Diamniadio, nos données ont montré une diminution de l'âge moyen avec des valeurs respectivement égales à 24 ; 12 et 5 ans.

La séparation des patients en deux groupes d'âge au seuil de 15 ans a montré que les malades sélectionnés étaient majoritairement des enfants soit les 73% ( $n = 124$  ; âge moyen =  $3,9 \pm 0,4$  ans). Les adultes âgés d'au moins 15 ans représentaient 27% de la population d'étude ( $n = 46$  ; âge moyen =  $33,8 \pm 1,9$  ans). Il convient de signaler que les patients recrutés à Diamniadio étaient tous des enfants (**Tableau I**).

### 3.1.2. Caractéristiques clinico-biologiques

Des densités parasitaires allant de 60 à 102000 P/ $\mu$ l ont été notées sur l'ensemble de la population d'étude (moyenne de 5401 P/ $\mu$ l). Une comparaison des densités parasitaires entre les divers sites de recrutement a montré des taux significativement plus élevés à Louga que dans les autres zones ( $p < 0,01$ ).

Cette variation est beaucoup plus faible entre les patients de Diamniadio et ceux originaires de Louga ( $p = 0,025$ ) (**Figure 11a**).



**Figure 11 : Variations des densités parasitaires entre les différentes localités (a) et entre les adultes et les enfants (b)**

Dans les différentes localités lorsque l'analyse des densités parasitaires est faite en tenant compte de l'âge des patients c'est-à-dire entre les enfants et les adultes, on observe des parasitémiées plus élevées chez les enfants. Toutefois, il est important de préciser que cette variation n'est statistiquement significative que pour les patients recrutés à Tambacounda ( $p = 0,037$ ) (**Figure 11b**).

Au plan clinique, la fièvre, les vomissements et les céphalées ont été les signes prédominant dans les accès qualifiés de simples. Pour les formes sévères, elles ont été surtout décrites chez les enfants avec des cas d'obnubilations, de coma et d'anémies.

### **3.2. Analyse des réponses anticorps contre les antigènes étudiés**

#### **3.2.1. Comparaison des prévalences et niveaux d'IgG dans la population d'étude**

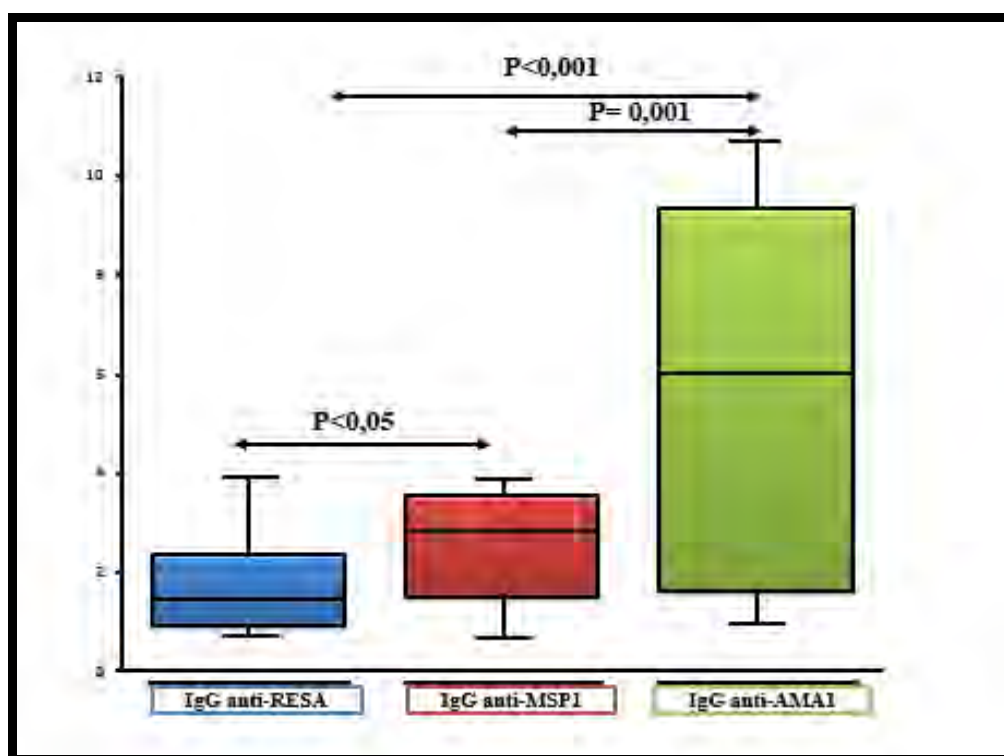
Ce sous chapitre regroupe les résultats des comparaisons des prévalences de répondeurs et des niveaux de réponses en IgG chez l'ensemble des patients étudiés et entre les antigènes testés AMA1, MSP1 et RESA. Un individu étant considéré comme répondeur lorsque le ratio de DO  $\geq 2$ , nous avons déterminé les prévalences des patients répondeurs dans la population globale. Les données sont résumées au niveau du Tableau II pour les trois antigènes testés. La prévalence de répondeurs en IgG la plus forte concerne l'antigène AMA1, reconnu par environ 71,7% des patients recrutés. Pour la protéine MSP1, il est reconnu par 65,8% des individus par contre la protéine RESA est reconnue par moins de 31,7% de la population globale. Cette variation entre les taux de prévalence des répondeurs est statistiquement significative ( $p < 0,0001$ ) (**Tableau II**).

**Tableau II : Prévalences de répondeurs dans la population globale**

Paramètres	MSP1	AMA1	RESA
N <sup>1</sup> /N <sup>2</sup>	112/170	122/170	54/170
Prévalences (%)	65,8	71,7	31,7

<sup>1</sup> = nombre de patients répondeurs ; <sup>2</sup> = nombre de patients testés ;

Cependant s'agissant des niveaux de réponses en IgG dirigées contre les différents Ag testés, ils sont représentés sous forme de boîtes à moustache au niveau de la **figure 12** pour les trois protéines.

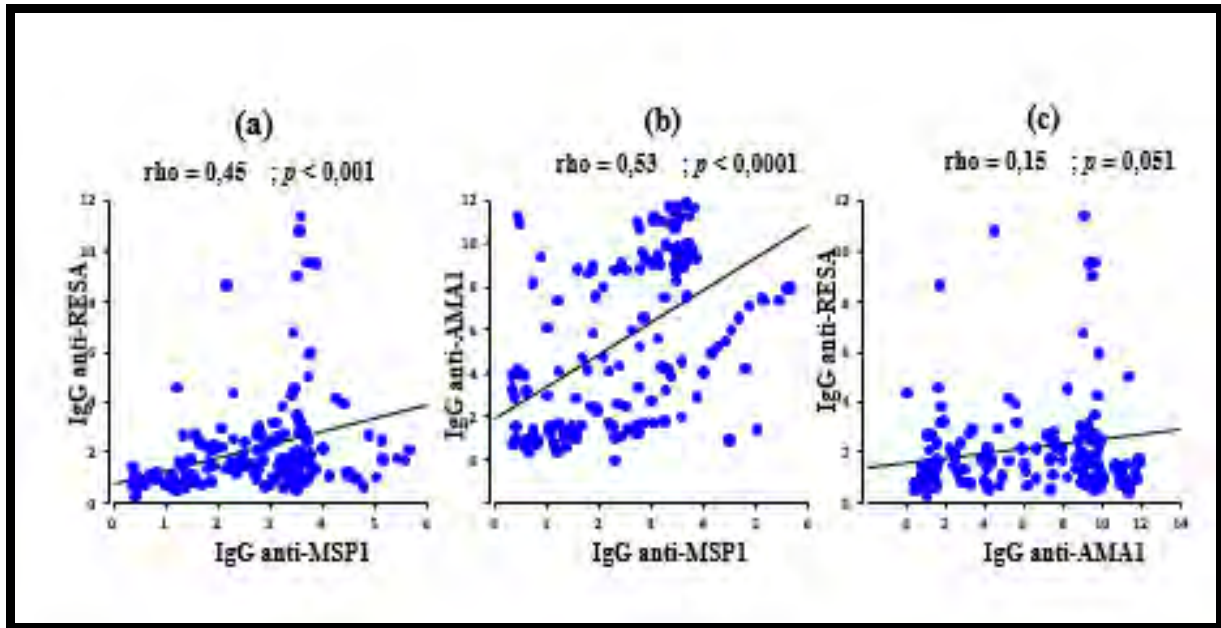


**Figure 12 : Comparaison globale des niveaux de réponses en IgG contre les antigènes étudiés**

En termes d'amplitudes, la protéine recombinante AMA1 est apparue comme étant l'antigène le plus reconnu par les antigènes testés. En effet, notre comparaison a décelé des niveaux d'IgG anti-AMA1 statistiquement plus élevés comparés à ceux des IgG anti-MSP1 ( $p = 0,001$ ) ou des IgG anti-RESA ( $p < 0,05$ ). Entre ces deux derniers antigènes, c'est la protéine MSP1 qui a montré l'intensité médiane de réponses anticorps la plus forte ( $p < 0,001$ ).

### 3.2.2. Corrélations entre les niveaux d'IgG contre les différents antigènes dans la population globale

Nous avons recherché l'existence d'interrelations entre les taux d'Ac de type IgG dirigés contre les antigènes testés. Il s'agit d'une analyse effectuée dans la population globale et les résultats obtenus sont illustrés au niveau des figures 13 a-c.

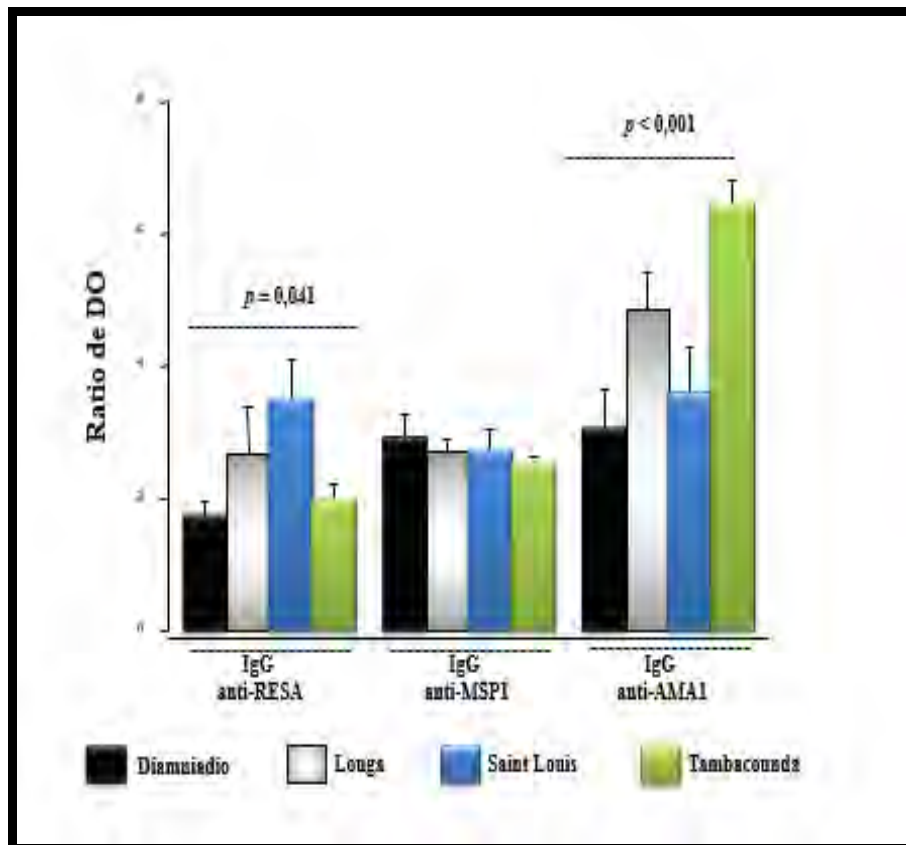


**Figure 13 :** Interrelations entre les niveaux de réponses Ac contre les antigènes testés : RESA/MSP1 (a) AMA1/MSP1 (b) et RESA/AMA1 (c).

Nos données montrent l'existence de corrélations positives entre les taux d'Ac dirigés contre les divers antigènes testés :  $\rho > 0,40$  et  $p < 0,001$ . Toutefois, cette liaison est beaucoup plus marquée entre les niveaux d'IgG anti-AMA1 et ceux des IgG anti-MSP1 ( $\rho = 0,53$  ;  $p < 0,0001$ ) (**Figure 13b**). En outre, les réponses Ac contre la protéine RESA apparaissent positivement corrélées à celles induites par l'antigène MSP1 ( $\rho = 0,45$  ;  $p < 0,001$ ) (**Figure 13a**).

### 3.2.3. Comparaison des niveaux de réponses en anticorps entre les localités

Nous avons analysé les réponses en Ac suivant les localités. La **figure 14** présentée en histogrammes permet de visualiser la comparaison des taux de réponses IgG obtenues dans nos différents sites.



**Figure 14 :** Comparaison des niveaux de réponses en IgG entre les différentes localités

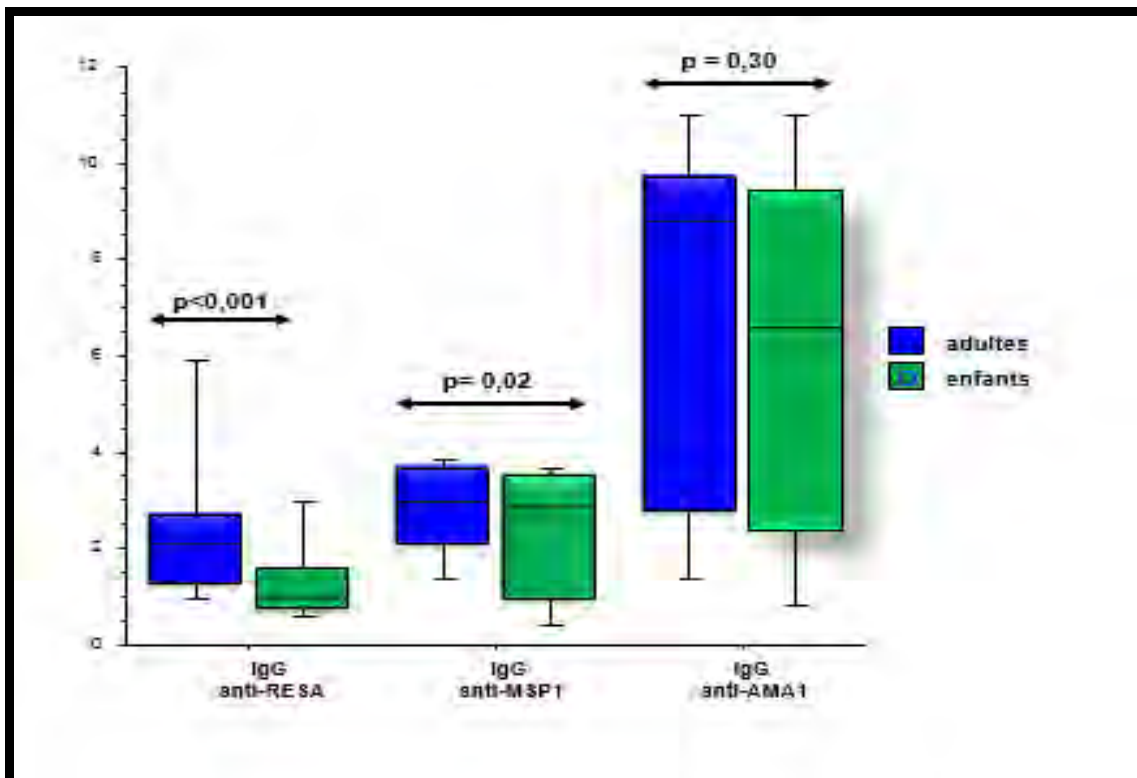
S'agissant de l'antigène AMA1, des niveaux de réponses en IgG significativement plus élevés ont été retrouvés chez les patients recrutés à Tamba comparés à ceux des autres sites ( $p < 0,001$ ). Pour ce même antigène, les taux d'IgG retrouvés chez les patients provenant de Louga demeurent également forts comparés aux données obtenues à Diamniadio et à St-Louis (**Figure 14**).

Une seconde variation significative des taux d'IgG concerne la protéine recombinante RESA avec des amplitudes plus faibles retrouvées chez les patients de St-Louis ( $p = 0,041$ ).

Pour l'antigène MSP1, aucune différence statistiquement importante des taux d'IgG n'a été décelée entre les différentes localités de l'étude (**Figure 14**).

### 3.2.4. Comparaison des niveaux de réponses en IgG à Tamba suivant l'âge

Cette analyse n'a concerné que le site de Tambacounda. Les autres régions n'ayant pas été sélectionnées en raison de leur faible effectif. Cette comparaison des taux d'anticorps suivant l'âge a permis de constater des profils évolutifs variables dans la localité de Tamba. Dans cette région nous constatons une augmentation exponentielle des taux d'anticorps avec l'âge, c'est-à-dire une acquisition des IgG contre les trois antigènes de stades sanguins testés. Les réponses en Ac sont statistiquement significatives suivant l'âge pour IgG anti-RESA ( $p < 0,001$ ) et IgG anti-MSP1 ( $p = 0,02$ ).



**Figure 15 :** Evolution des niveaux d'IgG suivant l'âge à Tambacounda

#### 4. DISCUSSION

Ce travail entre dans le cadre des investigations épidémiologiques, immunologiques et génétiques entreprises depuis quelques années par l'Unité d'Immunogénétique de l'Institut Pasteur de Dakar en collaboration avec l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar et le Ministère de la Santé et de l'Action Sociale à travers divers hôpitaux. L'objectif principal a été d'évaluer les réponses IgG spécifiquement dirigées contre trois antigènes associés à la phase sanguine du *Plasmodium falciparum* : AMA1, MSP1 et RESA chez des patients présentant un accès palustre, recrutés dans quatre zones d'endémicité palustre variable au Sénégal. C'est dans un contexte dit « de pré-élimination du paludisme » de certaines régions du pays, que la présente étude a été menée dans le but de déterminer les éventuelles variations des taux d'Ac suivant l'endémicité palustre de divers sites d'étude.

La présente discussion portera d'abord sur les aspects méthodologiques puis sur les données relatives à l'évaluation des réponses en IgG notamment la comparaison entre les sites et l'analyse suivant l'âge des patients recrutés.

Dans sa démarche méthodologique et son déroulement, ce travail a nécessité un recrutement de patients souffrant d'un accès clinique dans quatre sites et au cours d'une même période coïncidant avec le pic de transmission de paludisme : Septembre à Décembre. Les patients ayant été recrutés en milieu hospitalier, cette démarche a permis d'éviter les individus avec un portage asymptomatique antérieurement décrit en zone hyperendémique. Le recrutement de la population d'étude ainsi que les autres aspects méthodologiques utilisés ont été largement discutés dans les travaux antérieurement menés à Tambacounda [118].

Le choix des différents sites est basé d'une part sur les données épidémiologiques de l'infection palustre dans chacune des zones et d'autre part sur la disponibilité du personnel chargé du recrutement dans ces sites. Au

Sénégal, le niveau de transmission augmente en passant du Nord (hypo ou mésoendémique) au Sud (hyper ou holoendémique) du pays [116]. C'est ainsi que nous avons sélectionné au Nord le site de Saint louis (CHRS) une région de très faible endémicité palustre affichant même l'espoir d'une pré-élimination. Au centre notre choix a porté sur la région de Louga (CHRASML), zone intermédiaire présentant un faciès épidémiologiques dit sahélien avec une transmission palustre faible et instable [116]. Au Sud, Tambacounda (CHRTc) a été choisi pour la présente étude. Situé dans la zone soudano-guinéenne avec une biodiversité très importante, c'est l'une des régions les plus pluvieuses du pays et le paludisme y est endémique. Sa structure hospitalière demeure la plus équipée de la région et assure la prise en charge de la majorité des cas de paludisme. L'existence d'une étude antérieure portant sur les réponses anticorps contre des antigènes de la phase hépatique, a également encouragé le choix de cette région. Afin d'évaluer l'immunité antipalustre en zone péri-urbaine et plus particulièrement dans la zone phytogéographique dite côtière, nous avons sélectionné l'hôpital de Diamniadio (CHNED). Sa proximité avec Dakar et sa banlieue, où ont porté la majorité des travaux antérieurs [119], a constitué un atout pour ce type d'étude aussi bien dans le recrutement que dans l'analyse et la comparaison des données.

S'agissant de la technique ELISA, les sérums ont été étudiés en duplicate et les résultats exprimés en rtDO correspondant à la réponse du naïf non répondeur additionné de deux fois le bruit de fond. La technique ELISA ayant une sensibilité et une spécificité basée sur les Ac monoclonaux, une simple mesure de la DO demeure insuffisante pour valider un taux d'Ac chez un individu donné [120]. Le choix d'une expression des résultats en rtDO a reposé sur les données de calibration et d'optimisation antérieurement obtenues et publiées par notre Unité. Cette méthode d'expression des résultats a été reconnue comme procurant une positivité d'environ 95%. Aussi, cette forme d'expression des résultats très largement appliquée en ELISA, rend possible des

comparaisons entre différentes séries de mesures et entre les divers groupes d'individus[121] ,[122] .

Le choix des antigènes étudiés repose sur le fait qu'ils sont considérés comme des marqueurs d'exposition palustre, plus particulièrement les protéines AMA1 et MSP1. En effet, les taux de réponse contre ces antigènes des mérozoïtes seraient le reflet des niveaux de transmission palustre [119]. Ces antigènes ont fait l'objet d'études antérieures menées par notre équipe [118],[119] et leurs concentrations et conditions d'utilisation ont été optimisées et demeurent identiques à celles antérieurement rapportées [123].

L'évaluation des réponses en IgG a montré une prévalence de répondeurs plus forte pour l'antigène AMA1, reconnu par la majorité des patients recrutés. Ce résultat est comparable à celui de **Bass et al** à Dakar en 2014, qui a montré une prévalence élevée de répondeurs chez les patients survivants du paludisme de réanimation à Dakar[123]. Pour la protéine MSP1, elle vient en seconde position par rapport au niveau de réponse en IgG tandis que l'antigène RESA apparaît avec des niveaux de réponses en IgG les plus faibles dans la population globale. AMA1 est apparue comme étant l'antigène le plus reconnu parmi les antigènes testés. Ces données montrent que les antigènes testés sont bien reconnus par le système immunitaire et les corrélations positives observées entre les antigènes demeurent une confirmation de cette immunogénicité. Ceci est conforté par des études antérieures notamment celles ayant montré des prévalences de répondeurs plus fortes en IgG anti-AMA1, chez des adultes, que pour les deux autres antigènes [124]. Ces différences de prévalences de répondeurs entre les trois antigènes, décelées en dehors de toute analyse suivant les localités et l'âge des patients, seraient liées aux étapes du cycle parasitaire déterminant les phases d'expression maximale des antigènes. En effet, les trois antigènes sont exprimés différemment au cours de la phase érythrocytaire du cycle de *P falciparum* ; AMA1 et MSP1 sont des protéines parasitaires

naturellement retrouvées à la surface du mérozoïte alors que la protéine RESA au niveau de la membrane des globules rouges parasités ou GRp. Des travaux antérieurs ont montré que le mérozoïte est une cible critique dans les mécanismes de protection contre l'infection à *P. falciparum*, les facteurs exacts du point de vue fonctionnel restent à élucider. Toutefois, nos données sont en faveur d'une stimulation notable du système immunitaire dirigée contre ces antigènes de *P. falciparum* d'où leur utilisation comme candidats vaccins [125].

Dans une analyse recherchant les variations des taux d'Ac entre les localités nous avons retrouvé des taux d'IgG anti-AMA1 significativement plus fortes à Tamba. Ce constat serait surtout lié au fait que dans ce site d'étude, les enfants sont majoritaires comparés aux sites de Louga et de St louis. Les enfants classiquement plus sensibles à la symptomatologie palustre seront les premiers à consulter, ce qui se caractérise par des réponses anti-AMA1 plus fortes dans cette localité. Les fortes corrélations observées entre l'âge et les taux d'Ac sont les bases d'une telle explication à Diamniadio aussi.

Dans cette étude, les données immunologiques obtenues chez les patients recrutés à Tambacounda, sont en faveur d'une forte endémicité palustre dans la zone. En effet, l'augmentation des niveaux de réponse parallèlement à l'âge, la positivité des réponses IgG anti-AMA1, les taux d'anticorps significativement plus forts chez les adultes comparés aux enfants, sont les stigmates d'un état de prémunition largement décrit dans les zones de forte endémicité palustre [126].

# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Nous avons étudié les niveaux de réponses en IgG dirigées contre trois protéines de *P falciparum* représentant des candidats vaccins en phase d'essais cliniques (AMA1, RESA et MSP1). Réalisé dans un contexte dit «de pré-élimination du paludisme» dans certaines régions du pays, la présente étude a permis de comparer les réponses immunitaires antipalustres dans le paludisme clinique au niveau des différents sites.

Le but a été de déterminer les éventuelles variations des taux d'Ac suivant l'endémicité palustre d'une part et d'autre part d'apprécier les fluctuations suivant l'âge des malades recrutés en milieu hospitalier. Nos données ont montré que les trois antigènes testés sont bien reconnus et que cette reconnaissance est beaucoup plus marquée pour AMA1 suivi de MSP1. Il existe des corrélations positives entre les taux d'Ac dirigés contre les trois antigènes. En recherchant les interrelations entre l'âge et les taux d'anticorps, nous avons trouvé des corrélations positives en zone de plus forte endémicité palustre : Tambacounda et Diamniadio et pas dans les autres localités. Ces données témoignent d'une acquisition des IgG avec l'âge plus prononcée à Tambacounda.

Cependant, la réalisation d'études similaires avec un plus grand effectif notamment pour les patients de Diamniadio, de Louga et de St-Louis ainsi qu'une évaluation des différentes sous-classes d'IgG et de leur fonctionnalité pourraient compléter ce type de travail. Ces travaux devraient néanmoins être poursuivis parallèlement avec les investigations portant sur la génétique du parasite et de l'hôte humain. Une analyse plus approfondie tenant compte de l'issue de la maladie, la durée d'hospitalisation, le type d'accès ainsi que les traitements appliqués, pourrait améliorer ce type d'étude.

# REFERENCES

1. Mackinnon, M.J., et al., , *Heritability of malaria in Africa*. PLoS Med, 2005. 2(12): p. e340.
2. O.M.S., *Rapport sur le paludisme dans le monde*, Genève. . 2016.
3. Gay, F., et al. , *Cerebral malaria: what is known and what is on research*. Rev Neurol (Paris), , 2012. 168( 3): p. 239-56.
4. Andrade BB et al, *Biomarkers for susceptibility to infection and disease severity in human malaria*. Mem Inst Oswaldo Cruz, , 2011. 106(1): p. 70-78.
5. Carme B et al, *Indices plasmodiques et charges parasitaires chez des donneurs de sang à Brazzaville CONGO*. malaria J, 1993.
6. Miller, L.H., M.F. Good, and G. Milon, , *Malaria pathogenesis*. Science,, 1994. 264((5167)): p. 1878-83.
7. Singh B, K.S.L., Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, et al. , *A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings*. . Lancet,, 2004. 363: p. 1017-1024.
8. Greenwood, B.M.a.J.R.A., *Comparison of two simple methods for determining malaria parasite density*. . Trans R Soc Trop Med Hyg,, 1991. 85(2): p. 186-8.
9. Modiano, D., et al.,, *Different response to Plasmodium falciparum malaria in west African sympatric ethnic groups*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(23): p. 13206-11.
10. Marsh, K., *Malaria, a neglected disease?* Parasitology,, 1992. 104 Suppl: p. S53-69.
11. Snow, R.W., et al., *The global distribution of clinical episodes of Plasmodium falciparum malaria*. . Nature, 2005. 434(7030): p. 214-7.
12. World Health Organization, *Severe falciparum malaria, communicable Diseases Cluster*. . Trans R Soc Trop Med Hyg 2000. 94(1): p. 90.
13. Sallaha K et al, *Modélisation des déplacements humains par modèles de gravité dans la transmission du paludisme, Mbour, Sénégal* Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique, 2014. 62(5): p. 175.
14. PNLP., *Bulletin épidémiologique annuel du paludisme au Sénégal*. 2014-2015.
15. OMS., *world malaria report 2014*.
16. Mouchet J et al, *Biodiversité du paludisme dans le monde*. Impact Malaria, 2004. 35(2): p. 107.

17. PNLP., *Rapport statistique*. 2009-2011.
18. PNLP., *Plan strategique national* 2011-2015.
19. M.Wery, *Protozoologie médicale*. 1995: p. 1-276.
20. Coetzee M, F.D., *Advances in the study of Anopheles funestus, a major vector of malaria in Africa*. Insect Biochem Mol Biol, 2004. 34: p. 599-605.
21. Fontenille D, C.A., Awono-Ambene PH, Antonio-Nkondjio C, Wondji C, et al., *Systematics and biology of Anopheles vectors of Plasmodium in Africa*. Med Trop, 2003. 63: p. 247-253.
22. Pages F, O.-P.E., Corbel V, , *Vectors of malaria: biology, diversity, prevention, and individual protection*. . Med Mal Infect, 2007. 37: p. 153-161.
23. John C. Beier et al, *Malaria parasite development in mosquitoes*. Annu Rev Entomol 1998. 43: p. 519-543.
24. White NJ, P.S., Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, et al. , *Malaria*. Lancet., 2013.
25. Berendt, A.R., McDowall, A., Craig, A. G., Bates, P. A., Sternberg, M. J., Marsh, K., And C.I.A.H. Newbold, N., *The binding site on ICAM-1 for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes overlaps, but is distinct from, the LFA-1-binding site*. . Cell, 1992. 68: p. 71-81.
26. Malvy D DF, T.R., Le Bras M., *Plasmodies-Malaria. Formes cliniques et diagnostic*. Encyclopédie médico-chirurgicale Paris Elsevier 2000. 8.
27. WCMJJ, J., *Paludisme. Section X j Maladies infectieuses*. 2006: p. 824-830.
28. English, M., et al., , *Deep breathing in children with severe malaria: indicator of metabolic acidosis and poor outcome*. Am J Trop Med Hyg, 1996. 55(5): p. 521-4.
29. CLARK, I.A.C., W. B., , *The pathophysiology of falciparum malaria*. . Pharmacol Ther, 2003. 99: p. 221-60.
30. Brown, H., et al., , *Cytokine expression in the brain in human cerebral malaria*. J Infect Dis, 1999. 180(5): p. 1742-6.
31. Day, N.P., et al., *The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria*. J Infect Dis, 1999. 180(4): p. 1288-97.
32. Clark, I.A.a.K.A.R., *Sequestration, cytokines, and malaria pathology*. . Int J Parasitol, 1994. 24(2): p. 165-6.
33. Baruch, D.I., et al., , *Cloning the P. falciparum gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes*. Cell, 1995. 82(1): p. 77-87.

34. Gardner, M.J., et al., , *Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum*. Nature, 2002. 419(6906): p. 498-511.
35. Turner, G.D., et al., *An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration*. . Am J Pathol,, 1994. 145(5): p. 1057-69.
36. Rowe, A., Obeiro, J., Newbold, C. I. & Marsh, K., *Plasmodium falciparum rosetting is associated with malaria severity in Kenya*. Infect Immun, 1995. 63: p. 2323-6.
37. Rowe, J.A., Moulds, J. M., Newbold, C. I. & Miller, L. H., P., *falciparum rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1*. Nature, 1997. 388: p. 292-5.
38. Craig, A.S., A., *Molecules on the surface of the Plasmodium falciparum infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion*. . Mol Biochem Parasitol, 2001. . 115: p. 129-43.
39. Flick, K., Ahuja, S., Chene, A., Bejarano, M. T. & Chen, Q., Malar J , *Optimized expression of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 domains in Escherichia coli*. . 2004. 3: p. 50.
40. Roberts, D.J., et al., , *Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria*. . Nature, 1992. 357(6380): p. 689-92.
41. Flick, K., et al., , *Role of nonimmune IgG bound to PfEMP1 in placental malaria*. . Science,, 2001. 293(5537): p. 2098-100.
42. Gupta, S., Snow, R. W., Donnelly, C. A., Marsh, K. & Newbold, C. , *Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections*. . Nat Med, 1999. 5: p. 340-3.
43. Nardin, E., et al., , *Pre-erythrocytic malaria vaccine: mechanisms of protective immunity and human vaccine trials*. Parassitologia, 1999. 41(1-3): p. 397-402.
44. Hoffman, S.L., et al., , *Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated Plasmodium falciparum sporozoites*. J Infect Dis, 2002. 185(8): p. 1155-64.
45. Scheller, L.F.a.A.F.A., *Maintenance of protective immunity against malaria by persistent hepatic parasites derived from irradiated sporozoites*. . Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(9): p. 4066-8.
46. Tsuji, M.Z., F., , *T cells as mediators of protective immunity against liver stages of Plasmodium*. . Trends Parasitol, 2003. 19: p. 88-93.
47. Doolan, D.L.H., S. L. , *The complexity of protective immunity against liver-stage malaria*. . J Immunol, 2000. 165: p. 1453-62.

48. Reece, W.H., et al., , *A CD4(+) T-cell immune response to a conserved epitope in the circumsporozoite protein correlates with protection from natural Plasmodium falciparum infection and disease*. Nat Med, 2004. 10(4): p. 406-10.
49. Sabchareon, A., et al.,, *Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria*. Am J Trop Med Hyg, 1991. 45(3): p. 297-308.
50. Osier, F.H., et al., , 76(5): p. , *Breadth and magnitude of antibody responses to multiple Plasmodium falciparum merozoite antigens are associated with protection from clinical malaria*. Infect Immun, 2008. 76(5): p. 2240-8.
51. Polley, S.D., Mwangi, T., Kocken, C. H., Thomas, A. W., Dutta, S., Lanar, D. E., Remarque, E., Ross, A., Williams, T. N., Mwambingu, G., Lowe, B., Conway, D. J. & Marsh, K., , *Human antibodies to recombinant protein constructs of Plasmodium falciparum Apical Membrane Antigen 1 (AMA1) and their associations with protection from malaria*. . Vaccine, 2004. 23: p. 718-28.
52. Okech, B.A., et al., , *Fine specificity of serum antibodies to Plasmodium falciparum merozoite surface protein, PfMSP-1(19), predicts protection from malaria infection and high-density parasitemia*. Infect Immun, 2004. . 72(3): p. 1557-67.
53. Pombo, D.J., et al., , *Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with Plasmodium falciparum*. .Lancet, 2002. 360(9333): p. 610-7.
54. Von Der Weid, T., Honarvar, N. & Langhorne, J. , *Gene-targeted mice lacking B cells are unable to eliminate a blood stage malaria infection*. J Immunol, 1996. 156: p. 2510-6.
55. Stevenson, M.M., Tam, M. F., Wolf, S. F. & Sher, A., , *IL-12-induced protection against blood-stage Plasmodium chabaudi AS requires IFN-gamma and TNF-alpha and occurs via a nitric oxide-dependent mechanism*. J Immunol, 1995. 155: p. 2545-56.
56. Bouharoun-Tayoun, H., et al., , *Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of Plasmodium falciparum asexual blood stages*. J Exp Med, 1995. 182(2): p. 409-18.
57. Taylor Robinson, A.W., and Smith, E. C. , *A role for cytokines in potentiation of malaria vaccines through immunological modulation of blood stage infection*. Immunol. Rev, 1991. 171: p. 105-23.
58. Ho, M., Sexton, M. M., Tongtawe, P., Looareesuwan, S., Suntharasamai, P., and Webster, H.,, *Interleukin-10 inhibits TNF $\alpha$  production but not antigen-specific lymphoproliferation in acute Plasmodium falciparum malaria*. J. Infect. Dis, 1995. 172: p. 838-44.

59. Toure Balde, A., Sarthou, J. L., Aribot, G., Michel, P., Trape, J. F., Rogier, C., and Roussilhon, C., ., . 64: p. , *Plasmodium falciparum* induces apoptosis in human mononuclear cells. Infect. Imm, 1996. 64(744-50.).
60. Hviid, L., Ja, K., Goka B. Q, Jong, O. C., Nkrumah F. K, and T.G., T., , *Rapid reemergence of T cells into peripheral circulation following treatment of severe and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria*. Infect. Imm, 1997. 65: p. 4090-93.
61. Troye-Blomberg, M., Riley, E. M., Kabilan, L., Holmberg, M., Perlmann, H., Andersson, U., Heusser, C. H., and Perlmann, P., , *Production by activated human T cells of IL- 4 but not INF $\gamma$  is associated with elevated levels of serum antibodies to activating malaria antigens*. Pro. Nat. Acad. Sc. USA., 1990. 87(14): p. 5484-88.
62. Kumaratilake, L.M., Rathjen, D. A., Mack, P., Widmer, F., Prasertsiriroj, V., and Ferrante, A., , *A synthetic TNF $\alpha$  agonist peptide enhances human polymorphonuclear leukocyte-mediated killing of Plasmodium falciparum in vitro and suppresses Plasmodium chabaudi infection in mice*. J. Clin. Invest, 1995. 95(5): p. 2315-23.
63. Urban, B.C., and Roberts, D. J., , *monocytes, macrophages and myeloid dendritic cells: sticking of infected erythrocytes switches off host cells*. . Malaria, Cur. Opinion Immunol., 2002. 114: p. 458-65.
64. Clark, I.A., Alleva, L. M., Mills, A. C., and Cowden, W. B. , , *Pathogenesis of Malaria and Clinically Similar Conditions*. . Clin. Biol. Rev, 2004. 17: p. 509-39.
65. Vallance, P., and Collier, J., Bio. Med. J., *Biology and clinical relevance of nitric oxide*. . 1994. 13: p. 453-57.
66. Rockett, K., *Possible role of nitric oxide in malaria immunosuppression*. . Parasite Immunol, 1994. 16: p. 243-49.
67. Celada, A., Cruchaud, A., and Perrin, L. H. , , *Assessment of immune phagocytosis of Plasmodium falciparum infected red blood cells by human monocytes and polymorphonuclear leukocytes. A method for visualizing infected red blood cells ingested by phagocytes*. Immunol. Met., 1983. 14(2): p. 263-71.
68. Kumaratilake, L.M., Ferrante, A., and Rzepczyk, C. , *The role of T lymphocytes in immunity to Plasmodium falciparum. Enhancement of neutrophil mediated parasite killing by lymphotoxin and IFN $\gamma$ : comparisons with TNF $\alpha$  effects*. Vaccine., 1991. 146(2): p. 762-67.
69. Stevenson, M.M.a.E.M.R., *Innate immunity to malaria*. Nat Rev Immunol, 2004. 4(3): p. 169-80.

70. Mavoungou E, L.A., Kremsner PG., , *Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity of Plasmodium falciparum-infected human red blood cells in vitro*. Eur. Cytokine Netw, 2003. 14: p. 134-142.
71. Roland J, S.V., Sellier C, Drapier AM, Di Santo JP, Cazenave PA, Pied S., , *NK cell responses to Plasmodium infection and control of intrahepatic parasite development*. J.Immunol, 2006. 177: p. 1229-1239.
72. Mohan K, M.P., Stevenson MM., , *Natural killer cell cytokine production not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage Plasmodium chabaudi AS infection*. . J.Immunol, 1997. 159: p. 4990-4998.
73. Stevenson, M.M., and Riley, E. M., , *Innate immunity to malaria*. . Nature Rev, 2004. 4: p. 169-80.
74. Luty, A.J., Lell, B., Schmidt-Ott, R., Lehman, L. G., Luckner, D., Greve, B., Matousek, P., Herbich, K., Schmid, D., Migot-Nabias, F., Deloron, P., Nussenzweig, R. S., and Kremsner, P. G., , *INF $\gamma$  responses are associated with resistance to reinfection with Plasmodium falciparum in young African children*. J. Infect. Dis., 1999. 179: p. 980-88.
75. Kwiatkowski, D., *Immunol. Lett.* TNF $\alpha$ , fever and fatality in malaria, 1990. 25: p. 213-16.
76. Linke, A., Kuhn, R., Muller, W., Honarvar, N., Li, C., and Langhorne, J. , *Plasmodium chabaudi chabaudi: differential susceptibility of gene-targeted mice deficient in IL-10 to an erythrocytic-stage infection*. Exp. Parasitol., 1996. 84(2): p. 253-63.
77. Lyke, K.E., Burges, R., Cissoko, Y., Sangare, L., Dao, M., Diarra, I., Kone, A., Harley, R., Plowe, C. V., Doumbo, O., and Sztein, M. B., *Serum levels of proinflammatory cytokines interleukin-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, TNF $\alpha$  and IL-12 in Malian children with severe Plasmodium falciparum malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls*. . Infect. Imm., 2004. 70: p. 5630-37.
78. Kurtzhals, J.A., Reimert, C. M., Tette, E., Dunyo, S. K., Koram, K. A., Akanmori, B. D., Nkrumah, F. K., and Hviid, L., , *Increased eosinophil activity in acute Plasmodium falciparum infection association with cerebral malaria*. . Clin. Exp. Immunol, 1998. 112(2): p. 303-7.
79. Bosch, J., Turley, S., Daly, T. M., Bogh, S. M., Villasmil, M. L., Roach, C., Zhou, N., Morrissey, J. M., Vaidya, A. B., Bergman, L. W., and Hol, W. G. , *Structure of the MTIP-MyoA complex, a key component of the malaria parasite invasion motor*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, , 2006. 103(13): p. 4852-57.
80. Mercereau-Puijalon, O., *Les réponses immunes contre les stades sanguins asexués de Plasmodium falciparum et leurs cibles antigéniques*. Cahiers Santé, 1993. 3: p. 256-66.

81. Bouharoun-Tayoun, H., Attanath, P., Chongsuphajaisiddhi, T., Sabchareon, A., and Druilhe, P., , *Antibodies that protect humans against Plasmodium falciparum blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro but act in cooperation with monocytes.* . J. Exp. Med, 1990. 172: p. 1633-41.
82. Pouvelle, B., Spiegel, R., Hsiao, L., Howard, R. J., Morris, R. L., Thomas, A. P., and Taraschi, T. F., , *Direct accesses of serum macromolecules by intraerythrocytic malaria parasites.* Nature, 1991. 353: p. 73-75.
83. Fujioka, H., and Aikawa, M., , *Morphological changes of clefts in Plasmodium-infected erythrocytes under stress conditions.* Exp. Parasitol., 1993. 76: p. 302-7.
84. Udeinya, I., Miller, L. H., Mac Gregor, I. A., and Jensen, J. , *Plasmodium falciparum strain-specific antibody blocks binding of erythrocytes to a melanotic melanoma cells.* Nature, 1983. 303: p. 429-431.
85. David, P., Hommel, M., Miller, L. H., Udeinya, I., and Oligino, L.,, *Parasite sequestration in Plasmodium falciparum malaria: spleen and antibody modulation of cytoadherence of infected erythrocytes.* Pro. Nat. Acad. Sc. USA, 1988. 8: p. 5075-79.
86. Ringwald, P., Peyron, F., Vuillez, J. P., Touze, J. E., Le Bras, J., and Deloron, P., *Parasite virulence factors during Plasmodium falciparum malaria: rosetting cytoadherence and modulation cytoadherence by cytokines.* Infect. Imm, 1993. 61: p. 5198-204.
87. Schofield, L., Vivas, L., Hackett, F., Gerold, P., Schawrz, R. T., and Tachado, S., *Neutralizing monoclonal antibodies to glycosyl phosphatidylinositol, the determinant TNF $\alpha$  inducing toxin of Plasmodium falciparum: prospects for the immunotherapy of severe malaria.* Ann. Trop. Med. Parasitol., 1993. 87: p. 617-26.
88. Facer, C.A., and Agiostratidou, G., *High levels of antiphospholipid antibodies in uncomplicated and severe Plasmodiumfalciparum and Plasmodium vivax malaria.* . Clin. Exp. Immunol, 1994. 95: p. 304-9.
89. Allison, A.C., and Eugi, E. M., *The role of cell-mediated immune response in resistance to malaria, with special references to oxidant stress.* Ann. Rev. Immunol., 1983: p. 361-92.
90. Logan, G.J., Wang, L., Zheng, M., Cunningham, S. C., Coppel, R. L., and Alexander, I. , *vectors encoding malarial antigens stimulate antigen-specific immunity but do not protect from parasite infection.* Vaccine 2007. 25: p. 1014-22.
91. Bate, C., and Kwiatkowski, D., *A monoclonal antibody that recognizes phosphatidylinositol inhibits induction of TNF $\alpha$  by different strains of Plasmodium falciparum.* Infect. Immun, 1994. 62: p. 5261-66.

92. Miller, L.H., et al., *Analysis of sequence diversity in the Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 (MSP-1)*. Mol Biochem Parasitol., 1993. 59(1): p. 1-14.
93. Koussis, K., et al., *A multifunctional serine protease primes the malaria parasite for red blood cell invasion*. . EMBO J, 2009. 28(6): p. 725-35.
94. Holder et al, *The carboxy-terminus of merozoite surface protein 1: structure, specific antibodies and immunity to malaria*. Parasitology,, 2009(136): p. 1445-1456.
95. Harris, P.K., et al., , *Molecular identification of a malaria merozoite surface sheddase*. PLoS Pathog, 2005. 1(3): p. 241-51.
96. Blackman, M.J., Heidrich, H. G., Donachie, S., McBride, J. S. & Holder, A. A. , *A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies*. J Exp Med, 1990. 172: p. 379-82.
97. Spencer Valero, L.M., et al., *Passive immunization with antibodies against three distinct epitopes on Plasmodium yoelii merozoite surface protein 1 suppresses parasitemia*. Infect Immun, 1998. 66(8): p. 3925-30.
98. Ling, I.T., Ogun, S. A. & Holder, A. A., *Immunization against malaria with a recombinant protein*. Parasite Immunol, 1994. 16: p. 63-7.
99. Perera, K.L., et al., *Baculovirus merozoite surface protein 1 C-terminal recombinant antigens are highly protective in a natural primate model for human Plasmodium vivax malaria*. Infect Immun, 1998. 66(4): p. 1500-6.
100. Chang, S.P., et al., *A recombinant baculovirus 42-kilodalton C-terminal fragment of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 protects Aotus monkeys against malaria*. Infect Immun,, 1996. 64(1): p. 253-61.
101. Guevara Patino, J.A., Holder, A. A., McBride, J. S. & Blackman, M. J., *Antibodies that inhibit malaria merozoite surface protein-1 processing and erythrocyte invasion are blocked by naturally acquired human antibodies*. J Exp Med, 1997. 186: p. 1689-99.
102. Omosun, Y.O., et al., *Antibody specificities of children living in a malaria endemic area to inhibitory and blocking epitopes on MSP-1 19 of Plasmodium falciparum*. Acta Trop, 2009. 109(3): p. 208-12.
103. Holder, A.A., et al., *Merozoite surface protein 1, immune evasion, and vaccines against asexual blood stage malaria*. Parassitologia, 1999. 41(1-3): p. 409-14.
104. Narum DLT, A.W., *Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of Plasmodium falciparum merozoites*. Mol Biochem Parasitol 1994. 67: p. 59-68.

105. Hodder, A.N., et al., *The disulfide bond structure of Plasmodium apical membrane antigen-1*. J Biol Chem, 1996. 271(46): p. 29446-52.
106. Howell, S.A., et al., *Proteolytic processing and primary structure of Plasmodium falciparum apical membrane antigen-1*. J Biol Chem, 2001. 276(33): p. 31311-20.
107. Mitchell, G.H., et al., *Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells*. Infect Immun, 2004. 72(1): p. 154-8.
108. Silvie, O., Franetich, J. F., Charrin, S., Mueller, M. S., Siau, A., Bodescot, M., et al., *A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by Plasmodium falciparum sporozoites*. J Biol Chem, 2004. 279: p. 9490-6.
109. Kato, K., et al., *Domain III of Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 binds to the erythrocyte membrane protein* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(15): p. 5552-7.
110. Cortes, A., et al., *Allele specificity of naturally acquired antibody responses against Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1*. Infect Immun, 2005. 73(1): p. 422-30.
111. Hodder, A.N., P.E. Crewther, and R.F. Anders., *Specificity of the protective antibody response to apical membrane antigen 1*. Infect Immun, 2001. 69(5): p. 3286-94.
112. Chelimo, K., et al., *Antibodies to Plasmodium falciparum antigens vary by age and antigen in children in a malaria-holoendemic area of Kenya*. Pediatr Infect Dis J, 2005. 24(8): p. 680-4.
113. Udhayakumar, V., et al., *Longitudinal study of natural immune responses to the Plasmodium falciparum apical membrane antigen (AMA-1) in a holoendemic region of malaria in western Kenya: Asembo Bay Cohort Project VIII*. Am J Trop Med Hyg, 2001. 100(7): p. Am J Trop Med Hyg.
114. Modiano, D., Chiucchiuini, A., Petrarca, V., Sirima, B. S., Luoni, G., Perlmann, H., Esposito, F., and Coluzzi, M. , *Humoral response to Plasmodium falciparum Pf155/ring-infected erythrocyte surface antigen and Pf332 in three sympatric ethnic groups of Burkina Faso*. Am. J. Trop. Med. Hyg, 1998. 58: p. 220-24.
115. Newton, P.N., Chotivanich, K., Chierakul, W., Ruangveerayuth, R., Teerapong, P., Silamut, K., Looareesuwan, S., and White., *A comparison of the in vivo kinetics of Plasmodium falciparum Ring- Infected Erythrocyte Surface Antigen-positive and negative erythrocytes*. Blood. N. J, 2001. 98: p. 450-57.
116. PNLP., *Rapport Statistiques plan stratégique national PNLP-2014*. Juillet 2015: p. 1-87.

117. Trape JF, a.a., *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: p. 123-137.
118. Ka Omar et al, *Analyse de la réponse anticorps anti-mézoïte dans le paludisme de recrutement hospitalier à Tambacouda (Sénégal)*. Université Cheikh Anta Diop de Dakar, 2014.
119. Mbengue B, S.N.M., Ndiaye Diallo R et al. , *IgG responses to candidate malaria vaccine antigens in the urban area of Dakar (Senegal): evolution according to age and parasitemia in patients with mild symptoms*. Bull Soc Pathol Exot, 2015. 108(2): p. 94-101.
120. Wirtz RA, S.J., Hall T et al. , *Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for Plasmodium vivax-VK247 sporozoites*. J Med Entomol, 1992. 29(5): p. 854-7.
121. Perraut R, M.-P.O., Diouf B et al. , *Seasonal fluctuation of antibody levels to Plasmodium falciparum parasitized red blood cell-associated antigens in two Senegalese villages with different transmission conditions*. Am J Trop Med Hyg, 2000. 62(6): p. 746-51.
122. Mbengue B, N.B., Diatta B et al. , *The use of crude Plasmodium falciparum antigens for comparison of antibody responses in patients with mild malaria vs. cerebral malaria*. Iran J Immunol., 2010. 7(3): p. 150-61.
123. Bass, A.e.a., *Analyse des réponses anticorps IgG anti-MSP1-19 et anti-AMA-1 dans le paludisme de recrutement hospitalier*. . dakar:Université Cheikh Anta Diop, 2014.
124. Duah et al, *Acquisition of antibody isotypes against Plasmodium falciparum blood stage antigens in a birth cohort* Parasite Immunol, 2010. 32(2): p. 125–134.
125. Lauren, S., *A review of malaria vaccine*. malaria journa, 2012.
126. Snow RW, O.J., Lowe B et al. , *Relation between severe malaria morbidity in children and level of Plasmodium falciparum transmission in Africa*. Lancet., 1997. 349(9066).