

République du Mali

Un Peuple - Un But - Une Foi

**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE DES SCIENCES, DES TECHNIQUES ET DES
TECHNOLOGIES DE BAMAKO (USTTB)**



FACULTE DE PHARMACIE

Année universitaire 2013-2014

N°

Titre

**Effets de l'âge, des types d'hémoglobine et de souches
parasitaires sur la réponse immunitaire IgG-antipalustre
chez les enfants de Kéniéroba, Commune Rurale de
Bancoumana, Mali**

Thèse

**Présentée et soutenue publiquement le ... / ... / 2014 devant la
Faculté de Pharmacie**

Par Mme Maimouna Halilou IDI

Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie (Diplôme d'Etat)

JURY

Président : Pr Amagana DOLO

Membres : Dr Boubacar MAIGA

Codirecteur : Dr Séidina Samba DIAKITE

Directeur : Pr Mahamadou DIAKITE

Remerciements

Gloire et louanges à ALLAH le Tout Puissant, le Miséricordieux, le clément qui par sa Grace m'a permis la réalisation de cette œuvre.

A notre prophète MOHAMED que la paix et le salut de Dieu soient sur lui

Je remercie du fond du cœur le Professeur Mahamadou Diakité mon directeur de thèse. J'ai eu le privilège de travailler parmi votre équipe et d'apprécier vos qualités et vos valeurs. Votre sérieux, votre compétence et votre sens du devoir m'ont énormément marqués. Veuillez trouver ici l'expression de ma respectueuse considération et ma profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines. Ce travail est pour moi l'occasion de vous témoigner ma profonde gratitude.

Je remercie sincèrement Docteur Seidina Diakité, pour ses connaissances, ses conseils, sa bonne humeur, sa disponibilité et surtout son amabilité. Seul Dieu peut le récompenser pour ses bonnes actions.

Je remercie également le Pr Amagana DOLO, pour ses conseils et sa bonne humeur.

Mes profonds remerciements vont également à toutes les personnes qui m'ont aidés et soutenu de près ou de loin principalement à tous les travailleurs du MRTC, surtout ceux du Laboratoire Immuno-génomique, particulièrement Dr Seibou Doumbia, Dr Seidina Diakite, Dr Drissa Konate, Dr Karim Traore, Dr Ibrahim Sanogo, Mr Salam Keita, Dr Ismaïla Coulibaly, Dr Sorry Diawara, Dr Mory Diawara ils n'ont ménagé aucun effort pour m'aider dans ce travail. Je leur remercie pour leur bonne foi, leur disponibilité, leur humanité, seul Dieu peut les récompenser pour tout ce qu'ils ont fait pour moi.

Mes remerciements s'adressent également à tous nos professeurs pour leurs générosités et la grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.

Je remercie tous mes amis (es), collègues qui, d'une quelconque manière, m'ont apporté leur amitié, leur attention, leurs encouragements, leur appui et leur assistance pour que je puisse mener à terme ce travail : Mme Boubé Rabiato Maiga, Karima Sani Alio, Souleymane Kadri, Ridwane Bawa, Mohamed Seydou Dodo, Nafissa Sissoko, Fatoumata O Maiga, Sekou Sissoko, Souleymane Mamoudou, mes voisines Laetitia, Oliver et Corine, ainsi que toute la promotion Professeur Ousmane Doumbia. Je remercie Dieu de leur avoir mis sur ma route que Dieu fasse que nous réussissons tous dans notre vie de famille et professionnelle.

Je remercie également toute la communauté Nigérienne vivant au Mali.

Dédicaces

Je dédie ce travail,

A la mémoire de ma défunte mère, Habibata Rabo

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices de ton vivant que tu as consentis pour mon éducation et ma formation. Repose en paix MAMAN.

A mon très cher papa, Halilou Idi

Affable, honorable, aimable : Vous représentez pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Vos prières et vos bénédictions m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez

éloquente pour exprimer ce que vous méritez pour tous les sacrifices que vous n'avez cessé de me donner tant matérielles que morales depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Vous avez fait plus qu'un père puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études. Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorde santé, longue vie et bonheur. Amen

A mon très cher mari, Mamane Souleymane

Quand je t'ai connu, j'ai trouvé l'homme de ma vie, mon âme sœur et la lumière de mon chemin. Ma vie à tes cotés est remplie de belles surprises.

Tes sacrifices, ton soutien moral et matériel, ta gentillesse sans égal, ton profond attachement m'ont permis de réussir mes études. Sans ton aide, tes conseils et tes encouragements ce travail n'aurait vu le jour. Que dieu réunisse nos chemins pour un long commun serein et que ce travail soit témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère et fidèle.

A ma tutrice, Mme Coulibaly Fanta

Vous m'avez accueilli à bras ouverts vous et votre mari dans votre famille et m'avez traité comme votre propre fille sans distinction. En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A toute ma famille, mes frères, sœurs, nièces, et neveux, Hamsatou, Hadiza, Moustapha, Idrissa, Zelika, Oumma khaltoum, Yasmina, Mouaz, Abdourahmane, Oumoulher, Amina, Abdoul Aziz. Je vous dis un grand merci pour votre soutien moral, physique et financier.

A ma belle-famille, toute la famille Mamane Illiassou : Amina, Abdoul kader, mes beaux-parents, Abdoul Rachid, Bashir, Myriam.

A tous mes oncles, tantes, cousins et cousines un grand merci pour vous.

A ma grand-mère maternelle Hadiza.

A mes autres grands parents que leurs âmes reposent en paix. Amen.

Homages aux membres du jury

A notre maître et président du jury

Professeur Sékou Fantamady TRAORE

- PhD en entomologie médicale
- Directeur du programme d'entomologie médicale du MRTC
- Professeur de Biologie et de Zoologie à la FMOS
- Chef du DER des sciences Fondamentales de la FMOS

Cher Maître,

Vous nous faites un immense honneur en acceptant de présider ce jury.

Nous avons bénéficié de votre enseignement de qualité, votre savoir scientifique et votre amour du travail bien fait. Trouvez ici toute notre admiration ainsi que notre profond respect.

A notre maître et membre du jury

Dr Boubacar Maiga

- Docteur en médecine
- PhD en Immunologie
- Maître-assistant en Immunologie (FMOS)
- Enseignant chercheur à la FMOS

Cher Maître, nous avons été très affectés par la gentillesse avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail.

Acceptez ici nos remerciements les plus sincères.

A notre maître et co-directeur de thèse

Docteur Seidina Aboubacar Samba Diakité

- Docteur en Pharmacie
- Assistant en Immunologie à la FAPH

- Doctorant (PhD) à l'Université Pierre et Marie Curie de France

Vous nous avez accepté avec facilité à vos côtés et vous nous avez guidé tout au long de la réalisation de ce travail.

Votre simplicité, votre gentillesse, votre rigueur scientifique et votre amour pour le travail bien fait font de vous un exemple à suivre.

Nous ne saurons vous remercier assez, trouvez dans ce travail le vôtre notre reconnaissance et notre attachement indéfectible.

A notre maître et directeur de thèse

Pr Mahamadou Diakité

- Docteur en Pharmacie
- PhD en génomique humaine
- Maître de conférences en Immunologie
- Responsable du laboratoire Immunogénétique du Centre de Recherche et de Formation sur le Paludisme (MRTC).
- Secrétaire Principal de la faculté de Médecine et d'odontostomatologie (FMOS)
- Secrétaire Permanent du Comité d'éthique de la FMOS
- Chef du Service des Relations Extérieures et de la Coopération de l'USTTB

Cher Maître, c'est un honneur pour nous d'avoir travaillé à vos côtés, de profiter de votre rigueur scientifique, de la valeur de vos connaissances.

Au-delà de votre compétence, votre disponibilité et votre engagement pour un travail bien fait, forcent l'admiration et le respect.

Cher Maître, permettez-nous, de vous exprimer notre gratitude et nos remerciements les plus sincères.

Tables de matières

Sommaire

Remerciements	2
Dédicaces	3
Hommages aux membres du jury	6
Tables de matières.....	8
Liste des figures	11
Liste des tableaux	12
Liste des sigles et des abréviations.....	13
1. Introduction	15
2. Objectifs	19
2.1. Objectif général.....	19
2.2. Objectifs spécifiques	19
3. Généralités sur le paludisme et les hémoglobinopathies	20
3.1. Définition du paludisme.....	20
3.2. Epidémiologie	20
3.2.1. Modalités de transmission du paludisme au Mali.....	20
3.2.2. Agent pathogène	23
3.2.3. Vecteur	24
3.2.4. Cycle de développement	25
3.3. Physiopathologie du paludisme	27
3.3.1. Accès palustre simple.....	27
3.3.2. Accès palustre grave et compliqué	28
3.4 Immunité antipalustre.....	31
3.4.1. Immunité innée ou naturelle.....	31
3.4.2 Immunité adaptative ou acquise	31
3.5. Vaccins antipalustres	32
3.6. Hémoglobinoses	33
3.6.1. Paludisme et hémoglobine S	33

3.6.2. Paludisme et hémoglobine C	34
4. Méthodologie.....	36
4.1. Cadre d'étude	36
4.2. Lieu d'étude	36
<input type="checkbox"/> Végétation/hydrographie/climat.....	38
<input type="checkbox"/> Infrastructures socio-sanitaires	40
<input type="checkbox"/> Activités socio-économiques et culturelles.....	40
4.3. Critères d'inclusion et de non inclusion.....	41
4.3.1. Critères d'inclusion	41
4.3.2. Critères de non inclusion	42
4.4. Types d'étude et techniques de laboratoire utilisées	42
4.4.1. Conception de l'étude	42
4.4.2. Souches de <i>P. falciparum</i> adaptées au laboratoire et isolats de <i>P. falciparum</i> cultivés à court terme.....	44
Détection de la réactivité des anticorps aux globules rouges parasites en utilisant la cytométrie en flux multicolore	44
4.5. Gestion et analyse statistique des données.....	46
4.6. Variables mesurées	47
5. Résultats	48
5.1. Association entre l'âge et HbAS et le risque réduit de paludisme chez les enfants de Kéniéroba.....	49
5.2. Optimisation de dosage pour mesurer la reconnaissance par les anticorps de la surface des globules rouges parasités.....	51
5.3. Proportion de patients répondeurs à la diversité des souches de <i>P. falciparum</i> et saison de transmission	54
5.4. Corrélation entre âge et type d'Hb et reconnaissance des globules rouges parasités par les anticorps IgG	55
5.5. Relation entre l'ampleur de la réponse IgG des enfants contre les souches parasitaires avec l'âge et le type d'Hb.....	58
5.6. Réponse IgG contre les souches parasitaires et le risque ultérieur de paludisme	62
5.7. Relation entre l'ampleur de la réponse IgG des enfants contre les antigènes du mérozoïte et la saison de transmission.....	63

6. Commentaires et discussion	66
7. Limites de notre étude.....	69
8. Conclusion et recommandations	71
8.1. Conclusion	71
8.2. Recommandations	71
9. Références Bibliographiques	72
10. Annexe	80
10.1 Détermination du Taux d'hémoglobine	80
10.2 Détermination du groupe sanguin ABO.....	81
10.3 Détermination du type d'Hémoglobine avec le D-10	83
10.4 Détection de la délétion 3.7-kb responsable de l'alpha-thalassémie par PCR ...	84
11. Fiche signalétique	88
Résumé :.....	88
Summary.....	90
Serment de Galien	91

Liste des figures

Figure 1: Cycle biologique du <i>Plasmodium</i>	27
Figure 2: Site d'étude dans la commune rurale de Bancoumana.....	37
Figure 3: Plan de masse des trois villages d'étude dans la commune rurale de Bancoumana Source: Unité GIS MRTC/FMPOS.	38
Figure 4: Variation de test-à-test en % de reconnaissance dans les plasmas d'adultes Américains (en haut) et Maliens (en bas).....	52
Figure 5 : Stratégie de déclenchement pour évaluer la reconnaissance des globules rouges parasités par les IgG et les IgM (GRi)	53
Figure 6: Pourcentage de sujets répondeurs aux sept souches de <i>P. falciparum</i> avant et après la saison de transmission 2009	54
Figure 7: Influence de l'âge et de la saison de transmission sur la réponse IgG plasmatiques des sujets aux sept souches de <i>P. falciparum</i> en amont et en aval de la saison de transmission.....	56
Figure 8: Influence du type d'hémoglobine (type d'Hb) et de la saison de transmission sur la réponse IgG plasmatiques des sujets aux sept souches de <i>P. falciparum</i> en amont et en aval de la saison de transmission.....	57
Figure 9: Impact de la saison de transmission, de l'âge et du type d'hémoglobine sur l'amplitude des réponses IgG aux souches de parasites	61
Figure 10. Étendue de la réponse IgG aux souches parasitaires corroboré avec l'augmentation du titre d'IgG aux antigènes du mérozoïte.	63
Figure 11: Variation des pourcentages de GR infectés (par les souches de <i>P. falciparum</i>) reconnus par les IgG plasmatique au cours de la saison de transmission.	64
Figure 12: Analyseur et Microcuvette HemoCue	80
Figure 13: Mécanisme de mesure du taux d'Hb par l'appareil HemoCue 201+	81

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des niveaux d'endémicité de la transmission du paludisme selon la classification de Yaoundé	22
Tableau 2 : Position taxonomique des anophèles [43].....	24
Tableau 3. Caractéristiques de la grande cohorte d'étude (1 543 enfants).....	48
Tableau 4. Taux d'incidence du paludisme stratifié selon le type d'Hb and l'âge.....	49
Tableau 5. Analyse de régression multivariée: effets de l'âge et du type d'Hb type sur le risque de paludisme. ^a	50
Tableau 6 : Analyse de contingence pour déterminer si la réponse IgG aux souches de parasites corrobore avec l'autre: saison de pré-transmission ^a	59
Tableau 7 : Analyse de contingence pour déterminer si la réponse IgG aux souches de parasites corrobore avec l'autre: saison de post-transmission ^a	59
Tableau 8. Analyse de régression multivariée: effets des IgG spécifiques de souches parasitaires sur le risque de paludisme. ^a	62

Liste des sigles et des abréviations

- AMA1:** Apical Membran Antigen 1 (Antigène membranaire apicale 1)
- CD:** Cluster of Differentiation (Agrégat de différenciation tels que CD35, CD36)
- CO:** Monoxide de Carbone
- CO2:** dioxide de Carbone
- CR1:** Complement Receptor 1(Récepteur du composant 1 du Complément, CR1)
- CSA:** Chondroïtine Sulfate A
- CSP:** Circum Sporozoit Protein (Protéine à la surface du sporozoïte)
- EBA175:** Erythrocyte Binding Antigen 175 (Antigène d'adhésion érythrocytaire 175)
- ELISA:** Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay (Test Immunoenzymatique liés absorbant)
- FMPOS:** Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie
- GIA:** Growth Inhibition Assay (Test d'inhibition de croissance)
- GRI :** Globules rouges infectés
- GPI:** Glycosyl phosphatidyl inositol (Glycosyle phosphatidyle inositol)
- G6PD:** Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase
- HEPES:** N-2 HydroxyEthyl Piperazine N'-2 Sulfonic acid
- Hb:** Hémoglobine (HbS; HbF)
- HO-1:** Hème Oxygénase-1
- ICAM-1:** Inter Cellular Adhesion Molecule-1(Molécule d'adhésion intercellulaire 1)
- IFN γ :** interféron γ
- Ig:** Immunoglobuline (exemple IgG)
- IL:** Interleukine (exemple IL-1)
- KAHRP:** Knob-Associated Histidin Rich protein
- KDa :** Kilo Dalton
- MRTC:** Malaria Research and Training Center
- MSP:** Merozoit Surface Protein 1 (protéine 1 à la surface du mérozoïte)

NIAID: National Institute of Allergy and Infectious Diseases (Institut National d'allergie et de maladies infectieuses)

NIH: National Institutes of Health (Instituts Nationaux de Sante des Etats-Unis)

NK: Natural Killer (Cellule tueuse naturelle)

NO: Oxyde nitrique

OMS (WHO): Organisation mondiale de la Santé

O₂: oxygene

OR : Odds Ratio

PfEMP: *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane protein

PfHRP: *Plasmodium falciparum* Histidin Rich protein

PCR: Polymerase Chain Reaction (Réactions de polymérisation en chaîne)

PECAM-1: Platelets Endothelial Cell Adhesing Molecular-1 (Molécule-1 adhérant à l'endothélium cellulaire des plaquettes)

PfHRP-1: *Plasmodium falciparum* Histidin Rich Protein-1 (Protéine 1 riche en histidine de *P. falciparum*)

Pf: *Plasmodium falciparum* (Pf)

RBC: Red Blood Cells

TNF: Tumor Necrosis Factor

USTTB: Université des Science, des Techniques et des Technologies de Bamako

VAR: antigène de variant

VCAM-1: Vascular Cell Adhesing Molecular-1 (Molécule d'adhésion cellulaire vasculaire)

VSA : antigènes de surface variant

1. Introduction

Le paludisme est une maladie parasitaire causée par des parasites protozoaires appartenant au genre *Plasmodium*. *Plasmodium falciparum* est responsable de la forme la plus grave du paludisme. Selon certaines estimations, plus de 3 milliards de personnes sont à risque de paludisme et la maladie tue jusqu'à 1 million d'entre eux chaque année [1, 2]. Le fardeau du paludisme à *P. falciparum* est largement porté par les plus jeunes enfants vivant en permanence dans les zones endémiques [3]. Le développement de l'immunité naturellement acquise contre le paludisme est lent et mal compris. Comme les enfants subissent de multiples infections à *P. falciparum* au cours de leur enfance et adolescence, ils développent des étapes successives de l'immunité non-stérilisante qui les protège du paludisme grave et compliqué et finissent par éliminer leurs densités parasitaires [4, 5]. Ce processus produit une population adulte avec des parasitémies asymptomatiques qui sont souvent en dessous du niveau de détection microscopique des frottis sanguins épais. Ces étapes de l'immunité acquise naturellement sont soupçonnées de se poser dans le cadre de l'exposition répétée à des souches parasitaires exprimant différentes constellations d'antigènes de surface variants (VSA) à la surface de leurs globules rouges (hématies) de l'hôte [6, 7]. L'exposition cumulée aux VSA entraîne un répertoire de réponses immunitaires spécifiques à la souche parasitaire qui confèrent collectivement un certain degré d'immunité transcendant la souche (c'est-à-dire, la prémunition)[8].

Plusieurs études ont trouvé que l'immunité à anticorps IgG acquise naturellement réduit l'incidence et la sévérité des syndromes de paludisme, et limite les densités parasitaires. En 1961, Cohen et collaborateurs ont démontré en Gambie que le transfert passif de gammaglobulines des adultes immunitaires à de très jeunes enfants atteints de paludisme atténuait leur maladie et réduisait leurs densités parasitaires[9]. Une étude ultérieure a montré que le transfert passif d'IgG immunitaire mixtes des adultes vivant dans différentes régions d'endémie palustre d'Afrique aux patients thaïlandais non/semi-immuns atteints de paludisme résistant aux médicaments a été associée à

une réduction efficace de la fièvre et de la parasitémie [10]. Les spécificités antigéniques et les mécanismes effecteurs immuns d'IgG passivement transférés n'ont pas été entièrement définis. La réponse IgG contre les antigènes du mérozoïte (par exemple, AMA-1, EBA-175, MSP-1, et MSP-2) et les variants de la protéine membranaire-1 de *P. falciparum* à la surface des érythrocytes (PfEMP1) - qui constituent une famille d'adhésines - ont tous été impliqués dans l'immunité protectrice. Les mécanismes possibles comprennent la neutralisation de l'invasion des globules rouges par les mérozoïtes et l'opsonisation des globules rouges parasités (GRi). L'opsonisation IgG des GRi peut affaiblir la liaison des GRi à l'endothélium microvasculaire, à fixer le complément à la surfaces les globules rouges parasités et à renforcer et compléter la phagocytose des GRi initiée par le récepteur FcγR et les récepteurs du Complément par les monocytes sanguins et les macrophages spléniques.

En Afrique sub-saharienne, les polymorphismes fréquents du globule rouge (hémoglobine falciforme (Hb) S, HbC, α-thalassémie, déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), antigène O du groupe sanguin), ont été diversement associés à la protection contre le paludisme à *P. falciparum* [11, 12], et donc représentent l'adaptation évolutive humaine à la morbidité et aux complications mortelles de cette maladie [13]. Une méta-analyse récente, par exemple, a constaté que l'HbS hétérozygotie (HbAS) et l'HbC homozygotie (HbCC) réduisent considérablement le risque de paludisme grave de plus de 90% par rapport à l'HbA homozygote (HbAA) [14]. Il a été proposé que ces traits d'Hb et autres variants (par exemple, HbAC) confèrent une protection contre le paludisme au moyen de mécanismes innés, des réponses immunitaires acquises, ou les deux. L'affichage anormal de PfEMP1, ligand majeur de cytoadhérence et les VSA du parasite, sur la surface de globules rouges HbAS, HbAC et HbCC a été impliqué dans la protection contre le paludisme[15]. Plus précisément, ce phénotype a été associé à l'affaiblissement de la cytoadhérence de globules rouges parasités aux cellules endothéliales microvasculaires et à la formation de rosettes avec des globules rouges non-infectés [16, 17]. Autres mécanismes innés de protection contre le paludisme ont été proposés pour HbAS tels que le renforcement

de la falciformation des GRi et les dommages induits par l'oxydation des membranes des GRi (avec des conséquences négatives pour la survie du parasite) [18, 19]. Un mécanisme supplémentaire proposé suggère une hémolyse augmentée des globules rouges HbAS, laquelle est traduite par des niveaux élevés de l'hème oxygénase-1 (HO-1) dans le sang qui affecte les niveaux du CO. L'augmentation de HO-1 a également été associée à la production de neutrophiles dysfonctionnels et à l'activité pro-inflammatoire diminuée [20, 21]. Les mécanismes à médiation immunitaire ont également été proposés pour l'HbAS, y compris l'amélioration des réponses d'anticorps contre PfEMP1 et peut-être d'autres VSA (par exemple, stevors, rifins) [22, 23].

Historiquement, les chercheurs se sont appuyés sur des tests d'agglutination du sérum pour mesurer la réactivité des anticorps contre les VSA à la surface des GRi intacts [6, 24, 25]. Par exemple, Marsh et Howard ont rapporté que les enfants gambiens ont montré des réponses d'agglutination spécifiques à la souche *P. falciparum*, tandis que les adultes gambiens ont montré des réponses à réaction croisée [6] - vraisemblablement des anticorps dirigés contre un antigène conservée, ou une variété d'anticorps contre plusieurs antigènes exprimés dans différentes souches. En travaillant également avec des sérums gambiens, Newbold et coll. ont confirmé que la réponse agglutinante des anticorps est très spécifique de la souche parasitaire [26]. Plus récemment, les résultats de tests d'agglutination ont été utilisés pour classer les VSA de *P. falciparum* en deux groupes: l'un contenant les VSA fonctionnels qui interviennent dans l'efficacité de la cytoadhérence et un autre contenant un répertoire diversifié d'antigène qui échappe au système immunitaire [27]. Les résultats de ces tests d'agglutination ont été corrélés avec le risque de paludisme (au moment de la collecte de l'échantillon) [28], à une protection spécifique de souche [29, 30], et à la protection clinique dans d'autres études [22, 31]. Compte tenu de ces résultats, il est clair que les cibles antigéniques, les fonctions immunitaires effectrices, et le rôle des anticorps agglutinants protecteurs contre les GRi intacts n'ont pas encore été complètement élucidés.

Les études utilisant le dosage indirect d'immunofluorescence (IFA) ont également conclu que la hausse des titres d'IgG contre les GRi est associée à une fièvre réduite et à la charge parasitaire [32, 33]. Cependant, ces résultats diffèrent des résultats obtenus lors des études de transfert passif en utilisant le modèle du singe *Saimiri sciureus* (singé écureuil), dans lequel les titres d'anticorps (mesurés par IFA) contre les schizontes de *P. falciparum* des GRi ne sont pas corrélés avec la protection (mesurée en évaluant le cours de la parasitémie après l'inoculation par voie intraveineuse avec 50×10^6 de GRi) [34, 35]. Une interprétation possible de ce résultat est que les anticorps anti-*Plasmodium* exercent leurs effets protecteurs à une concentration relativement faible et que l'augmentation de cette concentration par transfert passif d'anticorps n'améliore pas la protection. Avec les progrès de la technologie, les chercheurs ont utilisé des tests moins subjectifs et plus quantitatifs tels que l'ELISA utilisant des lysats de schizontes [36, 37] et la cytométrie de flux utilisant des trophozoïtes et schizontes intacts de GRi pour évaluer les réponses anticorps d'un individu contre les clones de *P. falciparum* adaptées au laboratoire et contre les isolats cliniques [31, 38, 39]. Staalsoe et collaborateurs, par exemple, ont rapporté une forte corrélation entre les réponses d'agglutination sérique contre les GRi et la réactivité des anticorps IgG contre les GRi telles que mesurées par la cytométrie en flux [38].

Étant donné que les anticorps jouent un rôle fondamental dans l'immunité contre le paludisme à *P. falciparum*, nous avons cherché à développer un test de cytométrie de flux normalisée afin de quantifier la réactivité des anticorps d'une personne contre la surface des GRi. Pour établir et appliquer ce test, nous avons comparé les réponses IgG de 176 enfants vivant à Kéniéroba et âgés de 3-11 ans contre un panel de GRi : 3 lignées de parasites adaptées en laboratoire et 4 isolats de parasite provenant du Mali ou du Cambodge. Nous avons également exploré si les réponses IgG contre ces sept souches de parasites augmentaient au cours de la saison de transmission et si elles différaient entre les groupes d'enfants appariés selon l'âge et le type d'hémoglobine (HbAA, HbAS HbAC).

2. Objectifs

2.1. Objectif général

Etudier la reconnaissance par les anticorps de type IgG de différentes souches de *P. falciparum* chez les enfants vivant dans la zone endémique de Kéniéroba.

2.2. Objectifs spécifiques

- Déterminer l'influence de l'âge, du type d'hémoglobine (HbAA, HbAS et HbAC) sur l'incidence du paludisme au cours de la période d'étude ;
- Déterminer l'influence de la saison de transmission sur la reconnaissance par les anticorps IgG de différentes souches de *P. falciparum* chez les enfants vivants dans la zone de Kéniéroba ;
- Déterminer l'influence de l'âge sur la reconnaissance par les anticorps IgG de différentes souches de *P. falciparum* chez les enfants vivants dans la zone de Kéniéroba ;
- Déterminer l'influence de l'HbAS et de l'HbAC sur l'acquisition de «anticorps souche-transcendants» sur la reconnaissance IgG de différentes souches de *P. falciparum* par le plasma des enfants vivants à Kéniéroba, Fourda et Bozokin.

3. Généralités sur le paludisme et les hémoglobinopathies

3.1. Définition du paludisme

Le paludisme est une affection due à la présence dans le sang d'un parasite unicellulaire (protozoaire) du genre *Plasmodium* à cycle diphasique : cycle à deux hôtes indispensables : Homme et l'Anophèle, son vecteur biologique.

3.2. Epidémiologie

3.2.1. Modalités de transmission du paludisme au Mali

Le paludisme constitue la première cause de mortalité et de morbidité au Mali [40]. Il est particulièrement endémique dans les régions du centre et du sud et épidémique dans les régions désertiques du nord. Il y a une extrême variabilité de la situation épidémiologique en fonction des faciès géo-climatiques. Au Mali, il existe cinq modalités épidémiologiques de transmission du paludisme [41] :

- ❖ La zone de transmission saisonnière longue de quatre à six mois au Sud correspondant à la région Soudano-guinéenne (régions de Sikasso, sud des régions de Ségou, Koulikoro et Kayes). Le paludisme y est holo-endémique avec un indice plasmodique supérieur à 75% de juin à novembre ;
- ❖ La zone de transmission saisonnière courte de quatre mois dans les régions de la savane nord soudano-sahélienne (régions de Mopti, nord des régions de Ségou, Koulikoro et Kayes). Le paludisme y est hyper-endémique avec un indice plasmodique variant entre 50 et 75% ;
- ❖ La zone subsaharienne au Nord où la transmission est sporadique voire épidémique (régions de Tombouctou, Gao et Kidal). L'indice plasmodique est inférieur à 5% ;
- ❖ La zone du delta inférieur du fleuve Niger (Office du Niger) et les zones de retenue d'eau et de riziculture (barrages de Sélingué et Mantali) où la transmission est bimodale voire plurimodale en début de la saison des pluies, au

cours de la période de décrue et de mise en eau des casiers rizicoles. Le paludisme est de type méso-endémique avec un indice plasmodique inférieur à 40% ; et le milieu urbain, en particulier Bamako et Mopti, qui est impropre à l'impaludation (pollution des gîtes larvaires, automédication élevée, etc.). Le paludisme y est de type hypo-endémique avec un indice plasmodique inférieur à 10%.

Tableau 1 : Classification des niveaux d'endémicité de la transmission du paludisme selon la classification de Yaoundé

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

3.2.2. Agent pathogène

L'agent pathogène du paludisme est un hématozoaire du genre *Plasmodium*, appartenant à la famille des *Plasmodidae*, à l'embranchement des *Sporozoa* et à l'ordre des *Haemosporidae*, caractérisé par la présence d'un complexe apicale jouant un rôle important dans la sécrétion des organelles et l'orientation du *Plasmodium* lors d'une invasion. Cent soixante-douze (172) espèces de *Plasmodium* ont été répertoriées et possèdent des cycles biologiques similaires, parmi lesquelles quatre sont inféodées à l'homme à savoir :

- *Plasmodium falciparum* : c'est la plus répandue et la plus redoutable surtout en Afrique. Il représente 80 à 95% de la formule parasitaire. Il est transmis pendant toute l'année avec des recrudescences saisonnières dans les régions tropicales. Cette transmission s'interrompt lorsque la température chute en dessous de 18°C. Son incubation est de 7 à 12 jours et il est responsable des formes cliniques graves.
- *Plasmodium vivax* : cette espèce se rencontre surtout en Amérique du Sud et en Asie. Il est rarement observé en Afrique noire où la majorité de la population sont du groupe sanguin érythrocytaire Duffy négatif. Sa période d'incubation est de 11 à 13 jours. Elle est responsable de la fièvre tierce bénigne et des rechutes.
- *Plasmodium malariae*: elle se rencontre en Afrique de façon sporadique et sa période d'incubation est plus longue que les autres, environ 15 à 21 jours. Cette espèce est responsable de la fièvre quarte bénigne. Parfois, elle peut entraîner des complications rénales.
- *Plasmodium ovale* : elle sévit surtout en Afrique intertropicale et dans certaines régions du Pacifique. Son incubation est de 15 jours mais peut être plus longue. Elle provoque la fièvre tierce et son évolution est bénigne mais est responsable des rechutes au même titre que *P. vivax*.

Enfin une cinquième espèce, *Plasmodium knowlesi*, responsable du paludisme chez le singe a été retrouvée infectant l'homme dans les conditions naturelles en Malaisie [42].

3.2.3. Vecteur

Les vecteurs du paludisme des mammifères y compris l'homme, appartiennent tous au genre *Anopheles* qui occupe une position taxonomique bien précise (tableau 2).

Tableau 2 : Position taxonomique des anophèles [43]

Embranchement	Arthropoda (= pattes articulées)
Classe	Insecta (= corps segmenté en trois parties)
Sous-classe	Pterygota (= avec des ailes)
Ordre	Diptera (= avec 2 ailes)
Sous-ordre	Nematocera (= avec des antennes rondes et longues)
Famille	Culicidae (= moustiques)
Sous-famille	Anophelinae (= anophèle)
Genres	Anopheles, Bironella, Chagasia

Il existe environ 484 espèces d'anophèles, mais seulement une soixantaine n'assure que la transmission des plasmodies humaines avec plus ou moins d'efficacité [43].

La répartition des espèces à travers le monde est fonction des conditions favorables à leur implantation et beaucoup de facteurs climatiques et environnementaux peuvent influencer la transmission du paludisme (sécheresse, variations de température, construction des barrages etc. Au Mali, la transmission est assurée par le complexe d'*Anopheles gambiae s.l.* et d'*Anopheles funestus* [44].

3.2.4. Cycle de développement

Le parasite du paludisme a un cycle hétéroxène à deux hôtes : un hôte intermédiaire (l'homme) chez lequel s'accomplissent le cycle asexué et un hôte définitif où a lieu la reproduction sexuée, l'anophèle femelle.

Le cycle de développement du *Plasmodium* est complexe, il comprend un hôte intermédiaire (homme) où il se multiplie de manière asexuée et un hôte définitif (Anophèle femelle) où a lieu la reproduction sexuée.

Le cycle se déroule successivement chez l'homme (phase asexuée) et chez l'anophèle (phase sexuée)

3.2.4.1. Cycle chez le moustique (Sporogonie)

Lors d'un repas sanguin sur une personne infectée, l'anophèle femelle ingère des gamétocytes à potentiel mâle et femelle. Ceux-ci parviennent dans l'estomac du moustique et se transforment en gamètes. Le gamète mâle subit un processus d'exflagellation à la suite duquel les gamètes femelles sont fécondés. Il en résulte un zygote mobile appelé ookinète qui va s'implanter sous la paroi stomacale et former l'oocyste. Cette brève phase diploïde s'achève par une division méiotique qui sera suivie de plusieurs milliers de mitoses conduisant au développement de sporozoïtes. Ces derniers vont gagner préférentiellement les glandes salivaires et constituent les formes infestantes prêtes à être inoculées avec la salive lors de son repas sanguin. L'ensemble de ce cycle se déroule en 4 à 10 jours, suivant la température extérieure et les espèces en causes[45].

3.2.4.2. Cycle chez l'homme (Schizogonie)

➤ Cycle exo-érythrocytaire

Les sporozoïtes inoculés par l'anophèle femelle lors de son repas sanguin envahissent les hépatocytes en quelques minutes, grâce à une interaction entre la protéine majeure de la surface du sporozoïte (CSP) et un récepteur spécifique situé sur la membrane plasmique de l'hépatocyte du côté de l'espace de Disse (espace en contact avec le sang circulant). Le sporozoïte entre alors en phase de réplication au sein de la vacuole parasitophore et la prolifération intracellulaire repousse en périphérie le noyau de la

cellule. Ce dernier finit par constituer une masse multi nucléée appelée schizonte (schizonte hépatocytaire) qui, après quelques jours de maturation, éclate et libère des milliers de mérozoïtes dans la circulation sanguine. Cette phase de multiplication est asymptomatique et dure de 8 à 15 jours selon les espèces.

Dans les infections dues à *P. vivax* et à *P. ovale*, on peut observer les formes hypnotiques (schizogonie hépatique retardée) entraînant la libération dans le sang de mérozoïtes plusieurs mois après l'infection, expliquant ainsi les rechutes tardives observées avec ces espèces.

➤ **Cycle intra-érythrocytaire**

C'est la phase du cycle qui est responsable des symptômes cliniques imputables au paludisme. Ces symptômes sont d'intensité variable en fonction du profil immunitaire de la personne infectée. Les mérozoïtes libérés lors de la rupture des schizontes hépatocytaires vont débiter le cycle sanguin asexué de prolifération en infectant les érythrocytes. Le mérozoïte pénètre grâce à un processus parasitaire actif et se différencie au sein de la vacuole parasitophore en anneau, puis en trophozoïte, stade à partir duquel une intense phase répllicative commence. Il donne alors naissance au schizonte qui, après une segmentation montre une forme caractéristique de rosace, entraînant la destruction des globules rouges et la libération de 8 à 32 mérozoïtes. Ces mérozoïtes vont rapidement réinfecter d'autres érythrocytes sains et commencer un nouveau cycle de réplication intra-érythrocytaire. L'ensemble de ce cycle dure 48 à 72 heures selon l'espèce plasmodiale.

L'apparition des gamétocytes a lieu après un certain nombre de cycles, généralement vers la deuxième semaine qui suit l'infection et ces formes peuvent persister plusieurs semaines après la guérison. Certains mérozoïtes subissent une maturation accompagnée d'une différenciation sexuée et se transforment en gamétocytes mâle et femelle. A la suite d'une nouvelle piqûre lors de son repas sanguin, les gamétocytes mâles et femelles (au dimorphisme sexuel marqué) sont ingérés par l'anophèle pour un nouveau cycle.

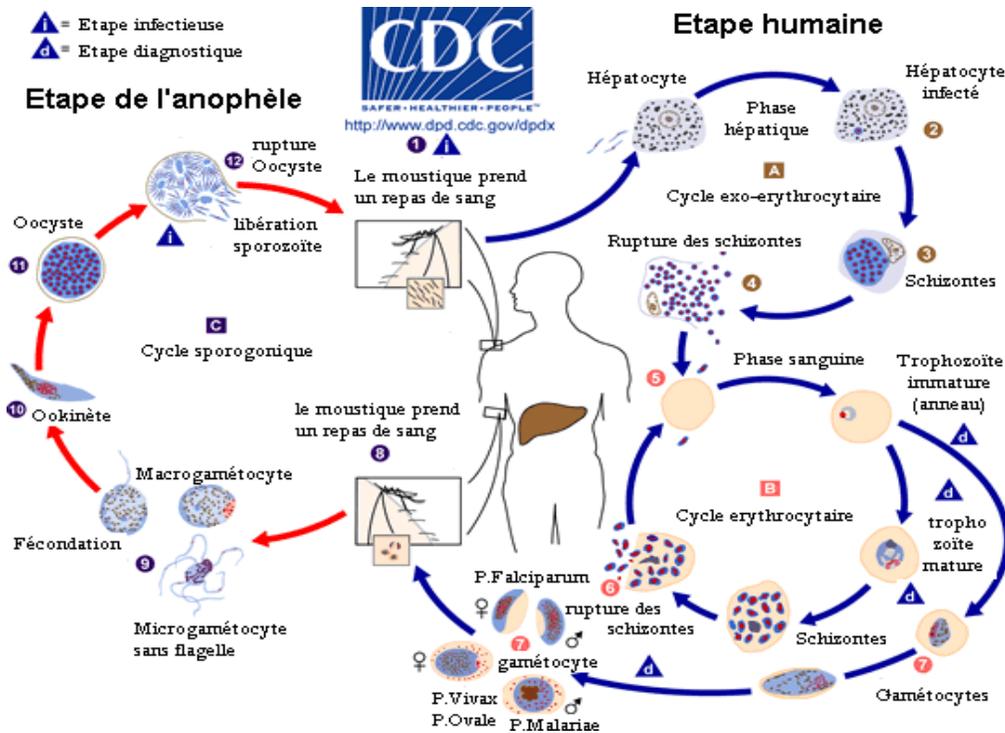


Figure 1: Cycle biologique du *Plasmodium*

Source: Center for Diseases Control and Prevention (CDC, www.dpd.cdc.gov/dpdx), Atlanta, Georgia, Division of parasitic diseases (Department of Health and Human Services US).

3.3. Physiopathologie du paludisme

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

3.3.1. Accès palustre simple

Les symptômes du paludisme commencent à se prononcer à partir du stade érythrocytaire du cycle de développement du parasite. La fièvre, lors de l'accès simple, survient au moment de la lyse des hématies qui libère l'hémozoïne (pigment malarique) et d'autres antigènes parasitaires. Pendant longtemps on a cru que le pigment malarique se comportait comme un pyrogène stimulant les centres hypothalamiques thermorégulateurs. Actuellement, il apparaît que la fièvre n'est pas propre au parasite lui-même, mais est due à des cytokines libérées par les macrophages et les cellules

endothéliales de l'hôte[46]. Toute une série de cytokines peuvent avoir un effet pyrogène, telles que l'IL-1, l'IL-6 et la lymphotoxine β . Mais c'est le TNF- α dont le lien avec la fièvre a été le mieux établi [47, 48] qui semble être l'élément clé. Ces cytokines se comportent comme des pyrogènes endogènes en stimulant les centres thermorégulateurs hypothalamiques. La fièvre n'apparaît que lorsque la parasitémie atteint un seuil critique, variable d'un sujet à l'autre et d'une souche de parasite à l'autre.

Au cours des accès de primo invasion, le cycle érythrocytaire est généralement non synchronisé. La fièvre prend alors une allure continue ou irrégulière selon la parasitémie. Lorsque les cycles se synchronisent progressivement, la fièvre prend un caractère de type intermittente, tierce ou quarte[46]. Pendant l'infection, le système phagocytaire débarrasse l'organisme non seulement des pigments malariques mais aussi des débris érythrocytaires, ce qui provoque l'hépatosplénomégalie[49].

3.3.2. Accès palustre grave et compliqué

L'infection palustre est le plus souvent asymptomatique en zone holo- et d'hyper-endémie chez les enfants d'âge scolaire. L'apparition des formes graves est surtout liée à la virulence de l'espèce *P. falciparum* et au niveau de l'immunité acquise des personnes [50]. Les concepts physiopathologiques du paludisme grave font intervenir deux phénomènes interdépendants : la séquestration des hématies parasitées et le phénomène immunologique.

3.3.2.1. Séquestration

C'est l'adhésion des érythrocytes infectés aux cellules endothéliales des capillaires veineux au moyen d'interaction spécifiques entre les molécules d'origine parasitaire présentes à la surface des globules rouges infectés avec les récepteurs correspondants à la surface des cellules endothéliales, aboutissant à l'obstruction des micro-vaisseaux. Trois mécanismes concourent à ce phénomène : l'auto-agglutination, la formation de rosettes «ou *rosetting* » et la cytoadhérence.

➤ **Auto- agglutination**

Elle correspond à un regroupement des érythrocytes infectés entre eux pour former des micros agrégats susceptibles d'obstruer les capillaires profonds. Elle a été observée chez de nombreuses souches de *P. falciparum* étudiées en culture au laboratoire. Pour certains auteurs, elle est favorisée par les plaquettes portant les récepteurs CD36 à leurs surfaces[51].

➤ **Formation des rosettes «ou rosetting »**

Les hématies parasitées ont la faculté d'attirer autour d'elles des hématies non-infectées pour former des rosettes : c'est le phénomène de « *rosetting* ». La formation des rosettes est la conséquence de la liaison entre des ligands parasitaires (PfEMP1) présents à la surface des hématies infectées et leurs récepteurs correspondant sur les globules rouges non infectés [52]. Plusieurs récepteurs pour les ligands parasitaires (PfEMP1) impliqués dans ce phénomène ont été décrits à la surface des globules rouges : récepteur 1 du complément (CR1/CD35), trisaccharides des groupes sanguins A et B, CD36, PECAM-1/CD31 (*Platelet-endothelial cell adhesion molecule*). Les anticorps (IgM et IgG) et certains composants du complément (C3b et C4b) jouent aussi un rôle dans ce phénomène à travers le CR1 [53]. Il aboutit à la formation d'un agrégat qui contribue à l'obstruction des petits vaisseaux sanguins. Il varie d'une souche plasmodiale à l'autre et est corrélé au degré de sévérité du paludisme[54-56]. La formation de rosettes constitue un mode de protection pour le parasite contre le système phagocytaire de la rate et exerce un effet délétère pour l'hôte par blocage du flux sanguin.

➤ **Cytoadhérence**

La cytoadhérence des hématies parasitées à l'endothélium vasculaire ou aux cellules trophoblastiques placentaires est le mécanisme qui a été le mieux étudié ces dernières années. Ce phénomène permet au *Plasmodium* de se développer plus facilement grâce à un environnement gazeux favorable et d'échapper à la clairance splénique. Les

hématies parasitées expriment à leur surface des protubérances (*knobs*) qui semblent jouer un rôle important dans leur adhésion aux cellules endothéliales. Il s'agit de protubérances protéiniques auxquelles sont incorporés des antigènes plasmodiques. Parmi ces antigènes plasmodiques on peut citer : PfEMP-1 et 2 (*Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1 et 2*) ; PfHRP-1 (*Plasmodium falciparum Histidin Rich Protein*) ou KAHRP (*Knob-Associated Histidin-Rich Protein*), RESA (*Ring Erythrocyte Surface Antigen*) et EDM (*Electron-Dense- Material*).

Parmi ces protéines parasitaires associées aux knobs, PfEMP-1 est le ligand parasite le mieux caractérisé. PfEMP-1 interagit avec des récepteurs spécifiques au niveau des cellules endothéliales vasculaires et du syncytiotrophoblaste, comme ICAM-1 (*Inter Cellular Adhesion Molecule-1*), CD36, VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesing Molecular-1*) CD31 ou PECAM-1, Le CSA (*Chondroitin Sulfate A*), et sélectine[30]. L'adhésion des hématies parasitées à ces récepteurs entraîne leur séquestration à l'intérieur de la microcirculation. La séquestration permet aux hématies parasitées d'échapper à la clairance splénique et de contribuer à la gravité du paludisme. Elle entraîne aussi une obstruction des micro-vaisseaux surtout au niveau cérébral qui semble être la principale cause du neuropaludisme. La séquestration entraînerait aussi une dilatation des micro-vaisseaux par la libération du monoxyde d'azote (NO), responsable de l'œdème cérébral et pulmonaire.

3.3.2.2. Mécanismes immunologiques

Le système à médiation cellulaire impliquant les lymphocytes CD4 et les macrophages joue un rôle très important dans la pathogénèse du neuropaludisme. Les antigènes plasmodiaux facilitent le recrutement des macrophages et la libération de nombreuses cytokines pro-inflammatoires dont l'Interféron gamma, le TNF- α , l'IL-1 et l'IL-6. Parmi ces médiateurs, le TNF- α est la cytokine clé de l'infection palustre. Expérimentalement, l'injection du TNF- α chez les souris reproduit la plupart des manifestations cliniques et biologiques du paludisme grave[57]. On pense aussi que la libération du TNF- α stimulerait l'expression des récepteurs des *knobs* au niveau endothélial, donc la séquestration.

3.4 Immunité antipalustre

3.4.1. Immunité innée ou naturelle

Les mécanismes de défense immunitaire dite «non spécifique» sont complexes et ne sont pas très bien connus. Il existe des facteurs génétiques conférant à certains sujets une immunité naturelle, notamment les facteurs de résistance érythrocytaires comme le trait drépanocytaire, le groupe sanguin Duffy négatif, le déficit en G6PD, mais aussi les facteurs non érythrocytaires comme le polymorphisme de la réponse immune et l'ethnicité.

L'infection palustre induit une augmentation des concentrations sériques des immunoglobulines non spécifiques due à une activation des cellules B polyclonales [9]. Les cellules NK stimulent la production d'IFN γ qui active le macrophage conduisant ainsi à la lyse des cellules parasitées[58]. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ semblent jouer un rôle protecteur pendant la phase précoce de l'infection palustre indiquant une contribution de l'immunité innée dans le contrôle de la parasitémie[59] .

Le complément, les chémokines, les interférons (IFN- α et IFN- β) et l'oxyde nitrique (NO) constituent les principales molécules de l'immunité innée jouant un rôle clé dans l'immunité antipalustre[60].

3.4.2 Immunité adaptative ou acquise

L'existence d'une immunité acquise protectrice contre l'infection palustre a été démontrée par Robert Koch en 1900 dans une étude menée sur deux populations différentes dans une zone de forte et de faible transmission[61]. L'immunité stimulée par le paludisme fait intervenir non seulement les réponses humorales mais aussi les réponses à médiation cellulaire. Cette immunité s'acquiert progressivement en situation d'exposition continue, elle est partielle et ne permet pas l'élimination totale du parasite. Par contre elle empêche progressivement la survenue des formes graves. C'est une protection incomplète, labile, qui disparaît entre 1 à 2 ans chez le sujet immun qui quitte la zone d'endémie, chez la femme enceinte au 2eme et 3eme trimestre de la grossesse, et chez le splénectomisé [62, 63].

On reconnaît deux types d'immunité, l'une antitoxique reposant sur les anticorps de type IgM, se mettant en place vers la troisième année de vie et permettant ainsi à l'individu de tolérer de fortes parasitémiés sans développer de signes cliniques. L'autre antiparasitaire impliquant les cellules T mémoires, permet de contrôler le niveau de densité parasitaire et de le maintenir au-dessous d'un seuil de pathogénicité. Elle se renforce progressivement avec la répétition des infections, ce qui explique la baisse progressive de l'incidence des accès palustres avec l'âge[51].

3.5. Vaccins antipalustres

Un vaccin est une préparation à caractère antigénique issu d'un agent pathogène (parasites, bactéries, virus, etc.) qui lorsqu'on l'injecte à une personne réceptive à la maladie, ne contracte pas la maladie ; mais dont l'organisme est capable de le reconnaître et de monter une réponse immunitaire protectrice (humorale et/ou cellulaire), garde en mémoire la structure de l'antigène et s'opposera à toute infection ultérieure même si cet organisme n'avait pas auparavant rencontré l'agent pathogène en question [61].

Les tentatives vaccinales, relativement nombreuses, se sont heurtées à la complexité du parasite, de son cycle et de la relation hôte-parasite, aussi bien qu'à la difficulté de son maniement au laboratoire. Aussi, après plus de vingt ans de travaux intensifs, il n'y a pas encore de vaccin commercialisé. Une des difficultés majeures dans la mise au point d'un vaccin contre ce parasite est qu'au cours de sa vie, le *Plasmodium* passe successivement par plusieurs stades avec des phases d'intense multiplication asexuée chez l'homme (dans le foie puis dans le globule rouge) et une phase de reproduction sexuée suivie de multiplication chez l'insecte. Chaque stade se termine par la libération d'un parasite d'une forme différente. Le parasite a développé de multiples stratégies pour échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. La difficulté majeure est d'identifier les meilleures molécules à utiliser, déterminer leur présentation optimale au système immunitaire de l'homme afin de stimuler préférentiellement des réactions de défense. Parmi les antigènes candidats vaccins on peut citer AMA-1 (*Apical Membran Antigen 1*), MSP-1 (Protéine-1 à la surface du mérozoïte), EBA175 (Antigène d'adhésion

érythrocytaire), MSP-2 (Protéine-2 à la surface du mérozoïte) et PfEMP1 (protéine membranaire érythrocytaire 1 de *P. falciparum*).

3.6. Hémoglobinoses

On parle d'hémoglobinoses lorsqu'il y'a synthèse d'une nouvelle chaîne de globine par substitution d'un ou de plusieurs acides aminés de l'une des chaînes de la globine. L'hémoglobine S est de loin l'hémoglobinoses la plus fréquente et la mieux étudiée ; on l'appelle encore l'hémoglobine drépanocytaire, ensuite vient l'hémoglobine C.[64]

3.6.1. Paludisme et hémoglobine S

La drépanocytose est le résultat d'une mutation ponctuelle au niveau de la position 6 du gène codant pour la chaîne β de l'hémoglobine, où la séquence GAG est remplacée par GTG. Cette mutation conduit au remplacement de l'acide glutamique par la valine, entraînant la formation de l'HbS [65]. L'HbS est retrouvé dans une large partie d'Afrique sub-saharienne aussi bien qu'au Moyen-Orient et en Europe. La superposition géographique des zones d'endémie palustre passée ou présente avec celles de haute fréquence d'HbS ou de thalassémie est à l'origine de la Théorie d'Haldane dans les années 50 selon laquelle Les thalassémies et l'HbS protégeraient les sujets qui en sont porteur contre la mortalité palustre. Cependant les premières observations entre le trait drépanocytaire et le paludisme provenaient de la Rhodésie du Nord où Beut notait que les parasites du paludisme étaient moins fréquents dans le sang des sujets ayant le trait drépanocytaire [66, 67]. Depuis, de nombreuses études ont recherché et rapporté l'existence d'une protection contre le paludisme associé au trait drépanocytaire. Ainsi, Allison attirait l'attention sur cette association et concluant que les personnes ayant le trait drépanocytaire développaient un paludisme moins fréquent et moins sévère que ceux n'ayant pas ce trait[68]. Les sujets hétérozygotes HbS (HbAS) n'ont généralement pas l'anomalie clinique. Raper a été le premier à suggéré que le trait drépanocytaire pourrait conférer un avantage de survie contre certaines conditions adverses dans les régions tropicales [69], puis Mackey et Vivarelli suggéraient que ce facteur pourrait être le paludisme [70]. HbAS confère une protection 10 fois supérieure aux formes graves de paludisme, et un léger degré de protection contre les formes modérées de cette maladie [11, 65, 68, 71-75]. Une méta-analyse récente, par exemple, a constaté que

l'HbS hétérozygotie (HbAS) et HbC homozygotie (HbCC) réduisent considérablement le risque de paludisme grave dans > 90% par rapport à l'HbAA homozygotie (HbAA) [76]

Le mécanisme par lesquels la protection conférée par l'HbAS contre le paludisme s'exerce reste non complètement élucidé. Cette protection semble résulter de l'action synergique d'une multitude de mécanismes chacun pouvant expliquer un aspect spécifique de cette protection complexe. Ainsi deux groupes de mécanismes ont été avancés: un accroissement de la clairance splénique des érythrocytes infectés ; et la suppression de la croissance des parasites dans les globules rouges défectueux s'expliquant sur le fait que le *P. falciparum* croit normalement dans les hématies HbAS infectées exposées à 17% d'oxygène, mais réduire l'oxygénation à 3% engendre la mort des parasites en quelques jours [77]. Cet effet de désoxygénation est plus prononcé dans les érythrocytes HbSC et HbSS. Même si les cellules falciformes infectées n'entrent pas dans la falciformation morphologique, les parasites sont encore gênés dans le stade précoce de trophozoïtes. A ce moment, les hématies infectées poussent des « knobs » sur la membrane érythrocytaire et adhèrent à la surface endothéliale des veinules [78, 79]. Ces veinules, particulièrement celles de petit diamètre, deviennent obstruées par des cellules infectées. L'obstruction partielle ou totale de ces vaisseaux causent l'hypoxie et l'acidose, lesquelles facilitent de plus la falciformation et reproduisent l'état dans lequel les parasites ne poussent pas bien [77]. Ainsi, la croissance de *P. falciparum* est compromise dans les cellules falciformes désoxygénées [80-82], bien que le taux d'invasion par les parasites paraît être intact [82]

Une étude chez les enfants kenyans a démontré que l'effet protecteur de HbAS contre le paludisme augmente de 20 à 56% entre les âges de 2 et 10 ans, suggérant que HbS augmente ou agit en synergie avec l'immunité acquise [83].

3.6.2. Paludisme et hémoglobine C

L'hémoglobinose C est une affection génétique autosomique récessive. Elle est due à une mutation ponctuelle sur le gène de la chaîne β de la globine. Cela aboutit à la substitution en position six de la séquence d'acide aminé de la chaîne β de la globine de l'acide glutamique par la lysine. Elle constitue la deuxième hémoglobinose de par sa

fréquence après la drépanocytose. L'Afrique occidentale où cette affection est plus fréquente que la drépanocytose au sein de certains groupes ethniques (ex. : les Dogon), serait le berceau de l'hémoglobine C, les fréquences les plus élevées étant observées au Ghana, au Burkina Faso, et au Bénin (7,4 à 28,2%) [84].

L'hypothèse d'une protection des sujets porteurs de l'HbC repose sur les mêmes arguments que celle décrite chez les sujet HbAS. L'HbC étant considérée comme une variante ouest africaine de l'HbS. Plusieurs auteurs ont rapporté une protection associée à l'HbC lors d'étude épidémiologique de terrain. Cette protection fut décrite pour la première fois chez les dogon au mali par Agarwal et al en 1998. Leur étude a révélé que l'HbAC était associée à une réduction d'environ 80 % du risque de développer des formes graves de paludisme. Cette étude a examiné 7 cas de sujets homozygotes CC ; aucun d'eux n'a présenté de forme grave de paludisme [85]. Modiano et al en 2001 ont rapporté une réduction de 29% du risque de paludisme chez les sujets hétérozygotes porteurs d'HbAC. Cette réduction était de 93% chez les sujets homozygotes d'HbCC [86]. L'étude qui a été réalisée à Bobo Dioulasso (Burkina Faso) par Rihet et al en 2004, a rapporté une réduction de l'incidence du paludisme et de la parasitémie chez les individus porteurs de l'HbC par rapport aux individus AA [87]. Il a été proposé que l'effet protecteur de l'HbC puisse entraîner une augmentation de la clairance des érythrocytes infectés. Ceci est basé sur l'observation de la réduction de la cytoadhérence des parasites, une expression anormale de PfEMP1, un agrégat de la protéine de la bande 3 de l'érythrocyte et une altération de la surface topographique de la membrane de l'érythrocyte en présence de l'HbC [16, 88, 89].

4. Méthodologie

4.1. Cadre d'étude

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche sur l'étude de l'immunité innée et acquise au paludisme chez des enfants Maliens, menée par le MRTC/FMPOS/USTTB en collaboration avec le LMVR/NIAID/NIH des Etats-Unis d'Amérique.

4.2. Lieu d'étude

Notre étude s'est déroulée dans les villages de Kéniéroba, Bozokin et Fourda dans la commune rurale de Bancoumana.

Bancoumana est un village situé à 60km au sud-ouest de Bamako sur la route nationale RN15 dans la zone soudano-guinéenne. La commune comporte 4 centres de santé et un centre de santé communautaire qui est celui de Bancoumana qui est en partenariat avec le MRTC/NIH. La commune est limitée au nord par celle de Siby, à l'est par la commune du Mandé, au sud-ouest par la commune de Minindian et au sud-est par le fleuve Djoliba qui la sépare des communes de Niagadina et de Kourouba.

- **Village de Kéniéroba**, il est situé au sud-ouest de Bamako à 60km sur la route RN15 de Kangaba. Refondé par Maré Famissa KEITA après son déclin pendant le règne de Samory Touré, qui fit réunir ses frères dispersés sur la terre de leur ancêtres d'où le nom Kéniéroba. Il est limité au sud-est par le village de Fourda, au nord par le village de Nanguilabougou et à l'ouest par le village de Ticko. Il compte 2341 habitants environ qui sont essentiellement les Malinké, les Peulh et les Bambara (recensement MRTC/FMPOS, 2012).
- **Village de Fourda**, c'est un hameau de pêche situé à 3km au sud-est de Kéniéroba. Il fut fondé par les frères Sogoré (Kalifa, Sinimba, Fodé, Mamady et Drissa) venus de Kangaba dans le but de faire la pêche. Il compte 325 habitants qui sont essentiellement les Somono-Malinké mais aussi les Bambara et les Peulh (recensement MRTC/FMPOS, 2012).
- **Village de Bozokin** : c'est un hameau de culture et de pêche de Bancoumana situé à 7km au sud-est. Il fut fondé par Soungalo Traoré il y a plus de 100 ans pour mener ses activités de pêche. Il compte actuellement 341 habitants dont les

Bozo sont majoritaires (Konta devenu Konaté par le langage mandingue) mais aussi les Peulh et les Dogon (recensement MRTC/FMPOS, 2012).

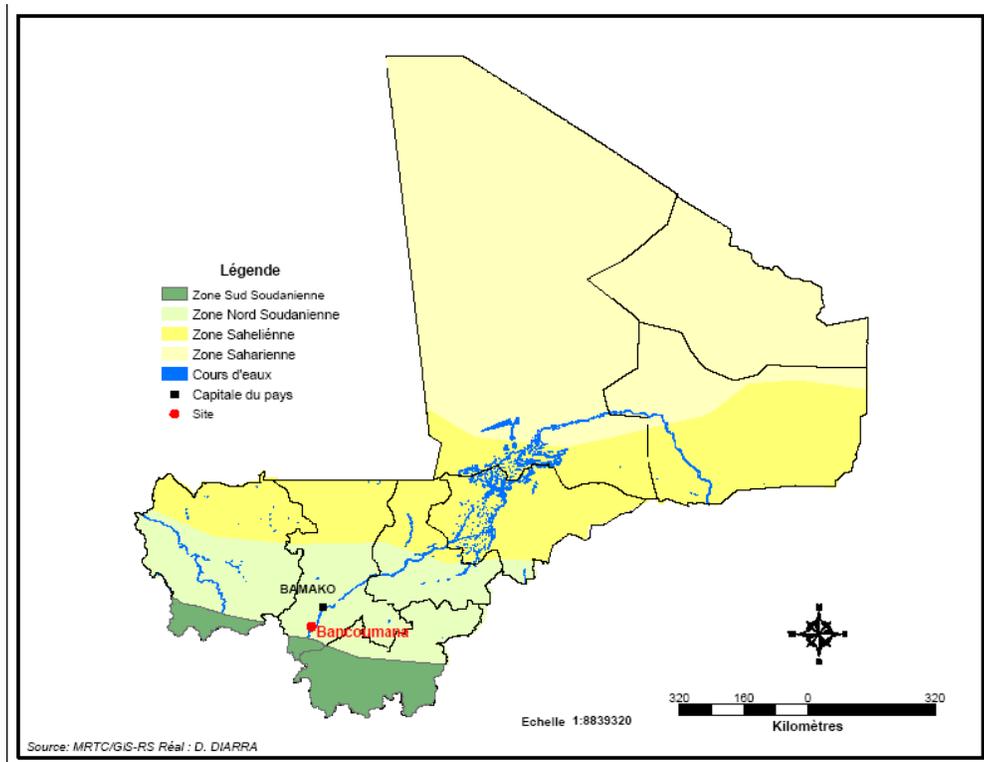


Figure 2: Site d'étude dans la commune rurale de Bancoumana

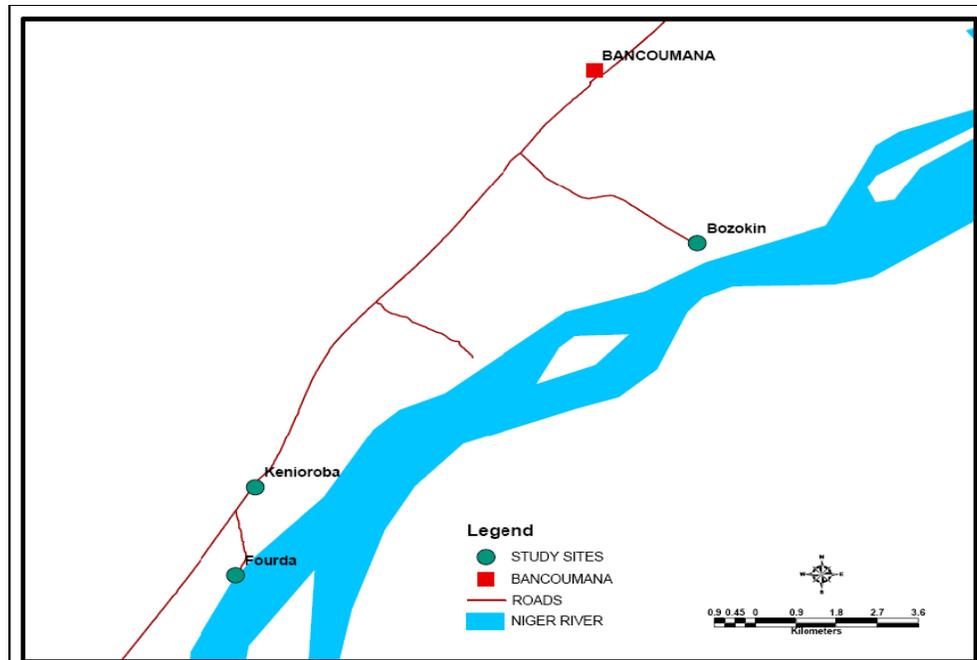


Figure 3: Plan de masse des trois villages d'étude dans la commune rurale de Bancoumana Source: Unité GIS MRTC/FMPOS.

➤ **Végétation/hydrographie/climat**

Les trois villages sont situés le long du fleuve Niger (ou fleuve Djoliba) qui constitue le principal réseau hydrographique. La couverture végétale originale rencontrée sous un climat soudano-guinéen marque la transition entre la savane arborée et la forêt guinéenne. Ce type de végétation existe encore à l'état délictuel au niveau des bois sacrés et le long du fleuve Niger.

Les feux de brousse, l'exploitation du bois de chauffage, les défrichements nécessaires aux cultures ont profondément dégradé cette végétation, devenant propice à l'implantation des moustiques.

La savane arborée constitue la principale formation végétale mais aussi quelques galeries forestières. On distingue:

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

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

Les trois villages se situent dans une zone climatique soudano-guinéenne. Deux grandes saisons se succèdent dans cette zone : la saison des pluies de juin à octobre et la saison sèche de novembre à mai. Une courte saison de transition s'étalant de novembre à janvier que les communautés rurales désignent sous l'appellation vernaculaire de *fôbònda* qui se caractérise par un adoucissement voire un rafraîchissement des températures par l'arrivée des côtes atlantiques de l'harmattan.

L'habitat de type traditionnel, est constitué de cases rondes et rectangulaires en terre battue et aux toitures en chaumes coniques. De plus en plus quelques maisons ont leurs toitures en tôle. Ces différents types de maisons propices au repos des moustiques, favorisent une densité et une agressivité anophélienne élevées. L'environnement physique des villages est propice à la transmission du paludisme. Les villages sont situés dans une grande plaine qui s'étend jusqu'au fleuve Niger. La plaine présente de nombreuses retenues d'eau pendant la saison des pluies. C'est une plaine de riziculture. Les retenues d'eau avec des crevasses naturelles du sol peuvent être des gîtes larvaires potentiels. Pendant la saison des pluies, il existe des cultures intradomiciliaires et une prolifération d'herbes sauvages dans le village, contribuant ainsi à augmenter la densité et l'agressivité des moustiques. La température la plus élevée se situe à ~40°C au mois de mai et la plus basse est voisine de 18°C aux mois de décembre-janvier. La température moyenne annuelle est autour de 23°C. D'une manière générale, le climat y est assez agréable et la végétation est luxuriante.

La faune entomologique est constituée d'invertébrés et d'arthropodes. *Anopheles gambiae* sl et *Anopheles funestus* abondent dans les villages où ils assurent la transmission du paludisme et de la filariose de Bancrofti surtout en saison des pluies.

Les simulis transmettent l'onchocercose durant l'hivernage tandis que les glossines (mouche tsé-tsé) transmettent la maladie du sommeil. *Anopheles gambiae sl* est le vecteur majeur du paludisme rencontré dans notre zone d'étude[90].

➤ **Infrastructures socio-sanitaires**

La commune rurale de Bancoumana dispose :

- dans le domaine de l'éducation :

Dix (10) écoles publiques dont 4 second-cycles

Trois (03) écoles communautaires

Sept (07) medersas communautaires

Dix Huit (18) centres d'alphabétisation.

- dans le domaine de la santé :

Quatre (04) dispensaires (Kéniéroba, Djiguidala, Ouoronina et Niamé)

Cinq (05) maternités

Un CSCOM: celui de Bancoumana

Une pharmacie (officine privée)

➤ **Activités socio-économiques et culturelles**

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

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

limonum RISSO.) a lieu surtout dans les alentours des concessions ou dans des jardins.

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

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

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

4.3. Critères d'inclusion et de non inclusion

4.3.1. Critères d'inclusion

Pour être inclus dans notre étude, les sujets devraient satisfaire aux critères suivants :

- résider à Kéniéroba, Bozokin ou Fourda, et ne pas prévoir de déménager loin du village d'étude pour la période d'étude
- accepter de participer volontairement à l'étude, comme en témoigne le consentement éclairé des parents ou des tuteurs des enfants et la volonté d'amener les enfants à l'étude clinique s'ils développent de la fièvre ou d'autres symptômes du paludisme
- être âgé de 3 à 11ans
- avoir un taux d'Hb \geq 8,5 g/dl

4.3.2. Critères de non inclusion

Les enfants souffrant d'une affection qui, de l'avis de l'enquêteur rendrait le sujet incapable de respecter le protocole (par exemple, maladie psychiatrique) n'ont pas été inclus ainsi que les enfants ayant un problème de santé qui, de l'avis de l'enquêteur ferait confondre l'analyse des données ou présenter des risques d'exposition inutiles (par exemple, la malnutrition sévère, l'immunodéficience acquise) à l'enfant.

4.4. Types d'étude et techniques de laboratoire utilisées

4.4.1. Conception de l'étude

La présente étude fait partie d'une plus grande étude de 4 ans sur l'incidence du paludisme menée dans trois villages ruraux voisins (Kéniéroba, Bozokin, et Fourda) situés dans la commune rurale de Bancoumana, cercle de Kati, région de Koulikoro au Mali, qui connaît une transmission saisonnière intense de *P. falciparum* entre juin et décembre. D'autres détails sur cette étude et sur la cohorte globale de 1 586 enfants ont été précédemment décrits [91]. Tous les enfants ont été génotypés pour le type Hb, l' α -thalassémie, le déficit en G6PD et les antigènes de groupes sanguins ABO/Rh comme décrit [91]. Les parents ou tuteurs ont été activement encouragés à amener leurs enfants à la clinique de l'étude à chaque fois qu'ils ont développé la fièvre ou d'autres symptômes du paludisme.

Dans la cohorte de 1586 enfants, nous avons établi une sous-cohorte de 200 enfants âgés de 3 à 11 ans provenant de Kéniéroba et Fourda en mai 2009. Chaque enfant

HbAS (n = 73) et HbAC (n = 27) a été apparié à un enfant HbAA (n = 100) du même âge. Chaque fois que possible, chaque paire d'enfant a également été apparié pour le sexe, les antigènes de groupes sanguins ABO/Rh, et les génotypes G6PD et α -thalassémie. Avant (mai) et après (décembre) la saison de transmission 2009, 5-8 ml de sang veineux ont été collectés dans un tube Vacutainer contenant de l'héparine (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Le sang total a été traité à l'aide de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Niskayuna, New York); le plasma a été séparé par centrifugation et stocké à -80°C jusqu'à utilisation. Après avoir suivi ces enfants pour les épisodes de paludisme pendant toute la saison de transmission, nous avons obtenu et traité du sang veineux de tous les enfants disponibles en décembre 2009.

Le paludisme simple a été définie comme la température axillaire $>37,5^{\circ}\text{C}$ (ou antécédents de fièvre dans les 48 heures précédentes) avec ou sans symptômes supplémentaires (par exemple, des maux de tête, des courbatures, de malaise), en plus de la parasitémie à *P. falciparum* (toute densité) sur un frottis sanguin épais, et aucune autre étiologie de maladie fébrile (par exemple, infection des voies respiratoires) perceptible à l'examen clinique. Les enfants ont été traités en cas de paludisme simple avec de l'artésunate et d'amodiaquine, comme décrit [91].

Pour la présente étude, sur les 200 enfants, nous avons analysé les données de 176 enfants dont deux échantillons au mois de mai (avant la saison de transmission) et au mois de décembre (après la saison de transmission) étaient disponibles. Les 176 enfants inclus 89 enfants HbAA, 61 et 26 HbAS HbAC, respectivement. Sur les 176 enfants, 6 (HbAA), 4 (HbAS) et 2 (HbAC) n'étaient pas appariés pour l'âge.

Les sera des adultes américains naïfs de paludisme et les globules rouges pour la culture parasitaire in-vitro ont été obtenus de l'*Interstate Blood Bank* (Memphis, TN).

4.4.2. Souches de *P. falciparum* adaptées au laboratoire et isolats de *P. falciparum* cultivés à court terme

Les souches de *P. falciparum* (la souche FCR3, la souche D10 et la souche PC26) ont été cultivées dans les globules rouges O⁺ à 2% d'hématocrite dans un milieu complet (CM) consistant en RPMI1640 W/L-Glutamine +25 mM de HEPES + 50 mg/l d'hypoxanthine (KD médicale, Columbia , MD), complété avec 30 ml du bicarbonate de sodium à 7,5% (Gibco, Life Technologies, grand Island, NY), 1 ml 10 µg/ml de gentamicine (Gibco, Life Technologies) et de 0,5% AlbuMAX II (Invitrogen, Life Technologies). Les cultures ont été maintenues à 37°C dans un flacon de 25 cm² (Corning, Tewksbury, MA) à 37°C dans une atmosphère de 5% d'O₂, 5% de CO₂ et 90% N₂. La souche FCR3 a été signalée comme provenant d'une personne vivant à Fajara, Gambie, en 1976 [92]. La souche D10 a été clonée à partir de la souche FC27 de *P. falciparum* provenant de la province de Madang, en Papouasie-Nouvelle-Guinée [93, 94]. La souche PC26 est décrite comme étant originaire du Pérou [95]. Les isolats de *P. falciparum* ont été obtenus à partir des enfants de Kéniéroba (KN1254, KN1068) [91] ou des adultes cambodgiens (CP803, CP806) [96] ayant un paludisme non compliqué, et adapté pour la culture *in-vitro* en CM modifié pour contenir 1% AlbuMAX II. Pour minimiser les effets de confusion de la variation antigénique des anticorps tests de réactivité, des lignées et des isolats de *P. falciparum* ont été cultivés pendant 1 semaine à la parasitémie élevée puis aliquotés et cryoconservés. Avant chaque essai, les parasites cryoconservés ont été décongelés et cultivés jusqu'au stade des trophozoïtes/début schizontes. Toutes les lignées de parasites et les isolats ont été confirmés négatifs pour la contamination avec *Mycoplasma* en utilisant le kit Mycotrace PCR Detection (PAA Laboratories, Morningside, Australie).

Détection de la réactivité des anticorps aux globules rouges parasites en utilisant la cytométrie en flux multicolore

La détection de la réactivité des anticorps contre les GRi intacts à la cytométrie en flux a été adaptée à partir de divers protocoles [31, 38, 97, 98] et a été décrit précédemment

[91]. Les cultures de parasites synchrones (<1% de parasitémie) ont été lavées dans du PBS, à pH 7,2, supplémenté avec 2% de sérum bovin fœtal inactivé par la chaleur (Gibco, Life Technologies) (FPBS) et diluée à 1% d'hématocrite. Une suspension de 200 µl de GRi lavés a été ajoutée à chaque puits d'une plaque à 96 puits (Corning Costar, Corning, NY) et centrifugée à 800 x g pendant 5 minutes. Le surnageant a été délicatement enlevé et remplacé par 200 µl de plasma inactivé par la chaleur (dilué 1:20 dans FPBS) recueillies auprès des enfants et adultes de Kéniéroba, ou des sérums inactivés par la chaleur des adultes américains naïfs de paludisme (PCR négative). Les mélanges des globules rouges parasités-plasma ont été constamment agités à 500 tours par minute à l'aide d'une plate-forme 100 Heidolph Titramax agitateur (Heidolph, Schwabach, Allemagne) pendant 30 minutes à température ambiante. Les GRi ont été rassemblés en un culot, lavés une fois avec du FPBS, et remis en suspension fraîchement préparée "Mix A» [0,5 µl/ml Syto61 (Invitrogen, Life Technologies), 3 µl/ml de Fluor Alexa 488 conjugué anti-IgG humaine (H+L) (Invitrogen, Life Technologies), et 3 µl/ml PE conjugué aux IgM (chaîne µ) de souris antihumaines (BD Pharmingen, San Diego, CA)], ainsi que des contrôles de réactifs simples au cas échéant. Les suspensions de GRi ont été constamment agitées à 500 tours par minute pendant 30 minutes à température ambiante, lavées une fois et remises en suspension dans du FPBS. Nous avons fermé sur les populations cellulaires uniques (FSC-H vs FSC-A) (> 75% du total), en excluant les doublets/agrégats et les débris. Les événements ≥5000 Syto61-positifs ont été acquis dans chaque puits et analysés en utilisant un cytomètre à flux Accuri C6 et le logiciel Accuri cflow Plus (BD Biosciences, San Jose, CA).

Technique ELISA

Nous avons déjà décrits la méthode ELISA standardisé [99]. L'absorbance de chaque échantillon test a été convertie en unités ELISA en utilisant une courbe standard générée par la dilution en série standard dans la même plaque. L'Antigène de membrane apicale-1 (AMA-1) [100] et le fragment de 42 kDa de la protéine de surface du mérozoïte-1 (MSP-1) [101] ont été aimablement fournies par le Dr David Narum (NIAID/NIH). La région II de l'antigène érythrocytes d'adhésion 175 kDa (EBA-175) [101] a été aimablement fournie par le Dr Annie Mo (DMID/NIAID). La protéine 2 de

surface du mérozoïte (MSP-2) de la lignée 3D7 de *P. falciparum* [102] a été aimablement fournie par le Dr Robin Anders (Université La Trobe, Melbourne, Australie). Le niveau de détection d'anticorps minimale était de 44 unités ELISA; toutes les réponses au-dessous de ce niveau ont été affectées d'une valeur de 22 unités ELISA.

4.5. Gestion et analyse statistique des données

Les comparaisons multiples non-paramétriques ont été faites en utilisant un test de Kruskal-Wallis; si des différences significatives ont été trouvées, nous avons utilisé le test de comparaison multiple de Dunn dans les analyses de suivi. Pour chaque échantillon de plasma, la proportion de GRi reconnus par les anticorps IgG («% reconnaissance») a été calculée. Pour chaque souche de parasite, nous avons déterminé une valeur de seuil (moyenne+2 écarts-types) pour la reconnaissance du pourcentage en utilisant les données de quatre échantillons de plasma des adultes américains naïfs testés dans cinq essais indépendants (par parasite évalués). Un enfant ayant une valeur de reconnaissance supérieure à la valeur du seuil a été défini comme un répondeur. La proportion de répondeurs dans le groupe des enfants testés a été définie comme "% de répondants." Le test exact de Fisher a été utilisé pour comparer les changements en % intervenants entre les échantillons de la pré- et post-saison de transmission.

Les données qualitatives provenant de plusieurs groupes ont été analysées en utilisant le test du rapport de probabilité du Chi-carré (*Chi-square likelihood ratio test*); si des différences significatives ont été trouvées, nous avons calculé l'odds ratio (OR) pour déterminer quel groupe était significativement différent des autres. L'ajustement logistique nominal a été utilisé pour analyser les données indiquant si ou non le paludisme a été vécu et le risque proportionnel ajusté a été utilisé pour analyser les données indiquant le temps de premier épisode de paludisme. Pour l'analyse de contingence, le rapport de vraisemblance du test du Chi-carré a été utilisé pour comparer deux souches de parasites; les valeurs p étaient corrigées et fournies selon la méthode Holm. Pour chaque souche de parasite, les valeurs de reconnaissance des

échantillons de la pré- et post-saison de transmission ont été comparées en utilisant le test de rang paires appariées signé Wilcoxon. Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software, La Jolla, CA) et le logiciel statistique JMP (SAS, Cary, NC). Les valeurs $p < 0,05$ ont été jugées statistiquement significatives.

4.6. Variables mesurées

Nous avons mesuré les variables suivantes :

- ❖ **Variables sociodémographiques** : âge, sexe, résidence
- ❖ **Variables biologiques** : type d'hémoglobine, nombre de souches de parasite.

5. Résultats

Dans cette étude, nous avons fait un sous-échantillonnage de 176 enfants parmi la cohorte d'enfants de la zone de Kéniéroba résumée dans le tableau 3.

Tableau 3. Caractéristiques de la grande cohorte d'étude (1 543 enfants)

Village,	n (%)
Kéniéroba	1,178 (76.3)
Fourda	180 (11.7)
Bozokin	185 (12.0)
Groupes ethniques,	n (%)
Malinke	1,332 (86.3)
Foula	121 (7.8)
Bambara	62 (4.0)
Sarakolé	24 (1.6)
Dogon	4 (0.3)
Sexe, n (%)	
Garçons	767 (49.7)
Filles	776 (50.3)
Age a l'inclusion, moyenne (écart-type)	6 (5.1)
Variants de la β-globine,	n (%)
HbAA	1,206 (78.2)
HbAS	220 (14.2)
HbAC	103 (6.7)
HbCC	1 (0.1)
HbSC	11 (0.7)
HbSS	2 (0.1)

5.1. Association entre l'âge et HbAS et le risque réduit de paludisme chez les enfants de Kénieroba

Nous avons analysé les données de 176 enfants maliens âgés de 3-11 ans qui ont fourni un échantillon de plasma avant et après la saison de transmission du paludisme en 2009. Des 89 enfants HbAA, 61 et 26 enfants HbAS et HbAC, respectivement, seuls 6 (HbAA), 4 (HbAS) et 2 (HbAC) n'étaient pas appariés selon l'âge en raison des échantillons manquants. Seuls trois enfants (âgés de 7, 8 et 10 ans) avaient une parasitémie asymptomatique de *P. falciparum* à la goutte épaisse lors de l'inclusion. Aucun enfant n'avait une parasitémie détectable à la fin de la saison de transmission. Les 176 enfants ont connu une moyenne de 1,23 épisode de paludisme au cours des 7 mois de la saison de transmission palustre. Le taux d'incidence du paludisme stratifié selon le type Hb et l'âge sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4. Taux d'incidence du paludisme stratifié selon le type d'Hb et l'âge

Type d'Hb	3 – 5 ans		6 – 8 ans		9 – 11 ans		Total
	n	(Cas) ^a	n	(Cas)	n	(Cas)	n (Cas)
AA	28	(2,10)	35	(1,40)	26	(0,88)	89 (1,47)
AS	23	(0,95)	20	(0,80)	18	(0,44)	61 (0,75)
AC	8	(2,12)	12	(1,66)	6	(0,66)	26 (1,57)
Total	59	(1,66)	67	(1,26)	50	(0,70)	176 (1,23)

^aMoyenne arithmétique du nombre d'épisodes de paludisme au cours de la saison de transmission de 7 mois.

Les enfants HbAS, mais pas HbAC, avaient significativement moins d'épisodes de paludisme que les enfants HbAA (0,75 vs 1,47, $p = 0,0004$ pour HbAS; 1,57 vs 1,47, $p = 0,6769$ pour HbAC; en utilisant le test de Kruskal-Wallis suivi par le test de comparaison multiple de Dunn). Les enfants âgés de 9-11 ans ont présenté

significativement moins d'épisodes de paludisme que les enfants âgés de 6-8 ans (0,7 vs 1,26, $p = 0,0458$) ou 3-5 ans (0,7 vs 1,66, $p < 0,0001$).

Tableau 5. Analyse de régression multivariée: effets de l'âge et du type d'Hb sur le risque de paludisme.^a

Age (ans)	Présence ou non de paludisme			Temps au 1 ^{er} épisode palustre		
	OR ^b	(IC 95%)	Valeur du p	RR ^c	(IC 95%)	Valeur du p
6-8 vs 3-5	0,36	(0,14-0,85)	0,019	0,56	(0,39-0,90)	0,014
9-11 vs 6-8	0,42	(0,19-0,92)	0,030	0,61	(0,36-0,99)	0,047
9-11 vs 3-5	0,15	(0,06-0,37)	<0,001	0,36	(0,21-0,59)	<0,001
AS vs AA	0,40	(0,19-0,82)	0,012	0,47	(0,30-0,71)	<0,001
AC vs AA	1,25	(0,45-3,89)	0,673	1,07	(0,63-1,74)	0,777

^a L'âge et le type d'Hb ont été analysés pour leur effet sur deux mesures du risque de paludisme: si oui ou non le paludisme a été expérimenté (dans la cohorte de 176 enfants), et le temps de premier épisode de paludisme (dans la sous-cohorte de 117 enfants qui ont fait au moins vécu un épisode palustre).

^b Odds ratio

^c Risque relative

Dans l'analyse de régression multivariée comptant pour l'âge et le type Hb, nous avons constaté que la probabilité d'avoir au moins un épisode palustre a diminuée de façon significative avec l'âge (tableau 5). Les enfants HbAS, mais pas HbAC, étaient également moins susceptibles de développer un épisode de paludisme que les enfants HbAA (OR = 0,40, IC 95% 0,19 à 0,82, $p = 0,012$) (tableau 5). Le temps du premier épisode de paludisme au cours de la saison de transmission en 2009 a augmenté de

façon significative avec l'âge et était plus long chez les enfants HbAS que chez les enfants HbAA (RR = 0,47, IC 95% 0,30 à 0,71, $p < 0,001$) (tableau 5). Dans l'analyse de régression multivariée comptant pour l'âge et le type Hb, nous avons trouvé que les réponses IgG contre plusieurs souches de parasites n'étaient pas associées à la protection contre le paludisme ou au retard de l'apparition du paludisme (données non présentées).

5.2. Optimisation de dosage pour mesurer la reconnaissance par les anticorps de la surface des globules rouges parasités

En optimisant le dosage à base de cytométrie en flux, nous avons constaté que l'agglutination induite par des anticorps dirigés contre les GRi a été minimisée dans les échantillons ayant une parasitémie $< 1\%$ et un taux d'hématocrite $< 1\%$. Dans ces conditions, les dilutions de plasma 1 :5 et 1 :40 produisaient de meilleurs rapports de signal sur bruit (données non présentées). Pour utiliser les échantillons avec parcimonie, toutes les expériences ultérieures ont été réalisées avec des dilutions de plasma 1:20. Dans les tests utilisant des sérums provenant de quatre Américains adultes naïfs, il y avait une variation minimale d'essai à essai (mesurée par l'écart type) de la proportion de GRi reconnus par les anticorps IgG («% reconnaissance») (Figure 4). Une plus grande variation dosage à dosage dans les valeurs de reconnaissance (Figure 4) et dans les intensités moyennes de fluorescence (IMF) des GRi (données non présentées) ont été observés chez les enfants maliens par rapport à des échantillons d'adultes américains. Nous avons donc transformé les données en définissant les enfants maliens comme IgG "répondeurs" s'ils ont montré une valeur de reconnaissance supérieure à la moyenne + 2 écarts-types de la valeur de reconnaissance des adultes américains. Les décodages binaires "répondeurs" et "non-répondeurs" ont ensuite été analysés à la place des valeurs de reconnaissance ou IMF. Tandis que les IgG de chaque enfant répondait à au moins une souche de *P. falciparum* à un ou aux deux temps de mesure, aucun anticorps IgM d'enfant a répondu à l'une des sept souches de parasites (données non présentées).

La stratégie de déclenchement est représentée sur la Figure 5.

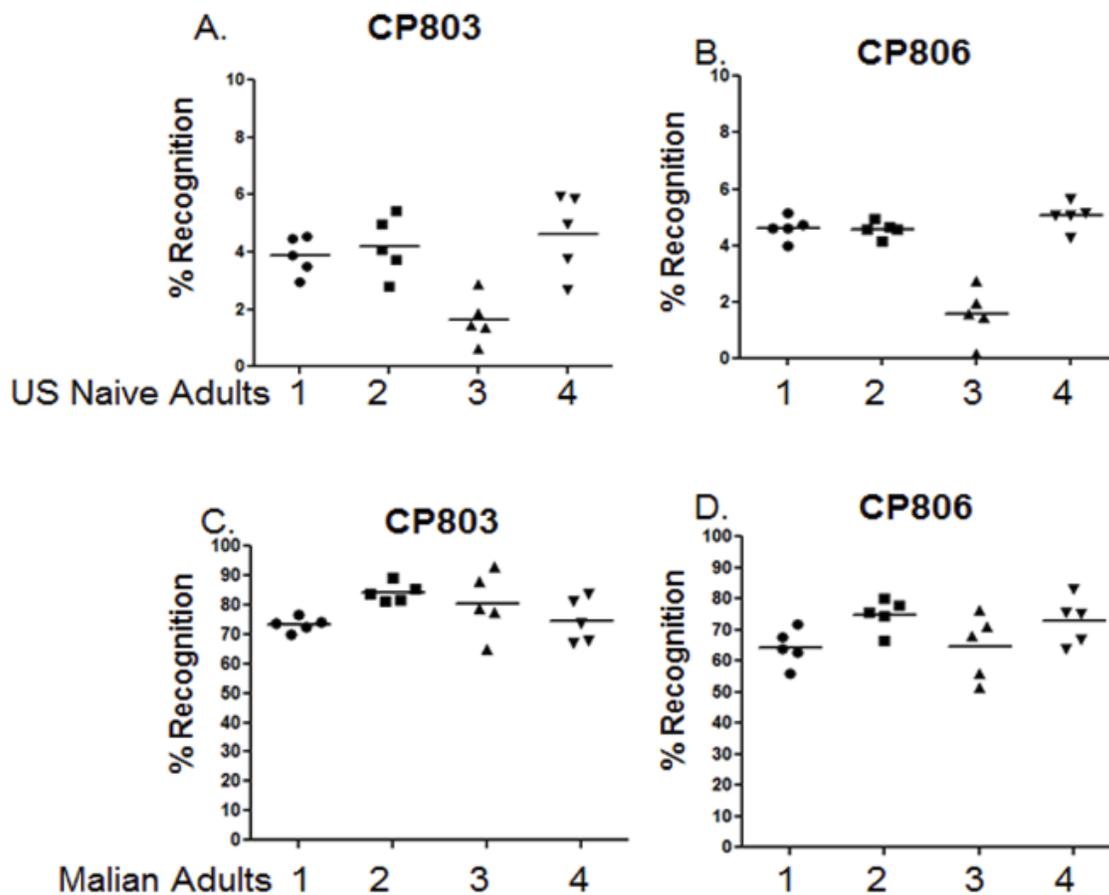


Figure 4: Variation de test-à-test en % de reconnaissance dans les plasmas d'adultes Américains (en haut) et Maliens (en bas)

La proportion de GRi reconnue par les IgG ("% reconnaissance») a été mesurée par la cytométrie de flux. Les sérums de quatre adultes américains naïfs de paludisme et de plasma de 4 adultes maliens exposés au paludisme ont été testés contre globules rouges infectés par des isolats de *P. falciparum* CP803 et CP806 cambodgiens. Chaque point représente un % de reconnaissance mesuré en différents jours et la barre représente la moyenne.

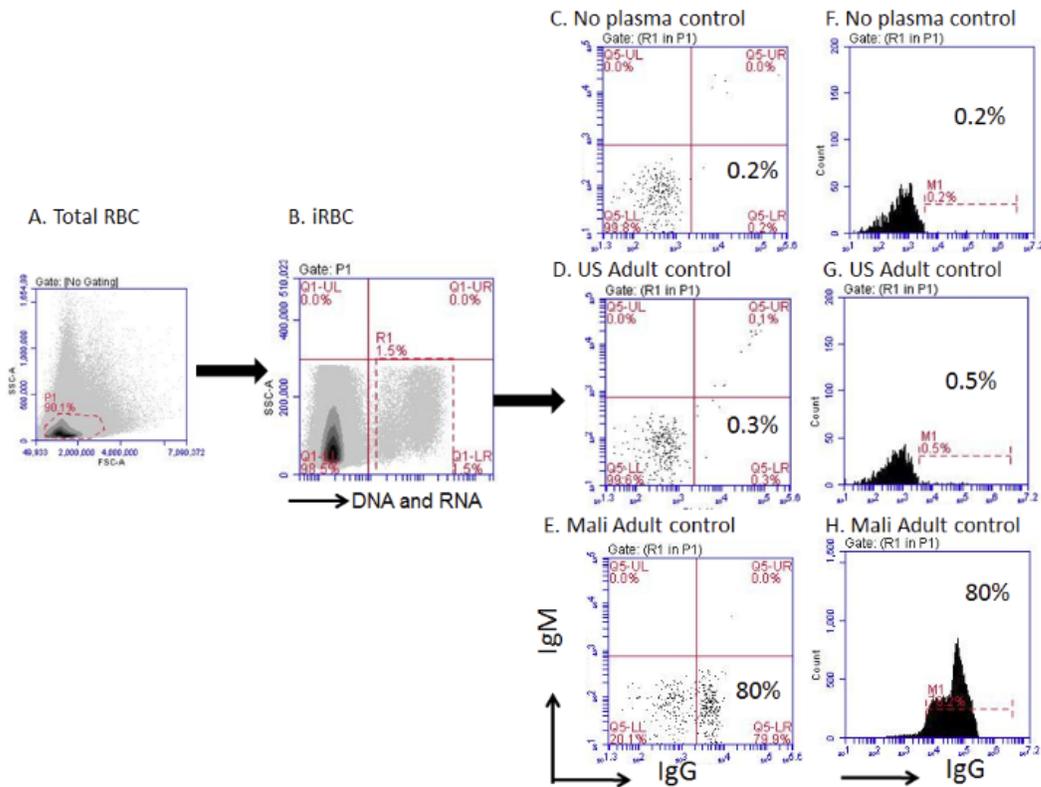


Figure 5 : Stratégie de déclenchement pour évaluer la reconnaissance des globules rouges parasités par les IgG et les IgM (GRi)

a, La population de globules rouges et de globules rouges parasités (GRi) a été encadrée. **b**, la porte R1 contient les GRi colorées avec le colorant d'acide nucléique Syto 61. Les 3 parcelles de points vers la droite représentent les populations R1 de GRi réagissant avec aucun plasma (**c**), le plasma des adultes américains naïfs de paludisme (**d**), et le plasma d'adultes maliens exposés au paludisme (**e**). La réactivité des IgG et des IgM est présentée dans les canaux FL1 et FL2, respectivement. La réactivité correspondante des IgG est présentée dans les histogrammes adjacents (**f**, **g**, **h**).

5.3. Proportion de patients répondeurs à la diversité des souches de *P. falciparum* et saison de transmission

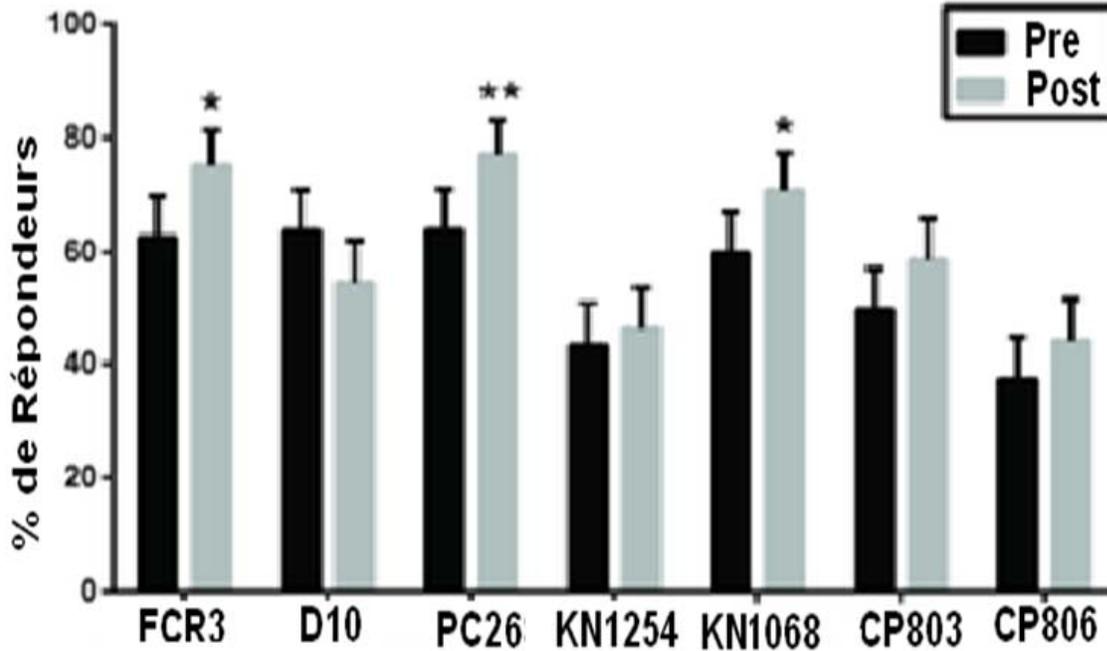


Figure 6: Pourcentage de sujets répondeurs aux sept souches de *P. falciparum* avant et après la saison de transmission 2009

Avant la saison de transmission palustre, 97,2% (171/176) des enfants ont reconnu ≥ 1 des 7 souches de parasites. La fréquence des répondeurs a varié de 37% à 77% en fonction de la souche de parasite testée (figure 6). Pour trois des 7 souches de parasites, les proportions de répondeurs ont augmenté de manière significative au cours de la saison de transmission (FCR3, $p = 0,0155$; PC26, $p = 0,0096$; KN1068, $p = 0,0425$; test exact de Fisher). Pour déterminer si la reconnaissance des GRi par les IgG a également augmenté, nous avons calculé la différence entre les valeurs de reconnaissance dans les échantillons de paires de plasma de chaque enfant (dosé simultanément). Au cours de la saison de transmission, les proportions de reconnaissance ont augmenté de manière significative pour cinq souches de parasites (FCR3, $p = 0,0006$; PC26, $p < 0,0001$; KN1068, $p = 0,0025$; CP803, $p = 0,0003$; CP806,

$p = 0,0005$; test de rang de paires appariées signé Wilcoxon) (Figure 6). En revanche, les valeurs de reconnaissance pour D10 ont diminué ($p < 0,0001$) et celles de KN1254 n'ont pas changées (Figure 6).

5.4. Corrélation entre âge et type d'Hb et reconnaissance des globules rouges parasités par les anticorps IgG

Pour évaluer la relation entre l'âge et la reconnaissance IgG de souches de parasites, nous avons stratifié les enfants a priori en trois groupes d'âge: 3-5, 6-8 et 9-11 ans. Avant la saison de transmission, la proportion de répondeurs à 3 souches de parasites (la souche FCR3, la souche KN1068 et la souche CP803) était significativement plus élevée chez les enfants âgés de 9 à 11 ans que chez les enfants de 3-5 ans (76% contre 47% pour FCR3, $p < 0,05$; 67% contre 47% pour KN1068, $p < 0,05$; 66% contre 39% pour CP803, $p < 0,001$; test de probabilité du Chi carré) (Figure 7). Les proportions de répondeurs à la souche D10, la souche PC26, la souche KN1254 et la souche CP806 ne différaient pas selon l'âge. Après la saison de transmission, aucune différence liée à l'âge chez les répondeurs à l'un des sept souches de parasites n'a été observée (Figure 7). Nous avons également évalué l'effet saisonnier sur la proportion de répondeurs en comparant les données de la saison pré- et post-transmission au sein de chaque groupe d'âge. Les seuls changements significatifs en proportion de répondeurs étaient l'augmentation des répondeurs contre FCR3 ($p = 0,0357$, test exact de Fisher) et PC26 ($p = 0,0183$) chez les enfants âgés de 3-5 ans (figure 7).

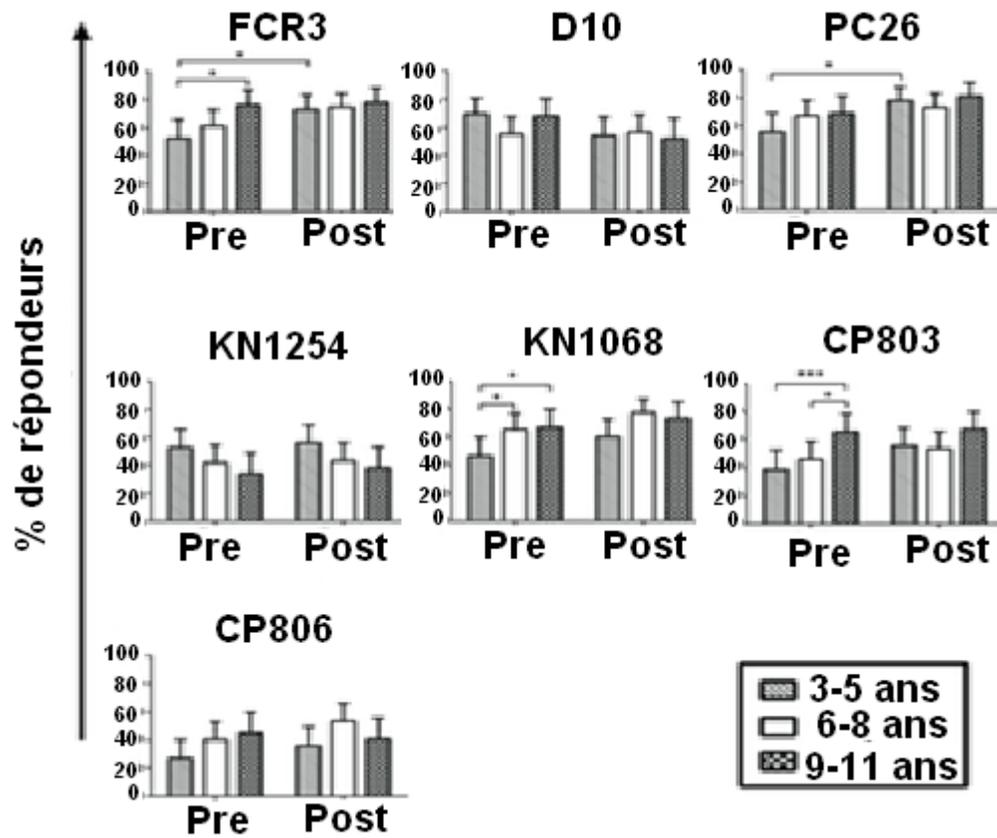


Figure 7: Influence de l'âge et de la saison de transmission sur la réponse IgG plasmatiques des sujets aux sept souches de *P. falciparum* en amont et en aval de la saison de transmission.

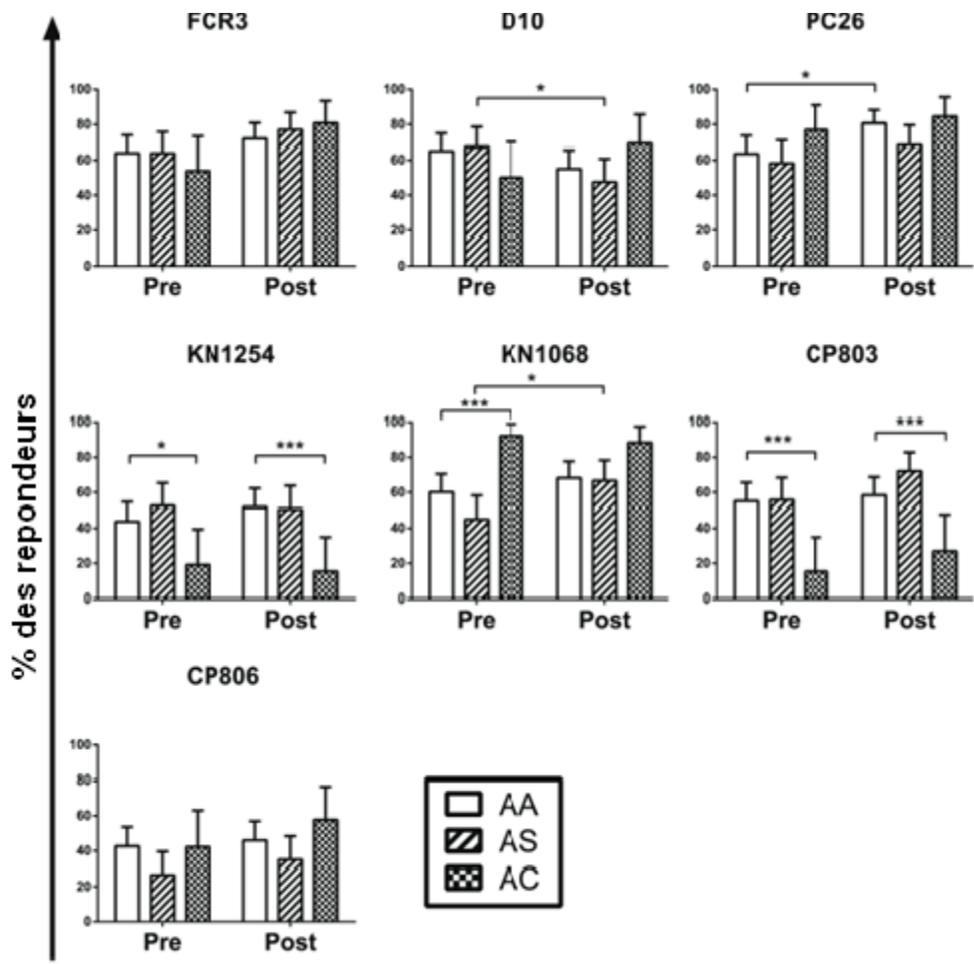


Figure 8: Influence du type d'hémoglobine (type d'Hb) et de la saison de transmission sur la réponse IgG plasmatiques des sujets aux sept souches de *P. falciparum* en amont et en aval de la saison de transmission.

Ensuite, nous avons évalué l'effet de différents types d'Hb sur la proportion de sujet répondeurs aux souches de parasite étudiées. Trois types d'Hb ont été étudiés : l'HbAA, l'HbAC et l'HbAS. En amont de la saison de transmission, les proportions de sujets répondeurs % des répondeurs étaient significativement différentes entre les enfants HbAA et HbAC pour 3 de 7 souches de parasites (44 % contre 19 % pour KN1254, $p = 0,012$; 60 % contre 92 % pour KN1068, $p = 0,0008$; 55 % contre 15 % pour CP803, $p = 0,0002$; Test du rapport de vraisemblance du Chi carré suivie d'un essai de Odds Ratio) (figure 8). En aval de la saison de transmission, les proportions des sujets répondeurs étaient significativement plus élevées dans le groupe des sujets

HbAA comparés au sujets du groupe HbAC pour les souches KN1254, KN1068 et CP803 (52 % contre 15 % pour KN1254, $p = 0,0006$; 68 % contre 88 % pour KN1068, $p = 0,0333$; 58 % contre 27 % pour CP803, $p = 0,0042$). Aucune différence n'a été observée entre les sujets du groupe HbAS et les autres sujets en terme de proportion de répondeurs et ceux quelque soit la souche de parasite.

De telles différences ont été observées entre les enfants HbAA et HbAS pour aucune des 7 souches de parasites, avant ou après la période de transmission. Nous avons également évalué si le type Hb a été associé à des changements dans la proportion des répondeurs au cours de la saison de transmission. Les enfants HbAA ont montré une augmentation des répondeurs contre PC26 (64% à 81%, $p = 0,018$, test exact de Fisher), tandis que les enfants HbAS ont montré une augmentation des répondeurs contre KN1068 (45% à 67%, $p = 0,027$) et une diminution des répondeurs contre D10 (67% à 48%, $p = 0,0436$) (figure 11). Aucun autre changement important des répondeurs n'a été trouvé. Ces données indiquent que la reconnaissance des GRi par les anticorps peut varier considérablement en fonction des facteurs de l'hôte (c'est-à-dire, l'âge et le type Hb), la saisonnalité et la souche de parasite.

5.5. Relation entre l'ampleur de la réponse IgG des enfants contre les souches parasitaires avec l'âge et le type d'Hb

Nous avons mesuré la corrélation entre les réponses IgG des paires d'échantillons (pré- et post- saison de la transmission) à tous les sept souches de parasites. Avant la saison de transmission, une réponse IgG à une seule souche de parasite était corrélée significativement à celle de l'autre souche de parasite dans 38% (08/21) des combinaisons testées (tableau 6). Toutes les corrélations significatives étaient des corrélations positives (par exemple, les enfants ayant une réponse positive à une souche de parasite avaient une réponse positive à une autre souche). Après la saison de transmission, cette proportion a augmenté à 62% (13/21) (tableau 7). De même, toutes les corrélations significatives ont été positives.

Tableau 6 : Analyse de contingence pour déterminer si la réponse IgG aux souches de parasites corrobore avec l'autre: saison de pré-transmission^a

	D10	PC26	KN1254	KN1068	CP803	CP806
FCR3	0,286	0,053	0,003	1	0,002	0,008
D10		1	1	1	0,613	0,613
PC26			0,613	0,002	0,027	0,002
KN1254				0,286	0,002	0,293
KN1068					1	0,018
CP803						0,286

^aLe test de probabilité du Chi-carré a été utilisé pour comparer les réponses IgG à deux souches de parasites. Les valeurs du p corrigées sont présentées.

Tableau 7 : Analyse de contingence pour déterminer si la réponse IgG aux souches de parasites corrobore avec l'autre: saison de post-transmission^a

	D10	PC26	KN1254	KN1068	CP803	CP806
FCR3	0,253	0,002	0,002	0,006	0,002	0,013
D10		0,013	0,794	0,002	0,974	0,794
PC26			0,463	0,002	0,054	0,012
KN1254				0,794	0,002	0,002
KN1068					0,024	0,002
CP803						0,346

^aLe test de probabilité du Chi-carré a été utilisé pour comparer les réponses IgG à deux souches de parasites. Les valeurs du p corrigées sont présentées.

Pour évaluer l'ampleur des réponses IgG, nous avons compté le nombre de souches de parasites reconnu par les IgG de chaque enfant avant et après la saison de transmission. Comme prévu, le nombre médian de souches parasitaires reconnu par l'ensemble de la cohorte des enfants a considérablement augmenté (4 à 5, $p = 0,0013$, test apparié des paires de Wilcoxon) au cours de la saison de transmission (figure 9a).

Pour évaluer l'effet de facteurs de l'hôte sur l'ampleur des réponses IgG, nous avons stratifié le nombre de souches de parasites reconnu par âge et par type Hb. Avant et après la saison de transmission, le nombre de souches de parasites reconnu par les IgG a augmenté de façon significative avec l'âge seulement chez les enfants HbAA (figures 9b, c). Les seules autres différences significatives ont été que les enfants HbAA de 9 à 11 ans, reconnaissaient plus de souches parasitaires que leurs homologues HbAS avant (nombre médian reconnu 5 vs 3,5, $p = 0,0094$, test de Mann-Whitney) et après (5 vs. 3, $p = 0,0208$) la saison de transmission (figures 9b, c).

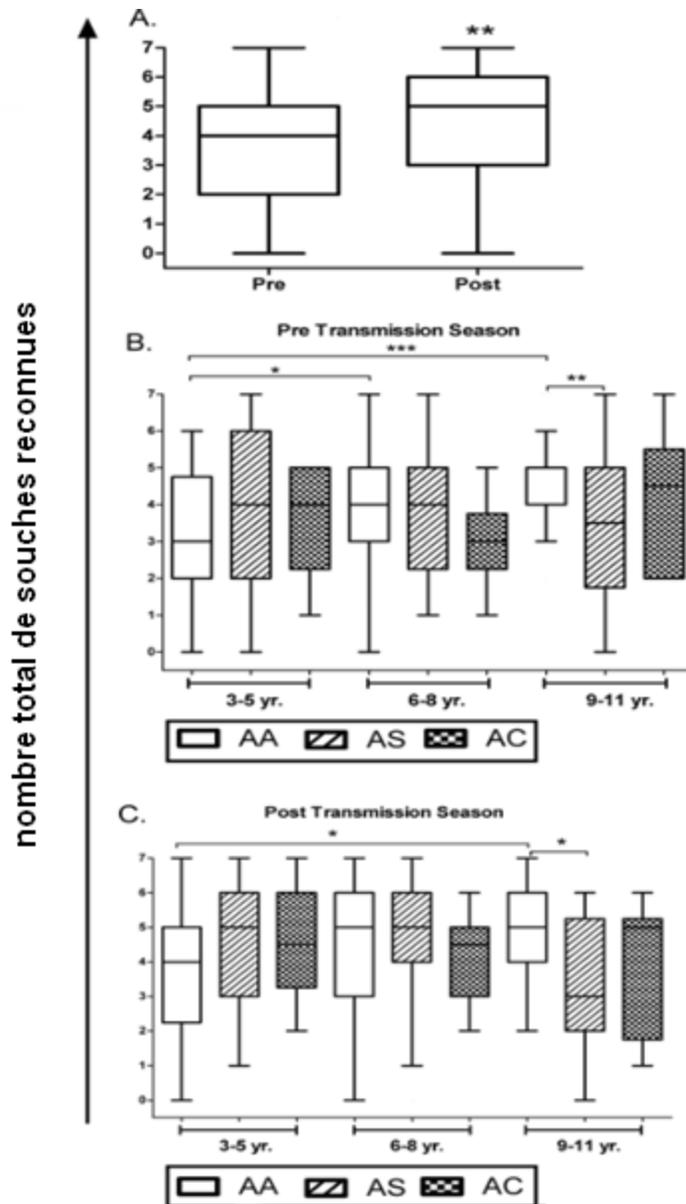


Figure 9: Impact de la saison de transmission, de l'âge et du type d'hémoglobine sur l'amplitude des réponses IgG aux souches de parasites

Nous avons défini l'amplitude de la réponse IgG aux souches de parasites comme étant le nombre de souche de parasite reconnu par les IgG plasmatiques des sujets (Pourcentage de reconnaissance par les plasma de sujet de GR infecté \geq à la moyenne des pourcentages de reconnaissance par les plasma de sujets non-immun de GR infectés + 2 Ecart-type).

5.6. Réponse IgG contre les souches parasitaires et le risque ultérieur de paludisme

Nous avons ensuite examiné si une réponse IgG à certaines souches de parasites avant la saison de transmission corrélait avec le risque ultérieur de faire le paludisme (tableau 8). Après ajustement pour l'âge et le type Hb, seule une réponse IgG contre la souche cambodgienne parasitaire CP803 corrélait avec la protection contre le paludisme (OR = 0,28, IC à 95% 0,10 au 0,75, $p = 0,011$); Toutefois, cette réponse IgG n'était pas corrélée avec un temps plus long pour le premier épisode de paludisme (tableau 8). Étonnamment, une réponse IgG a la souche parasitaire malienne KN1254 corrélée non seulement avec le risque accru de paludisme (OR = 4,40, IC 95% 1,69 à 12,5, $p = 0,002$), mais aussi avec un temps plus court au premier épisode de paludisme (RR = 1,78, 95 % CI 1,15 à 2,74, $p = 0,008$) (tableau 8).

Tableau 8. Analyse de régression multivariée: effets des IgG spécifiques de souches parasitaires sur le risque de paludisme.^a

	Cas de paludisme			Temps pour le premier épisode de paludisme		
	OR ^b	(IC 95%)	p	RR ^c	(IC 95%)	P
FCR3	1,04	(0,43-2,54)	0,925	0,95	(0,61-1,48)	0,823
D10	1,22	(0,55-2,66)	0,616	1,07	(0,72-1,61)	0,717
PC26	0,54	(0,21-1,29)	0,170	0,80	(0,53-1,23)	0,315
KN1254	4,40	(1,69-12,5)	0,002	1,78	(1,15-2,74)	0,008
KN1068	0,76	(0,31-1,82)	0,549	0,82	(0,53-1,25)	0,355
CP803	0,28	(0,10-0,75)	0,011	0,71	(0,43-1,15)	0,165
CP806	0,81	(0,35-1,87)	0,622	0,82	(0,53-1,25)	0,375

^a Ajuste pour l'âge et le type d'Hb

^b Odds ratio

^c Risque relatif

5.7. Relation entre l'ampleur de la réponse IgG des enfants contre les antigènes du mérozoïte et la saison de transmission

Enfin, nous avons mesuré les corrélations entre le nombre total de souches parasitaires reconnues par les IgG et le titre des anticorps IgG contre quatre antigènes recombinants du mérozoïte (AMA-1, EBA-175, MSP-1, MSP-2). Avant la saison de transmission, tous les titres d'IgG contre les quatre antigènes étaient significativement ($p < 0,05$) plus élevés dans le groupe d'enfants qui reconnaissent 4, 5 ou 6 à 7 souches de parasites que dans le groupe d'enfants qui reconnaissent 0-2 souches de parasites (figure 10). Les titres IgG anti-MSP-2 étaient également significativement ($p < 0,05$) plus élevés dans le groupe d'enfants qui reconnaissent trois souches de parasites que dans le groupe d'enfants qui reconnaissent 0-2 souches de parasites (figure 10). Après la saison de transmission, aucune de ces corrélations ne restait significative.

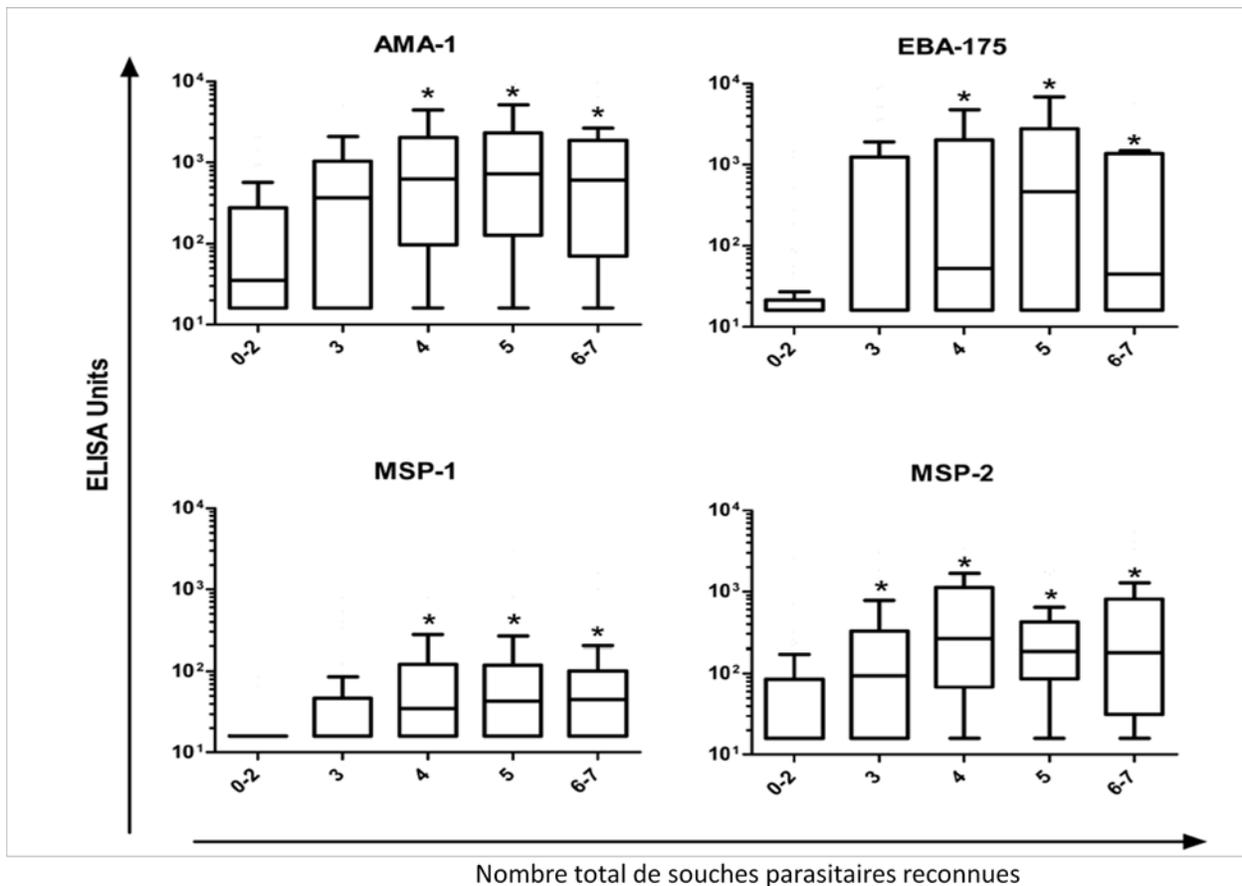


Figure 10. Étendue de la réponse IgG aux souches parasitaires corrobore avec l'augmentation du titre d'IgG aux antigènes du mérozoïte.

Les titres d'IgG contre les 4 antigènes du mérozoïte (AMA-1, EBA-175, MSP-1, MSP-2) étaient mesurés dans les plasmas obtenus avant la saison de transmission, et stratifiés selon le nombre total de souches de parasite reconnues par les IgG. Les titres IgG étaient comparés en utilisant le test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaison multiple de Dunn. * $p < 0.05$. Le nombre d'enfants reconnaissant 0-2, 3, 4, 5 et 6-7 souches parasitaires était 45, 34, 32, 36 et 30.

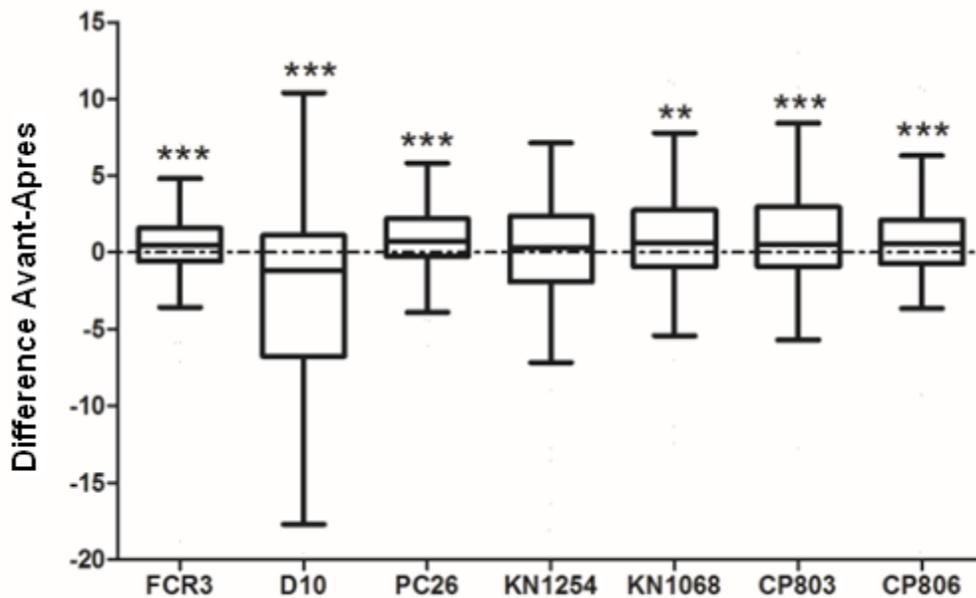


Figure 11: Variation des pourcentages de GR infectés (par les souches de *P. falciparum*) reconnus par les IgG plasmatique au cours de la saison de transmission.

Pour déterminer si les pourcentages des GR infectés (par les souches de parasite testées) reconnus par les IgG plasmatiques des sujets ont également augmenté au cours de la saison de transmission. Nous avons également évalué l'effet de la saison de transmission sur les proportions de sujets répondeurs aux souches de parasite au sein de chaque groupes d'âge en comparant les valeurs obtenues en amont à celles obtenues en aval de la saison de transmission. Seuls les sujets du groupe d'âge de 3-5 ans ont montré une augmentation significative des proportions de sujets répondeurs aux souches FCR3 ($p = 0,0357$, test exact de Fisher) et PC26 ($p = 0,0183$). Aucun changement significatif n'a été observé dans les autres groupes.

Nous avons également déterminé si le type d'Hb influençait la réponse IgG aux sept souches de parasite étudiées. Nous avons observé que seuls les sujets HbAA et HbAC avaient présenté une augmentation significative des proportions des sujets répondeurs respectivement aux souches CP26 (de 64 % à 81 %, $p = 0,018$, test exact de Fisher) et KN1068 (de 45 % à 67 %, $p = 0,027$) au cours de la saison de transmission. Cependant la proportion de sujets HbAC répondeurs à la souche D10 avait significativement diminué (de 67 % à 48 %, $p = 0.0364$). Aucun changement significatif en proportion des sujets répondeurs (à aucune des sept souches) n'a été trouvé dans le groupe de sujet HbAS.

6. Commentaires et discussion

Les anticorps dirigés contre les antigènes de surface de globules rouges infectés constituent un composant important de réponse immunitaire contre les parasites du paludisme au stade érythrocytaire. Des études antérieures ont démontré clairement que le transfert passif des anticorps peut réduire la morbidité et réduire la densité de parasite chez les patients atteints de paludisme [103]. Cependant, la spécificité de ces anticorps protecteurs n'a pas été déterminée. Ce travail participe à l'évaluation de l'immunité humorale aux antigènes de surface de globules rouges infectés. Ainsi, nous avons utilisé une méthode de cytométrie en flux pour rapidement tester la réponse IgG de 352 échantillons de plasma d'enfants maliens (plasma de 176 sujets collectés en amont et en aval de la saison de transmission 2009) à 7 souches de *P. falciparum*. Nous avons constaté que les IgG des enfants maliens reconnaissent des isolats génétiquement différents et d'origine géographique différente (y compris le Mali). L'amplitude de ces réponses IgG a généralement augmenté pendant une saison de transmission unique de 7 mois. Ces réponses apparaissent aussi influencées par certains facteurs liés à l'hôte comme l'âge et le type d'Hb et à la souche du parasite utilisée. De façon intéressante, nous avons constaté que l'ampleur des réponses IgG aux globules rouges infectés augmentait avec l'âge chez les enfants HbAA, mais pas chez les enfants HbAS ou HbAC.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence l'existence chez les enfants maliens des réponses IgG spécifique de souches et de réponses IgG pouvant reconnaître plusieurs souches de parasite. A titre d'exemple, 8 des 21 combinaisons entre les souches de parasite testés ont présenté une corrélation positive dans la réponse des IgG plasmatique en amont de la saison de transmission contre 13 sur 21 en aval de la saison de transmission soit respectivement 38% et 62% des combinaisons testées. Ce constat montre que les réponses IgG aux souches de parasite ont généralement augmenté au cours de la saison de transmission. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les enfants maliens développent activement au cours de la saison de transmission 2009 des réponses IgG aux antigènes de surface des globules rouges infectés pouvant reconnaître plusieurs souches de parasite ("anticorps souche-transcendante").

Le phénotype de "anticorps souche-transcendante" peut s'expliquer soit par le fait que les IgG produits par l'enfant peuvent reconnaître des antigènes communs à plusieurs souche de parasites, ou la production d'IgG contres des antigènes spécifiques de diverses souches, ou un mélange des deux. Une étude plus approfondie est nécessaire pour répondre à cette question. L'effet de la saison de transmission observé sur la reconnaissance IgG des GR infectés corrobore avec les résultats des travaux de Giha et coll., qui ont signalé une augmentation dans l'agglutination des GR infectés par *P. falciparum* par des sera d'enfant soudanais au cours d'une saison de transmission dans l'est du Soudan [104-107]. Les autres paires (avant et après saison de transmission) de réponses IgG ne sont pas corrélées à toutes, ce qui suggère que chacun des deux répertoires IgG reconnaît une constellation d'antigènes parasitaires spécifiques à la souche. Ces données sont compatibles avec ceux d'autres études montrant que les sérums des enfants atteints de paludisme agglutinaient les isolats parasitaires autologues mais pas les isolats hétérologues [105-107]. Alors que notre étude démontre que les enfants maliens sont capables de reconnaître les parasites génétiquement et géographiquement distincts, nos données mettent l'accent sur l'importance d'évaluer la réactivité IgG contre plusieurs souches de parasites différents.

Notre analyse a également déterminé les effets de l'âge sur la réponse IgG des sujets aux GR infectés par les sept souches de parasite. Avant la saison de transmission, la reconnaissance IgG des GR infecté augmente avec l'âge pour les souches FCR3, KN1068, et CP803. Cependant, l'effet de l'âge n'a pas été observé après la saison de transmission, ce qui suggère que les jeunes enfants maliens atteignent un plateau des réponses IgG à la fin de la saison de transmission approximativement égal à celles des enfants plus âgés. L'effet de l'âge observé avant la saison de transmission peut donc être le résultat du déclin de réponses IgG pendant la saison sèche précédente. L'absence d'un effet saisonnier significatif chez les enfants plus âgés est probablement en raison de plafonnement des réponses IgG à des niveaux adultes. Des études antérieures chez les adultes Soudanais, Nigériens, Tanzaniens et Gambiens ont montré que les anticorps peuvent reconnaître et agglutiner les diverses souches parasitaires d'origine Ghanéenne et Tanzanienne [103, 105, 108, 109]. Notre étude confirme ces

résultats en montrant que les IgG des grands enfants maliens reconnaissent également diverses souches de parasites du Pérou, de la Papouasie-Nouvelle-Guinée, du Cambodge, du Mali et de la Gambie.

Les effets du type d'Hb sur la reconnaissance IgG des antigènes du *P. falciparum* ont été étudiés récemment. En utilisant un panel de protéines recombinantes (*microarray*), Tan et *al.* ont constaté que HbAS et HbAC n'étaient pas associés à une meilleure réponse des IgG spécifiques du *P. falciparum* chez les enfants Maliens [110]. Une similaire étude menée sur la même cohorte de 176 sujets que notre étude-ci a révélé que les enfants HbAS, mais pas HbAC, ont des titres nettement inférieurs à deux antigènes recombinants mérozoïtes (EBA175 et MSP2) que leurs homologues HbAA appariés [111]. Ces deux études ont toutes travaillé sur des protéines du stade pré érythrocytaire. Notre travail ayant concerné le stade érythrocytaire de développement de *P. falciparum*, nous avons déterminé si le type d'Hb influençait l'acquisition de « anticorps souche-transcendants ». Ainsi l'amplitude de la réponse IgG plasmatique a été examinée en fonction des différents type d'Hb et à l'intérieur des 3 trois groupes d'âge étudiés. Nous avons constaté que l'amplitude de la réponse IgG aux souches de parasite ne variait pas significativement en fonction du type d'Hb chez les enfants de groupe d'âge 3-5 ans et 6-8 ans. Ce constat était invarié aussi bien en amont qu'en aval de la saison de transmission 2009. Cependant, l'amplitude de la réponse IgG des sujets HbAS aux souches étudiées était significativement plus faible que celle de leur homologue HbAA. Ces observations pourraient s'expliquer par le fait que les sujets HbAS ayant moins de risque de faire le paludisme au cours des premières années de vie que leur homologue HbAA, n'auraient donc pas rencontré autant de souches de parasitisme qu'eux et donc d'en être immunisés. L'évaluation des effets du type d'Hb sur l'acquisition des IgG spécifiques de souches et des IgG souches-transcendants bénéficiera probablement d'étudier un plus grand panel des isolats de parasites obtenus à partir de la même population d'étude spécifique de la souche.

Comme dans d'autres études [112-114], nous avons constaté que l'augmentation de l'âge et HbAS sont associés à un risque de paludisme réduit dans notre population d'étude. Des études antérieures ont suggéré que la présence d'une parasitémie

asymptomatique au moment de la collecte de plasma est en corrélation avec une protection plus élevée des réponses IgG [115, 116]. Après ajustement en fonction de l'âge et du type d'Hb, la réponse IgG à la souche cambodgienne CP803 était bien corrélée avec la protection contre le paludisme. Une explication de ce constat est que CP803 exprime d'ailleurs VSA qui sont très semblables à celles exprimées par les parasites en circulation et causant le paludisme dans notre cohorte d'enfants maliens en 2009. A l'opposé, notre étude montre que la réponse IgG à la souche malienne KN1254 est fortement corrélée à un risque accru de paludisme. Ce dernier constat en revanche nous apparaît beaucoup plus difficile à expliquer. En effet, la souche KN1254 a été obtenue à partir d'un enfant HbAA âgé de 15 ans qui a présenté un paludisme grave (tel que défini par l'OMS [117]). Bien que cette présentation clinique soit rare dans ce groupe d'âge, les VSA exprimés par KN1254 ne semblent pas être rare chez les populations de parasite circulant dans la zone d'étude, car jusqu'à 43% de nos sujets d'étude ont reconnu cette souche.

7. Limites de notre étude

Notre étude comporte plusieurs limites. Tout d'abord, les parasites Maliens et Cambodgiens que nous avons utilisés ne sont pas clonale (données non présentées). Cette constatation et le fait que les gènes var changent au cours de la culture *in-vitro*, fait qu'il est difficile d'utiliser ces parasites comme réactifs avec des phénotypes stables dans les études ultérieures. Deuxièmement, nous n'avons pas identifié les antigènes parasitaires reconnus par les IgG des enfants dans notre étude. Récemment, Chan et collaborateurs ont fait un argumentaire très convaincant en faveur de PfEMP1 comme étant la principale cible des anticorps anti-VSA [7]. Troisièmement, la dimension de cette étude a exigé que l'on compare les données de la cytométrie de flux recueillies sur plusieurs jours, ce qui a le potentiel d'introduire la variabilité d'une expérience à l'autre. Pour minimiser cette variabilité, nous avons analysé les résultats en binôme répondeurs/non-répondeurs au lieu de la proportion de reconnaissance ou MFI. Quatrièmement, nous n'avons pas inclus un témoin positif IgM humaine dans nos expériences car il n'était pas disponible. Par conséquent, il se peut que certains des signaux IgG que nous avons détectés par les anticorps anti-IgG (qui reconnaît les

chaînes lourdes et légères) provenaient de la réactivité croisée de l'anticorps anti-IgG à IgM. Cependant, nous croyons que la réactivité croisée aux IgM non spécifique était mineure, car tous les 4 échantillons plasmatiques des adultes américains naïfs de paludisme testés au cours de cinq essais indépendants ont toujours montré moins de 6% de réponses avec l'anticorps anti-IgG.

Nous n'avons pas détecté d'IgM avec aucun des échantillons dans la présente étude. Cependant, lors de l'évaluation du plasma et des parasites autologues, nous avons pu détecter les IgM chez un des 48 enfants testés, ce qui suggère que les réponses IgM n'étaient pas très robustes dans cette cohorte [91]. En outre, la rareté des anticorps IgM qui réagissent contre la surface des GRi est également connue et documentée depuis les années 1980[118]. Malgré ces limites, nous croyons que ce test semi-quantitatif peut rapidement mesurer les réponses immunitaires IgG aux antigènes de surface des GRi. Par exemple, ce test a été mis en œuvre avec succès au Mali pour étudier comment les réponses IgG influencent le taux de clairance des parasites en réponse au traitement avec l'artésunate [91]. Depuis que ce test examine rapidement de nombreux échantillons de plasma contre plusieurs souches de parasites, il peut également être utile pour évaluer l'étendue et l'ampleur des réponses IgG naturellement acquis aux antigènes de surface des GRi et leur relation avec la protection contre le paludisme.

8. Conclusion et recommandations

8.1. Conclusion

Au terme de notre étude, nous pouvons conclure que :

L'âge et le portage de l'HbAS étaient fortement associés à une réduction du risque de faire le paludisme au cours de la période d'étude. La saison de transmission a boosté la réponse IgG aux différentes souches étudiées de façon générale. Cette augmentation était significative pour les souches FCR3, PC28 et KN1068. L'âge était associé positivement à la réponse IgG contre certaines souches avant la saison de transmission mais pas après la saison de transmission. L'HbAS était associée à une réduction de la réponse IgG souche-transcendante chez les sujets de 9-11 ans. La réduction du risque de paludisme observée chez les sujets HbAS ne semble pas être liée à l'acquisition d'anticorps anti-descendants de souche.

8.2. Recommandations

Au vu de nos résultats, nous formulons les recommandations suivantes :

- Aux chercheurs, de réaliser des nouvelles études dans d'autres régions épidémiologiques afin de consolider ces résultats obtenus ;
- D'étudier d'autres antigènes du stade érythrocytaire dans les mêmes conditions chez les enfants vivant en zone d'endémie palustre en Afrique tout en tenant compte du polymorphisme érythrocytaire ; et
- A la population, une meilleure participation dans de telles études afin de faciliter la mise au point de mesures de protection efficiente contre le paludisme en Afrique.

9. Références Bibliographiques

1. Murray, C.J., et al., *Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis*. Lancet. **379**(9814): p. 413-31.
2. Lozano, R., et al., *Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010*. Lancet. **380**(9859): p. 2095-128.
3. W.H.O., *World Malaria Report 2012*. 2012.
4. Struik, S.S. and E.M. Riley, *Does malaria suffer from lack of memory?* Immunol Rev, 2004. **201**: p. 268-90.
5. Marsh, K. and S. Kinyanjui, *Immune effector mechanisms in malaria*. Parasite Immunol, 2006. **28**(1-2): p. 51-60.
6. Marsh, K. and R.J. Howard, *Antigens induced on erythrocytes by *P. falciparum*: expression of diverse and conserved determinants*. Science, 1986. **231**(4734): p. 150-3.
7. Chan, J.A., et al., *Targets of antibodies against *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in malaria immunity*. J Clin Invest, 2012. **122**(9): p. 3227-38.
8. Doolan, D.L., C. Dobano, and J.K. Baird, *Acquired immunity to malaria*. Clin Microbiol Rev, 2009. **22**(1): p. 13-36, Table of Contents.
9. Cohen, S., G.I. Mc, and S. Carrington, *Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria*. Nature, 1961. **192**: p. 733-7.
10. Bouharoun-Tayoun, H., et al., *Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes*. J Exp Med, 1990. **172**(6): p. 1633-41.
11. Hill, A.V., et al., *Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria*. Nature, 1991. **352**(6336): p. 595-600.
12. Rowe, J.A., et al., *Blood group O protects against severe *Plasmodium falciparum* malaria through the mechanism of reduced rosetting*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(44): p. 17471-6.
13. Williams, T.N., *Human red blood cell polymorphisms and malaria*. Curr Opin Microbiol, 2006. **9**(4): p. 388-94.
14. Taylor, S.M., C.M. Parobek, and R.M. Fairhurst, *Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis*. Lancet Infect Dis, 2012. **12**(6): p. 457-68.
15. Fairhurst, R.M., C.D. Bess, and M.A. Krause, *Abnormal PfEMP1/knob display on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes containing hemoglobin variants: fresh insights into malaria pathogenesis and protection*. Microbes Infect. **14**(10): p. 851-62.
16. Fairhurst, R.M., et al., *Abnormal display of PfEMP-1 on erythrocytes carrying haemoglobin C may protect against malaria*. Nature, 2005. **435**(7045): p. 1117-21.
17. Carlson, J., et al., *Natural protection against severe *Plasmodium falciparum* malaria due to impaired rosette formation*. Blood, 1994. **84**(11): p. 3909-14.

18. Williams, T.N., *Red blood cell defects and malaria*. Mol Biochem Parasitol, 2006. **149**(2): p. 121-7.
19. Bunn, H.F., *The triumph of good over evil: protection by the sickle gene against malaria*. Blood. **121**(1): p. 20-5.
20. Belcher, J.D., et al., *Heme oxygenase-1 is a modulator of inflammation and vaso-occlusion in transgenic sickle mice*. J Clin Invest, 2006. **116**(3): p. 808-16.
21. Cunnington, A.J., et al., *Prolonged neutrophil dysfunction after Plasmodium falciparum malaria is related to hemolysis and heme oxygenase-1 induction*. J Immunol, 2012. **189**(11): p. 5336-46.
22. Marsh, K., et al., *Antibodies to blood stage antigens of Plasmodium falciparum in rural Gambians and their relation to protection against infection*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1989. **83**(3): p. 293-303.
23. Cabrera, G., et al., *The sickle cell trait is associated with enhanced immunoglobulin G antibody responses to Plasmodium falciparum variant surface antigens*. J Infect Dis, 2005. **191**(10): p. 1631-8.
24. Brown, I.N., K.N. Brown, and L.A. Hills, *Immunity to malaria: the antibody response to antigenic variation by Plasmodium knowlesi*. Immunology, 1968. **14**(1): p. 127-38.
25. Eaton, M.D., *The Agglutination of Plasmodium Knowlesi by Immune Serum*. J Exp Med, 1938. **67**(6): p. 857-70.
26. Newbold, C.I., et al., *Plasmodium falciparum: the human agglutinating antibody response to the infected red cell surface is predominantly variant specific*. Exp Parasitol, 1992. **75**(3): p. 281-92.
27. Bull, P.C., et al., *Plasmodium falciparum-infected erythrocytes: agglutination by diverse Kenyan plasma is associated with severe disease and young host age*. J Infect Dis, 2000. **182**(1): p. 252-9.
28. Staalso, T., et al., *Antibody reactivity to conserved linear epitopes of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1)*. Immunol Lett, 1998. **60**(2-3): p. 121-6.
29. Southwell, B.R., et al., *Field applications of agglutination and cytoadherence assays with Plasmodium falciparum from Papua New Guinea*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1989. **83**(4): p. 464-9.
30. Bull, P.C., et al., *Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria*. Nat Med, 1998. **4**(3): p. 358-60.
31. Doodoo, D., et al., *Antibodies to variant antigens on the surfaces of infected erythrocytes are associated with protection from malaria in Ghanaian children*. Infect Immun, 2001. **69**(6): p. 3713-8.
32. Collins, W.E., G.M. Jeffery, and J.C. Skinner, *Fluorescent Antibody Studies in Human Malaria. 3. Development of Antibodies to Plasmodium Falciparum in Semi-Immune Patients*. Am J Trop Med Hyg, 1964. **13**: p. 777-82.
33. Collins, W.E., G.M. Jeffery, and J.C. Skinner, *Fluorescent Antibody Studies in Human Malaria.I. Development of Antibodies to Plasmodium Malariae*. Am J Trop Med Hyg, 1964. **13**: p. 1-5.
34. Gysin, J., P. Dubois, and L. Pereira da Silva, *Protective antibodies against erythrocytic stages of Plasmodium falciparum in experimental infection of the squirrel monkey, Saimiri sciureus*. Parasite Immunol, 1982. **4**(6): p. 421-30.

35. Gysin, J., S. Pauillac, and T. Fandeur, *Characterization by anti-Ig monoclonal antibodies of protective and non-protective antibodies against asexual forms of Plasmodium falciparum in the Saimiri monkey*. Ann Inst Pasteur Immunol, 1987. **138**(6): p. 829-44.
36. Voller, A., et al., *New serological test for malaria antibodies*. Br Med J, 1975. **1**(5959): p. 659-61.
37. Otoo, L.N., et al., *Immunity to malaria in young Gambian children after a two-year period of chemoprophylaxis*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1988. **82**(1): p. 59-65.
38. Staalsoe, T., et al., *Detection of antibodies to variant antigens on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes by flow cytometry*. Cytometry, 1999. **35**(4): p. 329-36.
39. Cabrera, G., et al., *Immunoglobulin G isotype responses to variant surface antigens of Plasmodium falciparum in healthy Gabonese adults and children during and after successive malaria attacks*. Infect Immun, 2004. **72**(1): p. 284-94.
40. SLIS, M.d., annuaire SLIS, 2007. **117**.
41. Doumbo, O., *Epidémiologie du paludisme au Mali, étude de la chimiorésistance, essai de stratégie de contrôle basé sur l'utilisation de rideaux imprégnés de perméthrine associé au traitement systématique des accès fébriles.*, Parasitologie, Pathologie, Ecologie, France., 1992, Montpellier II: Montpellier.
42. Singh, B., et al., *A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings*. Lancet, 2004. 363(9414): p. 1017-24.
43. Harbach, R.E., *The classification of genus Anopheles (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships*. Bull Entomol Res, 2004. 94(6): p. 537-53.
44. 19. Toure, Y.T., et al., *The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognized taxa of the Anopheles gambiae complex in Mali, West Africa*. Parassitologia, 1998. 40(4): p. 477-511.
45. Bannister LH, S.I., *Plasmodium*. 2009.
46. Angulo, I. and M. Fresno, *Cytokines in the pathogenesis of and protection against malaria*. Clin Diagn Lab Immunol, 2002. **9**(6): p. 1145-52.
47. McGuire W, D.A.U., Stephens S, Olaleye BO, Langerock P, Greenwood BM, et al. *Levels of tumour necrosis factor and soluble TNF receptors during malaria fever episodes in the community*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1998 Jan-Feb;92(1):50-3.
48. Kwiatkowski, D., *Tumour necrosis factor, fever and fatality in falciparum malaria*. Immunology letters, 1990. **25**(1-3): p. 213-6.
49. Pain A, F.D., Kai O, Urban BC, Lowe B, Marsh K, et al. *Platelet-mediated clumping of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes is a common adhesive phenotype and is associated with severe malaria*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Feb 13;98(4):1805-10.
50. Newton, C.R. and S. Krishna, *Severe falciparum malaria in children: current understanding of pathophysiology and supportive treatment*. Pharmacol Ther, 1998. **79**(1): p. 1-53.
51. Le Hesran, J.Y., *[The particularities of malaria in the child]*. Med Trop (Mars), 2000. **60**(1): p. 92-8.

52. Pain, A., et al., *Platelet-mediated clumping of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes is a common adhesive phenotype and is associated with severe malaria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(4): p. 1805-10.
53. Sterkers Y, S.A., *Plasmodium falciparum infected erythrocyte surface molecules and their role in malaria pathogenesis*. John Libbey eurotext., 2002. **8**(2): p. 113-9.
54. Ho, M., et al., *Rosette formation of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes from patients with acute malaria*. Infect Immun, 1991. **59**(6): p. 2135-9.
55. Rowe, A., et al., *Plasmodium falciparum rosetting is associated with malaria severity in Kenya*. Infect Immun, 1995. **63**(6): p. 2323-6.
56. Rowe, J.A., et al., *P. falciparum rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1*. Nature, 1997. **388**(6639): p. 292-5.
57. Grau, G.E., et al., *Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria*. Science, 1987. **237**(4819): p. 1210-2.
58. Mohan, K., P. Moulin, and M.M. Stevenson, *Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage Plasmodium chabaudi AS infection*. J Immunol, 1997. **159**(10): p. 4990-8.
59. Salerno, A. and F. Dieli, *Role of gamma delta T lymphocytes in immune response in humans and mice*. Crit Rev Immunol, 1998. **18**(4): p. 327-57.
60. Taylor-Robinson, A.W. and E.C. Smith, *A dichotomous role for nitric oxide in protection against blood stage malaria infection*. Immunol Lett, 1999. **67**(1): p. 1-9.
61. Diakite, M., *Paludisme uptodate. Seconde Edition, MRTC/FMPOS*. 2012, Bamako, Mali.
62. Deloron, P. and B. Maubert, *[Immunological interactions between malaria and pregnancy]*. Med Trop (Mars), 1995. **55**(4 Suppl): p. 67-8.
63. Cot, M. and P. Deloron, *[Malaria during pregnancy: consequences and interventional perspectives]*. Med Trop (Mars), 2003. **63**(4-5): p. 369-80.
64. Seidina, D.A., *Les mecanismes de protection de l'hémoglobine contre les formes graves de paludisme a P. falciparum: resultats d'études preliminaires in vitro in Medecine*. 2005, FMPOS: BAMAKO, Mali.
65. Pauling, L., H.A. Itano, and et al., *Sickle cell anemia a molecular disease*. Science, 1949. **110**(2865): p. 543-8.
66. Beet, E.A., *Sickle cell disease in the Balovale District of Northern Rhodesia*. East Afr Med J, 1946. **23**: p. 75-86.
67. Beet, E.A., *Sickle cell disease in Northern Rhodesia*. East Afr Med J, 1947. **24**(6): p. 212-22.
68. Allison, A.C., *Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection*. Br Med J, 1954. **1**(4857): p. 290-4.
69. AB, R., *Malaria and the sickling trait*. British medical journal 1955. **1**: **1186-1189**.
70. Mackey JP, V.F., *Sickle-cell Anaemia*. Br Med J. 1954. **1**: **276**.
71. Gilles, H.M., et al., *Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency, sickling, and malaria in African children in South Western Nigeria*. Lancet, 1967. **1**(7482): p. 138-40.

72. Brittenham, G.M., A.N. Schechter, and C.T. Noguchi, *Hemoglobin S polymerization: primary determinant of the hemolytic and clinical severity of the sickling syndromes*. Blood, 1985. **65**(1): p. 183-9.
73. Allen, S.J., et al., *Morbidity from malaria and immune responses to defined Plasmodium falciparum antigens in children with sickle cell trait in The Gambia*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1992. **86**(5): p. 494-8.
74. Stirnadel, H.A., et al., *Malaria infection and morbidity in infants in relation to genetic polymorphisms in Tanzania*. Trop Med Int Health, 1999. **4**(3): p. 187-93.
75. Sokhna, C.S., et al., *Host factors affecting the delay of reappearance of Plasmodium falciparum after radical treatment among a semi-immune population exposed to intense perennial transmission*. Am J Trop Med Hyg, 2000. **62**(2): p. 266-70.
76. Taylor SM, P.C., Fairhurst RM (2012) Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis.
77. Friedman, M.J., *Erythrocytic mechanism of sickle cell resistance to malaria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(4): p. 1994-7.
78. Kaul, D.K., et al., *The role of membrane knobs in microvascular obstruction induced by Plasmodium falciparum-infected erythrocytes*. Trans Assoc Am Physicians, 1985. **98**: p. 204-14.
79. Raventos-Suarez, C., et al., *Membrane knobs are required for the microcirculatory obstruction induced by Plasmodium falciparum-infected erythrocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(11): p. 3829-33.
80. Pasvol, G., D.J. Weatherall, and R.J. Wilson, *Cellular mechanism for the protective effect of haemoglobin S against P. falciparum malaria*. Nature, 1978. **274**(5672): p. 701-3.
81. Pasvol, G., *The interaction between sickle haemoglobin and the malarial parasite Plasmodium falciparum*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1980. **74**(6): p. 701-5.
82. Olson, J.A. and R.L. Nagel, *Synchronized cultures of P falciparum in abnormal red cells: the mechanism of the inhibition of growth in HbCC cells*. Blood, 1986. **67**(4): p. 997-1001.
83. Williams, T.N., et al., *Sickle cell trait and the risk of Plasmodium falciparum malaria and other childhood diseases*. J Infect Dis, 2005. **192**(1): p. 178-86.
84. Traverse P.M.De., J.G., Coqelet M.L et al. Contribution à l'étude de la répartition des hémoglobinoses chez les africains et les malgaches. Sem Hosp ;Paris ,1969, 45 (22) ; 1540-46
85. Agarwal A., G.A., Sissoko Y., Taylor J G., Coulibaly D., Koné A., Kayentao K., Djimde A., Plowe CV., Doumbo O., Wellems TE., and Diallo D. Hemoglobin C associated with protection. Blood, 2000, 96, (7): 2358-63.
86. Modiano D, L.G., Sirima BS, Simpore J, Verra F, Konate A, Rastrelli E, Olivieri A, Calissano C, Paganotti GM, D'Urbano L, Sanou I, Sawadogo A, Modiano G, Coluzzi M. : Haemoglobin C protects against clinical Plasmodium.falciparum malaria. Nature. 2001; 414(6861):305-8.
87. Rihet P, F.L., Tall F, Traore AS, Fumoux F. Hemoglobin C is associated with reduced Plasmodium falciparum parasitemia and low risk of mild malaria attack. Hum Mol Genet. 2004, 13, 1-6.

88. Arie, T., et al., *Hemoglobin C modulates the surface topography of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes*. J Struct Biol, 2005. **150**(2): p. 163-9.
89. Tokumasu, F., et al., *Band 3 modifications in Plasmodium falciparum-infected AA and CC erythrocytes assayed by autocorrelation analysis using quantum dots*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 5): p. 1091-8.
90. Sogoba, N., et al., *Monitoring of larval habitats and mosquito densities in the Sudan savanna of Mali: implications for malaria vector control*. Am J Trop Med Hyg, 2007. **77**(1): p. 82-8. .
91. Lopera-Mesa, T.M., et al., *Plasmodium falciparum clearance rates in response to artesunate in Malian children with malaria: effect of acquired immunity*. J Infect Dis, 2013. **207**(11): p. 1655-63.
92. Jensen, J.B. and W. Trager, *Plasmodium falciparum in culture: establishment of additional strains*. Am J Trop Med Hyg, 1978. **27**(4): p. 743-6.
93. Anders, R.F., G.V. Brown, and A. Edwards, *Characterization of an S antigen synthesized by several isolates of Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(21): p. 6652-6.
94. Culvenor, J.G., et al., *Plasmodium falciparum: identification and localization of a knob protein antigen expressed by a cDNA clone*. Exp Parasitol, 1987. **63**(1): p. 58-67.
95. Duan, J., et al., *Population structure of the genes encoding the polymorphic Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1: implications for vaccine design*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(22): p. 7857-62.
96. Amaratunga, C., et al., *Artemisinin-resistant Plasmodium falciparum in Pursat province, western Cambodia: a parasite clearance rate study*. Lancet Infect Dis, 2012. **12**(11): p. 851-8.
97. Williams, T.N. and C.I. Newbold, *Reevaluation of flow cytometry for investigating antibody binding to the surface of Plasmodium falciparum trophozoite-infected red blood cells*. Cytometry A, 2003. **56**(2): p. 96-103.
98. Fu, Y., et al., *Dual labeling with a far red probe permits analysis of growth and oxidative stress in P. falciparum-infected erythrocytes*. Cytometry A. **77**(3): p. 253-63.
99. Miura, K., et al., *Development and characterization of a standardized ELISA including a reference serum on each plate to detect antibodies induced by experimental malaria vaccines*. Vaccine, 2008. **26**(2): p. 193-200.
100. Kennedy, M.C., et al., *In vitro studies with recombinant Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 (AMA1): production and activity of an AMA1 vaccine and generation of a multiallelic response*. Infect Immun, 2002. **70**(12): p. 6948-60.
101. El Sahly, H.M., et al., *Safety and immunogenicity of a recombinant nonglycosylated erythrocyte binding antigen 175 Region II malaria vaccine in healthy adults living in an area where malaria is not endemic*. Clin Vaccine Immunol. **17**(10): p. 1552-9.
102. McCarthy, J.S., et al., *A phase 1 trial of MSP2-C1, a blood-stage malaria vaccine containing 2 isoforms of MSP2 formulated with Montanide(R) ISA 720*. PLoS One. **6**(9): p. e24413.

103. Cohen S, M.I., Carrington S (1961) Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature* 192: 733-737. doi:10.1038/192733a0.
104. Giha HA, T.T., Staalsø T, Roper C, Elhassan IM et al. (1998) Seasonal variation in agglutination of *Plasmodium falciparum* -infected erythrocytes. *Am J Trop Med Hyg* 58: 399-405.
105. Marsh K, H.R., *Antigens induced on erythrocytes by P. falciparum : expression of diverse and conserved determinants*. *Science*, 1986. **231**: p. 150-153. doi:10.1126/science.2417315.
106. Chulay JD, H.J., Diggs CL (1985) Serotypes of *Plasmodium falciparum* defined by immune serum inhibition of in vitro growth. *Bull World Health Organ* 63: 317-323.
107. Reeder JC, R.S., al-Yaman F, Anders RF, Coppel RL et al. (1994) Diversity of agglutinating phenotype, cytoadherence, and rosette-forming characteristics of *Plasmodium falciparum* isolates from Papua New Guinean children. *Am J Trop Med Hyg* 51: 45-55.
108. Marsh K, O.L., Hayes RJ, Carson DC, Greenwood BM (1989) Antibodies to blood stage antigens of *Plasmodium falciparum* in rural Gambians and their relation to protection against infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 83: 293-303. doi:10.1016/0035-9203(89)90478-1.
109. Aguiar JC, A.G., Cegielski P, Greenwood BM, Jensen JB et al. (1992) Agglutination of *Plasmodium falciparum* -infected erythrocytes from east and west African isolates by human sera from distant geographic regions. *Am J Trop Med Hyg* 47: 621-63.
110. Tan X, T.B., Kayentao K, Ongoiba A, Doumbo S et al. (2011) Hemoglobin S and C heterozygosity enhances neither the magnitude nor breadth of antibody responses to a diverse array of *Plasmodium falciparum* antigens. *J Infect Dis* 204: 1750-1761. doi:10.1093/infdis/jir638.
111. Miura K, D.M., Diouf A, Doumbia S, Konate D et al. (2013) Relationship between Malaria Incidence and IgG Levels to *Plasmodium falciparum* Merozoite Antigens in Malian Children: Impact of Hemoglobins S and C. *PLOS ONE* 8: e60182. doi:10.1371/journal.pone.0060182.
112. Modiano D, L.G., Sirima BS, Simporté J, Verra F et al. (2001) Haemoglobin C protects against clinical *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 414: 305-308. doi:10.1038/35104556.
113. Williams TN, M.T., Wambua S, Alexander ND, Kortok M et al. (2005) Sick cell trait and the risk of *Plasmodium falciparum* malaria and other childhood diseases. *J Infect Dis* 192: 178-186. doi:10.1086/430744.
114. Crompton PD, T.B., Kayentao K, Doumbo S, Ongoiba A et al. (2008) Sick cell trait is associated with a delayed onset of malaria: implications for time-to-event analysis in clinical studies of malaria. *J Infect Dis* 198: 1265-1275. doi:10.1086/592224.
115. Bull PC, L.B., Kortok M, Molyneux CS, Newbold CI et al. (1998) Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. *Nat Med* 4: 358-360. doi:10.1038/nm0398-358.
116. Kinyanjui SM, M.T., Bull PC, Newbold CI, Marsh K (2004) Protection against clinical malaria by heterologous immunoglobulin G antibodies against malaria-

- infected erythrocyte variant surface antigens requires interaction with asymptomatic infections. *J Infect Dis* 190: 1527-1533. doi:10.1086/424675.
117. OMS, W.H.O., *Severe falciparum malaria Communicable Diseases Cluster*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2000. **94 Suppl 1: p. S1-90.**
 118. Marsh, K., J.A. Sherwood, and R.J. Howard, *Parasite-infected-cell-agglutination and indirect immunofluorescence assays for detection of human serum antibodies bound to antigens on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes*. *J Immunol Methods*, 1986. **91(1): p. 107-15.**

10. Annexe

Description des techniques de laboratoire

10.1 Détermination du Taux d'hémoglobine



Figure 12: Analyseur et Microcuvette HemoCue

Source : Photo prise à Kéniéroba

➤ Principe de la méthode

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

➤ Matériel et réactifs

-Appareil analyseur

-Microcuvette HemoCue

-Lancette

-Alcool 70°

-Coton

➤ **Technique**

-cibler un doigt, bien désinfecté avec le tampon d'alcool à 70°;

-piquer en un coup sec avec une lancette ; nettoyer la première goutte de sang, presser le bout du doigt pour avoir une deuxième goutte ;

- Appliquer la microcuvette sur la goutte de sang. La quantité nécessaire est aspirée automatiquement dans la microcuvette par capillarité.

-Après avoir enlevé minutieusement toute trace de sang présente à la surface de la microcuvette, la mettre sur son support et l'insérer ensuite dans le photomètre



Figure 13: Mécanisme de mesure du taux d'Hb par l'appareil HemoCue 201+
Le résultat est exprimé en gramme d'hémoglobine par décilitre de sang (g/dl)

Source : www.hemocue.com

10.2 Détermination du groupe sanguin ABO

Nous avons déterminés le groupe sanguin par l'épreuve de Beth VINCEN

➤ **Principe**

Cette méthode consiste a recherché les antigènes A, B ou D à la surface des globules rouges, par un test d'agglutination utilisant les sérums Anti-A, anti-B et anti-D.

➤ **Matériel et réactifs**

- lame porte objet
- cure-dent
- coton
- alcool 70°
- lancette
- crayon de papier
- Sérums tests, (anticorps) : anti-A (couleur bleu), anti-B (couleur jaune), anti-D (incolore)

➤ **Mode opératoire**

-marquer à l'aide de crayon de papier le numéro d'identification du sujet sur trois lames porte objet en les marquant A, B et D

-cibler un doigt

-nettoyer le doigt avec un tampon d'alcool à 70°

-piquer en un coup sec le bout du doigt par une lancette et nettoyer la première goutte de sang avec le coton sec;

- presser le bout du doigt pour avoir d'autres gouttes et déposer une goutte (de 10µl) de sang sur chacune des trois lames porte objets.

-ajouter :- une goutte (10µl) du sérum anti-A sur la goutte de la lame A

-une goutte (10µl) du sérum anti-B sur la goutte de la lame B

-une goutte (10µl) du sérum anti-D sur la goutte de la lame D ;

-turturer les trois gouttes avec trois cure-dents différents.

➤ **Résultat**

Observer l'agglutination avec les sérums tests :

- sérum anti-A + le sang = agglutination (présence de l'antigène A)
- sérum anti-B + le sang = agglutination (présence de l'antigène B)
- sérum anti-D + le sang = agglutination (présence de l'antigène D) pour le rhésus.

L'absence d'agglutination signifie l'absence d'antigène correspondant.

Ce qui nous permet de déterminer les phénotypes : A +, B+, AB+ , O+, A-,B -, AB-, O- .

10.3 Détermination du type d'Hémoglobine avec le D-10

➤ Principe de la procédure du D-10

Le D-10 Dual Program repose sur le principe de la séparation des analyses par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) par échange d'ions. Les échantillons sont automatiquement dilués dans le système D-10 puis injectés dans la cartouche analytique. Le système D-10 envoie un gradient programmé de tampon de force ionique croissante (il existe 2 solutions de réactif de force ionique différentes, l'une hyper concentrée en ion et l'autre peu concentrée en ion. La machine mélange de façon automatique au fil du temps ces solutions pour obtenir une solution finale de concentration croissante) dans la cartouche ; les molécules d'hémoglobine sont alors séparées en fonction de leur interaction ionique avec le matériau contenu dans la cartouche. Les molécules d'hémoglobine séparées traversent ensuite la cellule à circulation du photomètre filtre où sont mesurés les changements d'absorbance à 415 nm.

Le logiciel D-10 intègre les données brutes recueillies lors de chaque analyse. Un étalonnage à deux niveaux est employé pour déterminer les concentrations des différents types d'Hb recherchés. Un compte-rendu d'analyse et un chromatogramme sont générés pour chaque échantillon. La surface de l'A1c est calculée à l'aide d'un algorithme gaussien exponentiellement modifié (EMG) qui permet d'exclure la surface des pics dus à l'A1c labile et à l'hémoglobine carbamylée de la surface du pic A1c.

➤ Prélèvement et manipulation des échantillons

➤ **. Type d'échantillon**

On utilise le Sang total.

➤ **Précautions relatives au prélèvement des échantillons**

Comme toute substance d'origine humaine les échantillons de sang doivent être manipulés en appliquant les procédures de biosécurité d'usage.

Les échantillons de sang total doivent être recueillis dans un tube sous vide contenant de l'EDTA.

➤ **Conservation des échantillons**

Les échantillons de sang total peuvent être conservés jusqu'à 4 jours entre 2 et 8 °C, et à -4°C si l'échantillon ne peut être traité avant une semaine.

➤ **Préparation des échantillons**

Porter les tubes d'échantillons à température ambiante (entre 15 et 30 °C) avant l'essai. Les échantillons sont stables à température ambiante pendant 1 jour. Aucune préparation particulière des échantillons n'est nécessaire. Il n'est pas nécessaire d'agiter les tubes avant le chargement. Les tubes d'échantillons sont placés dans le portoir à échantillons du D-10 puis mis dans le système D-10. S'assurer que les codes-barres sur les échantillons sont tournés vers l'arrière de l'appareil. Utiliser des adaptateurs spéciaux pour les tubes de 12, 13 et 14 mm de diamètre. Retirer tous les adaptateurs pour les tubes de 16 mm de diamètre. Les tubes dont la hauteur est comprise entre 75 mm et 100 mm peuvent être utilisés. Si l'échantillon se trouve dans un tube de taille ou de type anormal ou si le tube contient moins de 2,0 mL d'échantillon, une prédilution est nécessaire. Pour prédiluer, pipeter 1,5 mL de solution de lavage/dilution dans un microtube de 1,5 mL étiqueté puis ajouter 5 µL de l'échantillon de sang total. Boucher le tube et bien mélanger. Utiliser un adaptateur pour les microtubes de 1,5 mL.

10.4 Détection de la délétion 3.7-kb responsable de l'alpha-thalassémie par PCR

Il s'agit d'une PCR nichée (nested PCR) où le produit de la première PCR est amplifié de nouveau dans une deuxième PCR.

➤ **Matériel et réactifs**

• **Matériel**

- Termocycler
- Micropipette (1000µl, 200µl et 10µl)
- Embout pour micropipette (1000µl, 200µl et 10µl)
- Tube PCR 0.2ml

• **Réactifs**

- Le Tris-HCl, pH 8.5
- KCl
- Betaine (Sigma)
- dNTP (ATP, GTP, TTP, CTP)
- Taq polymerase
- Les Amorces:
 - α2/3.7F = 5'-CCCCTCGCCA AGTCCACC C-3'
 - α2R= 5'-AGACCAGGAAGGGCCGGTG-3'
 - 3.7/20.5R= 5'- AAAGCACTCTAGGGTCCAG CG-3'
 - A3.7F= 5'-CTTTCCCTACCCAGAGCCAGGTT -3'
 - 3.7R1= 5'-CCACTTTCCCTCCTCCATCCC-3'
 - α2R1= 5'-AGGAG GGCCCGTTGGGAGGC-3'

➤ **Procédure**

• **Première amplification**

Il s'agit d'une PCR multiplex visant à amplifier en même temps dans la même réaction, le fragment d'ADN portant la délétion 3.7 et le fragment d'ADN normal sans délétion. Ces deux fragments ont en commun une amorce ($\alpha 2/3.7F$) la seconde amorce étant spécifique pour chaque fragment ($\alpha 2R$ pour le fragment normal et 3.7/20.5R pour le fragment délétère). Il consiste à amplifier approximativement 5ng d'ADN (2.5 μ l d'ADN extrait avec le Qiagen) dans un volume réactionnel de 25 μ l dont la composition est la suivante:

- 20 mmol/L de Tris-HCl pH 8.5
- 50 mmol/L KCl
- 1.5 mmol/L MgCl₂
- 1 mol/L de Betaine
- 0.3 μ mol/l de chaque amorce ($\alpha 2/3.7F$, $\alpha 2R$ et 3.7/20.5R)
- 0.2mmol/L de chaque dNTP
- 1.25 unité de platinum Taq polymerase (Invitrogen)

• **Deuxième amplification**

Chaque produit de première amplification est amplifié deux fois dans deux tubes de PCR différents.

Dans le tube de PCR N°1, les amorces spécifique pour le fragment normal ($\alpha 3.7F$ et $\alpha 2R1$) sont utilisé alors que dans le tube de PCR N°2 sont introduites les amorces spécifiques pour les gènes délétères ($\alpha 3.7F$ et 3.7R1).

Dans chaque tube de PCR 1 μ l d'une dilution au 1 /20 est utilisé dans un volume réactionnel de 25 μ l de même composition que dans la première amplification.

Le programme utilisé pour l'amplification est le suivant :

Il est le même pour la première et la deuxième amplification.

- Dénaturation initiale : 95°C pendant 5 minutes

Suivit de 35 cycle de :

- Dénaturation : 97°C pendant 45 secondes

- Renaturation : 60°C pendant 1 minute et 15 secondes

- Extension : 72°C pendant 2 minutes et 30 secondes

Une extension Final à 72°C pendant 5 minutes

➤ **Migration du produit de PCR**

On utilise un gel d'agarose à 2% auquel est incorporé du bromure d'éthidium (~ 3µg/100ml) dans TBE 0.5X. La migration se fait à 200 volts pendant 30 minutes et la révélation est faite à la lumière UV.

➤ **Interprétation**

Présence d'une bande de 2 kb dans le tube N° 1 signifie que le sujet possède le gène Normal.

Présence d'une bande de 1.8 kb dans le tube N° 2 signifie que le sujet possède le gène délétère. Trois scénarios sont possibles :

1- Le sujet est Normal : On observe la présence d'une bande de 2 kb dans le tube N° 1 et l'absence de bande dans le tube N° 2

2- Le sujet est α -thalassémique hétérozygote : On observe la présence d'une bande de 2 kb dans le tube N° 1 et aussi la présence d'une bande de 1.8kb dans le tube N° 2

3- Le sujet est α -thalassémique homozygote : On observe la présence d'une bande de 1.8 kb dans le tube N° 2 et l'absence de bande dans le tube N° 1

11. Fiche signalétique

Nom : HALILOU IDI

Prénom : Maimouna

Section : Pharmacie

Titre : Année Universitaire : 2013-2014

Pays d'origine : Niger

Ville de soutenance : Bamako, Mali

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la Faculté de Pharmacie de Bamako

Résumé :

Les anticorps acquis naturellement contre les antigènes de *P. falciparum* présents à la surface des globules rouges infectés ont été impliqués dans l'immunité antipaludique. Pour reproduire le développement de cette immunité, nous avons étudié une cohorte d'enfants vivant dans la zone de transmission intense saisonnière du paludisme dans le village de Kéniéroba, dans la commune rurale de Bancoumana au Mali.

Nous avons recueilli le plasma à partir d'une sous-cohorte de 176 enfants âgés de 3 à 11 ans, avant (au mois de mai) et après (au mois de décembre) la saison de transmission 2009. Pour mesurer l'effet du type d'hémoglobine (Hb) sur les réponses d'anticorps, nous avons appariés les enfants selon l'âge et le type d'Hb (HbAA, HbAS et HbAC). Pour quantifier la reconnaissance par les anticorps des globules rouges infectés (GRi), nous avons conçu un test à cytométrie de flux à haut débit afin de tester rapidement de nombreux échantillons de plasma contre plusieurs souches de parasites. Nous avons évalué la réactivité des anticorps de chaque échantillon de plasma contre 3 lignes de parasites adaptées au laboratoire (FCR3, D10, et PC26) et quatre isolats de parasites cultivés à court terme (2 maliens et 2 cambodgiens). Quarante-huit pour cent (97%) des enfants ont reconnus au moins une souche parasitaire et la proportion de répondeurs IgG a considérablement augmenté au cours de la saison de

transmission contre la plupart des souches parasitaires. Les anticorps IgG spécifiques à la fois des souches et de descendants de souches ont été détectés, et varient selon l'âge, le type d'Hb et les souches de parasite. En outre, l'intensité des réponses IgG contre les souches de parasite augmentait avec l'âge chez les enfants ayant l'hémoglobine normale (HbAA), mais pas chez les enfants ayant l'hémoglobine anormale (HbAS ou HbAC).

Notre étude a détecté à la fois des anticorps IgG spécifiques de souches et de descendants de souches contre les érythrocytes infectés par *P. falciparum*. L'ampleur et l'étendue de la réponse anticorps variaient non seulement selon l'âge, mais aussi selon le type Hb et la souche du parasite utilisée. Ces résultats indiquent que les études sur l'immunité humorale acquise devraient prendre en compte le type Hb et tester un grand nombre de diverses souches de parasites.

Mots clés : Paludisme, Anticorps, hémoglobine, Souches *P. falciparum*, Mali

Summary

Effects of age, types of hemoglobin and parasite strains on the immune response IgG against malaria in children living in Kéniéroba, Bancoumana, Mali

Naturally-acquired antibody responses to antigens on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells (iRBCs) have been implicated in antimalarial immunity. To profile the development of this immunity, we have been studying a cohort of Malian children living in an area with intense seasonal malaria transmission.

We collected plasma from a sub-cohort of 176 Malian children aged 3-11 years, before (May) and after (December) the 2009 transmission season. To measure the effect of hemoglobin (Hb) type on antibody responses, we enrolled age-matched HbAA, HbAS and HbAC children. To quantify antibody recognition of iRBCs, we designed a high-throughput flow cytometry assay to rapidly test numerous plasma samples against multiple parasite strains. We evaluated antibody reactivity of each plasma sample to 3 laboratory-adapted parasite lines (FCR3, D10, PC26) and 4 short-term-cultured parasite isolates (2 Malian and 2 Cambodian). 97% of children recognized ≥ 1 parasite strain and the proportion of IgG responders increased significantly during the transmission season for most parasite strains. Both strain-specific and strain-transcending IgG responses were detected, and varied by age, Hb type and parasite strain. In addition, the breadth of IgG responses to parasite strains increased with age in HbAA, but not in HbAS or HbAC, children.

Our assay detects both strain-specific and strain-transcending IgG responses to iRBCs. The magnitude and breadth of these responses varied not only by age, but also by Hb type and parasite strain used. These findings indicate that studies of acquired humoral immunity should account for Hb type and test large numbers of diverse parasite strains.

Key words: Malaria, Antibodies, Hemoglobin, *P. falciparum* strains, Mali

Serment de Galien

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

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

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

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

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

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses !

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Je le jure!