

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique

République du Mali
Un Peuple- Un But- Une Foi



Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako
Faculté de Pharmacie



U.S.T.T-B

Année universitaire 2022-2023



N° :

Titre de la Thèse

**Réactivité croisée de la protéine *rPvs48/45* de
Plasmodium vivax avec les sérums des individus
vivant dans les zones endémiques à *Plasmodium
falciparum* en Afrique**

Présentée et soutenue publiquement le 29/07/2023 devant la Faculté de
Pharmacie

Par M. Karamoko TANGARA

Pour l'obtention du titre de Docteur en Pharmacie
(Diplôme d'Etat)

Jury

Président :	M. Sory Ibrahim	DIAWARA	Maître de Recherche
Membres :	M. Souleymane	DAMA	Maître de Conférences
	M. Issa	DIARRA	Chargé de Recherche
Co-Directeur :	M. Saidou	BALAM	Maître-Assistant
Directeur :	M. Mahamadou	DIAKITE	Professeur Titulaire

Dédicace

Je dédie ce travail

A mon défunt père, feu Issa TANGARA

Le souhait de tout parent étant de voir son enfant réussir, cher père, aujourd'hui ce jour ci, j'aurai aimé que tu sois présent, oui aux côtés de ta famille pour vivre cette victoire qui n'est autre que la tienne, mais la volonté divine l'a décidé autrement. Par cet écrit, je voudrais une fois de plus témoigner de ta gratitude, de tes sacrifices, de tes conseils, amour et soutien pour ta famille. Tu resteras une référence et une fierté pour nous. Puisse ton âme reposée en paix, amine.

A ma mère, Djénéba COULIBALY

Si une mère est censée protéger ses enfants, alors nous ne pouvons que nous réjouir de t'avoir comme mère, nous te sommes redevables pour tous les sacrifices dans le but de protéger tes enfants que nous sommes. Ta présence constante, ta bravoure, tes soutiens et bénédictions indéfectibles font de toi une mère exceptionnelle. Merci. Qu'Allah te donne une longue vie et te récompense de la plus belle des manières, amine.

Remerciements

A mon frère et à ma sœur, Ibrahim et Rokiatou TANGARA

Merci pour le soutien, l'amour et l'affection apporté, ce travail est aussi le vôtre.

Que Dieu bénisse notre fraternité et la perdure à vie.

A ma tante, feu Makono TANGARA

Merci de nous avoir reconnue et soutenue comme tes propres enfants. Que ton âme repose en paix, amine.

A mes oncles et tontons, Sériba A COULIBALY, Yacouba TANGARA, Ibrahima TANGARA, Moussa TANGARA, Bakary A COULIBALY, Safounè COULIBALY, Seydou DEMBELE, Abdel Kader DIAWARA, Issouf SACKO.

La disponibilité et les enseignements prodigués.

A mes tantes, Fatoumata COULIBALY, Assan SISSOKO, Awa DIOUF, Aminata DIALLO, Sitan COULIBALY, Bérénice DEMBELE, Assetou SISSOKO.

Pour le soutien.

A ma grande mère, Korotimi KONE

Pour les multiples bénédictions.

A mes cousins et cousines, M. Dramane TANGARA, M. Assimi TANGARA, M. Aboubacar S DIAWARA, M. Sega DIAWARA, M. Waly DIAWARA, M. Mohamed COULIBALY, Mlle. Kadiatou TANGARA, Mlle. Aminata TANGARA, Mme. Aissata DIAWARA, Mme. Fatoumata DIAWARA, Mme. Zeinab COULIBALY,

Pour les accompagnements

A mes camarades, M. Ousmane KOUMERE, M. Amadou KOROKOSSE, M. Mahamadoun CISSE, M. Boubacar S TOURE, Dr Alou DIARRA, Dr Tièkoro COULIBALY, M. Sékou Ag OYE, M. Lassine CAMARA, M. Baboye WANE, M. Djibril Diallo, Dr Aboubacar TENINTAO, Dr Emmanuel L DRABO, M. Sidi H DIOP, M. Housseyni SERRY.

Pour le soutien. Que DIEU fortifie nos liens.

A mes amis et compagnons, Dr Mariam COULIBALY, M. Thierno KEBE, M. Oumar KEBE, Feu Mohamed KALOGA, M. Hamed I HAIDARA, Feu Bakary KEBE, M. El hadji G KONATE, M. Moussa S KONE, M. Ibrahima CISSE.

Pour les accompagnements.

Au Pr Mahamadou Diakité

De nous avoir accepté dans son unité pour réaliser ce travail. Vos encouragements et soutiens ne nous n'ont jamais fait défaut. Nous avons beaucoup apprécié votre exemplarité durant tout au long de ce travail. Que Dieu vous en récompense.

Aux Drs Saidou Balam, Drissa Konaté, Abdouramane Traoré et Salimata Kanté

Pour vos soutiens, disponibilités et accompagnements durant ce travail. Que Dieu vous accompagne dans tout ce que vous faites et vous donne une longue vie.

Merci de nous avoir permis de vivre cette expérience de recherche avec vous, pour le soutien, l'accompagnement et les connaissances acquises tout au long de ce travail.

Aux personnels de l'unité immunogénétique et parasitologie de l'ICER Mali

Pr Seidina A.S. DIAKITE, Dr Drissa KONATE, Pr Sory I. DIAWARA, Dr Karim TRAORE, Dr Agnès GUINDO, Dr Bourama KEITA, Dr Mory DOUMBOUYA, Dr Ibrahim SANOGO, Dr Oumou COULIBALY, Dr Fatoumata KASSE, Dr Larissa DENOU, Dr Salimata KANTE, Dr KONATE Assitan DEMBELE, Dr Kadidiatou KONE, Dr Job KONE, Dr Abdouramane TRAORE, Dr Abdourhamane CISSE, Dr Mohamedou KATHRY, Dr Aboubacar FOMBA, Dr Salim KANTE, Dr Djénébou DIALLO, M. Issoufi Y MAIGA, M. Mohamed TRAORE, M. Dramane SOGODOGO, Dr Mariam SIDIBE, M. MATHIAS KAMATE, M. ISSA TRAORE, M. Ousmane BERTHE, Mme Rahmatoullah YENA, Mlle KOROTOUMOU MALLE. Recevez ici le témoignage de votre persévérance, courage, expertise et expérience qui ont permis à ce travail d'y voir le jour. Nous vous en sommes reconnaissants, merci.

A tout le personnel de la pharmacie TENEMAN

Principalement à la Promotrice Dr Guindo Aissata DEMBELE, chère tante, merci de m'avoir accepté au sein de votre entreprise, soutenue et facilité l'apprentissage tout au long de mon parcours.

A tout le personnel de la FMOS/FAPH, merci pour l'enseignement offerts.

A tous les éléments de la 13ème promotion du numéris clausus, section pharmacie « Promotion Pr Mamadou KOUMARE ».

A tout le personnel du Centre de Recherche et de Formation sur le Paludisme (MRTC).

A tous ceux qui de près ou de loin m'ont soutenu et aidé, merci à tous.

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

A notre Maître et président du jury

Pr Sory Ibrahim DIAWARA

- **Médecin chercheur**
- **Maître de Recherche en Epidémiologie à la Faculté de Médecine et d'Odonto-Stomatologie/USTTB**
- **Chercheur au Centre International d'Excellence en Recherche (ICER-Mali) de l'Université des Sciences, des Techniques et des technologies de Bamako**

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury. Votre désir de vouloir toujours l'excellence, votre rigueur dans le travail, Votre souci constant d'assurer la formation de qualité des étudiants, votre simplicité et votre disponibilité sont des valeurs qui font de vous un grand homme de science apprécié de tous.

Cher Maître, veuillez recevoir en toute modestie, le témoignage de notre sincère reconnaissance et de notre profonde estime.

A notre Maître et juge

Pr Souleymane DAMA

- **Maître de conférences de Parasitologie-Mycologie à la Faculté de Pharmacie**
- **PhD en parasitologie ISFRA/USTTB**
- **Spécialiste en Parasitologie préclinique et clinique**
- **Chercheur au MRTC Parasitologie**

Cher Maître, Nous avons beaucoup apprécié la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail. Cela démontre l'intérêt que vous portez non seulement à ce travail mais aussi votre souci constant dans l'encadrement des étudiants. Votre simplicité et votre générosité nous ont beaucoup marqué tout au long de ce travail.

En espérant que par ce travail nous avons comblé vos attentes, veuillez recevoir cher Maître, l'expression de notre profonde gratitude.

A nôtre Maître et juge

Dr Issa DIARRA

- **Docteur en Pharmacie**
- **Chargé de recherche à la Faculté de Pharmacie**
- **Certificat d'Etude Spéciales de Parasitologie-Mycologie**
- **Master en Immunologie et Infection**
- **PhD en Maladies Infectieuses au Aix Marseille Université**
- **Chef d'Unité de Parasitologie au Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée (LBMA) de l'USTTB.**

Cher Maître, c'est un privilège que vous nous accordez en acceptant de juger ce travail. Nous avons apprécié vos qualités humaines et scientifiques. Votre amour pour le travail bien fait nous ont beaucoup impressionnés. Merci pour vos corrections et suggestions très utiles qui ont permis d'améliorer notre travail.

Trouvez ici l'expression de nos sincères remerciements.

A notre Maître et co-directeur

Dr Saidou BALAM

- **Docteur en Médecine**
- **PhD en Immunologie à l'Université de Lausanne en Suisse**
- **Maître-Assistant en Immunologie à la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie / USTTB.**

Tout au long de ce travail, nous avons apprécié vos qualités humaines et scientifiques. Votre désir de recherche continuel nous a beaucoup impressionné. Votre disponibilité constante, votre rigueur dans le travail, votre générosité et votre amour pour le travail bien fait font de vous un Maître responsable.

Permettez-nous cher Maître de vous adresser l'expression de notre profonde gratitude et de nos sincères remerciements.

A notre Maître et directeur de thèse

Pr Mahamadou DIAKITE

- **Professeur titulaire d'Immunologie et de Génétique à la Faculté de Pharmacie**
- **Vice-recteur de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologie de Bamako (USTTB)**
- **Responsable de l'Unité d'Immunogénétique et de Parasitologie de l'ICER-Mali**
- **Directeur Scientifique Adjoint du Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC)**
- **Secrétaire permanent du Comité d'Ethique de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologie de Bamako (USTTB).**

Vous nous avez fait un immense honneur en nous acceptant dans votre équipe de recherche. Nous avons été très séduits par votre conviction pour la recherche, vos grandes qualités scientifiques et humaines, vos enseignements et surtout votre sens élevé de la responsabilité et de la rigueur dans le travail. Par ce travail, nous espérons être à la hauteur de vos attentes.

Cher Maître veuillez recevoir en toute modestie, l'expression de notre immense gratitude. Que le Tout Puissant vous protège.

Table des matières

1. Introduction.....	1
2. Objectifs	3
2.1. Objectif général	3
2.2. Objectifs spécifiques	3
3. Généralités sur le paludisme	4
3.1. Définition du paludisme.....	4
3.2. Epidémiologie du paludisme.....	4
3.3. Vecteurs du paludisme	7
3.4. Agents pathogènes du paludisme	7
3.5. Cycle biologique du <i>Plasmodium</i> (figure 1).....	9
3.5.1. Cycle chez l'anophèle (phase sexuée)	10
3.5.2. Cycle chez l'Homme (phase asexuée).....	10
3.6. Physiopathologie du paludisme	12
3.7. Immunité antipalustre	13
3.7.1. Immunité naturelle ou innée.....	13
3.7.2. Immunité adaptative ou acquise	14
3.7.3. Antigènes candidats vaccins	16
3.7.4. Vaccins au stade sexué du développement du <i>Plasmodium</i>	17
3.8. Diagnostic biologique	19
3.9. Prévention et prise en charge du paludisme	19
4. Méthodologie	21
4.1. Cadre et site d'étude	21
4.2. Type d'étude et collecte des échantillons.....	21
4.3. Analyse d'homologie des séquences entre <i>Pvs48/45</i> et <i>Pfs48/45</i>	21
4.4. Technique de laboratoire utilisée (Test d'ELISA Indirect)	23
4.5. Considérations éthiques.....	24

4.6. Gestion et analyse des données	24
4.7. Déroulement de l'étude	24
5. Résultats	26
5.1. Résultats globaux	26
5.2. Résultats descriptifs et analytiques	27
6. Commentaires et discussion	35
7. Limites de l'étude	38
8. Conclusion et recommandations	39
8.1. Conclusion	39
8.2. Recommandations	39
9. Références	40
10. Annexes	46
11. Fiche signalétique	48
Serment de Gallien	50

Liste des figures

Figure 1. Cycle de développement du Plasmodium (Source : [55]).....	12
Figure 2. Homologie de séquence entre les protéines <i>Pvs48/45</i> et <i>Pfs48/45</i>	22
Figure 3. Proportion de séroréactivité à l'antigène rPvs48/45 dans des échantillons provenant des quatre pays africains où <i>P. falciparum</i> est endémique.....	28
Figure 4. Titre médian d'anticorps anti-rPvs48/45 dans les échantillons provenant des quatre pays d'Afrique où <i>P. falciparum</i> est endémique	29
Figure 5. Proportion de la séroréactivité à l'antigène rPvs48/45 selon les groupes d'âge dans les échantillons provenant du Mali et de Tanzanie	30
Figure 6. Titre médian d'anticorps anti-rPvs48/45 selon les groupes d'âge dans les échantillons provenant du Mali et de Tanzanie.....	31
Figure 7. Proportion de la séroréactivité à rPvs48/45 selon le sexe dans les échantillons provenant du Mali	32
Figure 8. Titre médian d'anticorps anti-rPvs48/45 dans les échantillons provenant du Mali selon le sexe	33
Figure 9. Réactivité des différentes fractions d'anticorps purifiés et spécifiques pour rPvs48/45 dans un pool de sérum de Tanzanie	34

Liste des tableaux

Tableau 1. Répartition des participants selon le pays d'origine des échantillons 27

Sigles et abréviations

ADCI	<i>Antibody Dependant Cellular Inhibition</i> (inhibition cellulaire dépendante des anticorps)
AL	Artéméther-Luméfantrine
AMA-1	Antigène-1 de la membrane Apicale du Mérozoïte
An.	<i>Anophèles</i>
BF	Burkina Faso
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> (agrégat de Différenciation)
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPS	Chimioprévention du Paludisme Saisonnier
CR1	<i>Complement Receptor 1</i> (Récepteur-1 du complément)
CSA	<i>Chondroitin Sulfate A</i> (sulfate de chondroïtine A)
CSP	Protéine à la surface du sporozoïte
CTA	Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine
DC	Cellule dendritique
DO	Densité Optique
EBA175	Antigène-175 d'adhésion érythrocytaire
EDM	<i>Electron-Dense-Materials</i> (Matériaux denses aux électrons)
EDTD	Ethylène-Diamine-Tétra-Acétique
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay</i> (Technique d'Immuno-enzymatique)
FAPH	Faculté de Pharmacie
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> (Antigènes leucocytaires Humains)
HRP	Peroxydase de Raifort
HRP-2	Histidine riche protéine 2 (Protéine 2 riche en histidine)
ICAM-1	<i>Inter Cellular Adhesion Molecule-1</i> (Molécule-1 d'adhésion intercellulaire)
IFAT	Test anticorps d'immunofluorescence indirecte
IFN- γ	Interféron gamma
IG	Indice Gamétocytaire
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine

IS	Indice Splénique
IP	Indice Plasmodique
KAHRP	<i>Knob-Associated Histidin-Rich Protein</i> (Protéine riche en histidine associée aux protubérances)
LASUTH	<i>Lagos State University Teaching Hospital</i>
MSP1	Protéine-1 à la surface du mérozoïte
MSP2	Protéine-2 à la surface du mérozoïte
NK	<i>Natural Killer</i> (cellule tueuse naturelle)
NO	Monoxyde d'Azote
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampon phosphate saline)
PECAM	<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule</i> (Molécule d'adhésion endothéliales des plaquettes)
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PfEMP1	<i>Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protéine-1</i> (Protéine-1 membranaire de <i>Plasmodium falciparum</i> à la surface de l'érythrocyte)
PNLP	Programme National de Lutte contre le Paludisme
<i>Pv</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
RESA	<i>Ring Erythrocyte Surface Antigen</i> (Antigène de surface des érythrocytes en anneau)
TDR	Test de Diagnostic Rapide
TIE	Taux D'inoculation Entomologique
TNF-ALPHA	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Facteur Nécrosant Tissulaire)
TPI	Traitement Préventif Intermittent
TRL	<i>Toll-Like Receptor</i> (Récepteur de type Toll)
TZ	Tanzanie
USTTB	Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesing Molecular1</i> (Molécule-1 d'adhésion des cellules vasculaires)

1. Introduction

Le paludisme est une maladie parasitaire dû à des espèces de *Plasmodium* (*P*) dont les plus courantes en pathologie humaine sont *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale curtisi*, *P. ovale wallikeri*, *P. knowlesi* et *P. cynomolgi* [1]. Il reste toujours une priorité de santé publique malgré la réduction de sa charge dans ces deux dernières décennies [2]. *P. falciparum* et *P. vivax* sont responsables, ensemble, de plus de 90% des cas de paludisme recensés dans le monde. Ces deux espèces sont endémiques dans les régions d'Asie et d'Amérique où *P. vivax* représente 74% des cas de paludisme, et en Afrique où *P. falciparum* est à l'origine de 99% des cas cliniques [3].

L'évolution stable voire une légère hausse des cas du paludisme dans certaines régions dans ces dernières années, constituent des obstacles majeurs dans l'effort d'élimination du paludisme [4]. Ces obstacles ont incité à redoubler d'efforts pour mettre au point de nouveaux outils et stratégies visant à renforcer l'élimination du paludisme, notamment le développement de vaccins. Le vaccin RTS/S basé sur la protéine à la surface du sporozoïte (CSP) est le premier vaccin antipaludique recommandé par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) chez les enfants dans les zones de transmission modérée à intense de *P. falciparum* d'Afrique subsaharienne. Cependant, le vaccin RTS/S ne présente qu'une efficacité de 39% contre le paludisme clinique modéré et 29% contre le paludisme grave [5]. D'autres candidats vaccins contre *P. falciparum* comme le vaccin R21 (basé sur le même antigène) et le vaccin Pf-SPZ (basé sur des parasites entiers cryoconservés) se sont révélés sûrs et très immunogènes avec une efficacité prometteuse contre le paludisme [6-8].

Bien que la recherche sur le vaccin contre *P. vivax* accuse un retard par rapport à *P. falciparum*, des candidats vaccins sont également en phases précliniques et cliniques comme la protéine à la surface du sporozoïte du stade pré-érythrocytaire (CS) de *P. vivax* [9-11]. Parallèlement, d'autres antigènes exprimés au stade sexué du parasite comme *Pvs48/45*, *Pvs25* et *Pvs230* [12-17] et au stade asexué contenant des motifs en spirale [18, 19] figurent parmi les candidats vaccins les plus prometteurs [18, 20-22]. *Pvs48/45* est une protéine orthologue de *P. falciparum* dont les gènes sont hautement conservés et présentent une homologie de séquence globale de 56% entre

P. falciparum et *P. vivax* [23-25]. En outre, le faible polymorphisme génétique ne semble pas influencer sa structure tertiaire ou son antigénicité [26].

Des études récentes ont démontré que des sérums provenant des zones endémiques palustres à *P. vivax* ou à *P. falciparum* présentent une reconnaissance élevée de la protéine *Pvs48/45* [27]. En plus, il a été observé que les souris immunisées avec *Pvs48/45* présentaient une forte réactivité croisée avec le *Pfs48/45* montrant ainsi que les deux antigènes sont capables de se stimuler mutuellement dans l'induction de la réponse immunitaire [23-25, 28, 29]. Cette étude a été initiée pour évaluer la réactivité de l'antigène *rPvs48/45* (protéine recombinante de *Pvs48/45*) avec les sérums provenant des zones endémiques à *P. falciparum* d'Afrique. Les résultats de cette étude contribueront à renforcer les efforts du développement de potentiels candidats vaccins, surtout un vaccin multi-espèces contre les deux espèces plasmodiales les plus répandues au monde.

2. Objectifs

2.1. Objectif général

Evaluer la réactivité croisée de la protéine *rPvs48/45* avec les sérums des individus vivant dans des zones d'endémie palustre à *P. falciparum* en Afrique.

2.2. Objectifs spécifiques

- Déterminer la réactivité croisée de la protéine *rPvs48/45* avec les sérums des individus naturellement exposés à *P. falciparum* en Afrique ;
- Comparer le titre médian d'anticorps anti-*rPvs48/45* dans les sérums provenant du Mali et de la Tanzanie en fonction des groupes d'âge et du sexe ; et
- Analyser l'homologie de séquence entre la protéine *Pvs48/45* de *P. vivax* avec son orthologue *Pfs48/45* de *P. falciparum*.

3. Généralités sur le paludisme

3.1. Définition du paludisme

Le paludisme est une érythrocytopathie fébrile et hémolysante, causée par un hématozoaire du genre *Plasmodium*, transmis à l'homme par la piqure infectante du moustique femelle du genre *Anopheles* [30].

3.2. Epidémiologie du paludisme

L'organisation mondiale de la santé (OMS) dans son rapport 2022 sur le paludisme, a estimé à 247 millions le nombre des cas de paludisme dont 619 000 décès à travers le monde [31]. La région Africaine de l'OMS continue de supporter une part importante et disproportionnée de la charge du paludisme. Plus de 95% de ces cas et décès sont recensés en Afrique, et particulièrement chez les enfants de moins de 5 ans. Les perturbations liées à la COVID-19 ont entraîné environ 13 millions de cas de paludisme supplémentaires et 63 000 décès dû au paludisme [31]. Bien qu'un recul de l'incidence du paludisme a été observé à partir des années 2000, mais un ralentissement voire une petite augmentation du nombre de cas du paludisme a été constaté depuis 2015 [32].

Quatre pays de la région Africaine ont enregistré près de la moitié des cas à l'échelle de la planète en 2021 : le Nigéria (26,6%), la République démocratique du Congo (12,3%), l'Ouganda (5,1%) et le Mozambique (4,1%). En 2021, l'Arabie saoudite n'a rapporté aucun cas de paludisme indigène pour la première fois, alors que pour la quatrième année consécutive, la République Islamique d'Iran n'a signalé aucun cas de paludisme indigène. Les derniers cas de paludisme indigène rapportés par le Maroc et la République arabe Syrienne remontent en 2004, pour l'Irak en 2008 et pour l'Oman en 2007. A l'exception de la Djibouti, du Soudan et du Yémen, tous les pays de la région n'ont rapporté aucun cas de décès dû au paludisme en 2021 [33].

Le paludisme est répandu dans les régions tropicales et subtropicales, notamment en Afrique subsaharienne, en Pacifique, et en Asie. Sept espèces sont responsables de la maladie chez l'homme : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale curtisi*, *P. ovale wallikeri*, *P. malariae*, *P. knowlesi*, *P. cynomolgi* [34]. *P. falciparum* est le parasite provoquant le plus de décès et c'est aussi le plus répandu sur le continent africain. *P. vivax* est

l'espèce dominante dans la plupart des pays en dehors de l'Afrique subsaharienne [35].

La région Africaine de l'OMS couvre 95 % de tous les cas de paludisme (234 millions de cas) en 2021. La région Asie du Sud-est comptait neuf pays endémiques qui ont enregistré près de 2 % de la charge du paludisme dans le monde en 2020. La plupart des cas dans la région se sont concentrés en Inde (79 %). De 2000 à 2021, le nombre total de cas de paludisme a diminué de 76 %, passant de 22,8 millions à 5,4 millions dans la région. En 2021, la région Méditerranée orientale couvrait 2,5 % des cas de paludisme à l'échelle de la planète. Le Soudan a enregistré à lui seul 54% des cas de paludisme de la région, suivi par l'Afghanistan, le Djibouti, le Pakistan, la Somalie et le Yémen [33]. Près d'un quart des cas en 2019 étaient dû à *P. vivax*, principalement en Afghanistan et au Pakistan [32]. Dans la région Pacifique occidental, le nombre total de cas de paludisme a diminué de 49 %, passant de 2,8 millions en 2000 à 1,4 million en 2021.

En 2021, la Chine a été déclarée par l'OMS exempte de paludisme alors que la Malaisie n'a enregistré aucun cas de paludisme chez l'homme pour la quatrième année consécutive. La région d'Amérique a couvert 0,2 % des cas de paludisme à l'échelle de la planète, selon les estimations en 2021. De 2019 à 2021, certains pays ont enregistré une baisse significative de leur nombre de cas de paludisme, notamment le Venezuela (-263 000), le Pérou (-22 000), le Brésil (-17 000) et la Colombie (-17 000) [33]. La distribution du paludisme est extrêmement variable d'une zone géographique à une autre. Elle est sous la dépendance de plusieurs facteurs liés au vecteur, à l'hôte, au parasite et à l'environnement [36]. L'indice de stabilité déterminé par Mac Donald permet de classer l'enracinement du paludisme en deux zones :

- les zones de paludisme stable ou endémique : la transmission du paludisme est longue et intense entraînant une prémunition permettant de limiter les manifestations cliniques graves chez les jeunes enfants âgés ;
- les zones de paludisme instable ou épidémique : la transmission du paludisme est très courte et le paludisme sévit sous forme épidémique. Ce caractère épisodique de la transmission ne permet pas le développement de la prémunition. Tous les individus quel que soit l'âge sont à risque de développer la maladie [37].

Dans une population donnée, les indices paludométriques qui permettent de déterminer l'endémicité du paludisme sont :

- ❖ **l'Indice Splénique (IS)** : c'est le pourcentage des enfants âgés de 2-9 ans présentant une rate palpable à l'examen clinique dans une population examinée.
- ❖ **l'Indice Plasmodique (IP)** : c'est le pourcentage des enfants âgés de 2-9 ans dont les frottis sanguins relèvent la présence de formes asexués d'hématozoaires du paludisme dans une population examinée.
- ❖ **l'Indice Gamétocytaire (IG)** : c'est le pourcentage de personnes dans une population examinée présentant les formes sexuées du *Plasmodium*.
- ❖ **le Taux d'Inoculation Entomologique (TIE)** : c'est le nombre de piqûres infectantes que reçoit une personne pendant un intervalle de temps donné. C'est le produit de l'agressivité des moustiques par l'indice sporozoïtique et est directement corrélé à l'intensité de la transmission.

Ces indices permettent de classer les zones en termes d'endémicité du paludisme. Ils ont permis de définir 4 zones selon le niveau de transmission du paludisme [38].

- **Zone hypoendémique** : l'IS est compris entre 0 et 10% ou l'IP < 25%. Dans cette zone, l'état de prémunition de la population est faible et le risque d'épidémie est élevé selon les conditions climatiques. Le paludisme est instable et toute la population est exposée au même risque du paludisme sévère ou compliqué.
- **Zone mésoendémique** : l'IS est compris entre 11 et 50% ou l'IP entre 26 et 50%. Dans cette zone, l'état de prémunition de la population est faible. Le risque épidémique existe. Des cas d'accès perniciose sont observés chez les adultes jeunes.
- **Zone hyperendémique** : l'IS est compris entre 51 et 75%, l'IP entre 51 et 75%. L'état de prémunition a atteint son maximum. C'est une zone sans risque épidémique. Mais il existe un risque important de paludisme grave et compliqué pour les enfants de moins de 5 ans et les patients provenant de zones non-paludéennes. Le taux de mortalité infantile liée au paludisme reste élevé. Les accès palustres peuvent évoluer en paludisme grave.

- **Zone holoendémique** : l'IS et l'IP sont tous supérieurs à 75%. Il s'agit des zones de barrages. L'état de prémunition est solide. Le risque épidémique est quasiment nul. Cependant, il existe un risque important de paludisme grave et compliqué pour les patients neufs, la morbidité et la mortalité infantile liée au paludisme restent notoires.

Au Mali, le risque de transmission du paludisme a été faite sur la base du cadre pour l'élimination du paludisme de l'OMS de 2017, les données d'indice ajustée des districts sanitaires et des aires de santé ont été utilisées. L'intensité de transmission du paludisme a ainsi été stratifiée comme suit (source PNLP) :

- **zone de très faible transmission** : l'incidence ajustée aux taux de test diagnostic et de fréquentation inférieure à 100 cas pour 1000 personnes-année ;
- **zone de faible transmission** : l'incidence ajustée aux taux de test diagnostic et de fréquentation entre 100 et 250 cas pour 1000 personnes-année ;
- **zone de transmission modérée** : l'incidence ajustée aux taux de test diagnostic et de fréquentation entre 250 et 450 cas pour 1000 personnes-année ;
- **zone de forte transmission** ; l'incidence ajustée aux taux de test diagnostic et de fréquentation supérieure à 450 cas pour 1000 personnes-année.

3.3. Vecteurs du paludisme

La transmission du paludisme est assurée par les moustiques *Culicidea* du genre *Anopheles* dont il existe plus de 400 espèces, seule une cinquantaine est capable de transmettre le paludisme à l'homme. Les vecteurs responsables de la transmission en Afrique sont : *An. gambiae* et *An. funestus* [39]. La distribution de ces vecteurs dépend fortement des variations spatiales et temporelles, *An. funestus* étant abondant pendant la saison froide et sèche, *An. gambiae* pendant la saison des pluies [40, 41]. Seule la femelle hématophage assure la transmission du parasite.

3.4. Agents pathogènes du paludisme

Le *Plasmodium* appartient au Phylum des *Apicomplexa*, à la Classe des *Aconoidasida*, à l'Ordre des *Haemosporida*, à la Famille des *Plasmodiidae* et au Genre

Plasmodium [42]. Il existe de très nombreuses espèces de *Plasmodium* touchant diverses espèces animales, mais les plus retrouvées en pathologie humaine sont [43]:

3.4.1. *Plasmodium falciparum*

P. falciparum est plus largement répandu à travers le monde. Il est responsable de plus de 99% des cas de paludisme en Afrique et est responsable des formes cliniques graves potentiellement mortelles. *P. falciparum* développe plus fréquemment des résistances aux antipaludiques [32]. Il est responsable de la fièvre tierce maligne [36]. Sa transmission se fait pendant toute l'année avec des recrudescences saisonnières. On n'observe pas de rechutes tardives comme avec les autres espèces [44].

3.4.2. *Plasmodium vivax*

C'est la deuxième espèce la plus fréquente après *P. falciparum*. Il est très largement répandu en Amérique du Sud et en Asie, mais beaucoup plus rarement en Afrique (Afrique de l'est et dans les îles de l'océan Indien). Les érythrocytes du groupe sanguin Duffy négatif, observé surtout chez des sujets originaires d'Afrique de l'ouest et centrale, ne possèdent pas le récepteur membranaire habituellement nécessaire à l'infection par *P. vivax* [44, 45]. Sa transmission s'arrête en dessous de 15°C. Sa période d'incubation est comprise entre 11 à 15 jours. On peut observer des accès de reviviscence dues au réveil des formes dormantes, les hypnozoïtes pendant 3 à 4 ans. L'infection par *P. vivax* est classiquement considérée comme bénigne. Dans les zones d'endémie, il peut entraîner des répercussions sur l'état de santé des populations comme l'anémie. Des cas de résistance de *P. vivax* commence à s'observer à la chloroquine [44].

3.4.3. *Plasmodium ovale*

Plasmodium ovale est biologiquement et morphologiquement très semblable à *P. vivax*, il est essentiellement présent en Afrique intertropicale du centre et de l'ouest, et dans certaines régions du Pacifique occidental. Son incubation peut aller de 15 jours à 4 ans. Il provoque une fièvre tierce comme *P. vivax*, et ses manifestations cliniques sont généralement modérées. Les méthodes de la biologie moléculaire ont démontré que *P. ovale* se compose de deux sous-espèces bien distinctes : *P. ovale curtisi* et *P. ovale wallikeri* [46]. Schématiquement, on dit que *P. ovale* remplace *P. vivax* en Afrique

là ou cette dernière espèce n'existe pas. Les deux sous espèces ont une morphologie similaire [47].

3.4.4. *Plasmodium malariae*

Cette espèce sévit dans les pays tropicaux de manière beaucoup plus sporadique. Il se différencie des autres espèces par sa période d'incubation plus longue allant de 15 à 21 jours et des rechutes très tardives jusqu'à 20 ans dont les mécanismes physiopathologiques ne sont pas totalement clairs mais certains évoquent la présence de mérozoïtes latents dans les voies lymphatiques [48]. L'infection par *P. malariae* est bénigne mais il peut parfois entraîner des complications rénales [49].

3.4.5. *Plasmodium knowlesi*

P. knowlesi sévit en Asie du Sud-est particulièrement en Malaisie, à Bornéo, en zone forestière car il est étroitement lié à la répartition des singes macaques, son hôte habituel, et de son vecteur piquant l'homme et le singe. Il est morphologiquement proche de *P. malariae*. Il se différencie des autres espèces par un cycle érythrocytaire de 24 heures responsable d'une fièvre quotidienne. Il existe de rares formes graves, voire mortelles, avec de forte parasitémie. A ce jour, aucune chimiorésistance n'a été observée avec cette espèce [44].

3.4.6. *Plasmodium cynomolgi*

P. cynomolgi fait partie des espèces plasmodiales infectant les singes macaques comme *P. knowlesi* et, est principalement rencontré en Asie du Sud-est. Il possède des caractéristiques biologiques et génétiques proches de *P. vivax* [50]. Récemment, un cas de paludisme causé par *P. cynomolgi* a été signalé à l'est de la Malaisie [51].

3.5. Cycle biologique du *Plasmodium* (figure 1)

Les plasmodies sont des protozoaires ayant un cycle complexe qui se déroule successivement chez l'homme (phase asexuée chez l'hôte l'intermédiaire) et chez l'anophèle (phase sexuée chez l'hôte définitif). La connaissance du cycle du paludisme permet de comprendre les modalités de transmission. Il est transmis par la pique de l'anophèle femelle mais la phase sanguine du cycle rend possible d'autres modes de contamination telles que la transmission congénitale, la transmission transfusionnelle et par greffe d'organe [52].

3.5.1. Cycle chez l'anophèle (phase sexuée)

Au cours d'un repas sanguin chez un individu infecté, l'anophèle femelle ingère des gamétocytes à potentiels sexuels. Ceux-ci vont, dans l'intestin de l'anophèle vont se différencier en gamètes mâles et femelles. Les gamétocytes mâles se différencient en microgamètes (4 à 8) rendus très mobiles par un processus d'exflagellation, tandis que les gamétocytes femelles se différencient en macrogamètes (ovules). La rencontre entre ces gamètes produit un zygote mobile appelé ookinète [53]. Celui-ci pénètre dans la paroi intestinale où il s'implante sous la paroi stomacale en formant l'oocyste. A l'intérieur de cet oocyste (brève phase diploïde) se forment plusieurs sporoblastes, dans lesquels se développent des milliers de sporozoïtes par sporogonie. Ces sporozoïtes haploïdes et mobiles perforent la coque de l'oocyste, puis passent dans l'hémolymphe pour aboutir au niveau des glandes salivaires du moustique où ils vont acquérir leur pouvoir infectieux [54]. Chez le moustique, le cycle se déroule en une quinzaine de jours, selon la température extérieure et l'humidité.

3.5.2. Cycle chez l'Homme (phase asexuée)

La phase humaine du cycle de développement du *Plasmodium* est constituée de deux phases : une phase exo-érythrocytaire et une phase érythrocytaire.

3.5.2.1. Phase exo-érythrocytaire

Cette première phase du cycle chez l'homme se déroule au niveau hépatique. Lors d'une piqûre, l'anophèle femelle portant des sporozoïtes infectieux dans sa salive, les injecte dans un capillaire. En moins d'une demi-heure, ces sporozoïtes migrent rapidement vers le foie via la circulation sanguine, et envahissent les hépatocytes dans lesquels se déroule la phase hépatique. Dans les hépatocytes, les sporozoïtes se développent en trophozoïtes qui subissent une multiplication immédiate (schizogonie hépatique ou exo-érythrocytaire) pour donner des schizontes renfermant des mérozoïtes. A maturité, les schizontes éclatent et libèrent plusieurs mérozoïtes dans la circulation sanguine, capables d'infecter les globules rouges. La phase exo-érythrocytaire est asymptomatique et dure 10 à 15 jours. Cependant, chez certaines espèces plasmodiales (*P. ovale*, *P. vivax*), on retrouve des formes persistantes hépatiques ou hypnozoïtes qui peuvent rester cachées sans se multiplier durant plusieurs mois ou années puis reprendre le cycle plus tard.

3.5.2.2. Phase érythrocytaire

Les mérozoïtes issus de la phase hépatique, présents dans la circulation sanguine, envahissent les globules rouges. Dans ces derniers, les mérozoïtes se développent d'abord en anneau (ring) puis en trophozoïtes. Au cours de ce stade, une intense activité métabolique (approvisionnement en acides aminées, synthèse nucléique et protéique) se développe. Le parasite peut dégrader jusqu'à 75% d'hémoglobine de la cellule hôte pour se nourrir et former le pigment malarique. Au bout d'une trentaine d'heures après l'invasion, le parasite est prêt à commencer sa division nucléaire : c'est la schizogonie érythrocytaire. L'éclatement des schizontes mûrs libère dans le sang des mérozoïtes et des déchets métaboliques (pigments et débris cellulaires pyrogènes responsables des accès de fièvre). Ceci s'accompagne également d'un relargage des antigènes parasitaires dans le sang. Cette nouvelle génération de mérozoïtes réinfecte rapidement les érythrocytes. La phase érythrocytaire qui dure environ 48 heures induit un spectre de symptômes chez l'homme responsable de la morbidité et de la mortalité associés à l'infection.

Après quelques cycles érythrocytaires, des gamétocytes se différencient en gamétocytes mâles et femelles, lesquels ne pourront poursuivre leur évolution que chez le moustique. Ils restent vivants une vingtaine de jours chez l'hôte humain puis disparaissent.

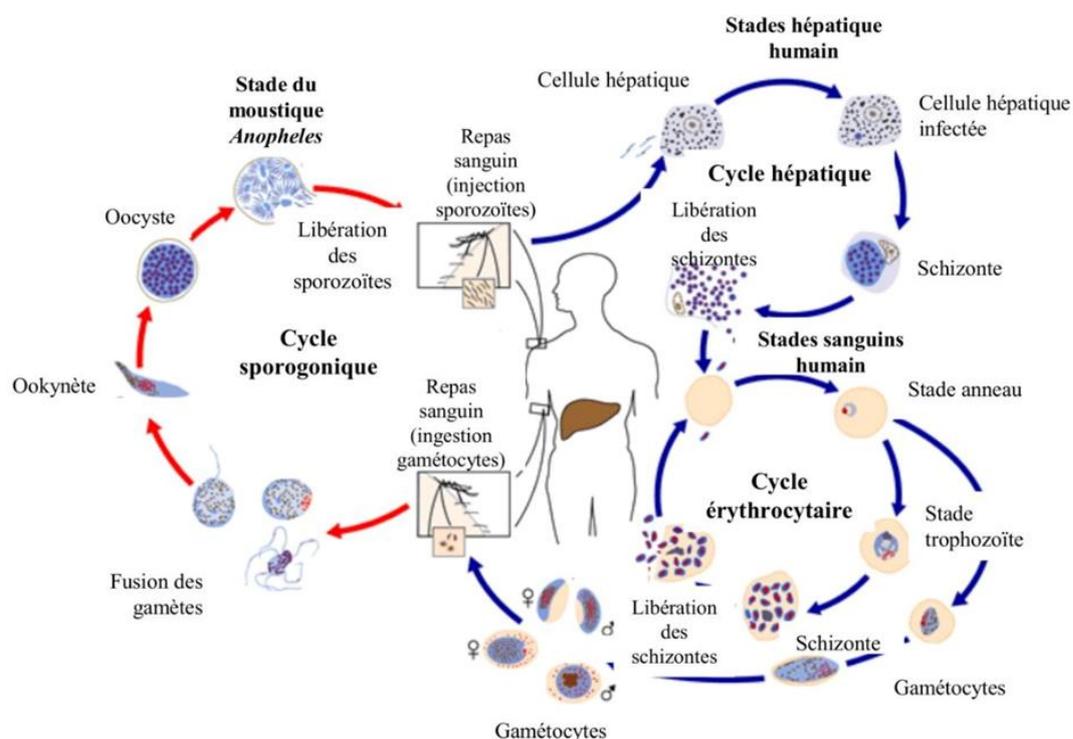


Figure 1. Cycle de développement du *Plasmodium* (Source : [55])

3.6. Physiopathologie du paludisme

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

Les symptômes du paludisme commencent à se prononcer à partir du stade intra-érythrocytaire du cycle de développement du parasite. La fièvre, lors de l'accès simple, survient au moment de la lyse des hématies qui libèrent les mérozoïtes, l'hémozoïne (pigment malarique) et d'autres substances comme le TNF-alpha, l'IL-1 et l'IL-6 [56]. 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-alpha dont le lien avec la fièvre a été le mieux établi [57]. La fièvre n'apparaît que lorsque la parasitémie atteint un seuil critique (seuil pyrogène), variable d'un sujet à l'autre et d'une souche parasitaire à l'autre. La fièvre prend une allure continue ou irrégulière selon la parasitémie. Au cours de l'infection palustre, le système phagocytaire débarrasse l'organisme non seulement des pigments malariques mais aussi des débris érythrocytaires ce qui aboutit à l'hépatosplénomégalie [58].

Le paludisme grave s'observe chez les jeunes enfants, les femmes enceintes, les expatriés provenant de zones non-endémiques palustres [59]. Les concepts physiologiques du paludisme grave font intervenir deux phénomènes interdépendants : la séquestration qui aboutit à une obstruction du microcapillaire par les globules rouges à la suite de l'auto-agglutination, de la formation de rosette « ou rosetting » et de la cytoadhérence ; et le système immunitaire qui implique les réponses à médiation cellulaire et humorale.

3.7. Immunité antipalustre

Dans les zones d'endémie palustre ou la population est quasiment exposée en permanence à des infections plasmodiales, l'hôte (Homme) développe progressivement des réponses immunitaires qui protègent contre les formes cliniques graves avec l'âge.

Les réponses immunitaires sont régulées aussi bien par le système immunitaire non-spécifique dit l'immunité naturelle (ou innée) que par le système immunitaire spécifique ou acquis, tous régulés par des facteurs érythrocytaires (traits drépanocytaire, groupe sanguin Duffy négatif, allèles HLA), le polymorphisme de la réponse immune, les facteurs ethniques et les facteurs environnementaux [60, 61].

3.7.1. Immunité naturelle ou innée

L'immunité innée se mobilise dès le début de l'infection en attendant la mise en place de l'immunité acquise. L'immunité innée est assurée par les cellules phagocytaires, les molécules et les enzymes (lysosomes). Les mécanismes cellulaires et humoraux de cette défense dite « non spécifique » ne sont pas très bien connus. Des études récentes ont permis de démontrer qu'une famille de protéines codée par la lignée germinale (Toll-Like Récepteurs ou TLR) serait importante pour la défense innée de l'hôte, aussi bien chez les vertébrés que chez les invertébrés [56] et que l'infection palustre induit l'activation des récepteurs Toll-Like, TLR1, TLR2, TLR9 [62].

Parmi les cellules en première ligne dans la réponse immunitaire innée contre l'infection palustre, on distingue les cellules dendritiques (DC), les lymphocytes T gamma delta ($T\gamma\delta$) et les cellules tueuses naturelles (cellules NK). Ces cellules sont impliquées dans l'élimination des érythrocytes infectés ainsi que des hépatocytes infectés. D'autres cellules comme les neutrophiles, le système monocyte/macrophage,

jouent également un rôle important dans l'élimination des parasites par le biais de la phagocytose et de la cytotoxicité cellulaire. Les cellules NK stimulent la production d'IFN- γ qui active à son tour le macrophage conduisant ainsi à la phagocytose et la lyse des cellules parasitées [63].

3.7.2. Immunité adaptative ou acquise

3.7.2.1. Réponse humorale

L'immunité acquise joue un rôle essentiel dans la protection contre le paludisme. Cette immunité s'acquiert progressivement et lentement en situation d'exposition continue. Cette immunité n'est pas stérilisante. Elle n'empêche pas d'être de nouveau contaminé et ne permet pas de se débarrasser totalement du parasite ; mais elle empêche progressivement la survenue de formes cliniques graves. Cela explique pourquoi en zone de transmission intense, les jeunes enfants payent le plus lourd tribut à la maladie lorsque la protection maternelle transmise s'amenuise et jusqu'à 4 à 6 ans [64]. Cet état immunitaire permet de contrôler la parasitémie à un seuil qui n'entraîne pas les manifestations cliniques du paludisme.

De nombreux travaux en zone d'endémie palustre ont démontré que l'induction de l'immunité antipaludique adaptative nécessite une exposition longue. Elle se met en place progressivement avec l'âge et les expositions répétées. Elle fait intervenir non seulement la réponse humorale mais aussi la réponse à médiation cellulaire [65]. L'immunité humorale acquise est principalement dirigée contre le stade érythrocytaire asexué, les cibles principales étant les mérozoïtes extracellulaires en circulation, mais le stade pré-érythrocytaire est également visé par les réponses immunitaires protectrices [65].

L'infection palustre induit à la fois une production d'immunoglobulines polyclonales et spécifiques par les cellules lymphocytaires B. Ces anticorps produits au cours de l'infection palustre sont constitués essentiellement par les immunoglobulines G (IgG) et d'autres isotypes d'immunoglobuline. Bien que des isotypes différents puissent avoir des fonctions protectrices, le rôle des IgG dans la protection contre l'infection palustre a été largement évoqué [66]. Les sous-classes cytophiliques IgG1 et IgG3 ont été fréquemment rencontrées dans le sérum des personnes protégées contre le

paludisme. L'augmentation de la concentration de ces anticorps IgG peut être associée à une diminution du risque d'infection palustre.

La sous-classe IgG4 qui est non-cytophilique tout comme IgG2 peut inhiber les mécanismes effecteurs par inhibition des anticorps cytophiliques [67]. Le rôle protecteur des immunoglobulines IgM et IgA contre le paludisme n'est pas bien élucidé. De même, aucune fonction spécifique antique n'a été attribuée aux IgA [68].

En revanche, une élévation des anticorps antipalustres de type IgE a été observée au laboratoire chez l'homme et les animaux au cours de l'infection palustre, traduisant le passage des activités régulatrices des cellules T de Th1 à Th2 en raison de l'exposition répétée des cellules du système immunitaire aux parasites du paludisme [69]. Il a été mentionné au cours des études d'une part, que l'élévation de la concentration d'IgE pourrait être associée à l'apparition du paludisme cérébral [68], et d'autre part, une association positive entre la faible parasitémie et le taux élevé d'IgE spécifique d'antigènes de *P. falciparum* [70]. Tous les mécanismes par lesquels les anticorps agissent contre le *Plasmodium* ne sont pas connus, mais les plus évoqués sont l'inhibition de l'invasion des hépatocytes par les mérozoïtes, l'inhibition de la croissance intra-érythrocytaire du parasite, la clairance des érythrocytes infectés par ADCI « *Antibody Dependent Cellular Inhibition* : l'inhibition cellulaire dépendante des anticorps » [71].

3.7.2.2. Réponse cellulaire

Les cellules T CD4⁺ (T helper) et les T CD8⁺ (T cytotoxiques) interviennent dans l'immunité antipalustre. Il est actuellement bien établi que les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ reconnaissent des peptides antigéniques du *Plasmodium* présentés respectivement par les molécules du CMH classe II et classe I exprimées à la surface des hépatocytes infectés [72, 73]. Il a été démontré que les cellules T CD4⁺ de type Th1 spécifiques d'épitopes de la CSP sont capable de conférer la protection contre *P. yoelii* chez la souris [74]. Les lymphocytes T CD4⁺ peuvent par le biais des cytokines activer les cellules T cytotoxiques contre les hépatocytes infectés. Ils sont essentiels à la protection contre les formes asexuées sanguines du *Plasmodium* aussi bien chez l'homme que chez la souris.

Chez la souris, les érythrocytes infectés induisent des réponses cellulaires T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques de *P. berghei*. En outre, ce parasite exprime des antigènes présentés par les cellules dendritiques lesquelles induisent des cellules T cytotoxiques spécifiques [75, 76]. Les études de vaccination avec les sporozoïtes atténués ont démontré que les cellules T cytotoxiques infiltraient le foie et pouvaient intervenir dans la destruction des hépatocytes infectés par le *Plasmodium* [77]. Les études de vaccination chez l'homme ont démontré qu'AMA-1 induit le développement d'une réponse cellulaire mémoire aussi bien chez les personnes naïves que chez celles vivant en zone d'endémie palustre [78].

3.7.3. Antigènes candidats vaccins

Les candidats vaccins contre le paludisme sont constitués d'antigènes qui servent de cibles pour le système immunitaire. Ces antigènes peuvent être des protéines entières exprimées par le parasite ou des sous-unités qui stimulent le système immunitaire. Tous les stades du cycle de développement du parasite chez l'hôte sont étudiés sur le plan immunologique afin de connaître les antigènes susceptibles d'être utilisés comme un vaccin [79]. Les antigènes des formes asexuées les plus étudiés durant les dernières décennies sont le MSP1 (Protéine-1 à la surface du mérozoïte), l'AMA1 (Antigène-1 de la membrane Apicale du Mérozoïte), l'EBA175 (Antigène d'adhésion érythrocytaire 175), le MSP2 (Protéine-2 à la surface du mérozoïte).

Les études ont montré que ces antigènes provoquent la production des anticorps qui jouent un rôle important dans la réponse immunitaire par différents mécanismes : inhibent la liaison avec les cellules et bloquent l'invasion de mérozoïtes *in-vitro* [80] et l'inhibition de la croissance des parasites [81]. Mais l'efficacité de ces antigènes reste toujours faible à cause de la diversité antigénique du parasite. Les vaccins contre les stades pré-érythrocytaires doivent induire des réponses immunes visant les sporozoïtes ou les schizontes hépatiques. Le but est pour prévenir l'infection ou d'empêcher toute libération de mérozoïte dans le sang.

Le vaccin RTS/S (Mosquirix™) est constitué d'un composant de la protéine circumsporozoite à *P. falciparum* (CSP) couplé à l'antigène de surface du virus de l'hépatite B [82] et d'un adjuvant complexe, l'AS02A [83]. Parmi plus de 30 candidats vaccins antipaludique [84], RTS,S/AS01 est le seul ayant atteint un stade d'évaluation clinique avancé, réalisé conformément aux directives de l'OMS garantissant la qualité,

l'innocuité et l'efficacité des vaccins recombinants ciblant les parasites plasmodiaux aux stades pré-érythrocytaire et sanguin [85] et qui a été recommandé chez les enfants dans les zones à transmission modérée à forte du paludisme à *P. falciparum* [86].

En Gambie, le RTS,S/AS02 a réduit de 34% le risque de nouvelle infection d'adultes sur une période de 15 semaines [87]. RTS,S/AS01 réduirait de 46% le risque de développer un accès palustre et de 35,5% celui de contracter une forme sévère du paludisme chez des nourrissons de 5 à 17 mois dont le vaccin a été administré. Il permettrait aussi de diminuer de 41,5%, le nombre d'hospitalisations liées au paludisme [88].

Les vaccins du stade érythrocytaire asexué visent soit à empêcher l'invasion des hématies et donc à contrôler la parasitémie circulantes, soit à empêcher l'évolution des infections vers les formes cliniques et potentiellement graves de la maladie. La principale cible de vaccin contre les stades sanguins asexués est le mérozoïte, la forme du parasite qui est libérée par les schizontes hépatocytaires ou érythrocytaires et qui envahie les hématies. Les efforts de développement d'un tel vaccin se sont concentrés sur les antigènes intervenant dans l'invasion des érythrocytes [89].

3.7.4. Vaccins au stade sexué du développement du *Plasmodium*

Actuellement, les efforts se concentrent sur l'identification des potentiels candidats vaccins ciblant les formes sexuées dans le but de bloquer la transmission du paludisme. Plusieurs antigènes du stade sexué sont en cours d'évaluation en tant que potentiels candidats vaccins mais les plus prometteurs des candidats vaccins bloquant la transmission du paludisme (MTBV) sont les antigènes parasitaires *Pfs230*, *Pfs48/45* et *Pfs25*.

Contrairement aux anticorps dirigés contre les antigènes pré-érythrocytaires et sanguins, la prévalence des anticorps spécifiques au stade sexué n'augmenterait pas avec l'âge [90]. On sait peu de choses sur le taux d'induction ou la longévité des réponses anticorps au stade sexué et cela peut être important pour la stimulation naturelle de toute réponse induite par le vaccin. Les réponses immunitaires naturellement acquises contre les stades sexués de *P. falciparum* peuvent réduire la transmission du paludisme des humains aux moustiques. Ces antigènes sont des vaccins candidats bloquant la transmission, mais on en sait peu sur l'acquisition de

l'immunité au stade sexué après exposition aux gamétocytes, ou sur leur longévité et leur fonctionnalité.

La phase sexuée vise à interrompre le cycle de transmission et limiter la propagation de la maladie. L'objectif de tels vaccins est d'induire des anticorps dirigés contre des antigènes des stades sexués du parasite qui peuvent empêcher la fécondation dans l'estomac de l'anophèle et bloquer le développement du parasite. Elle ne viserait pas à protéger l'individu vacciné mais à limiter la transmission des parasites de l'homme au vecteur, et du vecteur à l'homme. Ces derniers sont appelés vaccins bloquant la transmission. Les antigènes candidats vaccins sont entre autres : *Pfs25*, *Pfs28*, *Ps230*, *Ps45/48* [91] [29].

La protéine *Ps48/45* (*Pfs48/45* et *Pvs48/45*) est une protéine de surface des gamétocytes de 48/45 kDa du *Plasmodium*. Le développement du parasite chez le moustique peut être évité par la présence d'anticorps antipaludiques bloquant la transmission dans le repas de sang ingéré. Chez l'hôte, le gamétocyte est localisé dans le cytoplasme du globule rouge et il est alors relativement à l'abri des mécanismes de défense immunitaire humorale de l'hôte, mais il peut être phagocyté par les macrophages ou être inactivé (incapable de se transformer en gamètes) par les cytokines et les anticorps. Les anticorps anti-*Ps48/45* sont présents dans les sérums humains des zones endémiques et joueraient un rôle dans l'immunité bloquant la transmission dans ces zones [92].

Les anticorps contre l'antigène *Ps48/45* provoquent une réduction significative de la transmission du paludisme en raison de l'inhibition du développement des zygotes et de l'infection par les moustiques. L'antigène *Ps48/45* est spécifiquement exprimé dans les gamétocytes et les gamètes [24]. Les anticorps humains réduisant la transmission sont ingérés par les moustiques anophèles avec les gamétocytes et peuvent interférer avec la formation du zygote et, par conséquent, impacter le développement ultérieur du parasite chez le moustique vecteur. Les interventions qui peuvent bloquer la transmission de *P. falciparum* entre l'hôte humain et le vecteur anophèle ont le potentiel de réduire l'incidence du paludisme. *Ps48/45* est une protéine de surface gamétocytaire critique pour le développement et la transmission des parasites, et son ciblage par l'anticorps monoclonal (mAb) 85RF45.1 a conduit à la réduction significative de la transmission palustre [93].

Les molécules de surface des gamètes *Ps48/45* sont également exprimées dans les gamétocytes circulant dans le sang humain et des réponses anticorps contre ces antigènes détectés chez des individus naturellement exposés. Cela permet d'étudier la nature et la durée de l'immunité spécifique au stade sexué chez les individus naturellement infectés. Des réponses anticorps spécifiques au stade sexué naturellement acquises peuvent être acquises après exposition aux gamétocytes et rapidement induites dans le cadre de la réponse initiale à l'infection.

3.8. Diagnostic biologique

Les méthodes de diagnostic du paludisme sont nombreuses, les plus utilisées sont : les tests de diagnostic rapide (TDR) dont le principe est basé sur la détection d'histidine riche protéine 2 (HRP-2) du parasite, de la lactate déshydrogénase et de l'aldolase. Ces tests ont une sensibilité entre 88 et 99% pour *P. falciparum* mais une mauvaise sensibilité pour les autres espèces du *Plasmodium* particulièrement *P. ovale* et *P. malariae* [94]. Ils doivent toujours faire l'objet d'une confirmation par un frottis sanguin. Les frottis sanguins (goutte épaisse et frottis mince) dont le principe est basé sur la détection des parasites dans un étalement sanguin en utilisant la microscopie optique.

Les méthodes moléculaires bien qu'ayant une sensibilité élevée sont rarement utilisées en zone d'endémie palustre soit à cause du coût élevé des techniques de polymérisation en chaîne (PCR) ou du coût élevé de la formation spécifique des techniciens de laboratoire.

3.9. Prévention et prise en charge du paludisme

Les différentes stratégies de prévention contre le paludisme au Mali sont :

- la lutte antivectorielle (utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action, utilisation de biolarvicides pour la destruction des gîtes larvaires et des répulsifs ;
- la pulvérisation intradomiciliaire ;
- le Traitement Préventif Intermittent (TPI) utilisant la sulfadoxine-pyriméthamine chez les femmes enceintes ;

- la Chimio-prévention du Paludisme Saisonnier (CPS) chez les enfants de 3 à 59 mois à base de Sulfadoxine-pyriméthamine (AQ+SP) à intervalles réguliers d'un mois. La posologie recommandée en fonction de l'âge est pour les Nourrissons <12 mois : AQ-moitié d'un comprimé à 153 mg une fois par jour pendant trois jours plus une dose unique de SP- moitié d'un comprimé à 500/25 mg et pour les enfants de 12-59 mois : AQ-un comprimé entier à 153 mg une fois par jour pendant trois jours plus une dose unique de SP-un comprimé entier à 500/25 mg [95].

Récemment, l'OMS a recommandé le vaccin RTS,S/AS01 chez les enfants en Afrique subsaharienne [86] alors que d'autres pays africains (Ghana et Nigéria) ont autorisé le vaccin R21 de l'université d'Oxford au Royaume-Uni dans leur arsenal de lutte antipalustre.

Au Mali, la combinaison Artémether-Luméfantrine (AL) est recommandée en première intention, les combinaisons Dihydroartésiminine-Pypéraquine ou Artésunate-Pyronaridine peuvent être utilisées en traitement alternatif conformément aux directives du programme national de lutte contre le paludisme.

Pour les cas graves et compliqués, l'artésunate injectable ou l'Artémether injectable ou la quinine injectable sont préconisés. L'artésunate suppositoire est utilisé pour le pré-transfert des cas graves.

Le traitement du paludisme chez la femme enceinte se fait avec les combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA) ou la quinine (injectable ou comprimé) [96, 97].

4. Méthodologie

4.1. Cadre et site d'étude

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'un partenariat entre l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB) du Mali, de l'université de Lausanne en Suisse et de l'Institut de Valle en Colombie sur un projet de recherche vaccinal multi-espèces à la fois contre *P. falciparum* et *P. vivax*. Elle a inclus les sérums de quatre (4) pays d'Afrique : Mali, le Burkina Faso, la Tanzanie et le Nigéria où seul *Plasmodium falciparum* était connu endémique au moment de la collecte des données cliniques et biologiques (sérums).

4.2. Type d'étude et collecte des échantillons

Nous avons fait une analyse secondaire des échantillons déjà collectés au cours des enquêtes de surveillance du paludisme dans les quatre pays endémiques à *P. falciparum*.

Les échantillons du Burkina Faso ont été collectés à Ouagadougou en 1998 alors que ceux du Mali ont été collectés entre 2009 et 2011 à Kéniéroba, une zone de forte transmission palustre. Les échantillons de la Tanzanie ont été collectés de 1982 à 1984 au cours d'une étude communautaire à Ifakara (village du district de Kilombero à Morogoro) et ceux du Nigéria chez les donneurs adultes vivant à Lagos, dans le Sud-Ouest du Nigeria où la transmission du paludisme est annuelle mais intense au cours de la saison des pluies.

Des sérums anonymisés provenant de 10 adultes Suisses en bonne santé non-exposés au paludisme (et sans antécédents palustres) ont été utilisés comme des témoins.

4.3. Analyse d'homologie des séquences entre *Pvs48/45* et *Pfs48/45*

La séquence primaire de *Pvs48/45* présente des domaines 6-Cys avec 15 résidus, le peptide signal N-terminal, et l'ancre GPI C-terminale prédite par les serveurs Signal P 3.0 et GPI-SOM. Les séquences des protéines orthologues *Pvs48/45* (PlasmoDB N°ALS19583.1) et *Pfs48/45* (PlasmoDB N°CAA57308.1) ont été déterminées en utilisant la base de données du génome Salvador I (PlasmoDB). Les deux séquences ont ensuite été comparées pour leur homologie en utilisant Blast-p (protéine-protéine BLAST) (figure 2) [6, 98].

Des séquences d'acides aminés (aa) ou résidus des protéines *Pvs48/45* (pv) et *Pfs48/45* (pf) ont été identifiées en utilisant la base de données PlasmoDB. *Pfs48/45* et *Pvs48/45* partagent ~56% d'identité (238 sur 423) et ~78% de similarité dans leurs séquences. Les résidus de cystéine conservés sont identifiés par la lettre C en noir et en gras. Les résidus identiques entre les deux protéines sont en lettre rouge tandis que les résidus similaires sont marqués par (+) et les résidus différents par (*).

```

Pv 13  QMAKGEVKYVPPEELNKDVSFFFKCNFSSKGVHNLPEILTEKRSLVCSIIYSYFIYDKI 72
      +++*G***+**P**LN*++SGF*G+KCNFS++GVHNL+P**+*E+RS+*C+I+SYFIYDKI
Pf 23  RIISGNNDFCPPSSLNSEISGFIGYKCNFSNEGVHNLKPDMRERRSIFCTIHSYFIYDKI 82

Pv 73  KLTIPKKIPGSKFKMLPEKCFQTVYTYNEKRTEEKIENMGLVEYEVKEDDSNSEYTEKIL 132
      +L*IPKK****+FK+LPEKCFQ*VYT+YE*R*E**I**+GL+EYE++E+D+N**Y*E**+
Pf 83  RLIIIPKKSSSPEFKILPEKCFQKVYTYDYENRVETDISELGLIEYEIEENDTNPYNERTI 142

Pv 133 TISPFNTKDVEFFCICDNSENVISNVKGRVALVQVNVLKYPHKITSINLTKEPYSYLPNQ 192
      TISPF+*KD+EFFC*CDN+E*VIS+++GR*A+V*V*VLKYPH*I***NLT*++++YLP**
Pf 143 TISPFSPKDIEFFCFCDNTEKVISSIEGRSAMVHVRVLKYPHNIFLTNLTNDLFTYLPKT 202

Pv 193 VDKTSFKSNKLDLELQDGELVVLACEKVDKCFKKGKDTSPLSLYKSNKIVYHKNLSIFK 252
      *++++F*SN*L++EL*DGEL*VLACE*+++KCF++GK+*****LYKSNKI+YH+*L+IFK
Pf 203 YNESNFVSNVLEVELNDGELFVLACELINKKCFQEGKEK---ALYKSNKIYHEKLTIFK 259

Pv 253 APVYVKSADVTAECSCNVDSTIYTLKPKVYTKKLIHGKCNFSSDKST-HNFTNHVDM AEL 311
      AP*YV*S*DV**EC+C*****Y**+*LKP*Y*KK+IHGKCNFSS+*S+*H*FT**+D***+
Pf 260 APFYVTSKDVNTECTCKFKNNYKIVLKPKEKVIHGKCNFSSNVSSKHTFTDSLDSLIV 319

Pv 312 GENAQITCSIELVDTSYNHLIGMSPGPEVLPECFQVYQRESPELEPSKIVYLDLQNLNIG 371
      *++A*I+C+++L***YNHL+G++CPG+++P+CFQVYQ*ES*ELEPS*IVYLD+Q+NIG
Pf 320 DDSAHCNVHLEPKYNHLVGLNCPGDIIPDCFFQVYQPESELEPSNIVYLDLQNLNIG 379

Pv 372 NVEYFEDSKGENIVKIFGLVGSIPKTTSTFTCICRKRKIGYMSVKIAAGYFGFLAKIFIL 431
      ++EY+ED++G+++K+FG+VGSIPKTTSTFTCIC+K**K**YM+V*I***Y+GFLAK*FI*
Pf 380 DIEYYEDAEGDDKIKLFGIVGSIPKTTSTFTCICKKDKKSAYMTVTIDSAYYGF LAKTFIF 439

Pv 431 LIV 434
      LIV
Pf 440 LIV 442

```

Figure 2. Homologie de séquence entre les protéines *Pvs48/45* et *Pfs48/45*

4.4. Technique de laboratoire utilisée (Test d'ELISA Indirect)

Le principe de ce test est basé sur la détection et la quantification de la réaction antigène-anticorps dans un échantillon biologique. Ce test a été réalisé en utilisant des plaques de microtitration Maxisorp 96 puits (*Thermo scientific, Ref. 442404*) selon les étapes suivantes :

- revêtement des plaques avec 50µl/puit d'une solution de 2 µg/ml de la protéine *rPvs48/45* et incubation pendant une nuit à 4°C ;
- laver quatre fois la plaque avec du PBS-Tween (PBS-T) 1X (solution de lavage) ;
- les plaques ont été bloquées pendant une heure à température ambiante avec du PBS 1X-lait 3% ;
- ensuite vider les puits puis transférer les sérums humains à tester à une dilution de 1 :200 et incubée pendant deux heures à température ambiante ;
- laver quatre fois la plaque avec du PBS-Tween (PBS-T) 1X (solution de lavage) ;
- transférer un anticorps secondaire (IgG anti-humaine de chèvre conjuguée avec la peroxydase de raifort (HRP)) à une dilution de 1 :2000 (Life technologies, Ref H10307) et incubé pendant une heure ;
- laver quatre fois la plaque avec du PBS-Tween (PBS-T) 1X (solution de lavage) ;
- les signaux ont été révélés après 25 minutes dans l'obscurité à température ambiante à l'aide du réactif de substrat TMB (BD OptEIA, cat 555214) transférer dans les puits ;
- bloquer la réaction à l'aide d'acide sulfurique 1M (Merck, 1.00731.1000) ;
- la densité optique (DO) a été mesurée à 450 nm/630 nm à l'aide d'un spectrophotomètre TECAN Nano Quant Inifinit M200 PRO.

L'échantillon a été considéré comme positif lorsque la densité optique (DO) était supérieure à la densité optique (DO) moyenne + 3SD des contrôles négatifs (sérums humains naïfs, NHS de donneurs naïfs suisses) dilués à 1:200.

4.5. Considérations éthiques

L'approbation éthique a été obtenue auprès (i) du ministère de la Santé du Burkina Faso pour le Burkina Faso, (ii) du Comité d'éthique institutionnel de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB) (N°0840/FMPOS) pour le Mali, (iii) de la Commission pour la Science et la Technologie (UTAFITI NSR/RCA90) pour la Tanzanie, et (iv) du Comité d'Examen Ethique du *Lagos State University Teaching hospital* (LASUTH) pour le Nigéria. En outre, les études animales ont été approuvées par le comité d'éthique de la recherche de l'école de santé de l'Université de Valle (Cali-Colombie ; Code - 031-015) et la collecte de globules rouges infectés (iRBC) de donneurs positifs à *P. vivax* pour la préparation de l'antigène IFAT a été approuvée par le Comité d'éthique du Centre International de Vacunas (Cali-Colombie ; Code CECIV - 1506-2017).

4.6. Gestion et analyse des données

Toutes les données ELISA ont été présentées sous la forme d'une valeur de densité optique (DO) moyenne provenant de triple puits. Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour la comparaison du titre médian des anticorps. Le test de Fisher exact a été utilisé pour comparer les proportions de séroréactivité. Le logiciel GraphPad Prism version 5.0 a été utilisé pour l'analyse et la réalisation des figures.

4.7. Déroulement de l'étude

Les sérums des adultes (> 17 ans) et d'enfants (\leq 5 ans) collectés auprès des individus de quatre différents pays d'Afrique où le paludisme est endémique ont été utilisés pour cette étude. Les échantillons étaient déjà conservés et stockés à -80°C avant la sélection et l'acheminement à l'université de Lausanne, Suisse pour les différents tests de laboratoire. Au total, 350 échantillons de sérum ont été sélectionnés selon la disponibilité dont 35 provenant du Burkina Faso (adultes), 159 du Mali (62 adultes et 97 enfants), 146 de la Tanzanie (83 adultes et 63 enfants) et 10 adultes du Nigéria. Les 190 sérums d'adultes et 160 sérums d'enfants ont été envoyés ensuite dans des bonnes conditions de conservation au département de Biochimie de Lausanne pour y effectuer les différents tests.

Les échantillons du Burkina Faso et du Nigéria ont été prélevés auprès des donneurs vivant en milieu urbain. En revanche, les échantillons de la Tanzanie et du Mali ont

été prélevés dans des villages ruraux où l'exposition au paludisme est potentiellement plus élevée. Des sérums anonymisés provenant de 10 adultes suisses sains non exposés au paludisme (qui n'avaient pas d'antécédents de paludisme) ont été utilisés comme témoins négatifs. Les anticorps spécifiques anti-*rPvs48/45* ont été analysés par le test ELISA indirect. Tous les sérums disponibles avec des informations sociodémographiques ont été testés pour cette étude.

5. Résultats

5.1. Résultats globaux

Les échantillons sélectionnés pour cette étude étaient au nombre de 350 en tous parmi lesquels 159 provenaient du Mali (62 adultes et 97 enfants), 35 du Burkina Faso (adultes), 146 de la Tanzanie (83 adultes et 63 enfants) et 10 du Nigéria (adultes). La réaction avec l'antigène *rPvs48/45* était plus élevée dans les sérums provenant du Mali (90%), du Burkina Faso (90%) et de la Tanzanie (94%) contrairement aux sérums du Nigéria où la réaction n'était que de 40%. Le titre médian d'anticorps anti-*rPvs48/45* était significativement plus élevé aussi bien dans les échantillons d'adultes du Mali ($p = 0,0001$) que ceux de Tanzanie ($p = 0,001$).

5.2. Résultats descriptifs et analytiques

Tableau 1. Répartition des participants selon le pays d'origine des échantillons

Pays	Groupe d'âge		TOTAL N (%)
	ADULTE n (%)	ENFANTS n (%)	
Mali	62 (39)	97 (61)	159 (100)
Tanzanie	83 (56,8)	63 (43,2)	146 (100)
Burkina Faso	35 (100)	-	35 (100)
Nigeria	10 (100)	-	10 (100)
Total	190	160	350

La majorité de nos échantillons provenait du Mali (45,4% ; 159/350) dont 97 (61,0%) enfants, suivie par la Tanzanie (41,7% incluant 63 (43,2%) enfants). Le Burkina Faso, le Nigéria ont fourni uniquement des échantillons d'adultes qui étaient de 35 et 10 échantillons, respectivement.

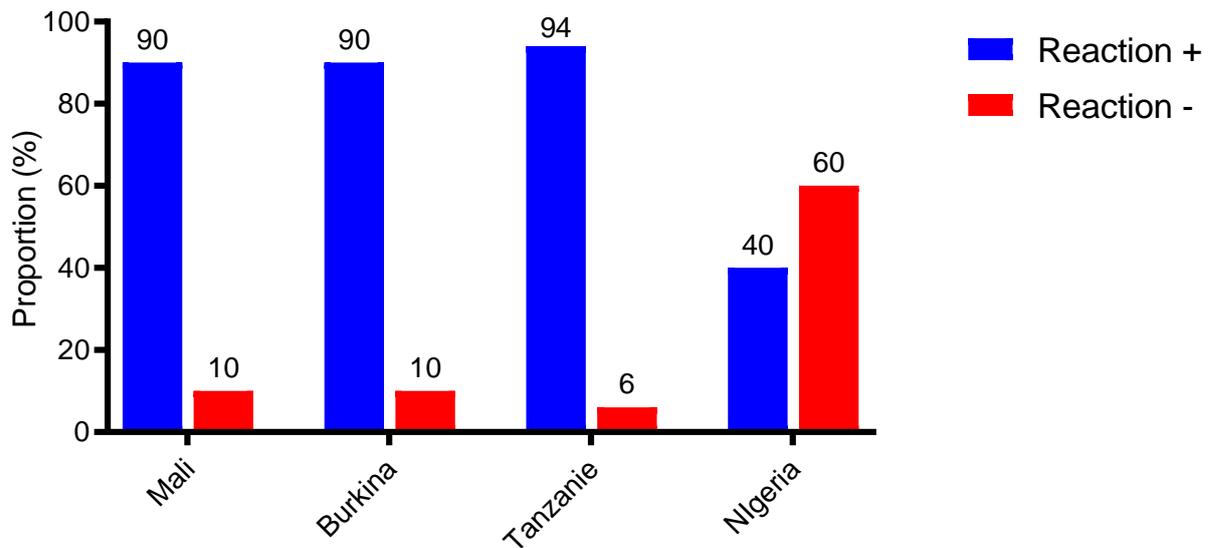
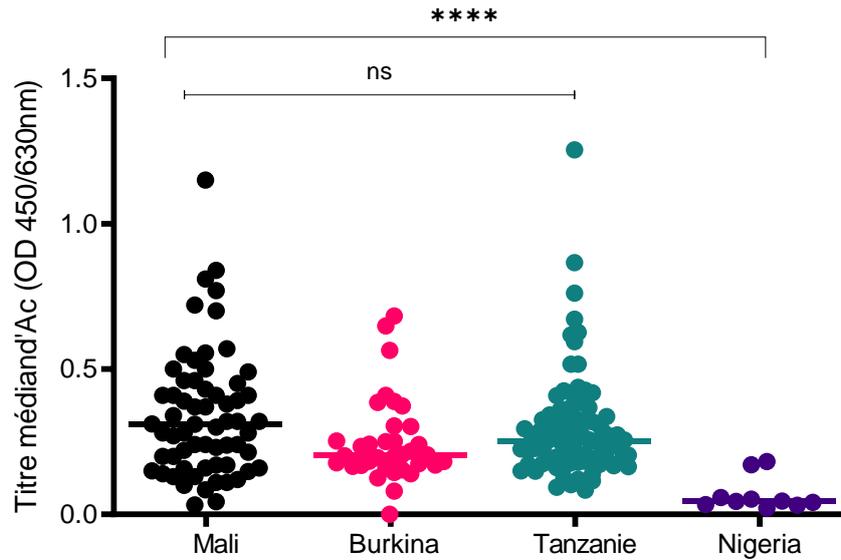


Figure 3. Proportion de séroréactivité à l'antigène *rPvs48/45* dans des échantillons provenant des quatre pays africains où *P. falciparum* est endémique

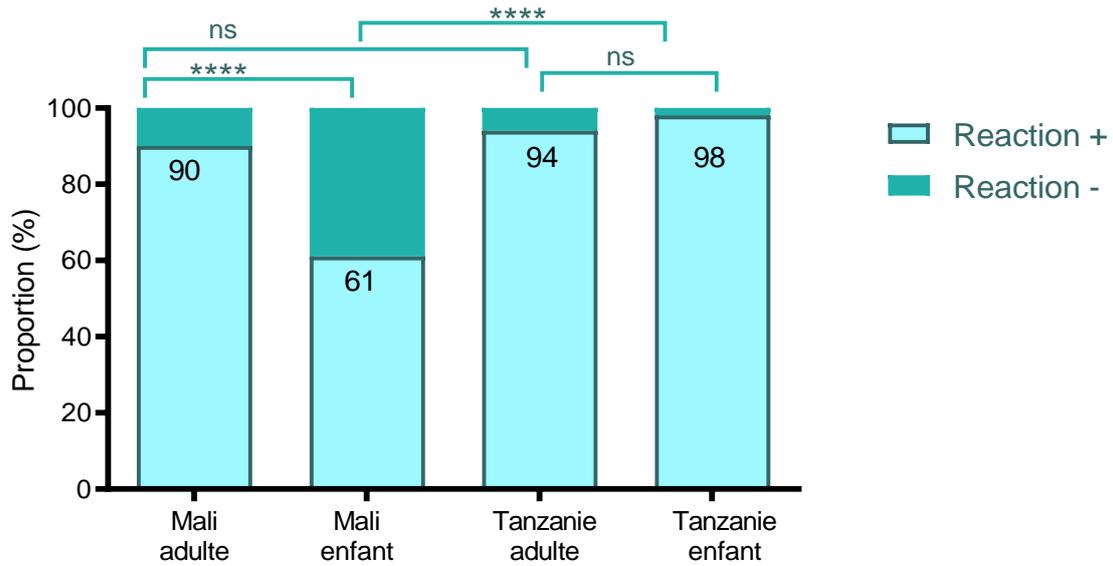
Les sérums provenant du Mali (90%), du Burkina Faso (90%) et de la Tanzanie (94%) ont mieux réagi avec l'antigène *rPvs48/45* contrairement aux sérums du Nigéria où la réaction n'était que de 40%.



**** $p < 0.0001$; ns, non significative ($p < 0.05$).

Figure 4. Titre médian d'anticorps anti-*rPvs48/45* dans les échantillons provenant des quatre pays d'Afrique où *P. falciparum* est endémique

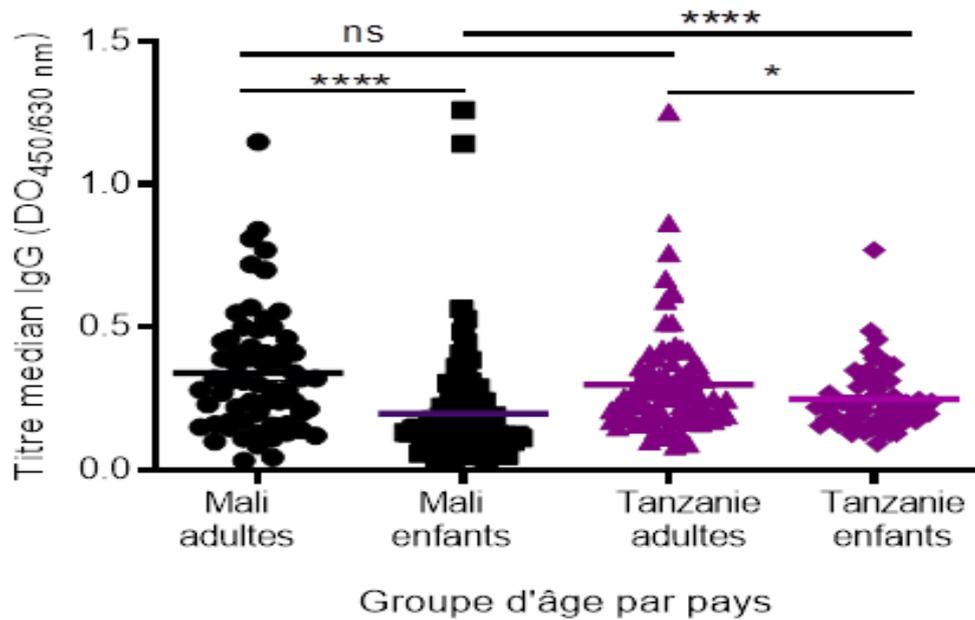
Globalement, le titre médian des anticorps dirigés contre *rPvs48/45* était significativement plus élevé dans les échantillons provenant du Mali, de Burkina et de Tanzanie que dans ceux du Nigeria ($p < 0,00001$). En revanche, il ne variait pas significativement entre le Mali, le Burkina Faso et la Tanzanie ($p > 0,05$).



*ns, non significative ; **** $p < 0.0001$.*

Figure 5. Proportion de la séroréactivité à l'antigène *rPvs48/45* selon les groupes d'âge dans les échantillons provenant du Mali et de Tanzanie

Au Mali, la proportion de la séroréactivité à *rPvs48/45* était significativement plus élevée chez les adultes que chez les enfants ($p = 0,00002$). En revanche, la réactivité était similaire entre les enfants et les adultes dans les échantillons provenant de la Tanzanie.



* $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$; ns, non significative.

Figure 6. Titre médian d'anticorps anti-*rPvs48/45* selon les groupes d'âge dans les échantillons provenant du Mali et de Tanzanie

Le titre médian d'anticorps anti-*rPvs48/45* était significativement plus élevé aussi bien dans les échantillons d'adultes du Mali ($p < 0,0001$) que ceux de Tanzanie ($p < 0,05$) comparativement aux enfants dans chaque pays. Il était plus élevé aussi chez les enfants de Tanzanie comparé au Mali ($p < 0,0001$). En revanche, il ne variait pas significativement entre les échantillons d'adultes du Mali et de Tanzanie ($p > 0,05$).

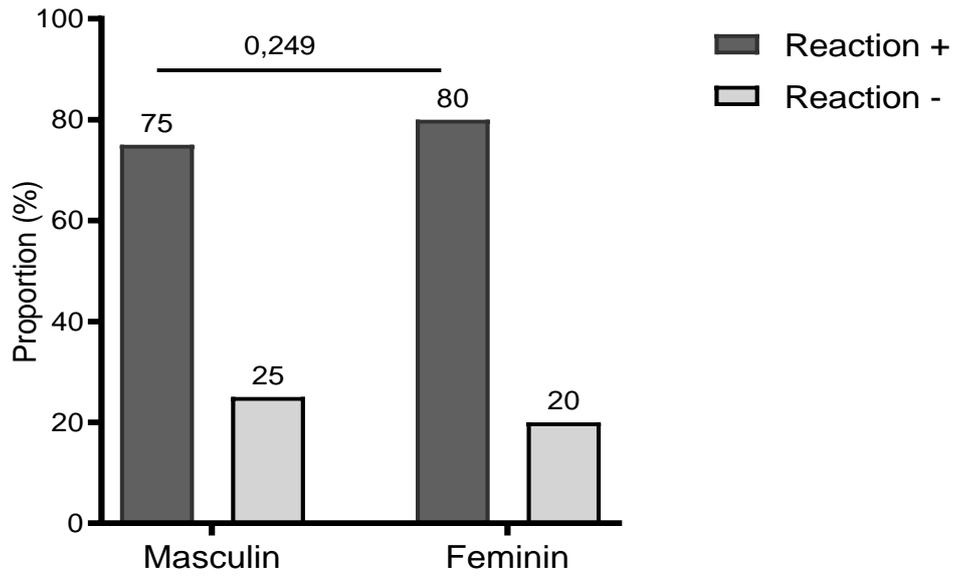


Figure 7. Proportion de la séroréactivité à *rPvs48/45* selon le sexe dans les échantillons provenant du Mali

Nous n'avons pas observé de variation statistiquement significative de la séroréactivité entre les masculins et les féminins dans les échantillons du Mali ($p = 0,249$).

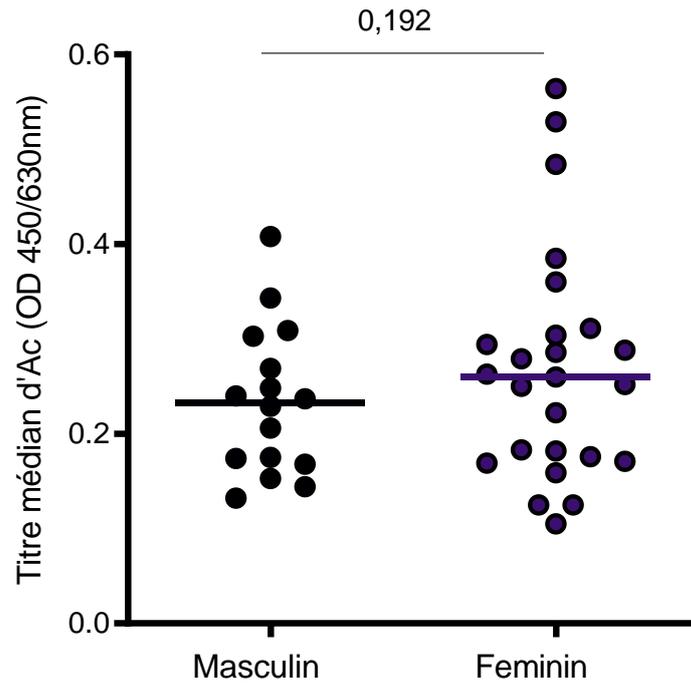
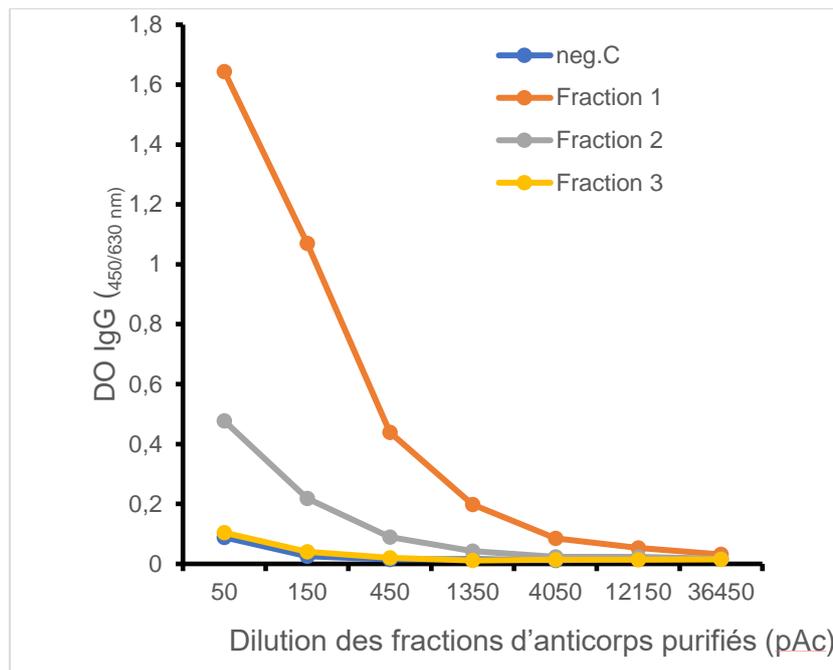


Figure 8. Titre médian d'anticorps anti-*rPvs48/45* dans les échantillons provenant du Mali selon le sexe

Le titre médian d'anticorps anti-*rPvs48/45* ne variait pas aussi entre les masculins et les féminins au Mali ($p = 0,192$).



NegC, contrôle négatif consistant en un pool de sérum provenant de donneurs naïfs de Suisse.

Figure 9. Réactivité des différentes fractions d'anticorps purifiés et spécifiques pour *rPvs48/45* dans un pool de sérum de Tanzanie

À l'aide du spectrophotomètre nanométrique, la courbe de titration a permis de vérifier que les IgG (différentes fractions) purifiées à partir d'un pool de sérums d'adultes Tanzaniens ont reconnu la protéine *rPvs48/45*. Comme attendu, la fraction 1 a mieux reconnu la protéine.

6. Commentaires et discussion

Cette étude avait pour but de déterminer la réactivité croisée entre la protéine *rPfs48/45* de *P. falciparum* et son orthologue de *P. vivax* dans les sérums de donneurs africains exposés à *P. falciparum* dans le cadre d'un partenariat pour la recherche d'un potentiel candidat vaccins efficace à la fois contre *P. falciparum* et *P. vivax*.

Pvs48/45 est une protéine exprimée à la surface des gamétocytes de *P. vivax*, connue pour être impliquée dans la fertilisation du parasite [16, 24, 99]. Les protéines 48/45 de *P. falciparum* et de *P. vivax* sont toutes deux bien établies comme cibles des réponses humorales naturelles aux stades sexuels parasitaires, qui ont montré une importante activité antipaludique dans des essais *ex vivo* [100], et étudiées actuellement en tant que candidats vaccins bloquant la transmission [15, 101-103]. Cette étude indique que les sérums d'une proportion significative de donneurs (40-94%) vivant dans des zones d'endémie de *P. falciparum* en Afrique reconnaissent la protéine *rPvs48/45*. La reconnaissance élevée et constante de la protéine *rPvs48/45* par des sérums provenant de différentes régions endémiques d'Afrique comme le Mali, le Burkina et la Tanzanie sans transmission de *P. vivax* connue au moment de la collecte des sérums est remarquable (Figure 3 & 4).

Contrairement aux études précédentes menées dans les zones endémiques d'Amérique latine où les deux parasites coexistent et dont la tendance était d'induire une augmentation croisée des réponses d'anticorps dans des conditions naturelles et dans l'immunisation des souris [29, 104], la présente étude démontre clairement une réactivité du *Pvs48/45* contre des échantillons provenant de zones endémiques de *P. falciparum*. Cette réactivité est très probablement expliquée par l'homologie significative de la séquence d'acides aminés (~ 60,8%) entre *P. vivax* et *P. falciparum* dans leur protéine *Ps48/45* [23, 25]. Cette caractéristique fait de cette protéine une cible prometteuse pour le développement d'un vaccin inter-espèces efficace.

Les communautés incluses dans cette étude ont été historiquement exposées à des intensités variables de transmission de *P. falciparum*. L'intensité de reconnaissance de *rPvs48/45*, déterminée par le niveau d'anti-*rPvs48/45* spécifiques et le pourcentage de la séropositivité dans les échantillons des quatre pays endémiques, peut être corrélée à l'intensité de transmission relative du paludisme dans ces pays. Cependant, des recherches supplémentaires sont maintenant nécessaires pour tester cette

hypothèse. En outre, malgré une proportion élevée de réponses sérologiques positives, notre recherche met en évidence des différences significatives dans les niveaux d'anticorps (valeur DO) en fonction des données démographiques (Figure 5).

Les niveaux d'anticorps anti-*rPvs48/45* étaient plus comparables et plus élevés pour le Mali et la Tanzanie, où les échantillons ont été collectés dans des zones rurales que pour le Burkina ou le Nigeria où la collecte des échantillons était faite dans les zones urbaines (Figure 6). Ces résultats soutiennent l'argument selon lequel les populations vivant dans des zones rurales et des petits villages sont plus susceptibles d'être exposées aux vecteurs du paludisme que celles vivant dans des zones métropolitaines [105].

Outre le lieu, l'âge a joué un rôle important dans la réponse humorale. Les adultes représentaient une plus grande proportion de répondants et présentaient des niveaux d'anticorps plus élevés que les enfants aussi bien qu'au Mali qu'en Tanzanie (Figure 6). Cela suggère que les réponses immunitaires acquises contre la protéine *rPvs48/45* peuvent augmenter avec l'âge, ce qui serait le résultat d'une exposition plus longue des adultes. Par conséquent, ces anticorps anti-*rPvs48/45* sont probablement acquis tôt dans l'enfance et sont ensuite renforcés tout au long de la vie, très probablement en réponse à des infections antérieures par *P. falciparum*. Cette tendance d'augmentation de la réponse immunitaire spécifique liée à l'âge dans la population naturellement exposée a également été démontrée avec d'autres antigènes du paludisme, bien que cette immunité soit due à des antigènes spécifiques des espèces de *Plasmodium* [21, 103, 106-108].

De plus, des études séroépidémiologiques récentes, réalisées avec des sérums provenant de régions où *P. vivax* et *P. falciparum* sont co-transmis, suggèrent que l'exposition fréquente aux infections à *P. falciparum* entraîne le maintien d'anticorps anti-*P. vivax* [15, 28, 29, 109, 110]. Cependant, cette étude n'a pas déterminé quels segments de *Ps48/45* étaient réactifs, ni démontré quels domaines protéiques conservés sont susceptibles d'être restreints malgré la reconnaissance de parasites hétérologues qui a été observée [27, 111, 112].

Dans l'ensemble, la réactivité constante des anticorps contre la protéine *rPvs48/45* avec les parasites *P. falciparum* et *P. vivax* dans des conditions naturelles sur des continents éloignés présentant des différences épidémiologiques importantes ainsi

que dans des modèles animaux, est en corrélation avec la conservation de la séquence de la protéine. Les résultats obtenus auprès de populations naturellement exposées à *P. falciparum* concordent également avec la réactivité croisée et les effets de renforcement croisé observés chez des souris expérimentalement immunisées avec des produits recombinants *rPfs48/45* et *rPvs48/45* [29, 109]. En outre, la réponse anti-*rPvs48/45* semble correspondre à la proportion élevée d'anticorps contre le *Pvs48/45* rapportée chez les adultes des zones d'endémie du paludisme en Amérique latine, où la transmission du paludisme est nettement plus faible [27, 113].

Plus important encore, l'utilisation de ces anticorps purifiés (Figure 9) nous montre déjà une réduction significative *ex-vivo* de 61,2 % du développement des oocystes de *P. falciparum* chez *An. stephensi* nourri avec des gamétocytes de *P. falciparum* (résultat préliminaire). Ces résultats sont intéressants et nous encourage à caractériser plus profondément les domaines fonctionnels de la protéine par la modélisation mathématique en vue de développer un vaccin contre plusieurs espèces plasmodiales et capable de bloquer la transmission du *Plasmodium*.

La reconnaissance des protéines natives des deux espèces en utilisant les tests IFAT, l'activité *ex-vivo* bloquant la transition de *P. falciparum* et le renforcement des anticorps anti-CHO *rPvs48/45* par l'injection des gamétocytes de *P. falciparum* chez la souris constituent des bases solides qui soutiennent la protéine *rPvs48/45* comme cible pour un vaccin bloquant la transmission (Figure 9). En outre, les données épidémiologiques actuelles, ainsi que la réactivité inter-espèces en utilisant le test ELISA et la capacité bloquant la transmission des anticorps spécifiques purifiés chez les individus semi-immuns pour *P. falciparum* contre *rPvs48/45*, plaident en faveur du développement d'un vaccin inter-espèces bloquant la transmission.

7. Limites de l'étude

Bien que la reconnaissance et la réactivité croisée aient été démontrées dans cette étude, il serait intéressant de corrélérer l'intensité de cette réactivité croisée avec les niveaux de transmission du paludisme et la saisonnalité qui conditionne cette réponse immunitaire dans les zones où les échantillons ont été collectés. Une autre limite de cette étude est que ces sérums n'ont pas été testés avec la protéine recombinante de *Pf*, *rPfs48/45*, qui est l'espèce majoritaire en Afrique. Des investigations qui tiennent compte de ces aspects en utilisant un échantillonnage élargi seront nécessaires.

8. Conclusion et recommandations

8.1. Conclusion

La présente étude a démontré une réactivité croisée de la protéine *Pvs48/45* de *P. vivax* avec les sérums provenant des zones endémiques à *P. falciparum*. Cette réactivité croisée était plus nette avec les sérums des adultes et surtout ceux provenant des zones rurales.

8.2. Recommandations

Au terme de cette étude et au regard de nos résultats, nous formulons les recommandations suivantes :

Aux autorités sanitaires et administratives

- D'encourager et de financer d'avantage la recherche biomédicale afin de renforcer les capacités de développement des candidats vaccin efficace contre le paludisme.

Aux chercheurs

- De mener d'autres études afin de mieux caractériser les portions de séquences interactives entre les deux espèces de *Plasmodium* ;
- De faire d'autres tests en tenant compte du niveau d'intensité de la transmission et de la saisonnalité pouvant impacter sur cette réponse humorale contre la protéine de *P. vivax* et son effet protecteur.

. A la population

- Adhérer au protocole de recherche pour faciliter les études qui pourront aboutir au développement d'un vaccin efficace contre le paludisme.

9. Références

1. Singh, B. and C. Daneshvar, *Human infections and detection of Plasmodium knowlesi*. Clin Microbiol Rev, 2013. **26**(2): p. 165-84.
2. Shretta, R., et al., *Malaria Elimination and Eradication*, in *Major Infectious Diseases*, K.K. Holmes, et al., Editors. 2017, The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank © 2017 International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank.: Washington (DC).
3. OMS. *Le Rapport sur le paludisme dans le monde 2019 en un clin d'œil*. 2019; Available from: <https://www.who.int/fr/news-room/feature-stories/detail/world-malaria-report-2019> (consulté le 19/04/2023).
4. Jan Evelyn, C., et al., *Malaria Transmission in South America—Present Status and Prospects for Elimination*, in *Towards Malaria Elimination*, M. Sylvie and D. Vas, Editors. 2018, IntechOpen: Rijeka. p. Ch. 12.
5. *Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial*. Lancet, 2015. **386**(9988): p. 31-45.
6. Datoo, M.S., et al., *Efficacy of a low-dose candidate malaria vaccine, R21 in adjuvant Matrix-M, with seasonal administration to children in Burkina Faso: a randomised controlled trial*. Lancet, 2021. **397**(10287): p. 1809-1818.
7. Lyke, K.E., et al., *Attenuated PfSPZ Vaccine induces strain-transcending T cells and durable protection against heterologous controlled human malaria infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(10): p. 2711-2716.
8. Sissoko, M.S., et al., *Safety and efficacy of PfSPZ Vaccine against Plasmodium falciparum via direct venous inoculation in healthy malaria-exposed adults in Mali: a randomised, double-blind phase 1 trial*. Lancet Infect Dis, 2017. **17**(5): p. 498-509.
9. Herrera, S., et al., *Safety and elicitation of humoral and cellular responses in colombian malaria-naive volunteers by a Plasmodium vivax circumsporozoite protein-derived synthetic vaccine*. Am J Trop Med Hyg, 2005. **73**(5 Suppl): p. 3-9.
10. Herrera, S., et al., *Phase I safety and immunogenicity trial of Plasmodium vivax CS derived long synthetic peptides adjuvanted with montanide ISA 720 or montanide ISA 51*. Am J Trop Med Hyg, 2011. **84**(2 Suppl): p. 12-20.
11. Arévalo-Herrera, M., et al., *Randomized clinical trial to assess the protective efficacy of a Plasmodium vivax CS synthetic vaccine*. Nat Commun, 2022. **13**(1): p. 1603.
12. Arévalo-Herrera, M., et al., *Malaria transmission blocking immunity and sexual stage vaccines for interrupting malaria transmission in Latin America*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2011. **106 Suppl 1**(Suppl 1): p. 202-11.
13. Miura, K., et al., *Transmission-blocking activity induced by malaria vaccine candidates Pfs25/Pvs25 is a direct and predictable function of antibody titer*. Malar J, 2007. **6**: p. 107.
14. Arakawa, T., et al., *Nasal immunization with a malaria transmission-blocking vaccine candidate, Pfs25, induces complete protective immunity in mice against field isolates of Plasmodium falciparum*. Infect Immun, 2005. **73**(11): p. 7375-80.
15. Tachibana, M., et al., *Plasmodium vivax gametocyte proteins, Pvs48/45 and Pvs47, induce transmission-reducing antibodies by DNA immunization*. Vaccine, 2015. **33**(16): p. 1901-8.
16. Miura, K., et al., *Functional comparison of Plasmodium falciparum transmission-blocking vaccine candidates by the standard membrane-feeding assay*. Infect Immun, 2013. **81**(12): p. 4377-82.
17. Mueller, I., A.R. Shakri, and C.E. Chitnis, *Development of vaccines for Plasmodium vivax malaria*. Vaccine, 2015. **33**(52): p. 7489-95.
18. Ayadi, I., et al., *P. falciparum and P. vivax Orthologous Coiled-Coil Candidates for a Potential Cross-Protective Vaccine*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 574330.

19. Céspedes, N., et al., *Plasmodium vivax* antigen discovery based on alpha-helical coiled coil protein motif. *PLoS One*, 2014. **9**(6): p. e100440.
20. Balam, S., et al., *Immunogenicity of dimorphic and C-terminal fragments of Plasmodium falciparum MSP2 formulated with different adjuvants in mice*. *Vaccine*, 2016. **34**(13): p. 1566-1574.
21. Balam, S., et al., *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2: epitope mapping and fine specificity of human antibody response against non-polymorphic domains. *Malar J*, 2014. **13**: p. 510.
22. Miura, K., *Progress and prospects for blood-stage malaria vaccines*. *Expert Rev Vaccines*, 2016. **15**(6): p. 765-81.
23. Feng, H., et al., *Genetic diversity of transmission-blocking vaccine candidate Pvs48/45 in Plasmodium vivax populations in China*. *Parasit Vectors*, 2015. **8**: p. 615.
24. van Dijk, M.R., et al., *A central role for P48/45 in malaria parasite male gamete fertility*. *Cell*, 2001. **104**(1): p. 153-64.
25. Kocken, C.H., et al., *Minimal variation in the transmission-blocking vaccine candidate Pfs48/45 of the human malaria parasite Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 1995. **69**(1): p. 115-8.
26. Vallejo, A.F., et al., *Global genetic diversity of the Plasmodium vivax transmission-blocking vaccine candidate Pvs48/45*. *Malar J*, 2016. **15**: p. 202.
27. Arévalo-Herrera, M., et al., *Immunoreactivity of Sera From Low to Moderate Malaria-Endemic Areas Against Plasmodium vivax rPvs48/45 Proteins Produced in Escherichia coli and Chinese Hamster Ovary Systems*. *Front Immunol*, 2021. **12**: p. 634738.
28. Cao, Y., et al., *Functional Conservation of P48/45 Proteins in the Transmission Stages of Plasmodium vivax (Human Malaria Parasite) and P. berghei (Murine Malaria Parasite)*. *mBio*, 2018. **9**(5).
29. Cao, Y., et al., *Immunological Cross-Reactivity between Malaria Vaccine Target Antigen P48/45 in Plasmodium vivax and P. falciparum and Cross-Boosting of Immune Responses*. *PLoS One*, 2016. **11**(7): p. e0158212.
30. Paludisme, G.s.l.; Available from: <https://www.clicours.com/generalites-sur-le-paludisme-2/> (consulté le 19/04/2023).
31. OMS. *Rapport 2022 sur le paludisme dans le monde*. 2022; Available from: <https://www.who.int/fr/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2022/questions-and-answers> (consulté le 19/04/2023).
32. Pierre A., e.a. *Généralités sur la Médecine Tropicale Actualités 2022*. 2022; Available from: <http://medecinetropicale.free.fr/cours/medecinetropicale.pdf> (consulté le 19/04/2023).
33. OMS. *Rapport 2022 sur le paludisme dans le monde, Dossier d'information, Principaux messages*. 2022; Available from: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/malaria/world-malaria-reports/wmr2022-global-briefing-kit-fre.pdf?sfvrsn=5ec7ec5c_6&download=true (consulté le 12/05/2023).
34. OMS. *Rapport 2021 sur le paludisme dans le monde dossier d'information principaux messages*. 2021; Available from: <https://cdn.who.int/media/docs/default-source/malaria/world-malaria-reports/world-malaria-report-2021-global-briefing-kit-fre.pdf> (consulté le 19/04/2023).
35. OMS. *Paludisme, Vue d'ensemble*. 2023; Available from: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/malaria> (consulté le 04/07/2023).
36. A., N. *Les facteurs influençant la distribution géographique du paludisme dans le monde* 1979; Available from: https://www.persee.fr/doc/globe_0398-3412_1979_num_119_1_1123 (consulté le 19/04/2023).
37. Macdonald, G., *Epidemiological basis of malaria control*. *Bull World Health Organ*, 1956. **15**(3-5): p. 613-26.

38. Autino, B., et al., *Epidemiology of malaria in endemic areas*. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 2012. **4**(1): p. e2012060.
39. 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.
40. Coetzee, M. and L.L. Koekemoer, *Molecular systematics and insecticide resistance in the major African malaria vector Anopheles funestus*. *Annu Rev Entomol*, 2013. **58**: p. 393-412.
41. Touré, Y.T., et al., *Ecological genetic studies in the chromosomal form Mopti of Anopheles gambiae s.str. in Mali, west Africa*. *Genetica*, 1994. **94**(2-3): p. 213-23.
42. Maier, A.G., et al., *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol*, 2019. **35**(6): p. 481-482.
43. Sato, S., *Plasmodium-a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology*. *J Physiol Anthropol*, 2021. **40**(1): p. 1.
44. ANOFEL. *Paludisme (ANOFEL) Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie 2014*. 2014; Available from: <https://fr.readkong.com/page/paludisme-association-francaise-des-enseignants-de-6695706> (consulté le 24/04/2023).
45. Twohig, K.A., et al., *Growing evidence of Plasmodium vivax across malaria-endemic Africa*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2019. **13**(1): p. e0007140.
46. Diallo, M.A., et al., [*Plasmodium ovale wallikeri and Plasmodium ovale curtisi Malaria in Senegal in 2016*]. *Bull Soc Pathol Exot*, 2017. **110**(5): p. 286-290.
47. Oguike, M.C., et al., *Plasmodium ovale curtisi and Plasmodium ovale wallikeri circulate simultaneously in African communities*. *Int J Parasitol*, 2011. **41**(6): p. 677-83.
48. Collins, W.E. and G.M. Jeffery, *Plasmodium malariae: parasite and disease*. *Clin Microbiol Rev*, 2007. **20**(4): p. 579-92.
49. Naqvi, R., et al., *Outcome in severe acute renal failure associated with malaria*. *Nephrol Dial Transplant*, 2003. **18**(9): p. 1820-3.
50. Faust, C. and A.P. Dobson, *Primate malaria: Diversity, distribution and insights for zoonotic Plasmodium*. *One Health*, 2015. **1**: p. 66-75.
51. Ta, T.H., et al., *First case of a naturally acquired human infection with Plasmodium cynomolgi*. *Malar J*, 2014. **13**: p. 68.
52. Bricaire, F., [*Infectious diseases transmitted by animal bites*]. *Rev Med Interne*, 1993. **14**(5): p. 313-6.
53. Yoeli, M. and R.S. Upmanis, *Plasmodium berghei ookinete formation in vitro*. *Exp Parasitol*, 1968. **22**(1): p. 122-8.
54. Touray, M.G., et al., *Developmentally regulated infectivity of malaria sporozoites for mosquito salivary glands and the vertebrate host*. *J Exp Med*, 1992. **175**(6): p. 1607-12.
55. Thériault, C. *Un niveau minimal d'un homologue potentiel de la phosphoinositide-phosphatase SAC1 chez "Plasmodium falciparum" semble requis pour assurer la survie durant le stade érythrocytaire asexué*. 2017.
56. Aderem, A. and R.J. Ulevitch, *Toll-like receptors in the induction of the innate immune response*. *Nature*, 2000. **406**(6797): p. 782-7.
57. Kwiatkowski, D., *Tumour necrosis factor, fever and fatality in falciparum malaria*. *Immunol Lett*, 1990. **25**(1-3): p. 213-6.
58. Couper, K.N., et al., *Macrophage-mediated but gamma interferon-independent innate immune responses control the primary wave of Plasmodium yoelii parasitemia*. *Infect Immun*, 2007. **75**(12): p. 5806-18.
59. Dechavanne, C. *Construction de la réponse anticorps spécifique du paludisme chez le jeune enfant : étude combinée de l'hôte, du parasite et de leur environnement*. 2012; Available from: <https://theses.hal.science/tel-00856581/document> (consulté le 29/04/2023).
60. Doolan, D.L., C. Dobaño, and J.K. Baird, *Acquired immunity to malaria*. *Clin Microbiol Rev*, 2009. **22**(1): p. 13-36, Table of Contents.
61. Shelton, J.M.G., et al., *Genetic determinants of anti-malarial acquired immunity in a large multi-centre study*. *Malaria Journal*, 2015. **14**(1): p. 333.

62. Eriksson, E., Sampaio, N., Schofield, L., *Toll-Like Receptors and Malaria – Sensing and Susceptibility*. 2013; Available from: <https://www.walshmedicalmedia.com/open-access/tolllike-receptors-and-malaria-sensing-and-susceptibility-2329-891X.1000126.pdf> (consulté le 30/04/2023).
63. Roetynck, S., et al., [*NK cells and innate immunity to malaria*]. *Med Sci (Paris)*, 2006. **22**(8-9): p. 739-44.
64. Artavanis-Tsakonas, K., J.E. Tongren, and E.M. Riley, *The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology*. *Clin Exp Immunol*, 2003. **133**(2): p. 145-52.
65. Dent, A.E., et al., *Temporal stability of naturally acquired immunity to Merozoite Surface Protein-1 in Kenyan adults*. *Malar J*, 2009. **8**: p. 162.
66. Tebo, A.E., P.G. Kremsner, and A.J. Luty, *Plasmodium falciparum: a major role for IgG3 in antibody-dependent monocyte-mediated cellular inhibition of parasite growth in vitro*. *Exp Parasitol*, 2001. **98**(1): p. 20-8.
67. Aucan, C., et al., *High immunoglobulin G2 (IgG2) and low IgG4 levels are associated with human resistance to Plasmodium falciparum malaria*. *Infect Immun*, 2000. **68**(3): p. 1252-8.
68. Leoratti, F.M., et al., *Pattern of humoral immune response to Plasmodium falciparum blood stages in individuals presenting different clinical expressions of malaria*. *Malar J*, 2008. **7**: p. 186.
69. Parker, H.M., *Plutonium--health implications for man: closing remarks and final discussion*. *Health Phys*, 1975. **29**(4): p. 627-32.
70. Fréville, A. *Identification et caractérisation des inhibiteurs de type 2 et 3 de la phosphatase de type 1 chez Plasmodium falciparum*. 2012; Available from: <https://theses.hal.science/tel-00868793> (consulté le 30/04/2023).
71. Bouharoun-Tayoun, H., et al., *Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of Plasmodium falciparum asexual blood stages*. *J Exp Med*, 1995. **182**(2): p. 409-18.
72. Hoffman, S.L., et al., *T lymphocytes from mice immunized with irradiated sporozoites eliminate malaria from hepatocytes*. *Bull World Health Organ*, 1990. **68** Suppl(Suppl): p. 132-7.
73. Hoffman, S.L., et al., *T lymphocytes from mice immunized with irradiated sporozoites eliminate malaria from hepatocytes*. *Bulletin of the World Health Organization*, 1990. **68**(Suppl): p. 132-137.
74. Rénia, L., et al., *Effector functions of circumsporozoite peptide-primed CD4+ T cell clones against Plasmodium yoelii liver stages*. *J Immunol*, 1993. **150**(4): p. 1471-8.
75. Huaman, M.C., et al., *Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 vaccine elicits multifunctional CD4 cytokine-producing and memory T cells*. *Vaccine*, 2009. **27**(38): p. 5239-46.
76. Longley, R.J., et al., *Development of an in vitro assay and demonstration of Plasmodium berghei liver-stage inhibition by TRAP-specific CD8+ T cells*. *PLoS One*, 2015. **10**(3): p. e0119880.
77. Overstreet, M.G., et al., *Protective CD8 T cells against Plasmodium liver stages: immunobiology of an 'unnatural' immune response*. *Immunol Rev*, 2008. **225**: p. 272-83.
78. Lyke, K.E., et al., *Cell-mediated immunity elicited by the blood stage malaria vaccine apical membrane antigen 1 in Malian adults: results of a Phase I randomized trial*. *Vaccine*, 2009. **27**(15): p. 2171-6.
79. Carvalho, L.J., C.T. Daniel-Ribeiro, and H. Goto, *Malaria vaccine: candidate antigens, mechanisms, constraints and prospects*. *Scand J Immunol*, 2002. **56**(4): p. 327-43.
80. Sim, B.K., et al., *Induction of biologically active antibodies in mice, rabbits, and monkeys by Plasmodium falciparum EBA-175 region II DNA vaccine*. *Mol Med*, 2001. **7**(4): p. 247-54.

81. Moss, D.K., et al., *Plasmodium falciparum* 19-kilodalton merozoite surface protein 1 (MSP1)-specific antibodies that interfere with parasite growth in vitro can inhibit MSP1 processing, merozoite invasion, and intracellular parasite development. *Infect Immun*, 2012. **80**(3): p. 1280-7.
82. Gordon, D.M., et al., *Safety, immunogenicity, and efficacy of a recombinantly produced Plasmodium falciparum circumsporozoite protein-hepatitis B surface antigen subunit vaccine*. *J Infect Dis*, 1995. **171**(6): p. 1576-85.
83. Stoute, J.A., et al., *A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against Plasmodium falciparum malaria*. *RTS,S Malaria Vaccine Evaluation Group*. *N Engl J Med*, 1997. **336**(2): p. 86-91.
84. Birkett, A.J., *Status of vaccine research and development of vaccines for malaria*. *Vaccine*, 2016. **34**(26): p. 2915-2920.
85. WHO. *Lignes directrices sur la qualité, la sécurité et l'efficacité des vaccins antipaludiques recombinants ciblant les stades pré-érythrocytaire et sanguin de Plasmodium falciparum, annexe 3, TRS n° 980*. 2014; Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/recombinant-malaria-vaccine-annex-3-trs-980> (consulté le 30/04/2023).
86. OMS. *Paludisme*. 2023; Available from: https://www.who.int/fr/news-room/questions-and-answers/item/malaria?gclid=EAlaIqObChMlvL6lytnR_givNAYGAB0BNQwQEAAAYASAAEgLSvD_BwE (consulté le 30/04/2023).
87. Bojang, K.A., et al., *Efficacy of RTS,S/AS02 malaria vaccine against Plasmodium falciparum infection in semi-immune adult men in The Gambia: a randomised trial*. *Lancet*, 2001. **358**(9297): p. 1927-34.
88. Abdulla, S., et al., *Randomized, controlled trial of the long term safety, immunogenicity and efficacy of RTS,S/AS02(D) malaria vaccine in infants living in a malaria-endemic region*. *Malar J*, 2013. **12**: p. 11.
89. Richards, J.S. and J.G. Beeson, *The future for blood-stage vaccines against malaria*. *Immunol Cell Biol*, 2009. **87**(5): p. 377-90.
90. Riley, E.M., et al., *Human antibody responses to Pfs 230, a sexual stage-specific surface antigen of Plasmodium falciparum: non-responsiveness is a stable phenotype but does not appear to be genetically regulated*. *Parasite Immunol*, 1994. **16**(2): p. 55-62.
91. Duffy, P.E. and D.C. Kaslow, *A novel malaria protein, Pfs28, and Pfs25 are genetically linked and synergistic as falciparum malaria transmission-blocking vaccines*. *Infect Immun*, 1997. **65**(3): p. 1109-13.
92. Gounoue, R., et al., *Anticorps anti-PFS48/45 dans les sérums de deux populations vivant en zone d'endémie palustre de niveaux de transmission différents*. *Bulletin de Liaison et de Documentation - OCEAC*, 1996. **29**(2): p. 16-21.
93. Molina-Cruz, A., G.E. Canepa, and C. Barillas-Mury, *Plasmodium P47: a key gene for malaria transmission by mosquito vectors*. *Curr Opin Microbiol*, 2017. **40**: p. 168-174.
94. Yombi, J.C.a.O., U.N., *LA MALARIA : ASPECT CLINIQUE ET THÉRAPEUTIQUE*. *louvainmedical*, 2015.
95. OMS. *Recommandation de politique générale de l'OMS : Chimio-prévention du paludisme saisonnier pour lutter contre le paludisme à Plasmodium falciparum en zone de forte transmission saisonnière dans la sous-région du Sahel en Afrique*. 2012; Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/337982/WHO-HTM-GMP-2012.02-fre.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (consulté le 31/07/2023).
96. SEVEREMALARIA. *Partage de connaissances à propos du paludisme grave*. Available from: <https://www.severemalaria.org/fr/paludisme-grave/traitement> (consulté le 30/04/2023).
97. PNL. *PLAN STRATEGIQUE DE LUTTE CONTRE LE PALUDISME 2013-2017*. 2013-2017; Available from: <https://www.severemalaria.org/sites/mmv->

smo/files/content/attachments/2017-07-25/Mali%20malaria%20Pstrag%202013-17PNLP_0.pdf (consulté le 30/04/2023).

98. Vandoolaeghe, P. and L. Schuerman, *The RTS,S/AS01 malaria vaccine in children 5 to 17 months of age at first vaccination*. *Expert Rev Vaccines*, 2016. **15**(12): p. 1481-1493.
99. Merino, K.M., G.P. Bansal, and N. Kumar, *Reduced immunogenicity of Plasmodium falciparum gamete surface antigen (Pfs48/45) in mice after disruption of disulphide bonds - evaluating effect of interferon- γ -inducible lysosomal thiol reductase*. *Immunology*, 2016. **148**(4): p. 433-47.
100. Bansal, G.P., et al., *Antibodies elicited during natural infection in a predominantly Plasmodium falciparum transmission area cross-react with sexual stage-specific antigen in P. vivax*. *Acta Trop*, 2017. **170**: p. 105-111.
101. Arévalo-Herrera, M., et al., *Induction of transmission-blocking immunity in Aotus monkeys by vaccination with a Plasmodium vivax clinical grade PVS25 recombinant protein*. *Am J Trop Med Hyg*, 2005. **73**(5 Suppl): p. 32-7.
102. Wu, Y., et al., *Phase 1 trial of malaria transmission blocking vaccine candidates Pfs25 and Pvs25 formulated with montanide ISA 51*. *PLoS One*, 2008. **3**(7): p. e2636.
103. Peymanfar, Y.a.T.-R., A. and *. *Plasmodium Sexual Stage Parasites Present Distinct Targets for Malaria Transmission-Blocking Vaccine Design*. Volume: 2.1. 2016; Available from: <https://www.sciforschenonline.org/journals/vaccines/article-data/IJVI-2-109/IJVI-2-109.pdf> (consulté le 09/05/2023).
104. Gnidehou, S., et al., *Cross-Species Immune Recognition Between Plasmodium vivax Duffy Binding Protein Antibodies and the Plasmodium falciparum Surface Antigen VAR2CSA*. *J Infect Dis*, 2019. **219**(1): p. 110-120.
105. Iqbal, S.A., et al., *Hematological Differences among Malaria Patients in Rural and Urban Ghana*. *J Trop Pediatr*, 2016. **62**(6): p. 477-486.
106. Griffin, J.T., et al., *Gradual acquisition of immunity to severe malaria with increasing exposure*. *Proc Biol Sci*, 2015. **282**(1801): p. 20142657.
107. Stanisic, D.I., et al., *Acquisition of antibodies against Plasmodium falciparum merozoites and malaria immunity in young children and the influence of age, force of infection, and magnitude of response*. *Infect Immun*, 2015. **83**(2): p. 646-60.
108. Mensah-Brown, H.E., et al., *Antibody Reactivity to Merozoite Antigens in Ghanaian Adults Correlates With Growth Inhibitory Activity Against Plasmodium falciparum in Culture*. *Open Forum Infect Dis*, 2019. **6**(7): p. ofz254.
109. Arévalo-Herrera, M., et al., *Recombinant Pvs48/45 antigen expressed in E. coli generates antibodies that block malaria transmission in Anopheles albimanus mosquitoes*. *PLoS One*, 2015. **10**(3): p. e0119335.
110. de Jong, R.M., et al., *Immunity against sexual stage Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax parasites*. *Immunol Rev*, 2020. **293**(1): p. 190-215.
111. Bergmann-Leitner, E.S., et al., *Immunization with pre-erythrocytic antigen CeITOS from Plasmodium falciparum elicits cross-species protection against heterologous challenge with Plasmodium berghei*. *PLoS One*, 2010. **5**(8): p. e12294.
112. Yadava, A., et al., *Cross-species immunity following immunization with a circumsporozoite protein-based vaccine for malaria*. *J Infect Dis*, 2012. **205**(9): p. 1456-63.
113. Arévalo-Herrera, M., et al., *Plasmodium vivax: transmission-blocking immunity in a malaria-endemic area of Colombia*. *Am J Trop Med Hyg*, 2005. **73**(5 Suppl): p. 38-43.

10. Annexes

TECHNIQUE ELISA

ELISA INDIRECT

a. Réactifs

- Protéine *rPvs48/45*
- PBS 1X
- Sérum à tester ou anticorps primaire
- IgG anti-humaine de chèvre (anticorps secondaire)
- Lait
- Substrat TMB (BD OptEIA, cat 555214)
- Solution de blocage à l'aide d'acide sulfurique 1M (Merck, 1.00731.1000)
- Eau distillée

b. Matériels

- Microplaque ELISA à fond plat
- Plaque de dilution de 1.8ml ou 2ml
- Pipettes de 10 µl, 20 µl
- Pipette multicanale de 50-300 µl
- Embout de 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl
- Gant
- Minuteur de temps
- Papier hygiénique
- Machine de lavage adaptée aux plaques ELISA
- Un lecteur de plaque ELISA (Spectrophotomètre TECAN Nano Quant Infnit M200 PRO)

Procédures

1^{er} JOUR

- Diluer le peptide à 2µg/ml dans du PBS 1X
- Distribuer 50µl de cette solution dans chaque puit d'une plaque de polystyrène à 96 puits
- Couvrir la plaque de para-film
- Et incuber la plaque pendant une nuit à 4°C.

2^{ème} JOUR

- Laver les plaques à l'aide de la machine de lavage des plaques ELISA
- Bloquer avec du PBS1X-lait 3% et incuber pendant une heure à température ambiante.
- Dilué les sérums à tester à 1 :200
- Distribuer 50 µl dans chaque puit et incuber pendant 2 heures à température ambiante
- Laver les plaques à l'aide de la machine de lavage des plaques ELISA
- Diluer l'anticorps secondaire à 1 : 2000
- Distribuer 50 µl dans chaque puit et incuber pendant 1 heure à température ambiante
- Laver les plaques à l'aide de la machine de lavage des plaques ELISA
- Distribuer 50 µl du substrat TMB et laisser agir pendant 25 minutes dans l'obscurité
- Ensuite stopper à l'aide de l'acide sulfurique 1M.
- Lire les plaques à l'aide d'un spectrophotomètre TECAN Nano Quant Infnit M200 PRO à une densité optique (DO) à 450nm/630nm.
- Enregistrer les données.

11. Fiche signalétique

Nom : TANGARA

Prénom : Karamoko

Téléphone : (+223) 62 10 76 32 / 78 73 16 03

Email : tangarakaramoko@gmail.com

Pays d'origine : MALI

Titre de la thèse : Réactivité croisée de la protéine *rPvs48/45* de *P. vivax* avec les sérums des individus vivant dans les zones endémiques à *Plasmodium falciparum* en Afrique.

Année universitaire : 2022-2023

Ville de soutenance : Bamako

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la FMOS/FAPH de Bamako

Source d'intérêt : Immunologie, Parasitologie, Santé Publique

Résumé

Ps48/45 est une protéine de surface des gamétocytes de *Plasmodium* figure parmi les candidats vaccins les plus pertinents contre *P. vivax*. *Pvs48/45* est une protéine orthologue de *P. falciparum* dont les gènes sont hautement conservés et présentent une homologie de séquence globale de 56% entre les deux espèces. Cette étude avait pour but d'évaluer la réactivité de l'antigène *rPvs48/45* aux sérums provenant des individus vivant dans les zones endémiques à *P. falciparum* d'Afrique.

La protéine *rPvs48/45* a montré une bonne réactivité avec les sérums d'individus des quatre pays africains, soit 90% au Mali et le Burkina, 94% en Tanzanie et 40% au Nigeria. Les titres des anticorps étaient plus élevés chez les adultes (≥ 17 ans) que chez les jeunes enfants (≤ 5 ans) au Mali et en Tanzanie ($p < 0,0001$). En outre, les IgG purifiées des différentes fractions éluées ont reconnu la protéine *rPvs48/45*. Cette étude a confirmé que les sérums africains (exposés uniquement à *P. falciparum*) reconnaissent de manière croisée la protéine *rPvs48/45* de *P. vivax* suggérant la possibilité de développer un candidat vaccin multiespèces contre le paludisme.

Mots clés : Réactivité croisée, *Pvs48/45*, *P. falciparum*, Afrique.

Summary

Ps48/45, a surface protein of *Plasmodium* gametocytes is among the most relevant vaccine candidates against *P. vivax*. *Pvs48/45* is an orthologous protein of *P. falciparum* whose genes are highly conserved and have an overall sequence homology of 56% between the two species. The purpose of this study was to evaluate the reactivity of *rPvs48/45* antigen to sera from individuals living in *P. falciparum* endemic areas of Africa.

The *rPvs48/45* protein showed good reactivity with sera from individuals in the four African countries, 90% in Mali and Burkina Faso, 94% in Tanzania and 40% in Nigeria. Antibody titers were higher in adults (≥ 17 years) than in young children (≤ 5 years) in Mali and Tanzania ($p < 0.0001$). In addition, purified IgG of different eluted fractions recognized *rPvs48/45* protein. This study confirmed that African sera (exposed only to *P. falciparum*) cross-recognize the *rPvs48/45* protein of *P. vivax* suggesting the possibility of developing a multispecies malaria vaccine candidate.

Keywords: Cross-reactivity, *Pvs48/45*, *P. falciparum*, Africa.

Serment de Gallien

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 couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.

Je le jure !