

République du Mali
Université des Sciences, des Techniques et des
Technologies de Bamako



Thèse de doctorat en Pharmacie

Année universitaire 2017-2018

N°.....

Titre :

**Relation entre la Réponse Humorale
Anti-PfEMP-1/VarO et le nombre
d'épisode Palustre dans une Cohorte
d'Enfants à Kéniéroba**

Présentée et soutenue publiquement le 08/08/ 2018 devant la Faculté de Pharmacie,
Bamako, Mali

Par Mme Assietou MAÏGA (Eponse MAÏGA) pour obtenir le grade de Docteur en
Pharmacie (Diplôme d'Etat)

Jury

Président du jury :	Professeur Amadou	DIALLO
Membre :	Docteur Charles	ARAMA
Co-directeur :	Docteur Séidina A. S.	DIAKITE
Directeur de thèse :	Professeur Mahamadou	DIAKITE

**Interaction entre la réponse humorale anti-PfEMP-1/VarO et l'incidence palustre chez
une cohorte d'enfants vivant à Kéniéroba**

DEDICACE

Je dédie ce travail :

A ALLAH le Tout Puissant, le Clément, le Très Miséricordieux, tout commence par Lui et tout finit par Lui.

Je te rends grâce de m'avoir donné la vie, le courage et la santé sans quoi ce travail n'aurait été. Puis-je Seigneur jusqu'à la fin de ma vie te servir, t'adorer et de n'effectuer que des œuvres positives et constructives.

Au prophète Mohamed que la paix et le salut soit sur Lui, sa famille, ces compagnons et tous ceux qui l'aiment et empruntent son chemin.

A mon père : Feu Seydou Maïga

Baba nous t'aurions voulu présent ce jour, mais ALLAH le Tout Puissant en a décidé autrement. Ce travail est le tien. Que Dieu le Tout Puissant t'accueille dans sa noble demeure éternelle. Tu vivras éternellement en nous.

A ma maman : Fatoumata Maïga

Maman chérie, les mots ne me suffiront jamais pour te qualifier et exprimer ce que tu représentes pour nous. Tu as été pour nous une mère exemplaire.

Ton affection, tes conseils et ton dévouement pour la réussite de tes enfants n'ont jamais fait défaut. Ce travail est le fruit de ta bravoure.

Je prie le Tout Puissant pour que tes souffrances endurées ne soient pas vaines et qu'IL te prête longue vie et une santé de fer afin que tu puisses continuer à nous conseiller, à nous consoler comme tu l'as toujours fait.

Maman que tes attentes puissent être comblées.

Amen!

A mon mari : Abdoul Aziz Maïga

Pour la confiance et le soutien que tu m'as accordés durant tout ce travail. Que le bon Dieu t'accorde une longue vie. Ce modeste travail est aussi le tien.

REMERCIEMENTS

Amadou Hampate Bah disait : «Quelle que soit la valeur du présent fait à un homme, il n'y a qu'un et un seul mot pour témoigner la reconnaissance inspirée par la libéralité, ce mot c'est : Merci». *Je voudrais à travers ce grand homme de culture africaine, témoigner ma reconnaissance à certaines personnes. Je voudrais dire merci à toutes celles qui de près ou de loin m'ont apporté une aide tant durant mon cycle d'études que pendant ce travail de thèse.*

Je pense particulièrement :

A tous mes frères et sœurs, cousins et cousines.

A toutes mes belles sœurs : Recevez ici l'expression de toute ma reconnaissance et merci pour vos soutiens indéfectibles

A mes amis : Diarrahou Diarra, Fanta Sanogo, hawa kansaye, Mariam Sow, Assetou Sogore etc ... pour tous les bons moments qu'on a passés ensemble. Qu'Allah nous bénisse.

A tous les enseignants de mon ancienne école, « Ecole privé Djéka Fané de Sénou » merci pour toutes les connaissances qu'ils m'ont transmises.

A tous les Professeurs enseignants de la faculté, pour la qualité de leurs enseignements

A Toutes et à tous mes amies

A Bourama Coulibaly

A toute la promotion N'golo Diarra

A Docteur Drissa Konaté : vous m'avez aidé durant tout ce travail de thèse. Vous êtes si simple et généreux. C'est dieu qui vous récompensera.

A Docteur Seidina A.S. DIAKITE : votre simplicité, votre rigueur dans le travail, votre amour pour la recherche ont forcé notre admiration. Vous avez été disponible tout au long de ce travail. Je ne peux que te remercier et te souhaiter tous le bonheur du monde.

A mon Directeur de thèse le Professeur Mahamadou DIAKITE : les moments passés dans votre service me resteront en mémoire à jamais grâce à votre sympathie, votre générosité et la qualité de vos formations. Que dieu vous donne une longue vie pour que nous puissions bénéficier durablement de votre savoir-faire.

A toute l'équipe de l'unité immunogénétique et Hémoglobinopathie du MRTC Docteurs Karim Keita, Ibrahima Sanogo, Mory Doumbouya, Saibou Soumbia, Bourama Keita, feu Amadou Cisse, et Fousseyni Doucouré, les Internes Alkali Doumbia, Fatoumata Kassé, Nouhoum Koné, Sidy Diallo, Alfousseni Maiga) : je vous remercie pour vos participations dans l'élaboration de ce travail.

Enfin mes remerciements vont à l'endroit de tous ceux qui de loin ou de près qui ont contribué à la réalisation de ce travail de thèse.

Liste des abréviations

AMA1 : Apical Membrane Antigen 1

ATS: Acid Terminal Segment

CIDR: Cystein-rich Inter-domaine region

CLAG : Cytoadherence Linked Asexual Gene (Protéine asexuée liée à la cytoadhérence)

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

DBL : Duffy Binding Like

DC: Dendritiques Cell

EBA175: Erythrocyte Binding Antigen 175

ELISA: Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay

EPCR : Endothelial Protein C Receptor

ETRAMP : Early Transcribed Membrane Proteins (protéine membranaire précocement transcrite)

GR : Globule Rouge

GYPA: glycophorine A

IAN : Immunité Acquisée Naturellement

ICAM-1: Inter Cellular adhesion Molecule (molécule d'adhésion intercellulaire-1)

IFN- γ : interféron- γ

IgA : immunoglobuline A

IL : Interleukine

Kda : Kilo Dalton

MSP1 : Merozoite Surface Protein 1

MSP2 : Merozoite Surface Protein 2

NK: Natural Killer

NO: Oxide Nitrogen

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PECAM1 : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule (molécule d'adhésion des plaquettes aux cellules endothéliales)

PfEMP1 : *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1

PHIST: *Plasmodium helical interspersed subtelomeric*

GRP: Globules rouges parasités

PRR : Pattern Recognition Receptor (récepteurs de reconnaissance de Motifs)

STEVOR: *Subtelomeric Variant Open Reading Frame*

SURFIN : *Surface-Associated Interspersed Protein*

TCR : T Cell Receptor (Recepteurs des Cellules T)

TGF- β : Transforming Growth Factor β (facteur de croissance transformant $-\beta$)

Th1: cellules T helper-1

TLR: Toll like Receptor

TNF: Tumor Necrosis Factor

TSP: thrombospondin

VCAM1 : vascular cell adhesion molecule-1

HOMMAGE AUX MEMBRES DU JURY

A notre maître et président du jury Professeur Amadou Diallo

- Professeur honoraire de biologie et de zoologie à la FMOS
- Recteur honoraire de l'Université de Bamako

Cher Maître, Vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider ce jury de thèse malgré vos multiples occupations. Votre rigueur scientifique, votre disponibilité, votre humilité et votre souci du travail bien fait font de vous un maître respectable et admiré. Soyez rassuré de notre profonde reconnaissance.

A notre maître et juge, Docteur Charles ARAMA

- PhD en Immunologie
- Chargé de recherche à la FAPH/USTTB

Cher maître

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail. La qualité de votre contribution fut précieuse et inestimable pour parfaire ce travail.

Trouver ici, cher maître, l'expression de notre reconnaissance.

A notre maître et co-directeur, Docteur Seidina A.S. DIAKITE

- PhD en Immunologie USTTB/UPMC (Paris 6)
- Maître-Assistant d'Immunologie à la FAPH
- Post-Doc à USTTB/WACCBIP

Cher maitre

Vous faites partie des instigateurs de cette œuvre et vous n'avez ménagé aucun effort pour améliorer la qualité et la valeur de celle-ci. Trouver ici maitre, notre reconnaissance et quelques mots de remerciements qui ne pourront à eux seules représenter toute l'estime que nous avons pour vous.

A notre maitre et directeur de thèse Professeur Mahamadou DIAKITE

- DPhil en Immunogénétique à l'Université d'Oxford
- Responsable du Laboratoire Immunogénétique et Parasitologie (MRTC)
- Chef du Département des Affaires Étrangères et de Coopération (USTTB)
- Directeur Scientifique Adjoint du Centre Universitaire de Recherche Clinique
- Secrétaire Permanent du Comité d'Ethique (FMOS/FAPH)

Cher maitre

Toutes les dédicaces à votre endroit ne sauraient suffire pour vous exprimer notre reconnaissance. Votre amour du travail bien fait, la clarté de votre enseignement et votre humilité fait de vous un maître qui inspire respect et admiration. Veuillez accepter maitre, l'expression de notre profond émerveillement.

Table des matières

DEDICACE	i
1. INTRODUCTION	15
2. OBJECTIFS	18
2.1. Objectif général.....	18
2.2. Objectifs spécifiques.....	18
3. GENERALITES	19
3.1. Définition du paludisme.....	19
3.2. Epidémiologie	19
3.3. Agents pathogènes	21
3.4. Cycle du <i>Plasmodium</i>	23
3.4.1. Cycle Chez le moustique (Sporogonie)	23
3.5. Physiopathologie du paludisme	26
3.5.1. Accès palustre simple	27
3.5.2. Accès palustre grave ou compliqué	28
3.6.1. Immunité naturelle ou innée contre le paludisme	34
3.6.2. Liaison entre l'immunité innée et adaptative au paludisme au stade sanguin	37
3.6.3. Immunité acquise ou adaptative contre le paludisme	39
3.6.4. Les mécanismes d'échappement de <i>P. falciparum</i> à l'immunité	42
3.6.5. Familles multigéniques de <i>P. falciparum</i>	43
3.6.6. PfEMP1 - Une famille de protéines parasitaires d'importance clé dans l'immunité et la pathogénèse du paludisme à <i>P. falciparum</i>	49
3.6.7. Réponse immunitaire spécifique à PfEMP-1	54
4. METHODOLOGIE	56
4.1. Cadre d'étude	56
4.2. Type d'étude	57
4.3 Période d'étude	57
4.4. Population d'étude	57
4.5. Critère d'inclusion	58
4.6. Critère de non inclusion	58
4.7. Echantillonnage.....	58
4.8. Variables mesurés	59
4.9. Collecte des données	59

4.10. Technique de laboratoire.....	59
4.10.1. Techniques de goutte épaisse et de frottis mince	59
L.....	59
4.10.2. Dosage des anticorps anti-varO	59
4.11. Déroulement et procédure de l'étude	60
4.12. Gestion et analyse statistique des données.....	61
4.13. Considérations éthiques	62
5. Représentation schématique de la procédure	63
5. RESULTATS	64
5.1. Résultats globaux	64
5.2. Caractéristiques sociodémographiques des participants	64
5.3. Résultats chimique et immunologique :.....	66
6. COMMENTAIRES ET DISCUSSION	74
7. CONCLUSION ET RECOMMANDATION.	82
7.1. Conclusion	82
7.2. Recommandations.....	82
8. LIMITES DE NOTRE ETUDE	83
9. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	84
10. FICHE SIGNALETIQUE	95
TECHNIQUE DE LA GOUTTE EPAISSE	98
Procédures Standard Opératoires (SOP) : Frottis Mince	101
Matériel.....	102
Lieu du prélèvement	102
Technique.....	102
Coloration avec l'Hemacolor®.....	103
Méthode de la numération des parasites du paludisme dans les frottis mince	104
SERMENT DE GALIEN	109

Liste des figures

Figure 1 : Cycle de développement de <i>P. falciparum</i>	26
Figure 2 : Illustration de l'immunité contre le paludisme indépendant des cellules T [41].	36
Figure 3 : Illustration de la Liaison entre l'immunité innée et adaptative au paludisme au stade sanguin [41].....	39
Figure 4 : Illustration de la séquestration des globules rouges parasités au cours du cycle de vie de <i>P. falciparum</i> [87].....	48
Figure 5 : Organisation chromosomique des gènes var de <i>P. falciparum</i> et du domaine architectural de <i>P. falciparum erythrocyte membrane protein-1</i> (PfEMP1) [95].....	51
Figure 6 : Sites d'étude Source: Unité GIS MRTC/FMPOS.....	56
Figure 7 : Plan de masse des trois villages d'étude dans la commune rurale de Bancoumana - Source: Unité GIS MRTC/FMPOS.....	57
Figure 8 : Schema de la procédure de l'étude	63
Figure 9 : Répartition des participants en fonction du sexe	64
Figure 10 : Répartition des participants en fonction des classes d'âge.....	65
Figure 11 : Répartition des participants en fonction de l'ethnie	65
Figure 12: Répartition des participants en fonction du nombre des épisodes palustres	66
Figure 13 : Technique de la goutte épaisse.....	99
Figure 14 :Technique du frottis mince	105

Liste des tableaux

Tableau I. Classification des niveaux d'endémicité de la transmission du paludisme au Mali	21
Tableau II : Familles multigéniques dans les régions subtélomériques de <i>Plasmodium falciparum</i> (http://plasmodb.org)	47
Tableau III : Répartition des participants en fonction du sexe et des classes d'âge	67
Tableau IV : Taux moyens des anticorps anti-PfEMP-1/VarO en fonction des classes d'âge en pré- et post-saison	68
Tableau V: Taux moyens des anticorps anti-PfEMP-1/VarO en fonction du sexe en pré- et post-saison.....	69
Tableau VI : Taux moyen des anticorps anti-PfEMP-1/VarO en fonction de l'ethnie.....	70
Tableau VII : taux moyen d'anticorps en amont de la saison de transmission en fonction du nombre d'épisode	71
Tableau VIII : Variation moyenne du taux des anticorps anti-PfEMP-1/VarO au cours de la saison de transmission en fonction du nombre d'épisode palustre chez les enfants de Kéniéroba en 2011.....	72

1. INTRODUCTION

Le paludisme est une infection parasitaire causée par un protozoaire du genre *Plasmodium*, transmis à l'homme par la pique de moustiques femelles infectés du genre *Anopheles*. Il constitue l'une des maladies parasitaires les plus répandues au monde. Malgré les grandes avancées enregistrées dans la lutte contre ce fléau au cours de la décennie écoulée, il demeure un véritable problème majeur de santé publique. L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime dans son rapport 2016 à 212 millions de nouveaux cas de paludisme et 429 000 décès dus à la maladie à travers le monde [1]. L'Afrique reste le continent le plus touché par cette maladie, 90% des cas et 92% des décès dus à la maladie surviennent en Afrique subsaharienne [1]. Au Mali, le paludisme représente 40% des motifs de consultation dans les formations sanitaires et sa prévalence est estimée à 36% chez les enfants de moins de 5 ans selon l'enquête sur les indicateurs du paludisme en 2015 [2]. Les femmes enceintes constituent avec les enfants les couches les plus vulnérables pour cette maladie [1].

La lutte contre le paludisme fait face à de nombreux obstacles notamment l'émergence de la résistance des parasites du paludisme aux antipaludéens [3, 4], la résistance des moustiques aux insecticides [5] et la situation politico-sécuritaire dégradée. L'un des plus grands challenges dans la lutte contre le paludisme est l'absence de vaccin efficace. Les efforts déployés dans le développement des vaccins contre le paludisme ont connu peu de succès à cause de la complexité biologique du parasite qui lui offre un avantage dans l'évasion du système immunitaire de l'hôte [6]. En zone d'endémie palustre, les personnes âgées développent une immunité antipalustre qui réduit considérablement l'incidence et la gravité du paludisme chez ces personnes [7]. En effet, de nombreux antigènes du *Plasmodium* des stades pré-érythrocytaires

et érythrocytaires immunogènes ont été évalués comme candidats vaccins. A ce titre, les protéines de *P. falciparum* exprimées à la surface des érythrocytes infectés appelées PfEMP (*Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein*) ont fait l'objet de beaucoup d'investigation car exprimées pendant la phase clinique de la maladie.

Le mécanisme complexe de régulation et d'expression de ces gènes (variation cyclique) atténue l'efficacité des anticorps anti-PfEMP1 contre l'infection palustre [8]. Les variants de PfEMP1 ont été classés en 3 groupes A, B et C et en groupes intermédiaires A/B et B/C [9, 10]. Certains variants de PfEMP-1 se distinguent par leur plus grande virulence notamment le variant PfEMP-1/VarO. C'est un PfEMP-1 du Groupe A impliqué dans la formation *in-vitro* des rosettes, un phénotype associé à la gravité du paludisme [11]. En effet, la structure du variant PfEMP-1/VarO présente un domaine DBL1 α (Domaine de fixation du Duffy) suivant directement le segment N terminal (NTS). Cette structure NTS-DBL1 α est impliquée dans la formation des rosettes [12] Ce variant de PfEMP1 est bien immunogène et des titres élevés d'anticorps anti-PfEMP-1/VarO ont été décrits chez les sujets âgés au Bénin et au Sénégal [13]. Ces anticorps ont été associés à une protection contre le paludisme en général et les cas graves en particulier [11].

En absence de vaccin efficace contre le paludisme, une approche plus spécifique est envisageable. En effet, il serait intéressant d'investiguer le développement de vaccins spécifiques contre certaines manifestations graves de la maladie comme chez les femmes enceintes ou spécifiques de souche. Ainsi, cette étude porte sur la réponse immunitaire humorale spécifique au variant PfEMP-1/VarO à Kéniéroba, un village hyper endémique palustre ayant une transmission saisonnière intense.

Interaction entre la réponse humorale anti-PfEMP-1/VarO et l'incidence palustre chez une cohorte d'enfants vivant à Kéniéroba

Hypothèses de travail:

La réponse humorale anti-PfEMP-1/VarO varie selon la saison de transmission et le nombre d'épisode palustre chez les enfants vivant à Kéniéroba.

2. OBJECTIFS

2.1. Objectif général

Etudier la réponse humorale anti-PfEMP-1/VarO chez une cohorte d'enfants vivant à Kéniéroba au cours de la saison de transmission 2011.

2.2. Objectifs spécifiques

- Déterminer le taux d'anticorps anti-PfEMP-1/VarO chez une cohorte d'enfant de Kéniéroba au début et à la fin de saison de transmission en 2011 ;
- Déterminer le nombre d'épisodes de paludisme chez les enfants de la cohorte au cours de la saison de transmission 2011 ;
- Déterminer la variation des taux des anticorps anti-PfEMP-1/VarO au cours de la saison de transmission chez les enfants de la cohorte ;
- Etablir la corrélation entre le nombre d'épisodes et les taux des anticorps anti-PfEMP-1/VarO.

3. GENERALITES

3.1. Définition du paludisme

Le paludisme est une érythrocytopathie fébrile et hémolysante, due à la présence et à la multiplication dans l'organisme d'un hématozoaire du genre *Plasmodium*, transmis à l'homme par la piqûre infestante d'un moustique femelle du genre *Anopheles*.

3.2. Epidémiologie

Dans une population donnée, un certain nombre de variables permet de quantifier rapidement la situation du paludisme :

- l'indice splénique,
- l'indice plasmodique.

L'indice splénique (IS) correspond à la proportion des enfants âgés de 2 à 9 ans présentant une rate palpable. L'indice plasmodique (IP) correspond à la proportion des enfants âgés de 2 à 9 ans ayant le *Plasmodium* dans leur sang.

Le paludisme au Mali est particulièrement endémique dans les régions du centre et du sud et épidémique dans les régions désertique du nord. Il y'a une extrême variabilité de la situation épidémiologique en fonction des faciès géoclimatiques. Il existe cinq modalités épidémiologiques de transmission du paludisme au Mali [14] :

- la zone de transmission saisonnière longue de quatre à six mois au Sud correspondant à la région Soudano-guinéenne (régions de Sikasso, sud des régions de Ségou, Koulikoro et Kayes). Le paludisme y est holoendémique

avec un indice plasmodique constamment supérieur à 75% de juin à novembre ;

- la zone de transmission saisonnière courte de quatre mois dans les régions de la savane nord soudano-sahélienne (régions de Mopti, nord des régions de Ségou, Koulikoro et Kayes). Le paludisme y est hyper-endémique avec un indice plasmodique variant entre 50 et 75% ;
- la zone subsaharienne au Nord où la transmission est sporadique voire épidémique (régions de Tombouctou, Gao et Kidal). L'indice plasmodique est inférieur à 5% ;
- la zone du delta inférieur du fleuve Niger (Office du Niger) et les zones de retenue d'eau et de riziculture (barrages de Sélingué et Manatali) où la transmission est bimodale voire plurimodale en début de la saison des pluies, au cours de la période de décrue et de mise en eau des casiers rizicoles. Le paludisme est de type mésoendémique avec un indice plasmodique inférieur à 40% ; et
- le milieu urbain, en particulier Bamako et Mopti, qui est impropre à l'impaludation (pollution des gîtes larvaires, automédication élevée, etc.). Le paludisme y est de type hypoendémique avec un indice plasmodique inférieur à 10% (tableau 1).

Tableau I. Classification des niveaux d'endémicité de la transmission du paludisme au Mali.

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

3.3. Agents pathogènes

L'agent pathogène du paludisme est un hématozoaire du genre *Plasmodium*, appartenant à la famille des *Plasmodidae*, à l'embranchement des *Sporozoa*, au sous phylum des *apicomplexa* (*sporozoa*), à la classe des *haemosporidea* et à l'ordre des *Haemosporidae*, caractérisé par la présence d'un complexe apical

Interaction entre la réponse humorale anti-PfEMP-1/VarO et l'incidence palustre chez une cohorte d'enfants vivant à Kéniéroba

jouant un rôle important dans la sécrétion des organelles et l'orientation du *Plasmodium* lors de l'invasion du globule rouge par le parasite.

Cent soixante-douze (172) espèces de *Plasmodium* ont été enregistrées qui infectent les oiseaux, les reptiles et les mammifères mais seulement cinq ont été retrouvés en pathologie chez l'homme. Ces espèces de *Plasmodium* diffèrent par des critères biologiques, cliniques, leur répartition géographique et leur capacité à développer des résistances aux différents antipaludiques.

-*Plasmodium falciparum* : C'est l'espèce la plus répandue et la plus redoutable surtout en Afrique. Il représente 80 à 95% de la formule parasitaire. Il est transmis pendant toute l'année avec des recrudescences saisonnières dans les régions tropicales. Cette transmission s'interrompt lorsque la température chute en dessous de 18°C. Sa période d'incubation est de 7 à 12 jours et il est responsable des formes cliniques graves.

- *Plasmodium vivax* : C'est l'espèce rencontrée surtout en Amérique du Sud et en Asie. Il est rarement observé en Afrique noire où la majorité de la population est du groupe sanguin érythrocytaire Duffy négatif. Sa période d'incubation est de 11 à 13 jours et est responsable de la fièvre tierce bénigne et des rechutes.

-*Plasmodium malariae* : Il se rencontre en Afrique de façon sporadique et sa période d'incubation est plus longue que les autres, environ 15 à 21 jours. Cette espèce est responsable de la fièvre quarte bénigne. Parfois, elle peut entraîner des complications rénales.

-*Plasmodium ovale* : Il sévit surtout en Afrique intertropicale et dans certaines régions du Pacifique. Sa période d'incubation est d'au moins 15 jours. Cette

espèce provoque la fièvre tierce et son évolution est bénigne mais est responsable des rechutes au même titre que *P. vivax*.

-*Plasmodium knowlesi* : Il est proche de *malariae* responsable de fièvre quotidienne et rarement responsable de formes cliniques graves. Aucune chimiorésistance n'a été observée avec cette espèce. *P. knowlesi* a été surtout décrit chez les singes et récemment retrouvé en pathologie chez l'homme en Malaisie [15].

3.4. Cycle du *Plasmodium*

Le parasite du paludisme a un cycle hétéroxène à deux hôtes : un hôte vertébré chez lequel la reproduction asexuée s'accomplit (***hôte intermédiaire***) et un insecte piqueur chez lequel s'accomplit la reproduction sexuée (***hôte définitif***). L'insecte est, en même temps, responsable de la transmission de la maladie.

3.4.1. Cycle Chez le moustique (Sporogonie)

Il s'agit du moustique appartenant au règne animal, au sous-règne des métazoaires, à l'embranchement des arthropodes, au sous-embranchement des Tracheates, à la classe des insectes, à la sous classe des Ptérygotes, à l'ordre des Diptères, au sous-ordre des Nématocères, et à la famille des Culicidés. Cette famille comprend quatre sous famille : *Anophelinae*, *Toxorhynchitinae*, *Aedinae*, et la sous famille des *Culicinae* qui est l'hôte définitif (HD) du cycle de développement du *Plasmodium*. Lors d'un repas sanguin sur un individu infecté, l'anophèle femelle ingère des formes sexuées du *Plasmodium*, les gamétocytes mâles (micro gamétocytes) et femelles (macro gamétocytes). Ceux-ci parviennent dans l'estomac du moustique et se transforment en gamètes. Le gamète mâle subit un processus d'ex flagellation à la suite duquel les gamètes femelles sont fécondés. Il en résulte un zygote diploïde appelé ookinète ou œuf mobile. Celui-ci s'implante sous la paroi stomacale de

l'anophèle en formant l'oocyste. Cette brève phase diploïde s'achève par une division méiotique suivie de plusieurs milliers de mitose qui conduit à la production de sporozoïtes.

L'éclatement de l'oocyste libère ces éléments mobiles et haploïdes dans l'hémolymphe. Les sporozoïtes gagnent préférentiellement les glandes salivaires du moustique d'où ils pourront être injectés avec la salive lors d'une piqûre infestant. On estime que les glandes salivaires d'un moustique contiennent jusqu'à 6 000 sporozoïtes et que le nombre de sporozoïtes inoculés au cours d'un repas sanguin est le plus souvent compris entre 20 et 30 [16]. Chez le moustique, l'ensemble de ce cycle se déroule entre 8 et 30 jours, suivant la température extérieure et l'espèce en cause. Plusieurs facteurs influencent le développement du parasite chez le moustique.

La température vient en première position : en dessous de 18°C et au-dessus de 35°C, le cycle sporogonique de *P. falciparum* est arrêté. Ensuite, suivie par la densité des gamétocytes et leur pouvoir infectant, l'âge des gamétocystes (3 à 5 jours après les premières exflagellation semblent être l'optimum) et leur sex-ratio (une proportion relativement élevée de mâles est favorable à l'infection des moustiques), de même que le statut immunitaire et le type d'hémoglobine du porteur de gamétocytes, ont aussi une influence positive sur l'infection des vecteurs [17]. Pour transmettre le paludisme, le moustique doit survivre plus de 7 jours. Les moustiques les plus efficaces dans la transmission du *Plasmodium* sont les moustiques du genre *Anopheles* (*A. gambiae s.l.* en Afrique) qui vivent plus longtemps, survivent en grande densité dans les climats tropicaux, se nourrissent volontiers, se reposent à l'intérieur des maisons et piquent l'homme de préférence par rapport aux autres animaux.

3.4.2. Cycle chez l'homme

Lorsqu'un moustique infesté pique un homme, il injecte le parasite avec sa salive sous la forme de sporozoïtes, éléments infectants, vermiformes de 4 à 5 µm de long, qui sont entraînés dans la circulation générale. La piqûre de 5 moustiques infectés suffit pour assurer un taux d'infection de 100% chez des volontaires [18]. Les sporozoïtes du *Plasmodium*, une fois chez l'homme, atteignent le foie et migrent à travers les cellules de Küpffer et finit par infecté un hépatocyte grâce à leur complexe apical [19]. Dans le foie, les sporozoïtes se divisent de très nombreuses fois (schizogonie). Cette phase, cliniquement asymptomatique (cycle exo-érythrocytaire), peut durer entre 7 jours et quelques semaines, suivant les espèces plasmodiales. Cette multiplication aboutit à un éclatement des hépatocytes et à la mise en circulation de plusieurs milliers de mérozoïtes capables d'envahir les globules rouges.

Chaque mérozoïte se divise pour donner naissance de 8 à 34 nouveaux parasites (mérozoïtes), capables à leur tour d'envahir d'autres globules rouges. Ce cycle dure de 48 à 72 heures selon les espèces. Après un certain nombre de cycles, spontanément ou sous l'effet d'une pression médicamenteuse, quelques parasites se différencient en gamétocytes mâles et femelles dont le potentiel sexué est bloqué jusqu'à leur absorption par l'anophèle. A la suite d'une nouvelle piqûre par un anophèle, les gamétocytes mâles et femelles qui vont s'unir en son sein pour conduire à la formation de sporozoïtes qui sont prêts à infecter une autre personne (figure 1).

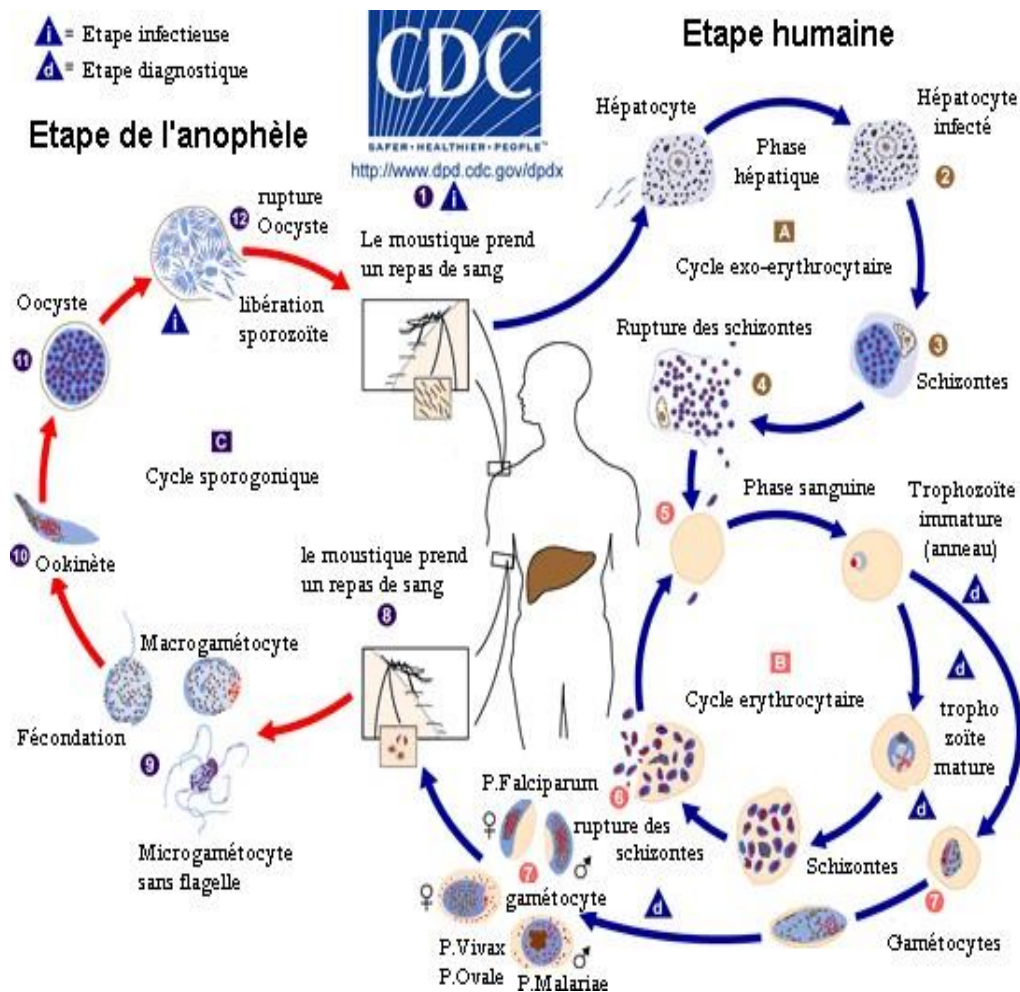


Figure 1 : Cycle de développement de *P. falciparum*

Source : <https://www.dpd.cdc.gov/dpdx> (consulte le 31/05/2018)

3.5. Physiopathologie du paludisme

De toutes les espèces de *Plasmodium* qui infectent l'homme, *P. falciparum* est le plus dangereux, qui tue l'homme. *P. falciparum* est associé à une mortalité élevée et les symptômes peuvent progresser vers le coma et à la mort. Les personnes qui résident en zones d'endémie sont exposées constamment aux infections palustres. Dans ces zones, la majorité des cas reste asymptomatique, seule une minorité des cas évolue vers le paludisme symptomatique et 1 à 2% vers les formes graves et compliquées [20].

Trois éléments déterminent la pathologie liée à l'infection par le *Plasmodium* : le parasite, l'hôte et l'environnement. Des interactions spécifiques interviennent entre le parasite et l'environnement et aboutissent à diverses manifestations cliniques de la maladie.

3.5.1. Accès palustre simple

Les symptômes de la maladie débutent au stade érythrocytaire du cycle de développement du parasite. La fièvre au cours du paludisme simple se manifeste au moment de la lyse des globules rouges qui libèrent les mérozoïtes, l'hémozoïne (pigment malarique) et d'autres antigènes parasitaires. Il a été découvert que la fièvre n'est pas propre au *Plasmodium*, mais est due à des cytokines libérées par les macrophages et les cellules endothéliales de l'hôte [21]. Plusieurs cytokines ont un effet pyrogène telles que l'IL-1, l'IL6, la lymphotoxine β et surtout le TNF- α dont le lien avec la fièvre a été le mieux établi [22, 23]. Ces cytokines se comportent comme des pyrogènes endogènes en stimulant le centre thermorégulateur hypothalamique.

La fièvre apparaît lorsque la parasitémie atteint un seuil critique, variable d'un sujet à un autre et d'une souche parasitaire à une autre. La fièvre est le symptôme majeur du paludisme et est utilisée comme marqueur du paludisme maladie [24]. Elle constitue le principal critère clinique pour apprécier la morbidité palustre chez les enfants et les sujets non-immuns. L'allure de la fièvre change selon les espèces de *Plasmodium*. Lors de la primo-invasion, le cycle érythrocytaire est généralement non synchronisé ; la fièvre prend une allure continue ou irrégulière. Quand le cycle se synchronise, elle prend une allure de fièvre intermittente, tierce ou quarte selon les espèces plasmodiales [21].

La physiopathologie de l'anémie palustre à *P. falciparum* est multifactorielle. L'anémie se définit comme une réduction du taux d'hémoglobine en dessous de

Interaction entre la réponse humorale anti-PfEMP-1/VarO et l'incidence palustre chez une cohorte d'enfants vivant à Kéniéroba

l'échelle normale pour l'âge, le sexe, et l'état de grossesse dans une zone endémique et en présence d'une parasitémie quelle que soit la densité parasitaire. L'anémie palustre survient au moment de l'éclatement et la libération des mérozoïtes conduisant à la diminution du taux d'hémoglobine. De nombreux enfants présentant une anémie sévère sans goutte épaisse positive répondent bien au traitement antipalustre [20].

En Afrique, l'infection palustre est une cause majeure d'anémie chez les femmes enceintes et les jeunes enfants. L'anémie sévère est une des plus importantes complications du paludisme chez les enfants vivant en zone endémique, spécialement chez ceux infectés par *P. falciparum* [20, 25]. Lors de l'infection palustre, le système phagocytaire (monocyte-macrophage) débarrasse l'organisme non seulement des pigments malariques mais aussi des débris érythrocytaires ce qui entraîne l'hépto-splénomégalie [26].

3.5.2. Accès palustre grave ou compliqué

Le paludisme simple mal ou non traité peut se compliquer. Seul *P. falciparum* et dans certains cas, *P. vivax*, sont à l'origine des complications grave du paludisme. Ces complications s'observent chez les sujets non-immuns (jeunes enfants, femmes enceintes, expatriés, personnes vivants en zone hypoendémique).

La schizogonie profonde de *P. falciparum* est à l'origine des complications redoutables telles que le neuropaludisme celui-ci consiste à des thromboses capillaires responsables des lésions vasculaires et hémorragiques provoquant des altérations dégénératives des cellules nerveuses entourées d'infiltrats

cellulaires [27]. La physiopathologie du paludisme grave repose sur deux phénomènes indissociables :

- la séquestration des hématies parasitée, et
- le phénomène immunologique.

3.5.2.1. La Séquestration des hématies parasitées :

La séquestration se décompose en trois mécanismes : l'auto-agglutination, la formation de rosettes et la cytoadhérence.

➤ Phénomène d'auto- agglutination

L'auto-agglutination des hématies parasitées a été observée sur de nombreuses souches de *P. falciparum* étudiées en culture au laboratoire. Il s'agit d'un regroupement des érythrocytes infectés entre eux pour former des micro-agrégats susceptibles d'obstruer les capillaires profonds, phénomènes secondaire et probablement favorisé par les plaquettes. Cet événement a été observé chez les sujets porteurs de forte parasitémie en dehors de tout phénotype d'adhésion. Les mécanismes moléculaires qui prédisposent à sa survenue sont encore mal connus.

➤ Phénomène de formation des rosettes « ou rosetting »

Les érythrocytes parasités ont la capacité de drainer au tour d'elles des érythrocytes sains matures pour former des rosettes : c'est le phénomène de « rosetting ». Les protéines parasitaires exprimées à la surface des érythrocytes infectés telles que le PfEMP-1 et leurs récepteurs présents sur l'érythrocyte comme le CD36, CR1, et certaines lectines [28, 29] semblent être impliqués dans le phénomène. Les anticorps (IgM et IgG) et certains composants du complément (C3b et C4b) jouent aussi un rôle dans ce phénomène à travers le CR1. Il aboutit à la formation d'un agrégat qui contribue à l'obstruction des petits vaisseaux sanguins. Ce phénomène a été bien étudié *in-vitro* sur des

lignées cellulaires (fibroblastes). Il varie d'une souche plasmodiale à l'autre et a été corrélé au degré de sévérité du paludisme [12, 30]. Le rosetting a été impliqué dans les complications du paludisme sévère au cours de nombreuses études [31].

Tous les isolats de *P. falciparum* issus de sujets ayant le paludisme grave sont capables d'induire le rosetting alors que beaucoup d'isolats issus de sujets ayant l'accès palustre simple en étaient incapables [32]. Le rosetting a aussi été observé *in-vitro* avec *P. vivax* [33, 34]. La formation de rosettes constitue un mode de protection pour le parasite contre le système phagocytaire de la rate et exerce un effet délétère sur l'hôte par blocage du flux sanguin.

➤ **Phénomènes de cytoadhérence**

La cytoadhérence est un mécanisme par lequel des érythrocytes parasités matures de *P. falciparum* s'attachent de manière spécifique aux cellules endothéliales des petits vaisseaux (artérioles, capillaires, et veinules post-capillaires). C'est ce qui explique, en partie, l'absence de formes matures de *P. falciparum* dans le sang périphérique. Ce phénomène permet au *Plasmodium* de se développer plus facilement grâce à un environnement gazeux favorable et d'échapper à la clairance splénique. La cytoadhérence est l'interaction cellulaire la mieux étudiée dans la pathogénèse du paludisme. Ainsi, de multiples molécules présentes sur les érythrocytes parasités et les cellules endothéliales impliquées dans ce phénomène ont été identifiées : l'ICAM-1, le VCAM-1, l'E-selectine, la Thrombospondine, le PECAM (Platelet-Endothelial cell Adhesion Molecule), l'antigène du groupe sanguin A, les IgM non-immunes, le CD36 [35, 36].

Enfin, PfEMP-1 apparait comme le plus important ligand parasitaire impliqué dans ce mécanisme [37, 38]. L'adhésion de l'hématie infectée à ces récepteurs conduit à leur séquestration à l'intérieur de la microcirculation. La séquestration permet aux hématies parasitées d'échapper à la clairance splénique et contribue à la gravité du paludisme. Elle entraîne aussi une obstruction des microvaisseaux surtout au niveau cérébral qui semble être la principale cause du neuropaludisme. La séquestration entraînerait aussi une dilatation des microvaisseaux par la libération du monoxyde d'azote (NO), responsable de l'œdème cérébral et pulmonaire [39].

3.5.2.2. Les phénomènes immunologiques

C'est une conséquence directe du phénomène de séquestration. Il s'agit de phénomène inflammatoire dû à l'action des cytokines pro inflammatoires dont le chef de file est le TNF α . Une grande partie de la pathophysiologie résulte de la production surabondante de cytokines, qui provoquent des paroxysmes douloureux de fièvre et de frissons, une anémie sévère et le paludisme cérébral souvent mortels chez les jeunes enfants. La nature de la réponse immunitaire innée au paludisme est un élément important de la pathophysiologie de cette maladie. Nous croyons qu'une grande partie de cette réponse immunitaire innée est activée par la reconnaissance de l'ADN parasitaire par les phagocytes.

3.6. Immunité antipalustre

L'immunité naturellement acquise contre le paludisme à *P. falciparum* protège des millions de personnes régulièrement exposées à l'infection à *P. falciparum* contre les maladies graves et la mort. Il n'y a pas de concept clair sur le fonctionnement de cette protection. Il n'y a pas d'accord général sur le niveau d'acquisition de l'immunité protectrice anti palustre ou sur ce qui constitue les principaux déterminants de la protection ; encore moins sur le(s) mécanisme(s) de protection. Cette revue de la littérature résume ce que l'on connaît de

l'immunité acquise naturellement et induite expérimentalement contre le paludisme à l'aide des connaissances évolutives fournies par la biotechnologie et place ces connaissances dans le contexte d'observations historiques, cliniques et épidémiologiques.

Nous préconisons que l'immunité acquise naturellement devrait être appréciée comme étant pratiquement 100% efficace contre les maladies graves et la mort chez les adultes fortement exposés. Même l'immunité qui se produit chez les nourrissons exposés peut dépasser l'efficacité de 90%. L'induction d'un statut immunitaire semblable à celui d'un adulte chez les nourrissons à haut risque en Afrique subsaharienne diminuerait considérablement les maladies et les décès causés par *P. falciparum*. Le mécanisme de l'immunité acquise naturellement chez les adultes vivant dans des zones hyperendémiques à holoendémiques doit être compris en vue de reproduire cette protection chez les nourrissons et les jeunes enfants dans les zones endémiques palustres.

Chez l'homme, différents types d'immunité acquise contre les plasmodies ont été définis : (i) l'immunité antiparasitaire, qui confère une protection contre la parasitémie, qui affecte la densité des parasites ; et (ii) la prémunition, qui offre une protection contre les nouvelles infections en maintenant une parasitémie de faible densité et généralement asymptomatique [40]. Ici, la protection est définie comme la preuve objective d'un risque plus faible de maladie clinique, comme l'indique à la fois l'absence de fièvre (température axillaire $>37,5^{\circ}\text{C}$) avec une parasitémie et des densités parasitaires plus faibles. Dans toute l'Afrique subsaharienne où la maladie est holoendémique, la plupart des personnes sont presque continuellement infectées par *P. falciparum*, et la majorité des adultes

infectés sont rarement atteints d'une maladie grave. Ils vont à l'école, au travail et aux tâches ménagères, se sentant essentiellement en bonne santé malgré une population de parasites dans leur sang qui s'avérerait presque universellement mortelle pour un visiteur naïf. Cette vigueur face à l'infection est l'immunité acquise naturellement (IAN) au paludisme à *P. falciparum*.

Les adultes ont une IAN, mais les nourrissons et les jeunes enfants, du moins occasionnellement, n'en ont pas. L'IAN est compromise chez les femmes enceintes, en particulier les primigravides, et les adultes vivant en dehors de leurs infections de routine. Ils semblent perdre l'IAN, du moins temporairement. Les interventions qui réduisent l'exposition en dessous d'un niveau capable de maintenir l'IAN risquent la possibilité d'un rebond catastrophique, comme cela s'est produit dans les hautes terres de Madagascar dans les années 1980, avec une épidémie de paludisme tuant plusieurs personnes. L'exposition systématique au paludisme hyper endémique à holoendémique protège une majorité d'individus tout en tuant une minorité. Les interventions intenses qui ne considèrent que les minorités vulnérables risquent de compromettre ou d'éliminer la protection solide contre le paludisme grave dans la majorité des cas.

Au cours de son cycle de vie complexe et à plusieurs stades, le *Plasmodium* n'exprime pas seulement une grande variété de protéines à différents stades, mais la nature de ces protéines change aussi souvent. Par conséquent, une infection naturelle par le *Plasmodium* n'entraîne qu'une immunité partielle et de courte durée qui ne permet pas de protéger l'individu contre une nouvelle infection. L'interaction complexe des protéines parasitaires avec le système

immunitaire de l'hôte a également rendu difficile, voire impossible, la mise au point d'un vaccin efficace contre la maladie jusqu'à présent. L'immunité contre le paludisme peut être classée en immunité naturelle ou innée et immunité acquise ou adaptative.

3.6.1. Immunité naturelle ou innée contre le paludisme

L'immunité naturelle ou innée contre le paludisme est une résistance inhérente de l'hôte qui empêche l'établissement de l'infection ou une réponse inhibitrice immédiate contre l'introduction du parasite. L'immunité innée est naturellement présente chez l'hôte et ne dépend d'aucune infection antérieure. On a constaté que les altérations de la structure de l'hémoglobine ou de certaines enzymes confèrent une protection contre l'infection ou ses manifestations graves, et ces caractéristiques se retrouvent souvent dans les régions où la transmission du paludisme est élevée.

La négativité du groupe sanguin Duffy dans les globules rouges protège généralement contre l'infection à *P. vivax*. Il est largement répandu en Afrique, ce qui pourrait être responsable de la quasi-élimination de ce parasite sur le continent. Certaines thalassémies (réduction de 50% de l'infection), l'hémoglobine C homozygotes (réduction de 90 %), l'hémoglobine E et le statut de porteur de l'ovalocytose ont été signalés comme conférant une protection contre *P. falciparum* ou *P. vivax*. Le déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase (protection à 50%) et l'hémoglobine drépanocytaire (protection à 90%) confèrent une protection contre le paludisme grave et la mortalité associée [1]. L'infection palustre aiguë induit également une réponse

immunitaire immédiate et non spécifique qui tend à limiter la progression de la maladie.

Les mécanismes humoraux et cellulaires de cette défense " non spécifique " sont mal définis. Les lymphocytes T extrathymiques primitives [*Natural Killer* (NK) 1.1, les récepteurs de cellules T (TCR) intermédiaires (TCRint)] et les cellules B-1 productrices d'anticorps naturelles ont été considérés comme les principaux moteurs de cette réponse. Les cellules tueuses naturelles (NK) se trouvent dans le sang, dans les organes lymphoïdes secondaires ainsi que dans les tissus périphériques non lymphoïdes. Les cellules apparentées qui jouent probablement un rôle dans l'immunité innée contre le paludisme sont les cellules NKT qui, chez la souris, portent à la fois le marqueur de surface NK1.1 et les récepteurs des cellules T (TCR).

Il a été démontré que les cellules NK augmentent en nombre et sont capables de lyser *in-vitro* les érythrocytes infectés par *P. falciparum*. Les cellules NK dans le sang périphérique produisent de l'interféron gamma en réponse aux érythrocytes infectés par le *Plasmodium*, ce qui conduit à l'activation parasiticide des macrophages, ce qui peut être plus important pour l'immunité innée du paludisme que leur potentiel de lyse des érythrocytes hôtes infectés. Ces cellules sont également importantes dans l'initiation et le développement de réponses immunitaires adaptatives. Les cellules NK induisent la production de la chémokine pro-inflammatoire Interleukine-8, qui joue à son tour son rôle dans le recrutement et l'activation d'autres cellules au cours de l'infection palustre. Les cellules dendritiques (DC), les macrophages, les cellules T gamma delta et les cellules NKT détectent également la présence du parasite et participent à la réponse immunitaire.

Les cellules NKT sont de puissants inhibiteurs de la réplication du parasite au stade hépatique dans les systèmes paludéens in-vitro. On a signalé que les cellules T murines CD4 NK1.1 régulent la réponse des anticorps IgG contre la protéine de *P. falciparum* glycosylphosphatidyl inositol (GPI), ce qui peut être important pour un contrôle parasitaire rapide, spécifique mais sans restriction du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). L'infection palustre donne lieu à des concentrations sanguines fortement élevées d'immunoglobulines non spécifiques contre le paludisme, mais l'importance de l'activation polyclonale sous-jacente des cellules B de l'immunité innée n'est pas connue[40].

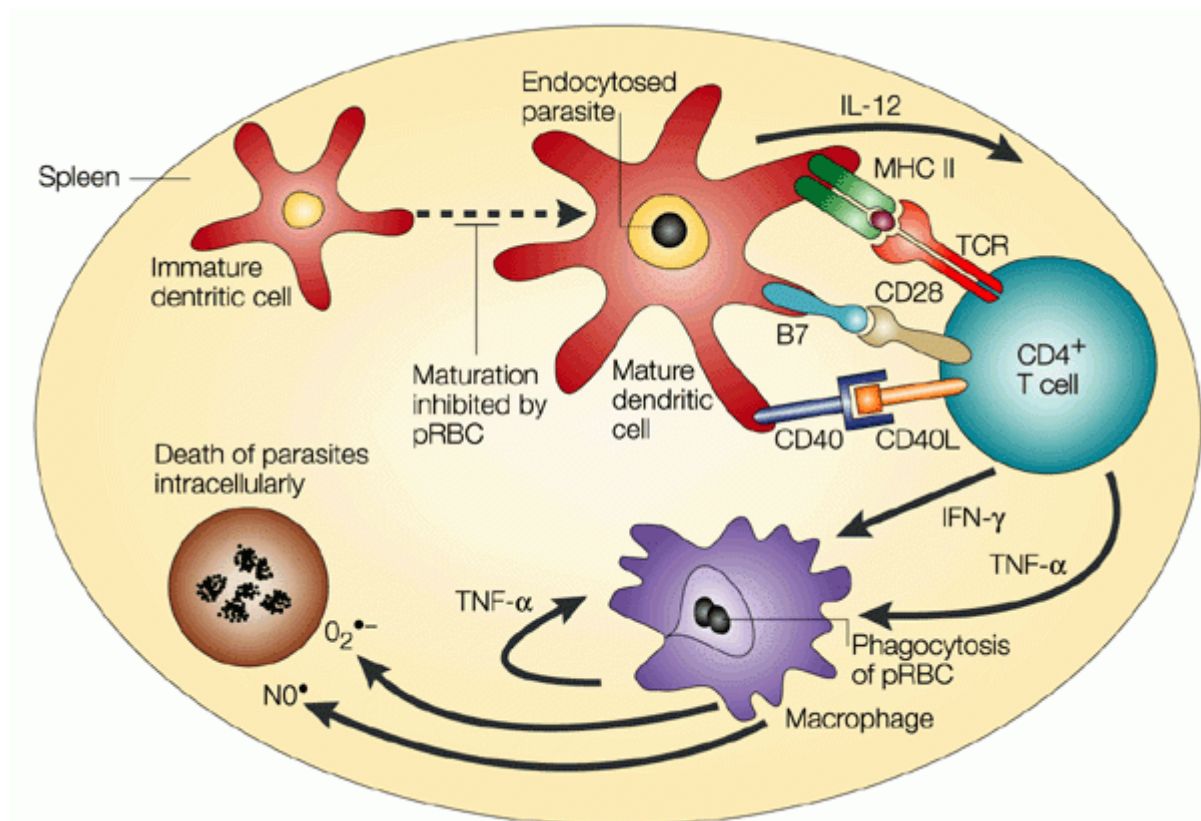


Figure 2 : Illustration de l'immunité contre le paludisme indépendant des cellules T [41].

L'activation des cellules T CD4+ par les cellules dendritiques matures conduisant à l'activation des macrophages, à la phagocytose des globules rouges

parasités (pRBC), et à la production de cytokines et de petites molécules inflammatoires (comme l'oxyde nitrique et les radicaux libres d'oxygène).

3.6.2. Liaison entre l'immunité innée et adaptative au paludisme au stade sanguin

La régulation possible de l'immunité adaptative au paludisme au stade sanguin par des cytokines produites par les cellules de la réponse immunitaire innée. En réponse aux ligands parasitaires reconnus par les récepteurs de reconnaissance de motif de pathogènes (PRR), tels que les récepteurs de type Toll (TLR) et CD36, ou les cytokines inflammatoires, telles que l'interféron- γ (IFN- γ), les cellules dendritiques (DCs) mûrissent et migrent vers la rate - le site principal des réponses immunitaires contre le parasite *Plasmodium* au stade sanguin. La maturation des DCs est associée à la régulation à la hausse de l'expression des molécules du CMH de classe II, de CD40, de CD80, de CD86 et des molécules d'adhésion et à la production de cytokines dont l'interleukine-12 (IL-12). IL-12 active les cellules tueuses naturelles (NK) pour produire IFN- γ et induit la différenciation des cellules T helper-1 (Th1).

La production de cytokines, en particulier IFN- γ , par les cellules NK entraîne une maturation en courant continu et renforce l'effet des stimuli de maturation dérivés de parasites, facilitant l'expansion clonale des cellules T naïves CD4⁺ spécifiques de l'antigène. L'IL-2 produite par des cellules Th1 spécifiques de l'antigène active les cellules NK pour produire IFN- γ , qui induit la maturation des DCs et active les macrophages, amplifiant ainsi la réponse immunitaire adaptative. Les cytokines telles que l'IL-10 et le facteur de croissance transformant - β (TGF- β) régulent négativement les réponses innée et adaptative [42].

Les mécanismes sous-jacents et la spécificité antigénique de l'immunité protectrice contre le paludisme ne sont pas bien compris. Il a été démontré que l'immunité antipaludique acquise est spécifique de la souche et du stade, avec une réactivité croisée. La réponse immunitaire a été documentée contre les divers antigènes parasites dans les stades pré-érythrocytaire (sporozoïte), érythrocytaire asexué (mérozoïte) et sexué (gamétocyte). L'exposition naturelle aux sporozoïtes n'induit pas une immunité antiparasitaire et anti-maladie complète (stérilisante) mais limite seulement la densité parasitaire et diminue ainsi la morbidité et la mortalité associées au paludisme. L'immunité acquise est dirigée principalement contre le stade érythrocytaire asexuel, les cibles primaires étant les mérozoïtes extracellulaires en circulation. Bien que le stade pré-érythrocytaire soit également ciblé par des réponses immunitaires protectrices, il ne bloque pas efficacement l'invasion des sporozoïtes ou le développement intrahépatique du parasite [43].

L'infection palustre induit à la fois la production d'immunoglobulines polyclonales et spécifiques, principalement des IgM et IgG mais aussi d'autres isotypes d'immunoglobulines. De ce nombre, 5% ou plus représentent des anticorps spécifiques d'une espèce ou d'un stade spécifique réagissant avec une grande variété d'antigènes parasites. Le transfert passif d'IgG à partir de donneurs immuns peut être protecteur en réduisant la parasitémie et les symptômes cliniques. Les infections paludéennes chez l'homme et les animaux de laboratoire sont également associées à des taux élevés totaux d'anticorps IgG et à des IgE spécifiques antipaludiques, ce qui reflète le passage des activités régulatrices des lymphocytes T de Th1 à Th2 en raison de l'exposition répétée du système immunitaire aux parasites. Les taux d'IgE sont significativement plus élevés chez les patients atteints de paludisme cérébral ou d'autres formes graves que chez les patients atteints de paludisme non compliqué et l'effet

pathogène des IgE est probablement dû à une surproduction locale du TNF dans les micro vaisseaux et de l'oxyde nitrique (NO) causée par les complexes immuns contenant des IgE [44].

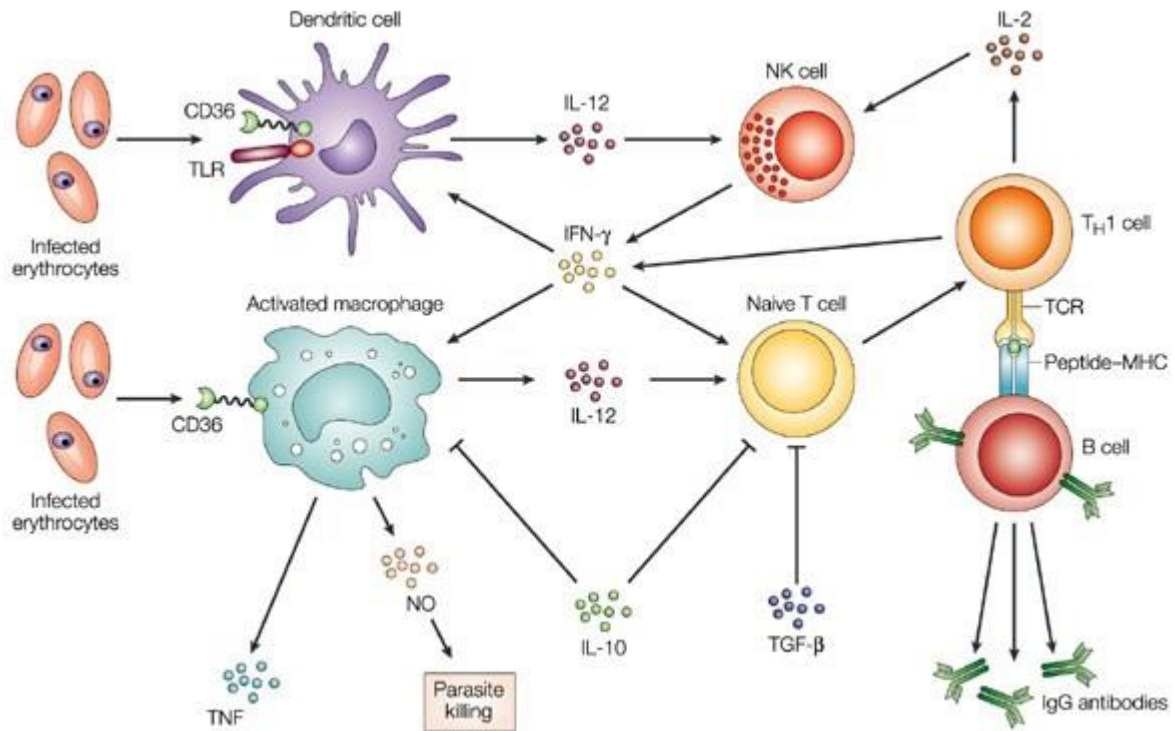


Figure 3 : Illustration de la Liaison entre l'immunité innée et adaptative au paludisme au stade sanguin [41]

3.6.3. Immunité acquise ou adaptative contre le paludisme

Elle se développe après l'infection et son efficacité protectrice varie en fonction des caractéristiques de l'hôte, de l'endémicité de la région, du nombre d'infections subies, etc. elle a été classée comme immunité anti-maladie (qui protège contre les manifestations cliniques), immunité antiparasitaire (protège contre les parasitémies élevées) et immunité stérilisante (protège contre les nouvelles infections en maintenant une parasitémie asymptomatique de faible

densité, également appelée prémunition), avec un chevauchement considérable entre les deux.

Après une infection par le *Plasmodium*, une personne non immunisée développe généralement une maladie clinique aiguë avec de très faibles niveaux de parasitémie et l'infection peut évoluer vers une maladie grave et entraîner la mort. Après quelques infections supplémentaires, l'immunité anti-maladie se développe et provoque la suppression des symptômes cliniques même en présence d'une parasitémie importante et réduit également le risque de maladie grave. Les infections fréquentes et multiples conduisent lentement au développement d'une immunité antiparasitaire qui entraîne une parasitémie très faible ou indétectable. L'immunité stérilisante, bien qu'elle n'ait jamais été entièrement atteinte, entraîne un degré élevé de réponse immunitaire, de faibles niveaux de parasitémie et un statut de porteur asymptomatique. La prémunition suggère une immunité entraînée directement par la présence des parasites eux-mêmes et non pas autant par le résultat d'infections antérieures [40].

La présence de souches génétiquement et antigéniquement distinctes des parasites dans une localité donnée et l'apparition d'une variation antigénique clonale au cours d'une infection forcent l'hôte à monter une réponse immunitaire contre ces différentes souches et variants antigéniques. L'acquisition de l'immunité contre le paludisme est donc très lente et peu efficace et reste spécifique de l'espèce et de la souche. Cependant, dans les régions où le paludisme est endémique stable et où la transmission du paludisme est intense, comme en Afrique subsaharienne et dans les régions d'Asie du Sud-est, l'immunité acquise se développe à un très jeune âge. Dans ces régions, les enfants nés de mères immunisées sont protégés contre les maladies au cours de leur première moitié de vie par des anticorps maternels. Cette immunité passive

est suivie d'une ou deux années (de 1 à 3 ans) de susceptibilité accrue avant l'acquisition de l'immunité active.

Le risque de maladie clinique augmente de la naissance à l'âge d'environ 6 mois, selon le taux de transmission, et à partir de l'âge de 3 à 4 mois, les nourrissons deviennent sensibles aux maladies graves et à la mort. Le risque de paludisme cérébral augmente avec l'âge chez les enfants de 2 à 4 ans. Vers l'âge de 5 à 10 ans, en raison d'infections répétées et fréquentes, la fréquence des maladies cliniques commence à diminuer et le risque de mortalité diminue fortement. À l'âge adulte, la plupart des habitants possèdent généralement une immunité stérilisante. D'autre part, les personnes vivant dans des zones d'endémie instables ont tendance à n'acquérir qu'une immunité partielle [45]. Ainsi, le niveau d'immunité antipaludique influence l'issue clinique de la maladie dans différents endroits et groupes d'âge.

Les anticorps peuvent protéger contre le paludisme par divers mécanismes. Ils peuvent inhiber l'invasion par le mérozoïte des érythrocytes et la croissance intraérythrocytaire ou améliorer la clairance des érythrocytes infectés de la circulation en se liant à leur surface, empêchant ainsi la séquestration dans les petits vaisseaux et favorisant l'élimination par la rate. L'opsonisation des érythrocytes infectés augmente significativement leur sensibilité à la phagocytose, à la cytotoxicité et à l'inhibition parasitaire par diverses cellules effectrices telles que les neutrophiles et les monocytes/macrophages. L'interaction des érythrocytes opsonisés avec ces cellules effectrices induit la libération de facteurs tels que le TNF qui peuvent causer des lésions tissulaires mais qui sont également toxiques pour les parasites [44]. Les réponses immunitaires à médiation cellulaire induites par l'infection palustre peuvent protéger contre les stades parasitaires pré-érythrocytaire et érythrocytaire.

Les lymphocytes T CD4 sont essentiels pour la protection immunitaire contre les stades sanguins asexués du paludisme, tant chez les souris que chez l'homme. Cependant, le rôle des cellules T CD8, qui ont des fonctions effectrices importantes dans l'immunité pré-érythrocytaire et qui contribuent à la protection contre le paludisme grave, est moins clair. Il a été proposé que les lymphocytes T CD8 puissent réguler l'immunosuppression dans le paludisme aigu et les réponses inflammatoires modulées vers le bas. Comme les érythrocytes humains n'expriment pas les antigènes du CMH, la lyse des érythrocytes infectés par les lymphocytes T cytotoxiques CD8 n'a aucun rôle dans la défense contre les parasites au stade sanguin [46].

3.6.4. Les mécanismes d'échappement de *P. falciparum* à l'immunité

Les parasites du paludisme non seulement échappent à la réponse immunitaire de l'hôte, en raison de leur diversité antigénique et de leur variation antigénique clonale, mais ils modulent également la réponse immunitaire et provoquent une importante suppression immunitaire. Il a été démontré que les globules rouges parasités, avec l'hémozoïne déposée à l'intérieur, inhibent la maturation des cellules dendritiques présentant un antigène, réduisant ainsi leur interaction avec les cellules T, ce qui entraîne une immunosuppression. La suppression immunitaire dans le paludisme augmente le risque d'infections secondaires (comme la *Salmonella* non typhoïde, le virus de l'herpès zona, le virus de l'hépatite B, le virus de la leucémie de Moloney et les infections à nématodes et la réactivation du virus Epstein-Barr) et peut également réduire la réponse immunitaire à certains vaccins [11, 46].

L'immunité anti palustre acquise ne dure pas longtemps. En l'absence de réinfection pendant environ 6 mois ou 1 an, comme cela peut se produire lorsque la personne quitte la zone touchée par le paludisme, l'immunité acquise

devient inefficace et la personne redevient vulnérable à infection sévère palustre. L'immunité est également rendue moins efficace pendant la grossesse, en particulier pendant la première et la deuxième grossesse, en raison de l'immunosuppression physiologique ainsi que de la cytoadhérence des érythrocytes aux nouveaux récepteurs de sulfate de chondroïtine A sur le placenta. Une telle perte de l'immunité acquise rend la femme enceinte plus vulnérable au paludisme et à ses complications [47].

L'immunosuppression dans le VIH/SIDA augmente également les risques de paludisme clinique, de complications et de décès [48].

3.6.5. Familles multigéniques de *P. falciparum*

P. falciparum possède un génome nucléaire haploïde d'environ 23 Mb qui est réparti entre 14 chromosomes [6]. Des comparaisons entre le génome de *P. falciparum* et les génomes d'autres Plasmodium spp. ont montré une conservation dans les régions centrales des chromosomes mais une variabilité remarquable dans les régions subtélomériques [6, 49].

La variation de séquence se développe par la transposition des variants génétiques [50], des mutations [51], des délétions, des translocations et des duplications segmentaires [52, 53] pendant la croissance mitotique [54], et pendant la fusion des parasites au stade sexuel chez le moustique [50]. Cette grande variabilité génétique, par laquelle des millions de nouvelles structures antigéniques peuvent être générées chez un seul individu infecté, aide le parasite à échapper à la reconnaissance immunitaire et à s'adapter à de nouveaux environnements. Des fragments de séquences identiques peuvent faciliter des événements génétiques tels que la recombinaison et ainsi augmenter la variation de séquence. En outre, chaque isolat d'un patient possède un répertoire

génétique spécifique. Les régions sous-téломériques consistent en un patchwork de blocs répétitifs qui sont placés au centre des répétitions téломériques.

Plus précisément, six répétitions non codantes de taille variable, connues sous le nom d'éléments répétitifs associés aux téломères (TARE), sont situées à côté des répétitions téломères [50]. Cette région est suivie d'un membre du gène *var* qui code pour PfEMP1 [37, 38], suivi des gènes *rif* et *stevor* qui codent pour RIFINs [55-58] et STEVORs [59, 60], et d'autres familles multigènes [61, 62], comme la protéine membranaire transcrite tôt [63], gène intercalé associé à la surface (surfin), sous-téломère (phist) [64], protéine asexuée liée à la cytoadhérence (clag) [65] et à la fik kinase [66], qui présentent une localisation subtéломérique [52] (tableau 2).

P. falciparum est à l'origine de la plupart des décès liés au paludisme parmi toutes les espèces de *Plasmodium* qui infectent les humains [67]. *P. falciparum* a un cycle de vie complexe à l'intérieur de son hôte humain naturel et de son vecteur, les moustiques femelles *Anopheles spp.* Le parasite se développe à plusieurs stades du cycle de vie dans le corps humain, d'abord dans le foie, avant de se développer et de se diviser dans les globules rouges. Plusieurs molécules qui ont des fonctions clés dans le cycle de vie de *P. falciparum* sont des cibles du système immunitaire humain et, par conséquent, *P. falciparum* a développé la capacité d'exprimer des centaines de variantes différentes de ces antigènes [50, 68]. En effet, une grande partie du génome du parasite est consacrée à des familles multigéniques avec des allèles d'identité de séquence partielle qui codent des variants polypeptides [37, 38, 55, 56, 58, 59], dont beaucoup sont des médiateurs de l'adhésion aux cellules hôtes.

Ces gènes se trouvent principalement dans les régions subtéломériques et sont présents sous forme de copies multiples [6]. Ces régions sont dynamiques du

point de vue de l'évolution et sont des points chauds pour la génération de nouvelles variantes génétiques et de pseudogènes. La plupart de ces gènes et pseudogènes appartiennent à trois grandes familles multigéniques - la famille répétitive intercalée (*rif*), la variante subtélomérique à cadre de lecture ouvert (*stevor*) et les familles *var*. Alors que la famille du gène *var* a été bien caractérisée, on en sait moins sur les gènes *rif* et *stevor*, et certaines des autres familles multigéniques subtélomériques n'ont été décrites qu'hypothétiquement (tableau 2).

Les familles de gènes *var*, *rif* et *stevor* codent la variante antigène *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1), *P. falciparum*-encoded repetitive interspersed families of polypeptides (RIFINs) et STEVOR, respectivement, et se trouvent à la surface des globules rouges infectés par des parasites (GRP). La progression des parasites du paludisme tout au long de leur cycle de développement modifie la forme des GRP de biconcave à une forme plus arrondie, et s'accompagne de changements dans la rigidité et la perméabilité de la membrane [69-71]. Par conséquent, les GRP bloquent partiellement la circulation sanguine et sont reconnus comme défectueux et éliminés par la rate [72].

Cependant, ils évitent la clairance splénique en se liant aux cellules endothéliales de la microvasculature [73, 74] et en formant des agrégats (aussi connus sous le nom de rosettes) avec d'autres globules rouges [75-77]. La plupart des rosettes sont composées de 3 à 5 globules rouges, mais les rosettes géantes peuvent comprendre de nombreux globules rouges infectés et non infectés [32], alors que les auto-agglutinants ne sont composés que de globules rouges infectés [78]. La cytoadhérence et la formation des rosettes sont

impliquées dans la pathogenèse du paludisme en bloquant le flux sanguin lorsque la liaison est excessive.

Cela conduit à un manque d'oxygène dans les tissus, à une production excessive de lactate et à une diminution du pH dans le sang et les tissus, ce qui peut aboutir à une détresse respiratoire, un coma, une anémie grave ou une combinaison des deux qui sont les caractéristiques du paludisme grave [79, 80]. La fixation excessive de GRP dans le placenta peut conduire à l'anémie, à un faible poids à la naissance et à un risque d'avortement [81-83]. PfEMP1, RIFIN et STEVOR sont tous des médiateurs de l'observance et ont donc été impliqués dans le développement du paludisme grave, bien que de nombreux autres facteurs parasitaires et hôtes soient impliqués dans le développement du paludisme grave. Chez de nombreux parasites, PfEMP1 n'est pas exprimé seul [84], mais avec les RIFINs [57, 85]. et/ou les STEVORs [86], et ces adhésines interviennent probablement dans la séquestration des GRP.

Tableau II : Familles multigéniques dans les régions subtélomériques de *Plasmodium falciparum* (<http://plasmodb.org>) consulté le 25/06/18.

Famille de gène	Protéine	nombre Approximatif de gènes	Sous-types et/ou types d'adhésion	Récepteur hôte et/ou fonction
<i>var</i>	PfEMP1	60	Liaison aux cellules endothéliales, placentaires, immunitaires ou aux globules rouges	α -macroglobuline, CD36, CSA, complément 1q, CR1, E-selectines et P-selectines, EPCR, sulfate d'héparine, ICAM1, IgM, IgM, IgG, PECAM1, TSP et VCAM1.
<i>rif</i>	RIFIN	150	RIFINs-A et RIFINs-B (seuls les RIFINs-A initient le rosetting)	Antigènes du groupe sanguin ABO, acide sialique sur GYPA
<i>stevor</i>	STEVOR	30	Initie l'invasion par les mérozoïtes ou le rosetting	Acide sialique sur GYPC
<i>surf</i>	SURFIN	10	A et B ; initiation de l'invasion par les mérozoïtes	Non déterminé
<i>phist</i>	PHIST	70	Oui	ATS de PfEMP1
<i>clag</i>	CLAG (également connu sous le nom de RhopH)	7	Plusieurs sous-types ; canal ionique et médiation de l'invasion par les mérozoïtes	Prise en charge par le biais d'un canal
<i>etramp</i>	ETRAMP	15	Aucun sous-type connu	Non déterminé
<i>fikk</i>	FIKK kinase	10	Oui, lié au stade	Phosphorylation de la membrane du globule rouge infecté
<i>pfmc-2tm</i>	PfMC-2TM	15	Non déterminé	Non déterminé

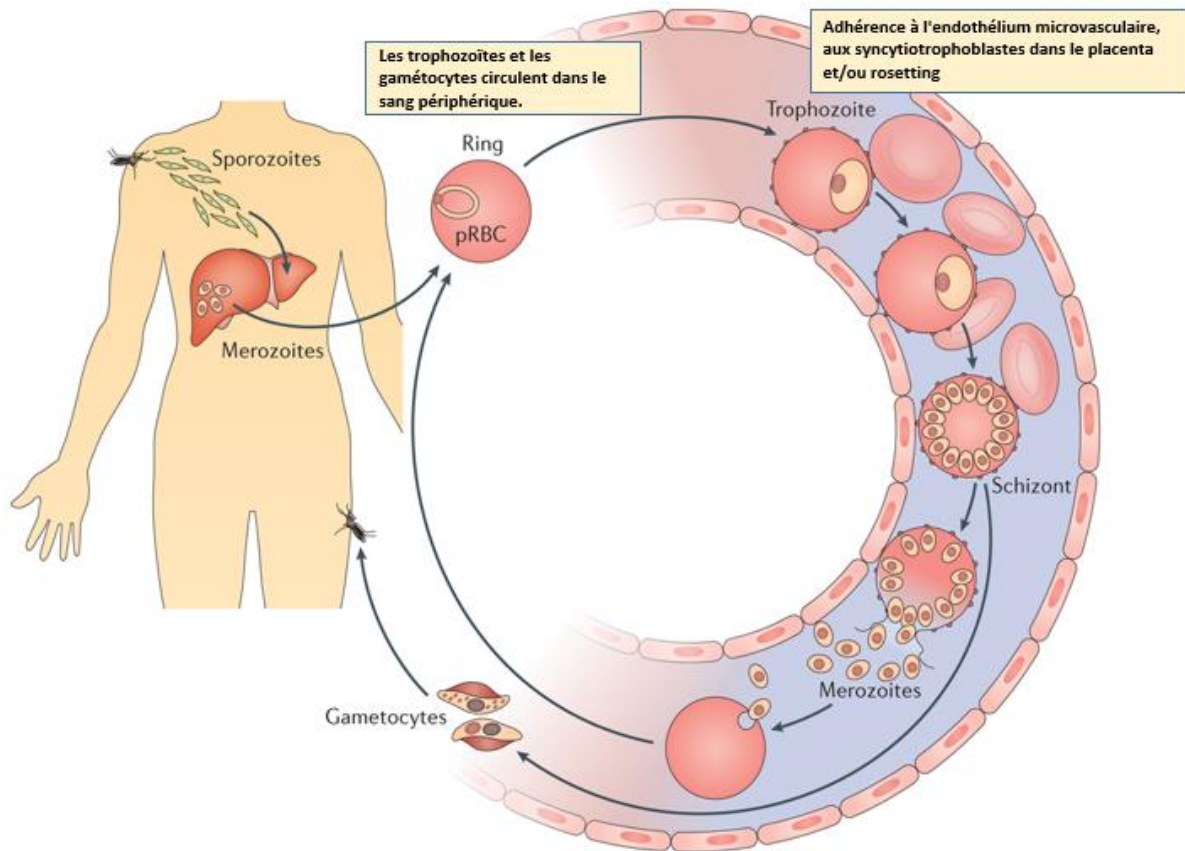


Figure 4 : Illustration de la séquestration des globules rouges parasités au cours du cycle de vie de *P. falciparum* [87]

Une infection paludéenne commence lorsqu'un moustique femelle *Anopheles spp.* infectée pique l'homme et injecte des sporozoïtes de *P. falciparum*, dont la plupart ne pénètrent pas directement dans le sang mais quittent le site d'injection et se dirigent vers la circulation sanguine. Les sporozoïtes se multiplient dans les cellules hépatiques pendant les 7 jours suivants (ou plus longtemps) et forment des milliers de mérozoïtes, mais ne causent aucun symptôme jusqu'à ce que les cellules hépatiques se rompent et que les parasites soient libérés dans le sang. Dans la circulation sanguine, les mérozoïtes envahissent les globules rouges pour former des parasites en forme caractéristique d'anneau qui se transforment en trophozoïtes au cours des 20 prochaines heures.

Les mérozoïtes sortent du globule rouge rompu pour envahir de nouveaux érythrocytes. Les globules rouges infectés par des parasites (GRP) ne circulent pas mais sont séquestrés dans la microvasculature par des polypeptides adhésifs, tels que les familles répétitives de polypeptides (RIFIN), les variants sous-télomériques (STEVOR) et *P. falciparum erythrocyte membrane protein 1* (PfEMP1), qui initie l'adhésion des GRP aux cellules endothéliales, aux autres érythrocytes (formant des rosettes) ou aux syncytiotrophoblastes placentaires. Par conséquent, on suppose que l'invasion de nouveaux érythrocytes se produit dans la microvasculature par la libération de mérozoïtes à partir de GRP séquestrés après 48 h de développement intracellulaire. Une petite proportion des parasites se développe en stades sexuels, les gamétocytes mâles et femelles, qui permettent la transmission du parasite.

3.6.6. PfEMP1 - Une famille de protéines parasitaires d'importance clé dans l'immunité et la pathogénèse du paludisme à *P. falciparum*

L'accumulation dans divers tissus des érythrocytes infectés par des parasites *P. falciparum* matures peut entraîner des troubles circulatoires et une inflammation, et on pense qu'il s'agit d'un élément central dans la pathogénèse du paludisme. Elle est initiée par l'interaction de ligands parasitaires à la surface des érythrocytes et d'une gamme de molécules réceptrices hôtes sur de nombreux organes et tissus. Parmi plusieurs protéines et familles de protéines impliquées dans ce processus, la famille de la protéine-1 de *P. falciparum* à la membrane érythrocytaire (PfEMP1) de poids moléculaire élevé et ayant des antigènes très variables semble être la plus importante. Ainsi, plusieurs études ont apporté des connaissances actuelles sur ces protéines, leur structure, leur fonction, leur présentation à la surface des érythrocytes et la régulation des gènes var qui les codent.

Le rôle du PfEMP1 dans la pathogenèse du paludisme, les réponses immunitaires spécifiques au PfEMP1 et la perspective d'une vaccination spécifique au PfEMP1 contre le paludisme ont faits l'objet d'importants travaux.

Plusieurs espèces de parasites du paludisme rendent les érythrocytes qu'ils infectent collants [88]. Chez *P. falciparum*, ce processus est si efficace que seuls les érythrocytes infectés par de jeunes parasites (les stades circulaires en anneau) sont présents dans la circulation périphérique des individus infectés, un fait connu depuis plus de 100 ans [87]. La raison en est que tous les érythrocytes infectés par *P. falciparum* de plus de 18 heures environ séquestrent dans les veines post-capillaires de divers tissus et organes pour le reste du cycle de multiplication asexuée de 48 heures du parasite [74, 89].

Cet événement physiopathologique clé peut avoir des conséquences désastreuses lorsqu'il se produit dans des organes comme le cerveau ou le placenta [81]. Vers la fin des années 1980, il était clair que la séquestration tissulaire spécifique des érythrocytes infectés par *P. falciparum* implique une protéine de poids moléculaire élevé (>200 kD) et des molécules parasitaires spécifiques de la souche affichées sur des protubérances à densité électronique (*knobs*) de surface des érythrocytes infectés [90-93] ont nommé *P. falciparum erythrocyte membrane protein 1* (PfEMP1) l'un de ces antigènes sensibles à la trypsine et de poids moléculaire élevé. Moins d'une décennie plus tard, trois études indépendantes utilisant différentes approches expérimentales ont démontré que PfEMP1 était en fait une famille de protéines codées par la famille multigènes des var [37, 94] [38].

3.6.6.1. Structure des gènes var et des protéines PfEMP1

PfEMP1 est une famille de protéines de poids moléculaire élevé (environ 200-450 kD) ancrées dans la membrane de surface des érythrocytes infectés par *P. falciparum*. Ces protéines sont codées par les 60 gènes var à deux exons dans le génome haploïde de *P. falciparum* [6]. L'exon-1 code la partie extracellulaire des protéines, tandis que le domaine transmembranaire court et le segment terminal intracellulaire sont codés par l'exon-2.

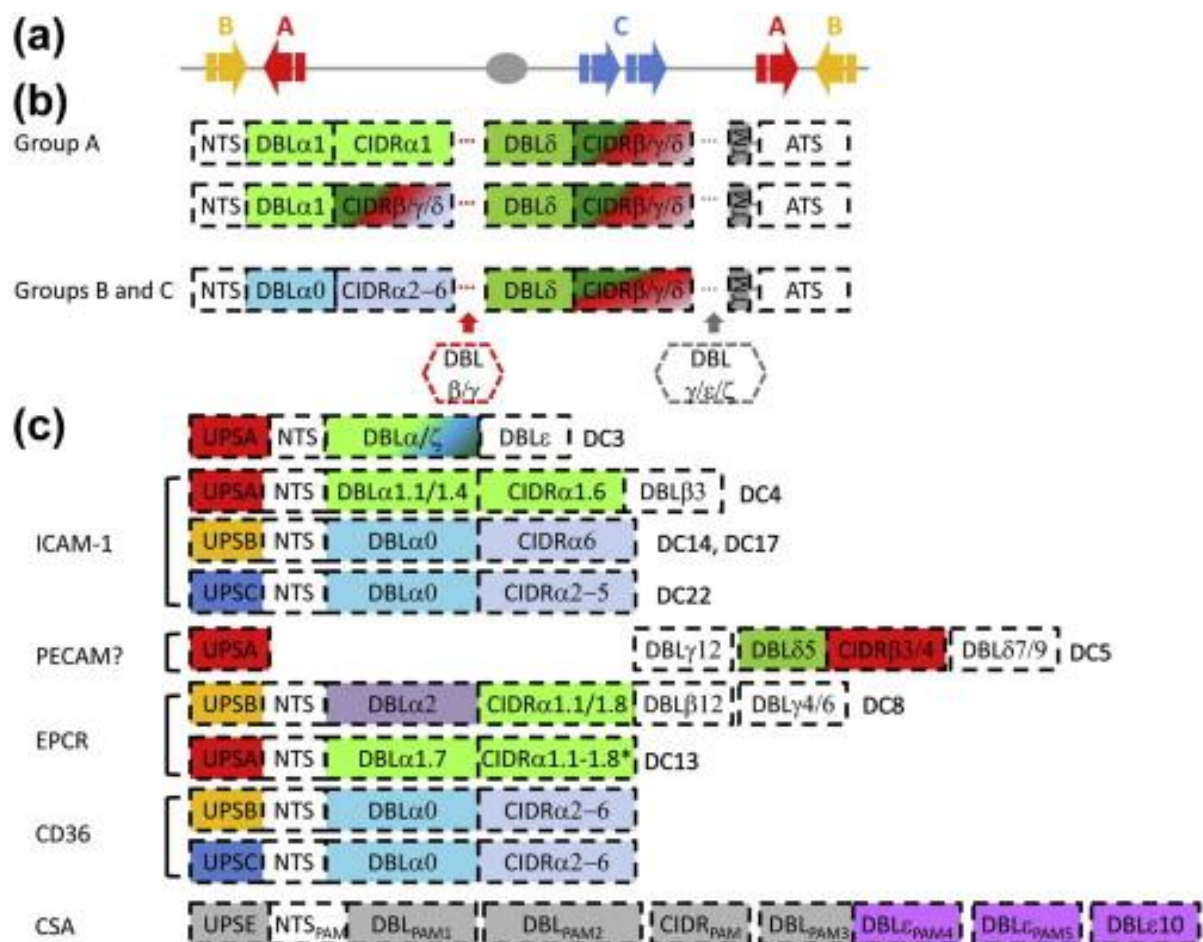


Figure 5 : Organisation chromosomique des gènes var de *P. falciparum* et du domaine architectural de *P. falciparum* erythrocyte membrane protein-1 (PfEMP1) [95]

(a) Les gènes var des groupes A et B sont situés dans les régions sous-télomériques de tous les chromosomes, mais sont transcrits dans des directions

Interaction entre la réponse humorale anti-PfEMP-1/VarO et l'incidence palustre chez une cohorte d'enfants vivant à Kéniéroba

opposées. Les gènes var du groupe C se trouvent dans les régions chromosomiques centrales.

(b) Les protéines PfEMP1 sont constituées de différents sous-types de domaines de type Duffy-binding-like (DBL) et de la région interdomaine riche en cystéine (CIDR). Les protéines PfEMP1 des groupes B et C ont principalement une structure à quatre domaines, tandis que les protéines PfEMP1 plus grandes (principalement du groupe A) ont des domaines DBL supplémentaires après la première ou la deuxième paire de domaines DBL-CIDR.

(c) Le génome de *P. falciparum* codent des arrangements de domaine tandem (cassettes de domaine, DC). Ces cassettes de domaine sont liées à différents phénotypes d'adhésion connus comme indiqué. DC8 est un gène chimérique entre un gène var du groupe A et un gène var du groupe B.

TM = thrombomoduline ; ATS = séquence terminale acide ; UPS = séquence promoteur en amont. (Figure modifiée à partir de [96]).

3.6.6.2. Fonction du PfEMP1

La séquestration des érythrocytes infectés matures dans le système vasculaire est d'une importance vitale pour *P. falciparum*, car elle permet aux érythrocytes déformés et raidis par les parasites en développement à l'intérieur d'eux d'éviter d'être détruits dans la rate [97, 98]. Également, la fonction première des protéines PfEMP1 est d'assurer cette séquestration des érythrocytes infectés [99]. La diversité de PfEMP1 est limitée par leur rôle de ligands pour l'adhésion via les récepteurs. Cela les distingue des autres familles de variants d'antigènes de surface parasitaires comme les glycoprotéines de surface des trypanosomes, dont la fonction principale est simplement d'agir comme appâts antigéniques

frustrant le système immunitaire humoral et retardant l'acquisition d'anticorps protecteurs.

La spécificité des récepteurs et d'autres caractéristiques des protéines PfEMP1 individuelles sont étroitement liées à leurs caractéristiques structurales. Relativement, peu de molécules endothéliales de surface ont été proposées pour agir comme récepteurs hôtes pour l'adhésion des érythrocytes infectés par *P. falciparum*, malgré la grande diversité des protéines PfEMP1. Il semble que de nombreuses protéines PfEMP1 différentes aient une affinité pour le même récepteur, et des études récentes indiquent que la spécificité des récepteurs est liée à la présence de certaines cassettes de domaine. Certains PfEMP1 contiennent clairement plusieurs domaines adhésifs ayant une spécificité différente de récepteur [35, 100], ce qui permettrait l'adhésion d'un érythrocyte infecté donné à plusieurs récepteurs hôtes, simultanément ou successivement [101]. Un exemple est la capacité de certains PfEMP1 d'agir comme médiateur de l'adhésion aux récepteurs à la surface des érythrocytes non infectés, ce qui entraîne la formation de rosettes, en plus de leur affinité pour les récepteurs endothéliaux [102].

3.6.6.3. Conclusions et perspectives sur le PfEMP-1

La compréhension de la manière dont les parasites de *P. falciparum* atteignent les objectifs contradictoires de l'utilisation de PfEMP1 comme protéines adhésives se liant à un ensemble limité de récepteurs hôtes, d'une part, et les protégeant de l'attaque immunitaire par variation antigénique clonale, d'autre part, s'améliore à grande vitesse. A titre d'exemple, de nouvelles données montrent que la spécificité adhésive peut être maintenue par des protéines PfEMP1 ayant une très grande diversité de séquences [103].

Ces résultats nous rappellent des études similaires sur les glycoprotéines de surface des variantes du trypanosome [104] et appellent à des études détaillées sur les réponses des cellules T aux antigènes PfEMP1, un domaine de recherche qui est resté relativement inexploré jusqu'à présent [105]. La communauté scientifique attend également avec impatience les résultats de l'analyse comparative des séquences du génome complet de nombreux clones de *P. falciparum*, qui sont susceptibles de faire progresser considérablement la recherche sur le PfEMP1.

Les premiers essais cliniques d'un vaccin à base de PfEMP1 contre le paludisme placentaire ont débuté en 2015, et l'espoir est grand (du moins dans certains milieux) que ce candidat vaccin et d'autres à base de PfEMP1 pourraient jouer un rôle important pour combler les lacunes dans la lutte contre le fléau ancien et récalcitrant du paludisme [106-108].

3.6.7. Réponse immunitaire spécifique à PfEMP-1

Les anticorps dirigés contre les antigènes de surface des GRP sont induits d'une manière spécifique à chaque variante. En raison de l'importance biologique probable de PfEMP1, RIFIN et STEVOR dans le paludisme grave, y compris chez les enfants et les femmes enceintes, les IgM et les IgG spécifiques de ces adhésines sont suggérées pour assurer la protection clinique [109-113]. La séquestration des GRP peut être évitée par une immunisation préalable avec un PfEMP1 homologue chez les rongeurs et les primates non humains [40].

Par exemple, la vaccination avec des fragments de PfEMP1, y compris les domaines N terminal DBL1 α ou les domaines CIDR1 α , protégeaient les singes *Aotus spp.* et *Rhesus spp.* et les autres animaux expérimentaux de la séquestration de pRBC avec le parasite homologue [40]. Une réactivité croisée

partielle des anticorps avec la surface des GRP contenant des parasites qui expriment des variants distincts de PfEMP1 a également été observée, et il pourrait être possible de générer une réactivité croisée des anticorps plus robuste pour les parasites qui expriment PfEMP1 (variante VAR2CSA)[114-116], PfEMP1 [117] ou PfEMP1 adhérant à l'ICAM1 [118].

Cependant, le rôle des anticorps contre les RIFINs et les STEVORs dans le blocage de la liaison des GRP aux RBCs doit également être considéré [113], car de tels anticorps ont été détectés dans des cohortes d'adultes semi-immuns du Gabon [119]. (Dans cette étude, moins d'anticorps ont été trouvés contre un fragment terminal N de PfEMP1 que contre les RIFINs. Il est intéressant de noter que des anticorps humains contenant un insert muté du récepteur 1 de type immunoglobuline associée aux leucocytes (LAIR1), qui est une protéine de liaison au collagène, ont été identifiés chez des patients du Kenya qui ont été exposés de façon chronique au paludisme [120]. Ces anticorps réagissent également avec les RIFINs, sont produits par des clones de cellules B des donneurs et réagissent de manière assez large. Par conséquent, il est possible de produire un vaccin qui comprend des épitopes protecteurs pour PfEMP1, RIFIN et STEVOR.

4. METHODOLOGIE

4.1. Cadre d'étude

L'étude s'est déroulée dans les villages de Kéniéroba, situé dans la commune rurale de Bancoumana à environ 75 km au sud-ouest de Bamako, la capitale du Mali. Le paludisme y est saisonnier et la période de sa haute transmission s'étend de juin à Décembre avec des pics observés en Juillet et en Octobre. Les participants à cette étude étaient inclus dans une étude de recherche conçue et mise en œuvre en partenariat avec des chercheurs de l'institut National de Santé des Etats Unis d'Amérique et du MRTC à la faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie à Bamako.

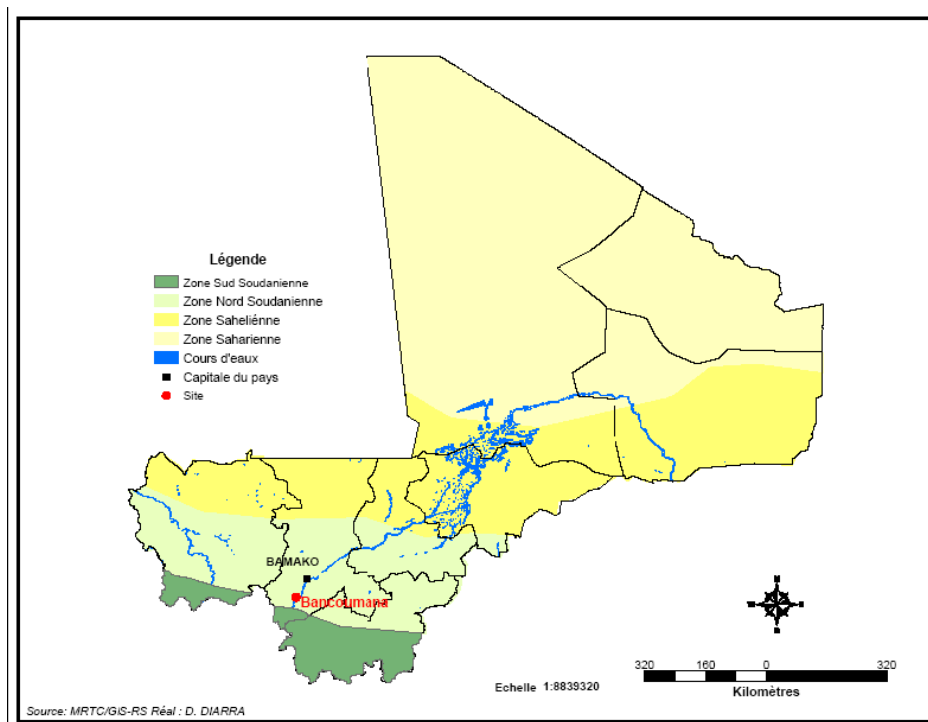


Figure 6 : Sites d'étude Source: Unité GIS MRTC/FMPOS

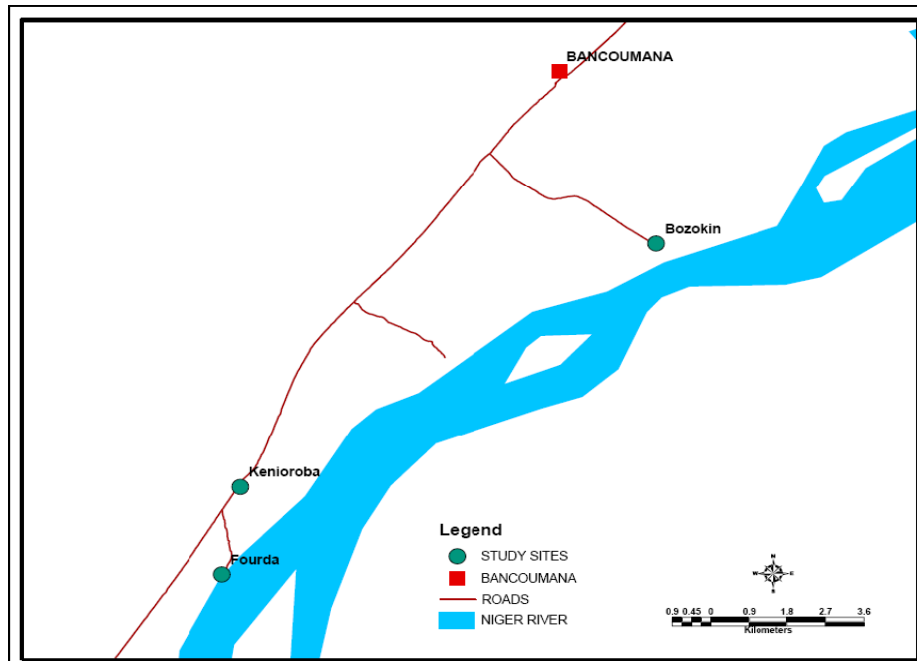


Figure 7 : Plan de masse des trois villages d'étude dans la commune rurale de Bancoumana - Source: Unité GIS MRTC/FMPOS

4.2. Type d'étude

Nous avons mené une étude de cohorte sur une année de transmission avec deux passages transversaux en début et à la fin de la saison.

4.3 Période d'étude

L'étude s'est déroulée durant la saison de transmission de mai 2011 à décembre 2011.

4.4. Population d'étude

La cohorte était constituée de 230 enfants choisis au sein des participants à une étude plus globale portant sur l'immunité innée et acquise au paludisme à Kéniéroba.

4.5. Critère d'inclusion

Les enfants répondants aux critères ci-dessous ont été inclus dans notre étude.

- ❖ résider dans le village de Kéniéroba pendant la période de l'étude,
- ❖ accepter de participer à l'étude comme attesté par le consentement volontaire, libre et éclairé obtenu des parents ou des tuteurs de l'enfant ;
- ❖ être âgé de 4 ans à 15ans

4.6. Critère de non inclusion

Les enfants ne répondants pas aux critères d'inclusion ci-dessus n'ont pas été inclus dans notre étude. En outre, tout enfant présentant une condition pouvant le rendre incapable de suivre le protocole (par exemple : maladie psychiatrique, hémophilie etc.) n'a pas été inclus dans l'étude.

4.7. Echantillonnage

La cohorte a été constituée de façon aléatoire au début de la saison de transmission en mai 2011 en tenant compte des facteurs génétiques connue comme ayant une influence sur l'immunité anti palustre. Un prélèvement veineux a été effectué chez chaque participant au début (en Mai) et à la fin de la saison de transmission (en Décembre). Les plasmas recueillis sur ces échantillons ont permis le dosage des anticorps. Les participants étaient encouragés à se présenter à l'équipe de suivi clinique en cas de signe de paludisme pendant toute la durée de la saison de transmission. Les cas de paludisme confirmé par goutte épaisse étaient enregistrés et comptabilisés.

4.8. Variables mesurés

Pour mieux répondre à nos questions de recherche, nous avons mesuré les variables suivantes :

- ✓ Sociodémographique : âge, sexe, et ethnie
- ✓ Biologie : dosage des anticorps Anti-varO

4.9. Collecte des données

Les informations ont été collectées sur les formulaires de report de cas (*CRF*). Un contrôle de qualité était effectué chaque jour pour corriger les incohérences avant la validation.

4.10. Technique de laboratoire

4.10.1. Techniques de goutte épaisse et de frottis mince

La goutte épaisse et le frottis mince confectionnés sur le terrain ont été colorés au Giemsa et lus sur place.

4.10.2. Dosage des anticorps anti-varO

Chaque aliquot de plasma a été testé en duplicata par méthode Immunoenzymatique ELISA (Enzym-Linked Immunosorbent assay = test immunoenzymatique sur support solide) contre une protéine recombinante d'antigène PfEMP-1/VarO. De façon succincte, 0,1µg de protéine recombinante de l'antigène PfEMP-1/VarO (dilué dans du PBS 1X) était adsorbé dans chaque puits d'une plaque de 96 puits à fond plat toute la nuit (à 4°C). Après avoir enlevé le surnageant et bloqué les protéines avec 200µl de lait (5% Regilait) à 37°C pendant 1 heure. 100µl d'une dilution de sérum au 1/100 dans une solution de PBS-Tween-lait (PBS 1x + 0.05% Tween 20+ 2.5% lait) était incubé dans les puits à 37°C pendant 1 heure.

Les puits étaient par la suite lavés 3 fois avec du PBS 1x 0.1% Tween. Les puits étaient ensuite incubés avec 100µl d'anticorps secondaire anti IgG humain de mouton (dilué au 1/7500 dans du PBS 1x 0.1% Tween) couplé à la peroxydase puis lavés. Une réaction colorimétrique était provoquée par addition de 100µl d'une solution de substrat de peroxydase. Après 10 minutes, la réaction était arrêtée par addition d'une solution de H₂SO₄ (1M). Les densités optiques (DO) étaient par la suite analysées par lecture au spectrophotomètre à 450nm.

NB : Chaque échantillon était testé en duplicata et la moyenne des DO était calculée. Pour chaque plaque, 4 puits contrôles de sérum négatifs (pool de sérum de sujets naïfs n'ayant pas séjourné dans des zones impaludées) étaient inclus. La moyenne des DO des sérums contrôles était calculée et utilisée pour la correction des DO des échantillons testés sur la même plaque. La correction consistait à retrancher le DO moyen des sérums contrôles négatifs de la plaque au DO moyen de chaque échantillon testé sur la même plaque. Les DO corrigées ont été utilisées pour l'analyse. Nous avons ainsi déterminé le DO dans les plasma en amont de la saison de transmission (DO PfEMP-1/VarO Amont) et les DO en aval de la saison de transmission (DO PfEMP-1/VarO aval)

Le protocole détaillé du dosage des anticorps est disponible dans le chapitre des annexes.

4.11. Déroulement et procédure de l'étude

Avant le démarrage de l'étude, une autorisation communautaire a été obtenue auprès du chef du village, des chefs de familles et des autorités communautaires et administratives.

En mai 2008, nous avons procédé à l'inclusion des sujets dans l'étude.

Un consentement individuel éclairé et volontaire était obtenu auprès du parent/tuteur pour chaque participant de l'étude, et une copie du consentement était remise au parent/tuteur. A l'inclusion, un aliquot de plasma était collecté chez chaque participant au début de la saison de transmission (mai 2011) et à la fin de la saison de transmission (Décembre 2011). Les plasmas étaient gardés à -80 °c jusqu'au moment de l'utilisation. Les parents et tuteurs des enfants étaient activement encouragés à amener tous les enfants présentant des signes de paludisme au centre de santé de Kéniéroba où une équipe médicale assurait la permanence pendant les saisons de transmission du paludisme.

Pour chaque enfant reçu en consultation, un interrogatoire suivi d'un examen physique était réalisé. Cela nous a permis de recueillir les données cliniques sur un formulaire de report de cas. Un prélèvement sanguin était par la suite réalisé pour quelques analyses médicales (GE, frottis mince et le dosage de l'anticorps anti var o).

Pour chaque cas confirmé de paludisme, une combinaison thérapeutique à base d'artémisinine (Artésunate + amodiaquine) était administrée à l'enfant. En cas de complications nécessitant des actions thérapeutiques particulières, les patients étaient référés à Bamako pour une meilleure prise en charge.

4.12. Gestion et analyse statistique des données

Les données ont été saisies sur Microsoft Excel 2007 et analysées avec le logiciel SPSS. Les résultats ont été présentés sous forme de tableaux et de figures. Le test de Khi2 de Pearson a été utilisé pour comparer les différents groupes. Le seuil de signification statistique a été fixé à 5%.

4.13. Considérations éthiques

L'étude a été approuvée par le comité d'éthique de l'université de Bamako ainsi que par la commission de révision institutionnelle de l'Institut National des allergies et des maladies infectieuses des Etats unis d'Amérique. Un consentement éclairé a été obtenu des parents ou tuteurs de chaque participant à l'étude. Sur le terrain, la communauté (autorités administratives, coutumières et les associations féminines et de jeunesse) a été informée de tous les aspects de l'étude. Une restitution des résultats a été faite à la fin de l'étude.

5. Représentation schématique de la procédure

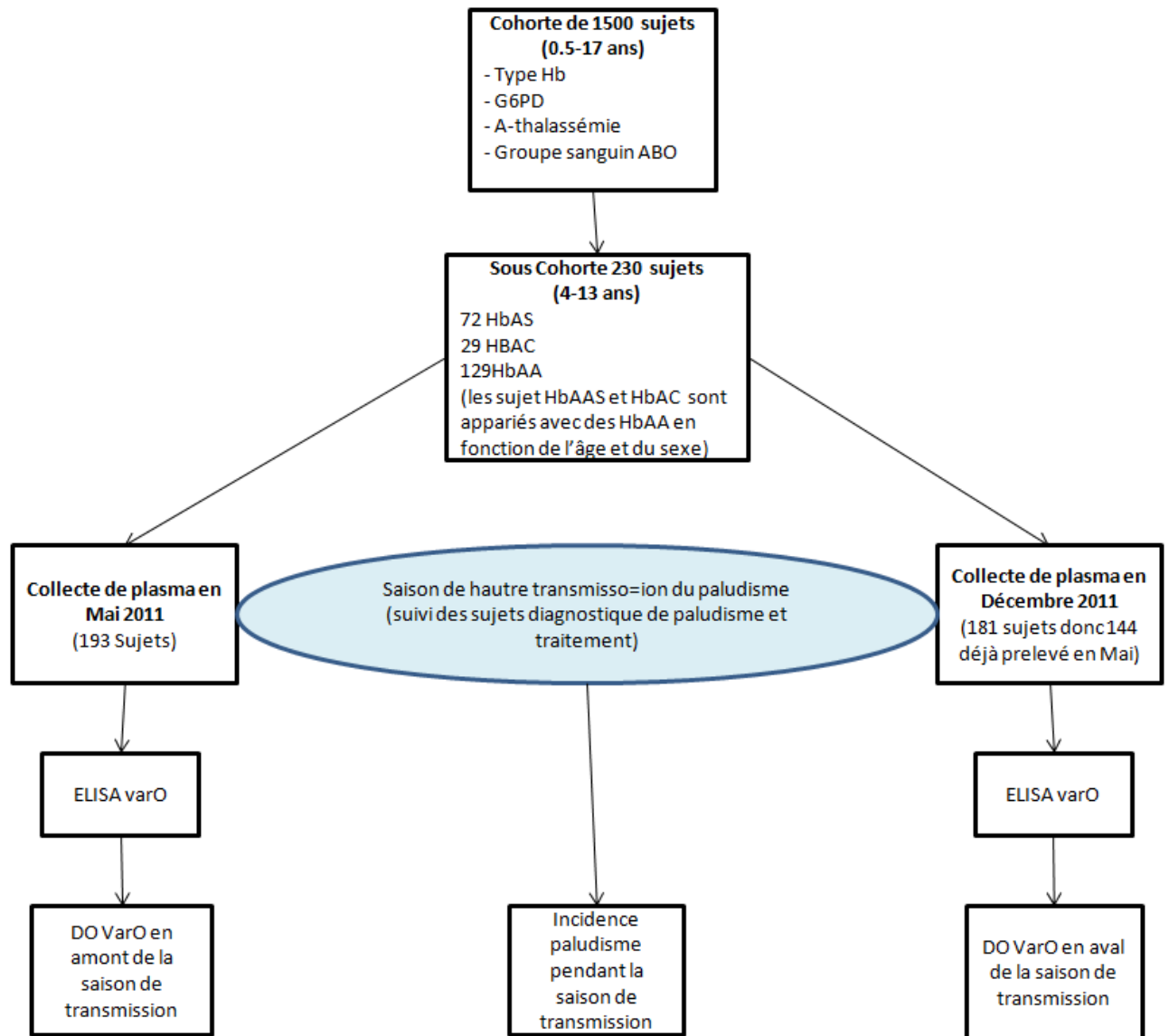


Figure 8 : Schéma de la procédure de l'étude

5. RESULTATS

5.1. Résultats globaux

Au total, nous avons 230 enfants âgés de 0 à 17 ans avec un sex-ratio de 1,03 en faveur du sexe masculin. La classe d'âge de 6 à 10 ans était la plus représentée (54,8%) suivi des moins de 5 ans (23,9%). Le groupe ethnique majoritaire était les Malinkés (94,3%).

5.2. Caractéristiques sociodémographiques des participants

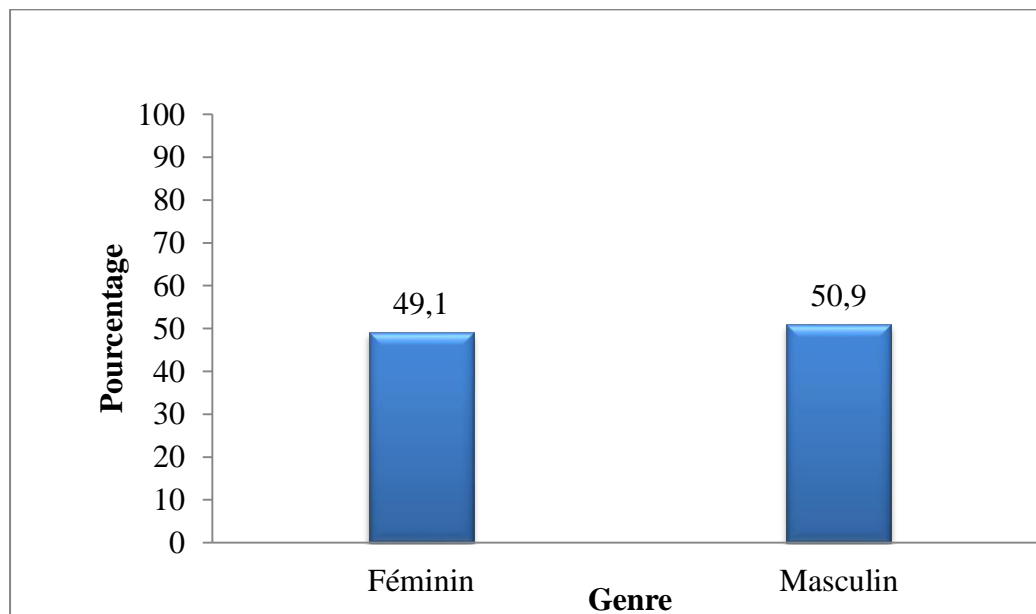


Figure 9 : Répartition des participants en fonction du sexe

Le sexe ratio était de 1,03 en faveur du sexe masculin.

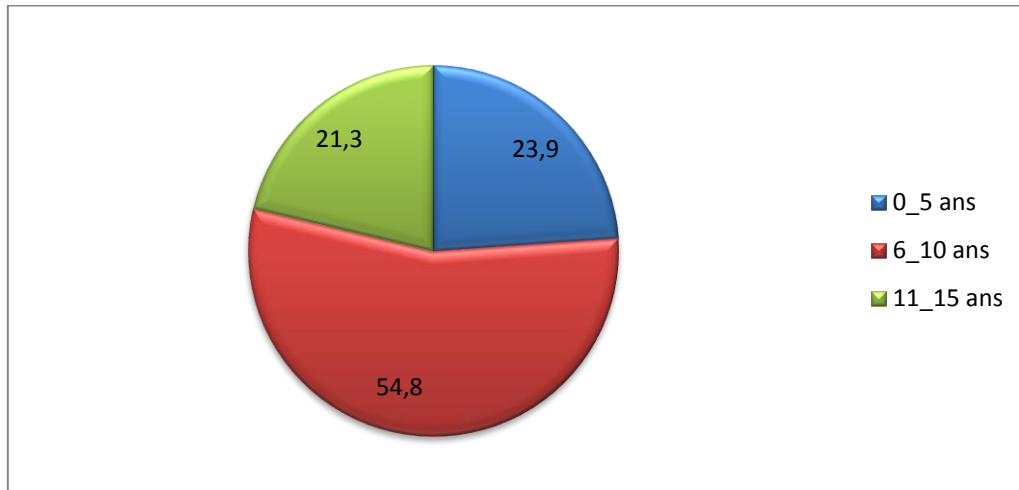


Figure 10 : Répartition des participants en fonction des classes d'âge

Plus de la moitié de nos participants avait un âge compris entre 6 et 10 ans (54,8%). Les classes d'âge de 0 à 5 ans et de 11 à 15 ans représentaient respectivement 23,9% et 21,3% dans notre étude.

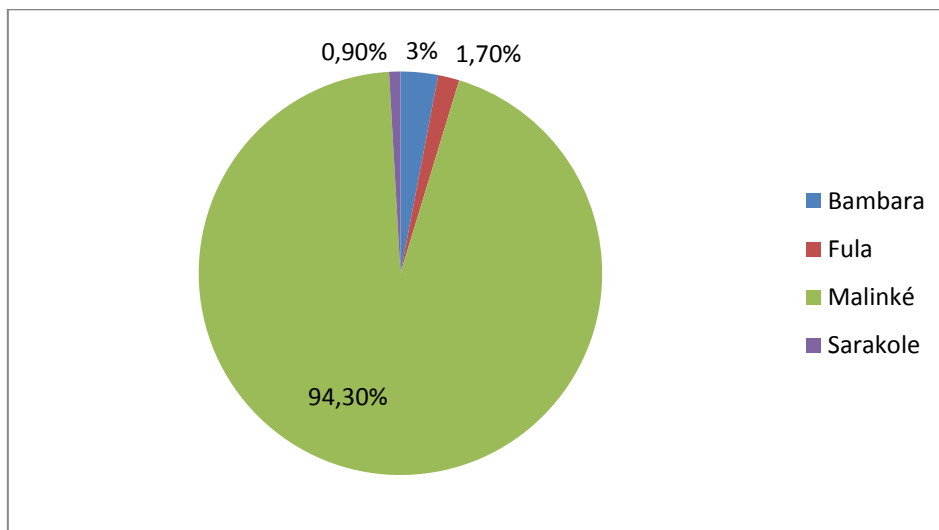


Figure 11 : Répartition des participants en fonction de l'ethnie

La majorité de nos sujets d'étude étaient des Malinkés (94,3%) suivis, respectivement, par les Bambaras (3%), les Fula (1,70%) et des Sarakolés (0,90%).

5.3. Résultats chimique et immunologique :

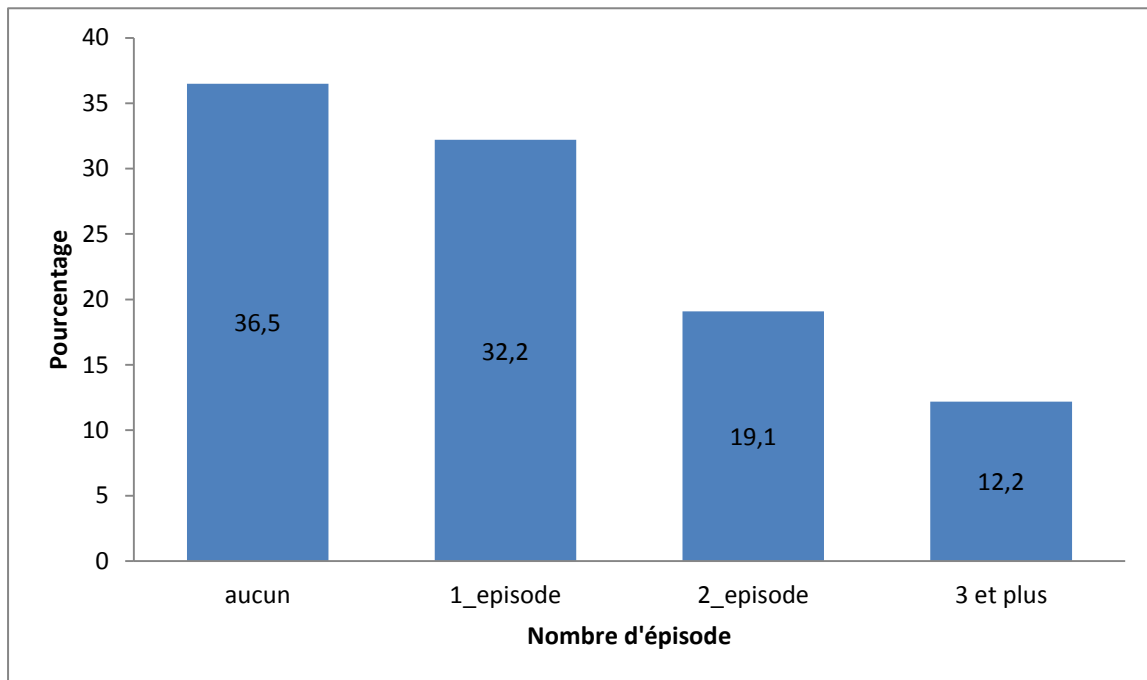


Figure 12: Répartition des participants en fonction du nombre des épisodes palustres

Plus du tiers de nos participants n'ont contracté aucun cas de paludisme au cours de la saison d'étude (36,5%). Par contre, près du tiers ont fait un seul épisode palustre (32,2%) et les autres participants avaient fait au moins deux épisodes palustres au cours de notre étude.

Tableau III : Répartition des participants en fonction du sexe et des classes d'âge

Classe d'âge	Sexe	
	Féminin	Masculin
	N (%)	N (%)
0 - 5 ans	29 (25,7)	26 (22,2)
6 - 10 ans	64 (56,6)	62 (53,0)
11 - 15 ans	20 (17,7)	29 (24,8)
Total	113 (100)	117 (100)

Il n'existe pas de différence statistique significative entre les deux sexes en fonction des classes d'âge ($p = 0,68$).

Tableau IV : Taux moyens des anticorps anti-PfEMP-1/VarO en fonction des classes d'âge en pré- et post-saison

Age	Moyenne DO ± Ecart Type		P
	Présaison	Post-saison	
0 - 5 ans	1,08 ±1,18	1,53 ±1,23	0,045
6 - 10 ans	2,61 ± 0,55	2,72 ± 0,51	0,28
11 - 15 ans	2,76 ± 0,53	2,69 ± 0,62	0,69
Valeur du p	10^{-3}	10^{-3}	

Nous avons observé que le taux moyen d'anticorps anti-PfEMP-1/VarO étaient significativement plus élevés dans les classe d'âge supérieures aussi bien en présaison et en post-saison ($P=10^{-3}$). Cependant nous avons observé une augmentation significative du taux moyen des anticorps anti-PfEMP-1/VarO en fin de saison chez les sujets de 0 à 5 ans ($p = 0,045$).

Tableau V: Taux moyens des anticorps anti-PfEMP-1/VarO en fonction du sexe en pré- et post-saison

Genre	Moyenne DO \pm Ecart Type		P
	Pré saison	Post-saison	
Féminin	2,05 \pm 1,13	2,31 \pm 1,01	0,08
Masculin	2,42 \pm 0,89	2,49 \pm 0,84	0,6
Valeur du p	0,01	0,21	

Le taux moyen des anticorps anti-PfEMP-1/VarO était plus élevé dans le sexe masculin par rapport au sexe féminin en présaison dans notre étude ($p = 0,01$). Cette différence disparaissait entre les deux groupes en fin de saison ($P = 0,21$). Cependant, le taux moyen des anticorps anti-PfEMP-1/VarO n'avait pas augmenté significativement au cours de la saison de transmission dans le sexe féminin ($p = 0,08$) et masculin ($p = 0,6$).

Tableau VI : Taux moyen des anticorps anti-PfEMP-1/VarO en fonction de l'ethnie

Ethnie	Moyenne DO \pm Ecart Type		P
	Pré saison	Post-saison	
Bambara	1,98 \pm 1,36	1,67 \pm 1,38	0,65
Fula	2,11 \pm 1,27	2,80 \pm 0,14	0,27
Malinké	2,27 \pm 1,00	2,42 \pm 0,91	0,15
Sarakolé	0,00 \pm 0	1,60 \pm 2,26	
Valeur du p	0,14	0,15	

Il n'existe aucune variation significative du taux moyen d'anticorps anti-PfEMP-1/VarO entre les différents groupes ethnique ni en présaison ($p=0,14$), ni en post-saison ($p=0,15$). De même, à l'intérieur des groupes ethniques, il n'existe aucune variation significative du taux moyen d'anticorps anti PfEMP-1/VarO au cours de la saison de transmission ($p > 0,05$).

Tableau VII : taux moyen d'anticorps en amont de la saison de transmission en fonction du nombre d'épisode

Episode	Moyenne DO ± Ecart type
aucun	2.69±0,65
1_episode	2.43±0,96
2_episodes	2.20±1,02
3 épisodes et plus	1.98±1,10
P	0 ,005

Nous avons constaté que les sujets présentant un niveau d'anticorps élevé en début de saisons de transmission faisaient moins d'épisode de paludisme au cours de la saison. La différence était statistiquement significative ($p=0,005$).

Nous avons observé une corrélation négative entre le nombre d'épisode et le taux d'anticorps anti PfEMP-1/VarO, cette corrélation est statistiquement significative (test de Pearson=-0,265 $p=0,001$).

Tableau VIII : Variation moyenne du taux des anticorps anti-PfEMP-1/VarO au cours de la saison de transmission en fonction du nombre d'épisode palustre chez les enfants de Kéniéroba en 2011

Classe d'Age (ans)	Nombre d'Episode	Différence Moyenne DO	Nombre de sujet	Ecart type
0-5	0	0.5887	6	1.22994
	1	0.3535	11	0.64182
	2	0.5092	13	0.88890
	3	0.3408	13	1.02978
	Total	0.4295	43	0.90357
6-10	0	0.0654	25	0.26996
	1	0.0442	28	0.68209
	2	0.1493	18	0.31888
	3	0.6656	6	0.86846
	Total	0.1241	77	0.53614
11- 15	0	-0.0344	12	0.46570
	1	-0.0666	10	0.63952
	2	-0.0995	1	0
	3	0.1400	1	0
	Total	-0.0432	24	0.51540
Total	0	0.1105	43	0.56428
	1	0.0911	49	0.66817
	2	0.2877	32	0.63100
	3	0.4282	20	0.94638
	Total	0.1874	144	0.68118

Interaction entre la réponse humorale anti-PfEMP-1/VarO et l'incidence palustre chez une cohorte d'enfants vivant à Kéniéroba

De façon générale, nous avons observé une augmentation de 0,1874 sur DO après la saison de transmission. Cette augmentation était négativement corrélée à l'âge. Nous n'avons observé aucun effet des épisodes palustres sur la variation du taux moyen des anticorps à l'intérieur des classes d'âge.

6. COMMENTAIRES ET DISCUSSION

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche sur le paludisme à *P. falciparum*, menée par le MRTC/FMPOS/USTTB en collaboration avec le NIAID/NIH des Etats-Unis d'Amérique. Elle visait à décrire l'interaction entre la réponse humorale anti-PfEMP-1/VarO et l'incidence palustre chez les enfants vivant dans le village de Kéniéroba pendant la période d'étude.

Le village de Kéniéroba a été choisi du fait de sa situation géographique. Il se trouve dans une zone d'endémie palustre saisonnière longue de juin à octobre. Sa proximité avec Bamako nous facilitait l'acheminement des échantillons au laboratoire au MRTC. Le village est accessible en toute saison. Notre équipe de recherche possède de solides relations avec les villageois depuis 1993. Le village possède une riche expérience dans la participation à des études de recherche biomédicale, facilitant ainsi leur adhésion au projet de recherche.

L'étude a concerné les enfants âgés de 4 à 15 ans dont les parents ou tuteurs ont donné leur consentement libre et éclairé. L'exclusion des enfants de moins de 4 ans se justifiait par le caractère contraignant de l'étude originale qui exigeait des prélèvements fréquents. Les sujets de plus de 15 ans pourraient aussi constituer un biais dans cette étude à cause de leur statut immun.

En effet, le village de Kéniéroba étant situé dans une zone d'endémie palustre, les sujets âgés y acquièrent une immunité protectrice contre l'incidence palustre avec l'âge. Au total, 230 enfants ont été inclus dans notre étude. La majorité des enfants étaient de la classe d'âge de 6 à 10 ans (54,8%), avec un sexe ratio de

1,03 en faveur du sexe masculin (figure 8) et La majorité de nos participants étaient des malinkés (94,3%).

Ainsi notre échantillonnage était assez homogène sur le plan du genre et de l'ethnie éliminant ainsi les effets confondant pouvant être liés à ces deux facteurs. Plus du tiers des participants de notre cohorte n'ont présenté aucun cas de paludisme clinique au cours de la saison de transmission soit 36,5%. Pour bien appréhender l'interaction entre la réponse anti-PfEMP-1/VarO et l'incidence palustre, les participants ayant présenté des cas de paludisme clinique ont été divisés en trois groupes : ceux ayant présenté un seul épisode de paludisme (32,2%), deux épisodes (19,1%), et au moins trois épisodes (12,2% ; Figure 11).

La vaccination contre le paludisme avec des antigènes recombinants nécessite l'optimisation d'un grand nombre de paramètres, notamment le système d'expression, la quantité de protéines injectées, le calendrier de vaccination, le nombre de doses, l'adjuvant et la voie d'administration. Seuls certains de ces paramètres ont faits l'objet d'études approfondies. La capacité des érythrocytes infectés par *P. falciparum* à se lier aux érythrocytes non infectés (rosetting) est associée à un paludisme grave chez les enfants africains. Le rosetting est initié par un sous-ensemble du variant des antigènes de surface PfEMP1 ciblés par des réponses anticorps protecteurs. L'analyse de la réponse aux parasites formant des rosettes et à leurs domaines adhésifs PfEMP1 est essentielle pour comprendre l'acquisition d'une protection contre le paludisme grave.

A cette fin, la réponse anticorps à une variante de la rosette a été analysée chez des enfants recrutés avec un paludisme non compliqué ou une infection asymptomatique à *P. falciparum*. Bien que le rosetting soit le phénotype de cytoadhérence le mieux documenté associé au paludisme grave chez les enfants africains, on sait peu de choses sur la réponse acquise contre le rosetting des parasites dans les zones endémiques. Une séroprévalence élevée de VarO chez les enfants semi-immuns et les adultes immunisés a été observée dans une population sénégalaise [13]. Les enfants atteints de paludisme grave ou non compliqué avaient une réponse anti-varO beaucoup plus faible que les enfants asymptomatiques semi-immuns, ce qui correspond à la conclusion que ces anticorps sont associés à une protection contre le paludisme clinique dans le groupe d'âge qui acquiert progressivement une réponse protectrice.

Nous avons observé que le taux moyen des anticorps anti-PfEMP-1/VarO était corrélé à l'âge aussi bien en amont ($p = 10^{-3}$) qu'en aval de la saison de transmission ($p = 10^{-3}$). De façon générale, nous avons observé une augmentation du taux moyen des anticorps anti-PfEMP-1/VarO au cours de la saison de transmission. Cependant, cette augmentation était significative seulement chez les sujets de 0 à 5 ans ($p = 0,045$). Par contre, nous n'avons pas observé de variation statistiquement significative chez les participants de 6 à 10 ans ($p = 0,28$) et 11 à 15 ans ($p = 0,69$). L'acquisition de l'immunité humorale est fortement liée à des expositions répétées au parasite du paludisme et l'âge est un paramètre surrogatoire de l'immunité antipaludique dans les zones d'endémie palustre [121]. L'augmentation significative du taux d'anticorps chez les enfants de 0 à 5 ans au cours de la saison de transmission peut s'expliquer par le fait que les sujets de ce groupe d'âge n'ont pas encore acquis l'immunité humorale et sont donc en plein processus d'acquisition des anticorps contre les antigènes de *P. falciparum*.

Interaction entre la réponse humorale anti-PfEMP-1/VarO et l'incidence palustre chez une cohorte d'enfants vivant à Kéniéroba

Une très forte prévalence des anticorps réagissant avec la surface VarO des érythrocytes infectés (VarO-IE) a été observée chez les enfants asymptomatiques. L'âge moyen des enfants asymptomatiques était de $6,5 \pm 1,3$ ans, âge auquel les enfants vivant dans de telles conditions de transmission sont semi-immuns mais sont toujours à risque de développer un paludisme clinique. En tant que tel, et avec les mises en garde de comparaisons entre différentes études, la séroprévalence à VarO-IE chez les enfants asymptomatiques de Ouidah au Bénin semblait plus élevée que la réponse à d'autres lignées parasitaires, y compris les parasites FCR3S1.2 formant des rosettes [122] ou un seul variant de la lignée A4var observé chez des enfants kenyans semi-immuns vivant dans des conditions de transmission similaires [123], ou à la réponse aux isolats locaux signalés chez des enfants tanzaniens vivant dans des conditions de transmission faible et modérée [124]. Elle est également plus élevée que la réponse observée contre [125-127] un panel d'isolats locaux au Ghana. Les enfants vivant dans des conditions de transmission plus intenses qui auraient acquis plus tôt dans leur vie un répertoire d'anticorps élargi [128].

Bien que ces données nécessitent une confirmation supplémentaire, elles sont compatibles avec le fait que VarO est un sérotype dit "fréquent" ou "prévalent" [129, 130] généralement associé au paludisme grave, ce qui semble être une caractéristique des *gènes var* du groupe A [131, 132] auquel appartient le *gène varO*. On ne sait pas encore si la réaction observée avec la surface VarO-IE et/ou les différents domaines recombinants dérivés de varO est strictement varO-spécifique ou reflète une large réactivité croisée avec d'autres "variants de rosetting" dont certaines appartiennent également aux gènes du groupe var A [133, 134].

Les taux et les niveaux de prévalence dans tous les tests liés à VarO (surface des érythrocytes infectés, IgG totale, IgG1 et IgG3 dans les trois domaines

Interaction entre la réponse humorale anti-PfEMP-1/VarO et l'incidence palustre chez une cohorte d'enfants vivant à Kéniéroba

recombinants) étaient beaucoup plus faibles chez les enfants atteints de paludisme clinique que chez les enfants atteints d'infection asymptomatique. Cette différence est demeurée significative dans l'analyse multivariée, c'est-à-dire après correction en fonction de l'âge et de la densité parasitaire au moment de l'inclusion. Il est possible que les différentes expositions des enfants contribuent en partie à ces résultats. Dans l'étude béninoise, certains enfants asymptomatiques avaient été recrutés dans une zone où l'intensité de transmission avait été estimée plus faible que dans la zone de Cotonou où vivaient les enfants symptomatiques recrutés à l'hôpital, bien que la transmission à Cotonou soit assez hétérogène.

Quoi qu'il en soit, cette différence se traduirait par un retard dans l'acquisition des anticorps dans une zone à transmission élevée par rapport à une zone à faible niveau de transmission, car une plus grande intensité de transmission est clairement associée à une acquisition plus rapide d'un répertoire d'anticorps élargi [124, 131, 135]. Pour mieux documenter l'association des anticorps réagissant au VarO avec la protection contre le paludisme clinique, un suivi longitudinal des enfants est nécessaire pour montrer que la présence de tels anticorps prévient la maladie causée par *P. falciparum* exprimant ce sérotype ou des sérotypes similaires par le biais de la réaction croisée.

Au cours de notre étude, le taux moyens des anticorps anti-PfEMP-1/VarO était plus élevé dans les classes d'âges supérieurs comparés aux classes d'âges inférieurs. Cela pourrait s'expliquer par la persistance des anticorps chez les enfants plus âgés après l'exposition au parasite au cours de la saison de transmission. Les enfants plus âgés ont habituellement des proportions plus élevées de plasmocytes de longue durée de vie permettant aux anticorps d'être continuellement produits [136]. Dans une étude en Gambie, Khosravi et al.

Interaction entre la réponse humorale anti-PfEMP-1/VarO et l'incidence palustre chez une cohorte d'enfants vivant à Kéniéroba

(2011) ont démontré que le taux d'anticorps anti MSP2 augmentait avec l'âge [137]. Udhayakumar et al. (2001) au Kenya ont démontré que les réponses humorales et cellulaires contre AMA1 augmentaient avec l'âge dans les populations continuellement exposées au paludisme [138]. Il est possible que les anticorps cytophiliques à la surface de l'érythrocyte infecté contribuent à la clairance parasitaire chez les patients qui n'ont pas (encore) acquis des anticorps perturbateurs de rosettes. Ces anticorps (IgG1 et IgG3) contribuent probablement à la protection, mais leur acquisition peut être séquentielle et/ou dépendre de l'endémicité et de l'intensité de la transmission. Une circulation réduite des parasites de *P. falciparum* sur le terrain, y compris les parasites VarO ou apparentés à VarO, ce qui réduit le transport asymptomatique et ses conséquences sur le maintien des réponses immunitaires pendant cette période est donc plausible.

Le taux moyen des anticorps anti-PfEMP-1/VarO était plus élevé dans le sexe masculin par rapport au sexe féminin en présaison dans notre étude ($p = 0,01$), L'influence de l'un ou l'autre des sexes n'as pas été rapporté. Dans notre étude, l'âge était positivement corrélé à la réponse anti-PfEMP-1/VarO. Cependant, les sujets des deux sexes étaient similairement repartis entre les différentes classes d'âge. La faible susceptibilité de certaines ethnies au paludisme a été décrite bien que les mécanismes qui sont à la base de cette observation ne soient totalement élucidés encore [139]. Des facteurs de l'immunité acquise semblent impliqués dans ce phénomène [140, 141]. Ainsi, nous avons comparé les taux d'anticorps anti-PfEMP-1/VarO Chez les différentes ethnies représentées dans la cohorte d'étude. Nous n'avons pas observé de différence entre les taux moyens d'anticorps chez les quatre ethnies représenté dans l'étude ni en amont ou en aval de la saison.

Nous avons évalué l'impact des taux des anticorps anti-PfEMP-1/VarO en présaison sur l'incidence du paludisme au cours de la saison de transmission subséquente. Nous n'avons pas observé d'association statistiquement significative entre le taux moyen d'anticorps anti PfEMP-1/VarO élevés en amont de la saison de transmission et les faibles incidences du paludisme même s'il y avait une tendance vers cette association. Une étude avec un échantillonnage plus large pour permettre d'y voir plus clairement. Ce constat suggère que les anticorps anti-PfEMP-1/VarO pourraient protéger contre l'incidence palustre. Le même constat avait été observé avec d'autres antigènes de *Plasmodium falciparum* dans la même zone. Une augmentation générale du taux d'anticorps a été constatée à la fin de la saison de transmission. Cette augmentation était plus accentuée chez les enfants de 0 à 5 ans. Cependant elle n'était pas corrélée au nombre d'épisode de paludisme clinique recensé au cours de la saison de transmission. Elle semble donc être due à l'exposition des sujets à l'antigène à travers les infections asymptomatiques.

Nous n'avons pas testé l'opsonisation des érythrocytes infectés, bien que la production d'anticorps opsonisants soit parallèle à la production d'anticorps réagissant en surface contre les domaines PfEMP1 formant des rosettes [142]. Il est intéressant de noter que les enfants semi-immuns n'avaient pas de niveaux détectables d'anticorps capables de perturber les rosettes varO. Ceci soulève la possibilité intrigante que les anticorps cytophilique contribuent à la protection contre le paludisme clinique en favorisant l'opsonisation des érythrocytes infectés, réduisant ainsi la charge parasitaire globale.

En résumé, les résultats rapportés ici sont prometteurs pour le développement de vaccins et constituent une base solide pour les études futures qui incluront des études dose-réponse et adjuvant, l'investigation de l'ampleur de la réponse anticorps contre un large panel d'isolats de terrain ainsi que de la durée de l'immunité induite par le candidat vaccin, une question critique pour un vaccin à l'ère de l'élimination du paludisme.

7. CONCLUSION ET RECOMMANDATION.

7.1. Conclusion

Le taux des anticorps anti-PfEMP-1/VarO augmentait avec l'âge aussi bien en amont qu'en aval de la saison de transmission palustre. Cette étude confirme la séroprévalence élevée de VarO chez les enfants semi-immuns et les adultes immunisés précédemment observés dans une population sénégalaise [13].

7.2. Recommandations

Au terme de cette étude et au vu de nos résultats, recommandons la poursuite des investigations sur la réponse immune anti-PfEMP1/VarO notamment l'exploration de la réponse immunitaire cellulaire aux PfEMP-1/VarO chez les sujets vivant en zone d'endémie palustre.

8. LIMITES DE NOTRE ETUDE

Notre étude s'est intéressée uniquement à la réponse humorale anti-PfEMP-1/VarO chez les enfants âgés de 4 à 15 ans. Nous n'avons pas inclus les enfants de 0 à 4 et les plus de 15 ans qui peut être source de biais vu la susceptibilité accrue des enfants de moins de 5 ans au paludisme. En outre, il serait intéressant d'étude la réponse des sous-types d'IgG (notamment IgG1 et IgG3) qui semblent être impliqués dans la protection contre le paludisme [8]. Une étude ayant une taille d'échantillon plus importante pourrait apporter une conclusion plus robuste par rapport à notre étude.

9. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. OMS, La lutte contre le paludisme s'améliore pour les personnes vulnérables en Afrique, mais les progrès stagnent à l'échelle mondiale. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2016/malaria-control-africa/fr/> consulté le 28/03/17, 2016.
2. Enquête sur les Indicateurs du Paludisme (EIPM) 2015.
3. Subramanian, G., et al., Targeted Phenotypic Screening in *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* Reveals Novel Modes of Action of Medicines for Malaria Venture Malaria Box Molecules. *mSphere*, 2018. **3**(1).
4. Tindall, S.M., et al., Heterologous Expression of a Novel Drug Transporter from the Malaria Parasite Alters Resistance to Quinoline Antimalarials. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 2464.
5. Dada, N., et al., Whole metagenome sequencing reveals links between mosquito microbiota and insecticide resistance in malaria vectors. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 2084.
6. Gardner, M.J., et al., Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 2002. **419**(6906): p. 498-511.
7. Healer, J., C.Y. Chiu, and D.S. Hansen, Mechanisms of naturally acquired immunity to *P. falciparum* and approaches to identify merozoite antigen targets. *Parasitology*, 2017: p. 1-9.
8. Vigan-Womas, I., et al., The humoral response to *Plasmodium falciparum* VarO rosetting variant and its association with protection against malaria in Beninese children. *Malar J*, 2010. **9**: p. 267.
9. Freitas-Junior, L.H., et al., Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome clusters of *P. falciparum*. *Nature*, 2000. **407**(6807): p. 1018-22.
10. Taylor, H.M., S.A. Kyes, and C.I. Newbold, Var gene diversity in *Plasmodium falciparum* is generated by frequent recombination events. *Mol Biochem Parasitol*, 2000. **110**(2): p. 391-7.
11. Guillotte, M., et al., Functional analysis of monoclonal antibodies against the *Plasmodium falciparum* PfEMP1-VarO adhesin. *Malar J*, 2016. **15**: p. 28.
12. Rowe, J.A., et al., *P. falciparum* rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1. *Nature*, 1997. **388**(6639): p. 292-5.
13. Vigan-Womas, I., et al., An in vivo and in vitro model of *Plasmodium falciparum* rosetting and autoagglutination mediated by varO, a group A var gene encoding a frequent serotype. *Infect Immun*, 2008. **76**(12): p. 5565-80.

14. Doumbo, O., et al., [Incidence of malaria and S hemoglobinopathy in the pediatric hospital milieu in Bamako, Mali]. *Med Trop (Mars)*, 1992. **52**(2): p. 169-74.
15. Singh, B., et al., A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. *Lancet*, 2004. **363**(9414): p. 1017-24.
16. Chinery, W.A., Effects of ecological changes on the malaria vectors *Anopheles funestus* and the *Anopheles gambiae* complex of mosquitoes in Accra, Ghana. *J Trop Med Hyg*, 1984. **87**(2): p. 75-81.
17. Drakeley, C.J., et al., Host haematological factors influencing the transmission of *Plasmodium falciparum* gametocytes to *Anopheles gambiae* s.s. mosquitoes. *Trop Med Int Health*, 1999. **4**(2): p. 131-8.
18. Rickman, L.S., et al., *Plasmodium falciparum*-infected *Anopheles stephensi* inconsistently transmit malaria to humans. *Am J Trop Med Hyg*, 1990. **43**(5): p. 441-5.
19. Kyes, S., P. Horrocks, and C. Newbold, Antigenic variation at the infected red cell surface in malaria. *Annu Rev Microbiol*, 2001. **55**: p. 673-707.
20. WHO., Severe falciparum malaria. . *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2000(World Health Organization, Communicable Diseases Cluster.): p. 94 Suppl 1: p. S1-90.
21. Angulo, I. and M. Fresno, Cytokines in the pathogenesis of and protection against malaria. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002. **9**(6): p. 1145-52.
22. Kwiatkowski, D., Tumour necrosis factor, fever and fatality in falciparum malaria. *Immunol Lett*, 1990. **25**(1-3): p. 213-6.
23. McGuire, W., et al., Levels of tumour necrosis factor and soluble TNF receptors during malaria fever episodes in the community. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1998. **92**(1): p. 50-3.
24. Smith, L.A., et al., Intermittent screening and treatment versus intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy: user acceptability. *Malar J*, 2010. **9**: p. 18.
25. OMS, Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster.. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2000.
, 2000(94 Suppl 1: p. S1-90.).
26. Newton, C.R.a.S.K., Severe falciparum malaria in children: current understanding of pathophysiology and supportive treatment.. *Pharmacol Ther*, 1998, 1998(79(1): p. 153.).
27. Aldjouma, Guindo., Hémoglobinopathies et paludisme chez l'enfant d'âge scolaire au Mali. Impact de deux schémas de supplémentation martiale. Thèse,
Pharm., Bamako ;1998. 98-p-25.

. 1998.

28. Handunnetti, S.M., et al., Involvement of CD36 on erythrocytes as a rosetting receptor for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Blood*, 1992. **80**(8): p. 2097-104.
29. Carlson, J.a.M.W., *Plasmodium falciparum* erythrocyte rosetting is mediated by promiscuous lectin-like interactions. *J Exp Med*, 1992: p. 176(5): p. 1311-7.
30. Rowe, A., et al., *Plasmodium falciparum* rosetting is associated with malaria severity in Kenya. *Infect Immun*, 1995. **63**(6): p. 2323-6.
31. Doumbo, O.K., et al., High levels of *Plasmodium falciparum* rosetting in all clinical forms of severe malaria in African children. *Am J Trop Med Hyg*, 2009. **81**(6): p. 987-93.
32. Carlson, J., et al., Human cerebral malaria: association with erythrocyte rosetting and lack of anti-rosetting antibodies. *Lancet*, 1990. **336**(8729): p. 1457-60.
33. Udomsanpetch, R., et al., Rosette formation by *Plasmodium vivax*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1995. **89**(6): p. 635-7.
34. Marin-Menendez, A., et al., Rosetting in *Plasmodium vivax*: a cytoadhesion phenotype associated with anaemia. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013. **7**(4): p. e2155.
35. Chen, Q., et al., The semiconserved head structure of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 mediates binding to multiple independent host receptors. *J Exp Med*, 2000. **192**(1): p. 1-10.
36. Cooke, B.M., et al., Rolling and stationary cytoadhesion of red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum*: separate roles for ICAM-1, CD36 and thrombospondin. *Br J Haematol*, 1994. **87**(1): p. 162-70.
37. Baruch, D.I., et al., Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell*, 1995. **82**(1): p. 77-87.
38. Su, X.Z., et al., The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell*, 1995. **82**(1): p. 89-100.
39. Newton, C.R., T.E. Taylor, and R.O. Whitten, Pathophysiology of fatal *falciparum* malaria in African children. *Am J Trop Med Hyg*, 1998. **58**(5): p. 673-83.
40. Belachew, E.B., Immune Response and Evasion Mechanisms of *Plasmodium falciparum* Parasites. *J Immunol Res*, 2018. **2018**: p. 6529681.
41. Good, M.F., Towards a blood-stage vaccine for malaria: are we following all the leads? *Nat Rev Immunol*, 2001. **1**(2): p. 117-25.
42. Stevenson, M.M. and E.M. Riley, Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**(3): p. 169-80.

43. Hviid, L. and A.T. Jensen, PfEMP1 - A Parasite Protein Family of Key Importance in Plasmodium falciparum Malaria Immunity and Pathogenesis. *Adv Parasitol*, 2015. **88**: p. 51-84.
44. Kumsiri, R., et al., IgE low affinity receptor (CD23) expression, Plasmodium falciparum specific IgE and tumor necrosis factor-alpha production in Thai uncomplicated and severe falciparum malaria patients. *Acta Trop*, 2016. **154**: p. 25-33.
45. McCallum, F.J., et al., Differing rates of antibody acquisition to merozoite antigens in malaria: implications for immunity and surveillance. *J Leukoc Biol*, 2017. **101**(4): p. 913-925.
46. Good, M.F. and L.H. Miller, Interpreting challenge data from early phase malaria blood stage vaccine trials. *Expert Rev Vaccines*, 2018. **17**(3): p. 189-196.
47. de Lima Corvino, D.F., et al., When Epidemiology Is the Clue to a Positive Outcome: A Case of Malaria During Pregnancy. *Am J Case Rep*, 2018. **19**: p. 128-132.
48. Feron, P., D. Dechamps, and D. Konopnicki, [Fatal outcome in a patient coinfecting by malaria and HIV]. *Rev Med Brux*, 2017. **38**(6): p. 515-519.
49. Larremore, D.B., et al., Ape parasite origins of human malaria virulence genes. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 8368.
50. Scherf, A., J.J. Lopez-Rubio, and L. Riviere, Antigenic variation in Plasmodium falciparum. *Annu Rev Microbiol*, 2008. **62**: p. 445-70.
51. Hamilton, W.L., et al., Extreme mutation bias and high AT content in Plasmodium falciparum. *Nucleic Acids Res.*, 2017. **45**(4): p. 1889-1901.
52. Ribacke, U., et al., Genome wide gene amplifications and deletions in Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol*, 2007. **155**(1): p. 33-44.
53. Mok, B.W., et al., A highly conserved segmental duplication in the subtelomeres of Plasmodium falciparum chromosomes varies in copy number. *Malar J*, 2008. **7**: p. 46.
54. Claessens, A., et al., Generation of antigenic diversity in Plasmodium falciparum by structured rearrangement of Var genes during mitosis. *PLoS Genet*, 2014. **10**(12): p. e1004812.
55. Helmby, H., et al., Rosetting Plasmodium falciparum-infected erythrocytes express unique strain-specific antigens on their surface. *Infect Immun*, 1993. **61**(1): p. 284-8.
56. Chen, Q., et al., Identification of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) as the rosetting ligand of the malaria parasite P. falciparum. *J Exp Med*, 1998. **187**(1): p. 15-23.
57. Fernandez, V., et al., Small, clonally variant antigens expressed on the surface of the Plasmodium falciparum-infected erythrocyte are encoded by the rif gene family and are the target of human immune responses. *J Exp Med*, 1999. **190**(10): p. 1393-404.

58. Kyes, S.A., et al., Rifins: a second family of clonally variant proteins expressed on the surface of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(16): p. 9333-8.
59. Kaviratne, M., et al., Small variant STEVOR antigen is uniquely located within Maurer's clefts in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Eukaryot Cell*, 2002. **1**(6): p. 926-35.
60. Niang, M., et al., STEVOR is a *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding protein that mediates merozoite invasion and rosetting. *Cell Host Microbe*, 2014. **16**(1): p. 81-93.
61. Sargeant, T.J., et al., Lineage-specific expansion of proteins exported to erythrocytes in malaria parasites. *Genome Biol*, 2006. **7**(2): p. R12.
62. Maier, A.G., et al., Exported proteins required for virulence and rigidity of *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. *Cell*, 2008. **134**(1): p. 48-61.
63. Spielmann, T., D.J. Ferguson, and H.P. Beck, etramps, a new *Plasmodium falciparum* gene family coding for developmentally regulated and highly charged membrane proteins located at the parasite-host cell interface. *Mol Biol Cell*, 2003. **14**(4): p. 1529-44.
64. Oberli, A., et al., A *Plasmodium falciparum* PHIST protein binds the virulence factor PfEMP1 and comigrates to knobs on the host cell surface. *FASEB J*, 2014. **28**(10): p. 4420-33.
65. Nguitragool, W., et al., Malaria parasite clag3 genes determine channel-mediated nutrient uptake by infected red blood cells. *Cell*, 2011. **145**(5): p. 665-77.
66. Nunes, M.C., et al., *Plasmodium falciparum* FIKK kinase members target distinct components of the erythrocyte membrane. *PLoS One*, 2010. **5**(7): p. e11747.
67. OMS, Paludisme. 2017, OMS: geneve.
68. Miller, L.H., et al., The pathogenic basis of malaria. *Nature*, 2002. **415**(6872): p. 673-9.
69. Dondorp, A.M., et al., Abnormal blood flow and red blood cell deformability in severe malaria. *Parasitol Today*, 2000. **16**(6): p. 228-32.
70. Tiburcio, M., et al., A switch in infected erythrocyte deformability at the maturation and blood circulation of *Plasmodium falciparum* transmission stages. *Blood*, 2012. **119**(24): p. e172-80.
71. Ishioka, H., et al., Sequestration and Red Cell Deformability as Determinants of Hyperlactatemia in *Falciparum* Malaria. *J Infect Dis*, 2016. **213**(5): p. 788-93.
72. David, P.H., et al., Parasite sequestration in *Plasmodium falciparum* malaria: spleen and antibody modulation of cytoadherence of infected erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983. **80**(16): p. 5075-9.

73. Trager, W., M.A. Rudzinska, and P.C. Bradbury, The fine structure of *Plasmodium falciparum* and its host erythrocytes in natural malarial infections in man. *Bull World Health Organ*, 1966. **35**(6): p. 883-5.
74. MacPherson, G.G., et al., Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *Am J Pathol*, 1985. **119**(3): p. 385-401.
75. David, P.H., et al., Rosetting: a new cytoadherence property of malaria-infected erythrocytes. *Am J Trop Med Hyg*, 1988. **38**(2): p. 289-97.
76. Udomsangpetch, R., et al., Cytoadherence of knobless *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and its inhibition by a human monoclonal antibody. *Nature*, 1989. **338**(6218): p. 763-5.
77. Handunnetti, S.M., et al., Uninfected erythrocytes form "rosettes" around *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Am J Trop Med Hyg*, 1989. **40**(2): p. 115-8.
78. Roberts, D.J., et al., Autoagglutination of malaria-infected red blood cells and malaria severity. *Lancet*, 2000. **355**(9213): p. 1427-8.
79. Kaul, D.K., et al., Rosetting of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells with uninfected red blood cells enhances microvascular obstruction under flow conditions. *Blood*, 1991. **78**(3): p. 812-9.
80. White, N.J., et al., The murine cerebral malaria phenomenon. *Trends Parasitol*, 2010. **26**(1): p. 11-5.
81. Clark, H.C., The Diagnostic Value of the Placental Blood Film in Aestivo-Autumnal Malaria. *J Exp Med*, 1915. **22**(4): p. 427-44.
82. Milner, D.A., Jr., et al., Severe malaria in children and pregnancy: an update and perspective. *Trends Parasitol*, 2008. **24**(12): p. 590-5.
83. Rogerson, S.J., Malaria in pregnancy and the newborn. *Adv Exp Med Biol*, 2010. **659**: p. 139-52.
84. Mok, B.W., et al., Comparative transcriptomal analysis of isogenic *Plasmodium falciparum* clones of distinct antigenic and adhesive phenotypes. *Mol Biochem Parasitol*, 2007. **151**(2): p. 184-92.
85. Goel, S., et al., RIFINs are adhesins implicated in severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Nat Med*, 2015. **21**(4): p. 314-7.
86. Niang, M., X. Yan Yam, and P.R. Preiser, The *Plasmodium falciparum* STEVOR multigene family mediates antigenic variation of the infected erythrocyte. *PLoS Pathog*, 2009. **5**(2): p. e1000307.
87. Wahlgren, M., S. Goel, and R. Akhouri, Variant surface antigens of *Plasmodium falciparum* and their roles in severe malaria. *Nat Rev Microbiol*, 2017. **15**(8): p. 479-491.

88. Berendt, A.R., D.J. Ferguson, and C.I. Newbold, Sequestration in *Plasmodium falciparum* malaria: sticky cells and sticky problems. *Parasitol Today*, 1990. **6**(8): p. 247-54.
89. Miller, L.H., Distribution of mature trophozoites and schizonts of *Plasmodium falciparum* in the organs of *Aotus trivirgatus*, the night monkey. *Am J Trop Med Hyg*, 1969. **18**(6): p. 860-5.
90. Langreth, S.G., et al., *Plasmodium falciparum*: loss of knobs on the infected erythrocyte surface after long-term cultivation. *Exp Parasitol*, 1979. **48**(2): p. 213-9.
91. Leech, J.H., et al., *Plasmodium falciparum* malaria: association of knobs on the surface of infected erythrocytes with a histidine-rich protein and the erythrocyte skeleton. *J Cell Biol*, 1984. **98**(4): p. 1256-64.
92. Udeinya, I.J., et al., *Plasmodium falciparum* strain-specific antibody blocks binding of infected erythrocytes to amelanotic melanoma cells. *Nature*, 1983. **303**(5916): p. 429-31.
93. Howard, R.J., et al., Two approximately 300 kilodalton *Plasmodium falciparum* proteins at the surface membrane of infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol*, 1988. **27**(2-3): p. 207-23.
94. Smith, J.D., et al., Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell*, 1995. **82**(1): p. 101-10.
95. Wahlgren, M., S. Goel, and R.R. Akhouri, Variant surface antigens of *Plasmodium falciparum* and their roles in severe malaria. *Nat Rev Microbiol*, 2017. **15**(8): p. 479-491.
96. Smith, D.L., et al., A sticky situation: the unexpected stability of malaria elimination. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2013. **368**(1623): p. 20120145.
97. Cranston, H.A., et al., *Plasmodium falciparum* maturation abolishes physiologic red cell deformability. *Science*, 1984. **223**(4634): p. 400-3.
98. Hommel, M., P.H. David, and L.D. Oligino, Surface alterations of erythrocytes in *Plasmodium falciparum* malaria. Antigenic variation, antigenic diversity, and the role of the spleen. *J Exp Med*, 1983. **157**(4): p. 1137-48.
99. Baruch, D.I., et al., *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(8): p. 3497-502.
100. Janes, J.H., et al., Investigating the host binding signature on the *Plasmodium falciparum* PfEMP1 protein family. *PLoS Pathog*, 2011. **7**(5): p. e1002032.
101. Esser, C., et al., Evidence of promiscuous endothelial binding by *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell Microbiol*, 2014. **16**(5): p. 701-8.
102. Adams, Y., et al., Rosetting *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes bind to human brain microvascular endothelial cells in vitro, demonstrating a dual adhesion

phenotype mediated by distinct *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 domains. *Infect Immun*, 2014. **82**(3): p. 949-59.

103. Lau, C.K., et al., Structural conservation despite huge sequence diversity allows EPCR binding by the PfEMP1 family implicated in severe childhood malaria. *Cell Host Microbe*, 2015. **17**(1): p. 118-29.

104. Blum, M., et al., A structural motif in the variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei*. *Nature*, 1993. **362**(6421): p. 603-609.

105. Gitau, E., et al., CD4+ T cell responses to the *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 in children with mild malaria. *J Immunol.*, 2014. **192**(4): p. 1753-61.

106. Hviid, L., The case for PfEMP1-based vaccines to protect pregnant women against *Plasmodium falciparum* malaria. *Expert Rev Vaccines*, 2011. **10**(10): p. 1405-14.

107. Pehrson, C., et al., Pre-clinical and clinical development of the first placental malaria vaccine. *Expert Rev Vaccines*, 2017. **16**(6): p. 613-624.

108. Fried, M., et al., Antibody levels to recombinant VAR2CSA domains vary with *Plasmodium falciparum* parasitaemia, gestational age, and gravidity, but do not predict pregnancy outcomes. *Malar J*, 2018. **17**(1): p. 106.

109. Carlson, J., et al., Antibodies to a histidine-rich protein (PfHRP1) disrupt spontaneously formed *Plasmodium falciparum* erythrocyte rosettes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(7): p. 2511-5.

110. Fried, M., et al., Maternal antibodies block malaria. *Nature*, 1998. **395**(6705): p. 851-2.

111. Staalsoe, T., et al., Variant surface antigen-specific IgG and protection against clinical consequences of pregnancy-associated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet*, 2004. **363**(9405): p. 283-9.

112. Abdel-Latif, M.S., et al., Antibodies to rifin: a component of naturally acquired responses to *Plasmodium falciparum* variant surface antigens on infected erythrocytes. *Am J Trop Med Hyg*, 2004. **71**(2): p. 179-86.

113. Abdel-Latif, M.S., et al., Antibodies to *Plasmodium falciparum* rifin proteins are associated with rapid parasite clearance and asymptomatic infections. *Infect Immun*, 2003. **71**(11): p. 6229-33.

114. Nielsen, M.A., et al., The Influence of Sub-Unit Composition and Expression System on the Functional Antibody Response in the Development of a VAR2CSA Based *Plasmodium falciparum* Placental Malaria Vaccine. *PLoS One*, 2015. **10**(9): p. e0135406.

115. Thrane, S., et al., A Novel Virus-Like Particle Based Vaccine Platform Displaying the Placental Malaria Antigen VAR2CSA. *PLoS One*, 2015. **10**(11): p. e0143071.

116. Khunrae, P., et al., Full-length recombinant Plasmodium falciparum VAR2CSA binds specifically to CSPG and induces potent parasite adhesion-blocking antibodies. *J Mol Biol*, 2010. **397**(3): p. 826-34.
117. Chen, Q., et al., Immunization with PfEMP1-DBL1alpha generates antibodies that disrupt rosettes and protect against the sequestration of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Vaccine*, 2004. **22**(21-22): p. 2701-12.
118. Bengtsson, A., et al., Transfected HEK293 cells expressing functional recombinant intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)--a receptor associated with severe Plasmodium falciparum malaria. *PLoS One*, 2013. **8**(7): p. e69999.
119. Abdel-Latif, M.S., et al., Recognition of variant Rifin antigens by human antibodies induced during natural Plasmodium falciparum infections. *Infect Immun*, 2002. **70**(12): p. 7013-21.
120. Tan, J., et al., A LAIR1 insertion generates broadly reactive antibodies against malaria variant antigens. *Nature*, 2016. **529**(7584): p. 105-109.
121. Ryg-Cornejo, V., A. Ly, and D.S. Hansen, Immunological processes underlying the slow acquisition of humoral immunity to malaria. *Parasitology*, 2016. **143**(2): p. 199-207.
122. Moll, K., et al., Generation of cross-protective antibodies against Plasmodium falciparum sequestration by immunization with an erythrocyte membrane protein 1-duffy binding-like 1 alpha domain. *Infect Immun*, 2007. **75**(1): p. 211-9.
123. Mackintosh, C.L., et al., Acquisition of naturally occurring antibody responses to recombinant protein domains of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1. *Malar J*, 2008. **7**: p. 155.
124. Vestergaard, L.S., et al., Differences in human antibody reactivity to Plasmodium falciparum variant surface antigens are dependent on age and malaria transmission intensity in northeastern Tanzania. *Infect Immun*, 2008. **76**(6): p. 2706-14.
125. Bull, P.C., et al., Plasmodium falciparum variant surface antigen expression patterns during malaria. *PLoS Pathog*, 2005. **1**(3): p. e26.
126. Kyriacou, H.M., et al., Differential var gene transcription in Plasmodium falciparum isolates from patients with cerebral malaria compared to hyperparasitaemia. *Mol Biochem Parasitol*, 2006. **150**(2): p. 211-8.
127. Normark, J., et al., PfEMP1-DBL1alpha amino acid motifs in severe disease states of Plasmodium falciparum malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(40): p. 15835-40.
128. Dodoo, D., et al., Antibodies to variant antigens on the surfaces of infected erythrocytes are associated with protection from malaria in Ghanaian children. *Infect Immun*, 2001. **69**(6): p. 3713-8.

129. Bull, P.C., et al., Antibody recognition of Plasmodium falciparum erythrocyte surface antigens in Kenya: evidence for rare and prevalent variants. *Infect Immun*, 1999. **67**(2): p. 733-9.
130. Nielsen, M.A., et al., Plasmodium falciparum variant surface antigen expression varies between isolates causing severe and nonsevere malaria and is modified by acquired immunity. *J Immunol*, 2002. **168**(7): p. 3444-50.
131. Cham, G.K., et al., Sequential, ordered acquisition of antibodies to Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 domains. *J Immunol*, 2009. **183**(5): p. 3356-63.
132. Jensen, A.T., et al., Plasmodium falciparum associated with severe childhood malaria preferentially expresses PfEMP1 encoded by group A var genes. *J Exp Med*, 2004. **199**(9): p. 1179-90.
133. Kyriacou, H.M., et al., Differential var gene transcription in Plasmodium falciparum isolates from patients with cerebral malaria compared to hyperparasitaemia. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2006. **150**(2): p. 211-218.
134. Kraemer, S.M., et al., Patterns of gene recombination shape var gene repertoires in Plasmodium falciparum: comparisons of geographically diverse isolates. *BMC Genomics*, 2007. **8**: p. 45.
135. Joergensen, L., et al., 3D7-Derived Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 is a frequent target of naturally acquired antibodies recognizing protein domains in a particular pattern independent of malaria transmission intensity. *J Immunol*, 2007. **178**(1): p. 428-35.
136. Akpogheneta, O.J., et al., Duration of naturally acquired antibody responses to blood-stage Plasmodium falciparum is age dependent and antigen specific. *Infect Immun*, 2008. **76**(4): p. 1748-55.
137. Khosravi, A., M. Hommel, and K. Sayemiri, Age-dependent antibody response to Plasmodium falciparum merozoite surface protein 2 (MSP-2). *Parasite Immunol*. **33**(3): p. 145-57. 2011.
138. Udhayakumar, V., et al., Longitudinal study of natural immune responses to the Plasmodium falciparum apical membrane antigen (AMA-1) in a holoendemic region of malaria in western Kenya: Asembo Bay Cohort Project VIII. *Am J Trop Med Hyg*, **65**(2): p. 100-7. 2001.
139. Dolo, A., et al., Difference in susceptibility to malaria between two sympatric ethnic groups in Mali. *Am J Trop Med Hyg*, 2005. **72**(3): p. 243-8.
140. Dolo, A., et al., [Humoral immune anti-Plasmodium falciparum AMA1 and MSP1 response in two ethnic groups living in sympatry in Mali]. *Bull Soc Pathol Exot*, 2012. **105**(5): p. 364-9.

-
141. Maïga, B., et al., Human candidate polymorphisms in sympatric ethnic groups differing in malaria susceptibility in Mali. *PLoS One*, 2013. **8**(10): p. e75675.
142. Ghumra, A., et al., Immunisation with recombinant PfEMP1 domains elicits functional rosette-inhibiting and phagocytosis-inducing antibodies to *Plasmodium falciparum*. *PLoS One*, 2011. **6**(1): p. e16414.

10. FICHE SIGNALÉTIQUE

Nom et Prénom: Mme Maïga Assietou Maïga

Nationalité: Malienne

Année et ville de soutenance: 2018, Bamako

Titre: Interaction entre la réponse humorale anti-PfEMP-1/VarO et l'incidence palustre chez une cohorte d'enfants vivant à Kéniéroba

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

Secteur d'intérêt: Parasitologie, Santé publique, immunologie.

Résumé :

Le PfEMP-1 est une protéine plasmodiale du stade érythrocytaire multi génique et très polymorphe impliquée dans la survie du parasite et la pathogenèse de la maladie. Le variant PfEMP-1/VarO est impliqué dans des phénomènes de rosetting associés à la survenue des manifestations graves du paludisme. Nous avons étudié la réponse humorale anti PfEMP-1/VarO chez une cohorte d'enfants vivant à Kénioroba (une commune rurale de Bancoumana, district sanitaire de Kati) au cours de la saison de transmission 2011.

Au total, 230 enfants âgées de 4 à 15 ans ont été inclus dans notre étude et plus du tiers des sujets de notre cohorte n'ont présenté aucun cas de paludisme clinique au cours de la saison de transmission.

Nous avons observé que le taux moyen d'anticorps anti PfEMP-1/VarO était corrélé à l'âge aussi bien en amont ($P=10^{-3}$) qu'en aval de la saison de transmission ($P=10^{-3}$). De façon générale, nous avons observé une augmentation du taux moyen d'anticorps anti PfEMP-1/VarO au cours de la saison de transmission.

Interaction entre la réponse humorale anti-PfEMP-1/VarO et l'incidence palustre chez une cohorte d'enfants vivant à Kéniéroba

Nous n'avons pas observé d'association statistiquement significative entre le taux moyen d'anticorps anti PfEMP-1/VarO élevé en amont de la saison de transmission et les faibles incidences du paludisme même s'il y avait une tendance vers cette association. Ce constat suggère que les anticorps anti-PfEMP-1/VarO pourraient protéger contre l'incidence palustre. Une étude avec un échantillon plus large est nécessaire pour évaluer plus clairement le rôle des anticorps anti-PfEMP1/VarO dans la protection contre l'incidence palustre.

Mots clés: Anticorps, PfEMP-1/VarO, l'incidence palustre.

Summary

PfEMP-1 is a multigenic and polymorphic erythrocytic stage protein of *P. falciparum* involved in the survival of the parasite and the disease pathogenesis. The PfEMP-1/VarO variant is involved in the rosetting phenomenon associated with severe disease manifestation. We studied the humoral response to PfEMP-1/varO in a malian children cohort living in Kénieroba () during the malaria transmission season of the year 2011.

A total of 230 children aged 4 to 15 years were enrolled in this study and more than the third of them had not presented clinical malaria case during the transmission season. The mean PfEMP-1/VarO antibodies level was positively correlated with the age both upstream ($P=10^{-3}$) and downstream the transmission season ($P=10^{-3}$).

We found no statistically significant associations between the PfEMP-1/VarO antibodies level upstream the transmission season and the low incidences of malaria, even though there was a trend towards this association.

This finding suggests that anti-PfEMP-1/VarO antibodies may protect against malaria. Further investigation with larger sample size is necessary to make clearer whether high PfEMP-1/VarO antibody level is associated with reduced risk of malaria incidence

Key words: Antibody, PfEMP1/VarO, Malaria incidence

11. ANNEXE

TECHNIQUE DE LA GOUTTE EPAISSE

Après avoir noté les renseignements relatifs sur le formulaire ou le registre approprié, ainsi que l'identité du patient sur la lame, réaliser la goutte comme suite :

1. En tenant la main gauche du malade la paume tournée vers le haut, choisir le troisième doigt après le pouce (le gros orteil peut être utilisé chez les nourrissons. Le pouce ne doit jamais être utilisé chez les adultes ou les enfants).
2. Avec un tampon de coton légèrement imbibé d'alcool, nettoyer le doigt en appuyant fermement pour enlever la saleté et la graisse du bout du doigt.
3. Avec le chiffon de coton propre, essuyer le doigt en appuyant fermement pour stimuler la circulation du sang.
4. Avec un vaccinostyle stérile, piquer le bout du doigt d'un seul geste.
5. Essuyer la première goutte de sang avec du coton sec. S'assurer qu'il ne reste pas de fibres de coton sur le doigt, qui pourraient se mélanger au sang.
6. En procédant rapidement et en tenant les lames propres uniquement par les bords, recueillir le sang comme suit :
7. Appuyer doucement sur le doigt et recueillir une petite goutte de sang au milieu de la lame (cf. figure).
8. Essuyer le sang restant sur le bout du doigt avec un tampon de coton.
9. Tenir la lame supérieure par les bords.
10. Placer le coin de l'autre lame au centre de la goutte de sang
11. Étendre légèrement la surface de la goutte par des mouvements spiralés appuyés de la lame (cf. figure).
12. Assurer cette défibrination mécanique pendant quelques secondes et étendre la goutte sur environ 1 cm de diamètre.

13. Laisser la préparation à plat, à l'abri de la poussière, de la chaleur et des mouches pendant deux heures en zone sahélienne. Respecter ce long temps de séchage sinon il y a risque de décollement de la préparation lors de la coloration (cf. figure).

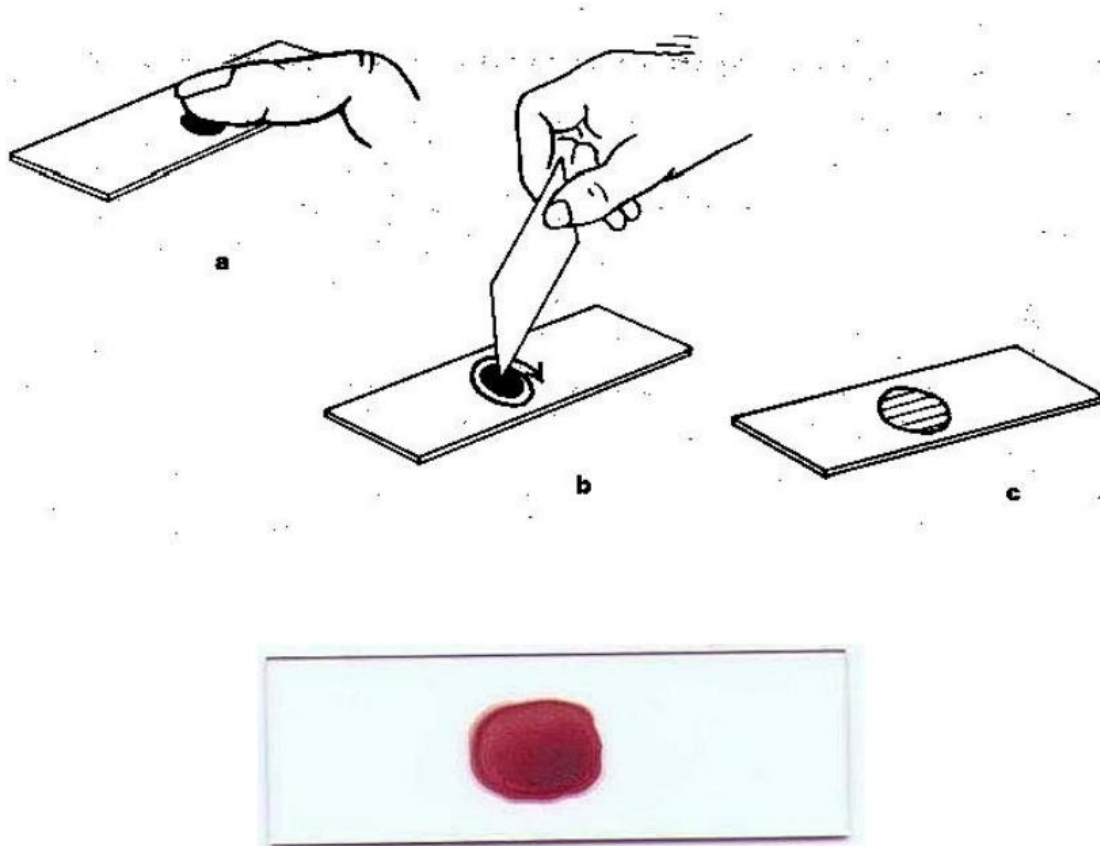


Figure 13 : Technique de la goutte épaisse

✚ **Technique de coloration de Giemsa.** C'est une méthode de coloration classique employée en routine pour la coloration des étalements sanguins et pour le diagnostic du paludisme. Toujours maintenir la bouteille bien fermée dans un endroit frais, à l'abri de la lumière solaire directe. Les bouteilles en verre blanc peuvent être recouvertes d'une enveloppe de papier noir épais pour les protéger de la lumière.

- Fixer le frottis mince en le tapotant doucement avec un tampon de coton imbibé de méthanol, ou en le trempant dans un récipient de méthanol pendant quelques secondes.
- Préparer la solution de Giemsa à 3 ou 5 dans l'eau tamponnée (PH 7,2) et bien mélanger le colorant. Verser doucement le colorant dans la bague jusqu'à ce que la lame soit entièrement recouverte.
- Laisser colorer pendant 30 à 45 mn pour 30 (15mn pour 10), à l'abri de la lumière solaire et de la poussière. Les lames sont ensuite rincées et séchées sur un râtelier.

Aspect

La lecture se fait au microscope à l'objectif 100 à l'huile d'immersion

- a) Le fond doit être propre, exempt de débris, coloré en bleu
- b) Les noyaux des leucocytes sont en violet foncé.
- c) Les parasites du paludisme sont bien définis, avec une chromatine rouge foncé et un cytoplasme d'une bleue pale. Dans les infections à *P. vivax* et *P. ovale*, on peut voir un semis de granulations de Schuffner dans le fantôme de l'érythrocyte hôte, en particulier sur les bords du frottis.

Méthodes de numération des parasites du paludisme dans les gouttes épaisses.

Parasites par μl (= mm^3)

On trouvera ci-dessous une méthode pratique de précision suffisante. Elle consiste à dénombrer les parasites par μl de sang dans un frottis épais, par rapport à un nombre prédéterminé de leucocytes. On prend comme norme une moyenne de 7500 leucocytes par μl . Malgré l'imprécision due aux variations du nombre de leucocytes parmi des personnes en bonne santé et aux variations encore plus grandes observées chez les malades, cette valeur permet des

comparaisons valables. Avant de commencer à compter, on examinera l'équivalent de 0,25µl de sang (environ 100 champs, avec un oculaire 7 X (ou 10X) et un objectif à immersion dans l'huile 100X) dans le frottis épais pour déterminer l'espèce de parasite et les stades présents. Ensuite, on appliquera la méthode suivante qui convient pour les frottis positifs :

1. Un compteur manuel à 4 chiffres nécessaire pour dénombrer séparément les parasites et les leucocytes.

2. a) Si, après avoir compté 300 leucocytes, on a identifié 10 parasites ou plus, noter les résultats sur le formulaire de notification, en indiquant le nombre de parasites par 300 leucocytes.

b) Si, après avoir compté 300 leucocytes, on a identifié neuf parasites ou moins, continuer de compter jusqu'à 500 leucocytes et noter le nombre de parasites par 500 leucocytes.

3. Dans chaque cas, le nombre de parasites par rapport au nombre de leucocytes peut être converti en nombre de parasites par µl par la simple formule mathématique suivante :

Nombre de parasite X 7500 /Nombre de leucocytes =**Nombre de parasite par µl**

En d'autres termes, si 300 leucocytes sont comptés, le nombre de parasites est à multiplier par 25 et si 500 leucocytes sont comptés, le nombre de parasites est à multiplier par 15.

Procédures Standard Opératoires (SOP) : Frottis Mince

Le frottis sanguin consiste en la réalisation d'un étalement monocellulaire des éléments sanguins. Lames à tenir par les bords pour éviter les empreintes digitales graisseuses. Plus la lamelle utilisée pour faire le frottis est mince, plus fin le frottis sera.

Matériel

- 2 lames porte-objet dégraissées
- Vaccinostyle stérile
- Alcool 70°
- Colorant de Giemsa pur
- Coton hydrophile sec
- Eau tamponnée, pH= 7,2
- Méthanol absolu

Lieu du prélèvement

- a. A l'extrémité d'un doigt gauche (ni index, ni pouce), sur la face latérale du doigt qui ne doit être ni œdémateux, ni cyanosé, ni traumatisé, ni infecté.
- b. Au lobe de l'oreille, après l'avoir réchauffé entre les doigts
- c. Au talon ou au gros orteil chez le nourrisson, après l'avoir réchauffé.

Technique

1. Dégraisser la lame à l'alcool (ou au toluène); faire sécher à l'air ou près d'une flamme ou avec un appareil sèche- cheveu (fig. 11a).
2. Désinfecter le bout du 3eme ou 4eme doigt avec de l'alcool 70°.
3. Piquer le doigt avec un vaccinostyle stérile, d'un seul geste.
4. Essuyer la première goutte de sang avec du coton sec.
5. Déposer une goutte de sang capillaire ou veineux à l'une des extrémités de la lame.
6. Poser le bord de la deuxième lame en avant de la goutte de sang, le faire glisser en arrière jusqu'au contact de la goutte de sang qui va se répandre sur toute la largeur du bord de la lame supérieure dans l'angle formé par les 2 lames.
7. Incliner la lame supérieure de 45°.

8. Pousser fermement la deuxième lame le long de la lame de sang, en la tenant inclinée à 45°, d'un geste rapide et régulier, en avant, vers l'extrémité libre de la lame porte-objet. S'assurer que la deuxième lame reste bien en contact avec la surface de la lame de sang pendant qu'on procède à l'étalement.
9. Faire sécher le film mince de sang obtenu en agitant la lame à l'air. Le frottis doit présenter deux bords et une queue, zones électives de lecture.
10. Porter le nom du patient ou le numéro de l'examen sur la marge de la lame ou sur la partie large du frottis sanguin au crayon de papier.
11. Placer la lame dans la boîte horizontale (type OMS), à l'abri des mouches, de la poussière et d'une trop forte chaleur si on ne peut la colorer immédiatement.
12. Fixer le frottis sanguin avec le méthanol
13. Appliquer le colorant de May-Grunwald-Giemsa, ou l'Hémacolor ou colorer avec le Giemsa 3% dans de l'eau tamponnée.

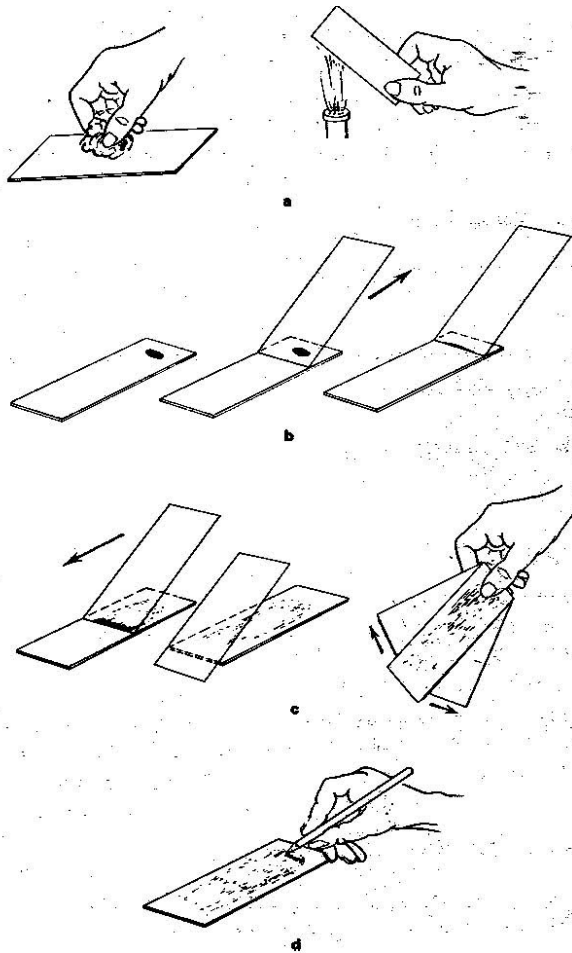
Coloration avec l'Hemacolor®

- Fixer le frottis avec le méthanol en plongeant deux fois 3 secondes
- Laisser sécher la lame à l'air libre ou faire sécher avec une machine sèche-cheveux.
- Plonger la lame 3 à 5 fois une seconde dans la solution d'éosine, qui colore le noyau du parasite en rouge.
- Rincer à l'eau propre.
- Plonger la lame 3 à 5 fois une seconde dans la solution de bleu de Méthylène qui colore le cytoplasme du parasite en bleu.
- Rincer à l'eau propre.
- Laisser sécher.
- Lire la lame au microscope optique binoculaire avec l'objectif 100 en immersion

Méthode de la numération des parasites du paludisme dans les frottis mince

Une méthode simple pour dénombrer les parasites dans le frottis mince consiste à compter 1000 hématies sur la queue, zone élective de lecture du frottis mince. On dénombre les hématies parasitées sur 1000 hématies dans un frottis mince. Le résultat est exprimé en pourcentage d'hématies parasitées.

Cette méthode est surtout utilisée dans les essais cliniques de nouveaux médicaments antipaludiques. Elle semble être plus précise que le nombre de parasites par μl de sang. L'inconvénient majeur est qu'elle consomme suffisamment de temps.



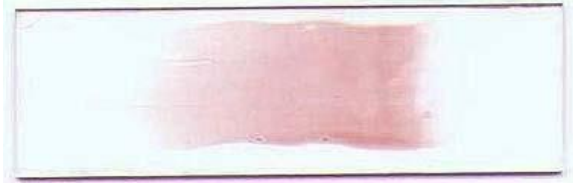


Figure 14 : Technique du frottis mince

Protocole d'ELISA VarO:

Matériels et réactifs :

Plaques d'ELISA (Maxisorp NUNC, ref 439454)

PBS GIBCO 1X (ref 14190-094, Invitrogen)

5% lait dégraissé (Regilait) dans PBS 1X

Tween 20 (Sigma P1379)

PBS 1X + 0.1 % Tween 20

Fragment F (ab)'2 de la chèvre conjugué à la peroxydase et lié à l'IgG humaine (réf 55246 Cappel) à 1/7500e dans du PBS.

Système de substrat de peroxydase TMB Micowell (ref: 50-76-00, KPL)

H₃PO₄ (acide orthophosphorique) 1 molaire (1M)

Lecteur de plaque VERSAmax

Protéines solubles recombinant PfEMP-1/VarO

Procédure :**Revêtement des puits de plaque par les protéines PfEMP-1/VarO**

-Déposer 100 ul de suspension de protéine à 1 pg / ml dans du PBS 1X dans chaque puits de la plaque et incuber pendant une nuit à 4 ° C.

-Après le revêtement, retirer le surnageant.

Blocage :

-Mettre dans chaque puis revêtu 200µl de lait écrémé à 5% (Regilait) et incuber pendant 1 heure à 37 ° C.

-Retirer le surnageant

Incubation avec du sérum :

Chaque plaque peut analyser 43 échantillons de sérum / plasma inconnus, 1 contrôle positif (Pool de Paludisme Hyper-Immunitaire Sérum= HIS), 1 contrôle négatif (Pool de Paludisme Non-Immun Sérum = NIS) [notez que HIS et NIS ont été analysés dupliquer à différents endroits dans la plaque] et 1 dupliquer avec du PBS / lait comme témoin pour l'anticorps secondaire. Chaque échantillon a été analysé en double

-Diluer le sérum / plasma au 1 / 100 dans du PBS-Twee-Milk (PBS 1X + 0,05% de Tween 20 + 2,5% de lait),

Mettre 100 ul de la dilution dans le puits bloqué et incuber pendant 1 heure à 37 ° C.

-Laver la plaque 3 fois avec 0,1% de Tween dans du PBS 1X avec une machine de lavage automatique PW 41 (Biorad)

Incubation avec anticorps secondaire :

-Ajouter 100 µl d'anti-IgG humaine (Cappel) dilué au 1/7500 dans du PBS + 0,1% de Tween dans chaque puits et incuber pendant 1 heure à 37 ° C

- Mettre les solutions TMB / H₂O₂ à température ambiante (environ 1 heure avant l'étape de détection)

-Laver la plaque 3 fois avec 0,1% de Tween dans du PBS 1X avec une machine de lavage automatique PW 41 (Biorad)

Détection :

-Faire un mélange à volume égal de la solution substrat de peroxydase de TMB et de la solution de substrat de peroxydase B

- Ajouter 100 ul du mélange dans chaque puits et incuber pendant 10 minutes à température ambiante (20-22 ° C)
- Ajouter 100 ul de la solution 1 M de H₃PO₄ pour arreter la reaction
- Lire la densité optique (DO) à 450 nm (référence 655 nm) avec un lecteur de plaque VERSAmax

SERMENT DE GALIEN

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

D'honorer ceux qui 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 la probité et du désintéressement ;

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

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

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

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

Je le jure!