

Ministère de l'Enseignement Supérieur

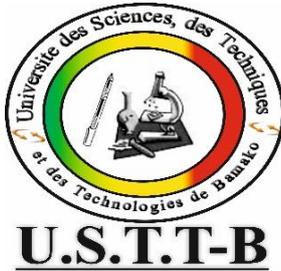
République du Mali

et de la Recherche Scientifique

Un Peuple- Un But- Une Foi

Université des Sciences, des Techniques
et des Technologies de Bamako (U.S.T.T.B.)

Faculté de Pharmacie (FA.PH.)



Année universitaire 2017-2018

N°.....

Titre :

**Influence des polymorphismes du globule rouge sur la réponse
humorale anti-PfEMP-1/VarO dans une cohorte d'enfants résidents
de Kéniéroba**

Thèse de Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement le 11/aout/ 2018 devant la Faculté de Pharmacie,
Bamako, Mali

Par Mr. ALKALI DOUMBIA pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie (Diplôme
d'Etat)

Jury

Président du jury : Professeur Sékou Fantamady TRAORE

Membre : Docteur Antoine DARA

Co-directeur : Docteur Seidina A.S. DIAKITE

Directeur de thèse : Professeur Mahamadou DIAKITE

LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DE PHARMACIE

➤ ADMINISTRATION

Doyen : Boubacar TRAORE, Professeur

Vice-doyen : Ababacar I. MAIGA, Professeur

Secrétaire principal : Seydou COULIBALY, Administrateur civil

Agent comptable : Famalé DIONSAN, Inspecteur des finances.

➤ PROFESSEURS HONORAIRES

N	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Boucacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
2	Mahamadou	CISSE	Biologie
3	Daouda	DIALLO	Chimie générale et minérale
4	Souleymane	DIALLO	Bactériologie - Virologie
5	Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
6	Boukassoum	H Aidara	Législation
7	Moussa	HARAMA	Chimie Organique (décédé)
8	Gaoussou	KANOUTE	Chimie Analytique
9	Alou A.	KEITA	Galénique
10	Mamadou	KONE	Physiologie
11	Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
12	Bréhima	KOUMARE	Bactériologie et Virologie
13	Abdourahamane S.	MAIGA	Parasitologie
14	Elimane	MARIKO	Pharmacologie

➤ **DER : SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES**

1. PROFESSEURS / DIRECTEURS DE RECHERCHE

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mounirou	BABY	Hématologie
2	Bakary Mamadou	CISSE	Biochimie
3	Abdoulaye	DABO	Biologie / Parasitologie
4	Alassane	DICKO	Santé Publique
5	Amagana	DOLO	Parasitologie - Mycologie
6	Ousmane	KOITA	Biologie-Moléculaire
7	Boubacar	TRAORE	Parasitologie - Mycologie

2. MAITRES DE CONFERENCE / MAITRE DE RECHERCHE

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Flabou	BOUGOUDOGO	Bactériologie-Virologie
2	Mahamadou	DIAKITE	Immunologie-Génétique
3	Abdoulaye	DJIMDE	Parasitologie - Mycologie
4	Akory Ag	IKNANE	Santé Publique-Nutrition
5	Bourèma	KOURIBA	Immunologie chef de DER
6	Ousmane	TOURE	Santé Publiq/Santé Environnem

3. MAITRES ASSISTANTS / CHARGE DE RECHERCHE

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mohamed	AG BARAIKA	Bactériologie-Virologie
2	Charles	ARAMA	Immunologie
3	Boubacar Tiétiè	BISSAN	Biologie clinique
4	Seydou Sassou	COULIBALY	Biochime Clinique
5	Djénéba Koumba	DABITAO	Biologie Moléculaire

6	Laurent	DEMBELE	Biotechnologie Microbienne
7	Klétigui Casimir	DEMBELE	Biochimie Clinique
8	Seydina S.A.	DIAKITE	Immunologie
9	Yaya	GOITA	Biochimie Clinique
10	Aldjouma	GUINDO	Hématologie
11	Ibrahima	GUINDO	Bactériologie-Virologie
12	Kassoum	KAYENTAO	Santé Publique Biostatistiques
13	Aminatou	KONE	Biologie Moléculaire
14	Birama Apho	LY	Santé Publique
15	Dinkorma	OUOLOGUEM	Biologie Cellulaire
16	Issiaka	SAGARA	Santé Publique Biostatistiques
17	Samba Adama	SANGARE	Bactériologie
18	Fanta	SANGHO	Santé Publique
19	Mahamadou Soumana	SISSOKO	Santé Publique Biostatistiques

4. ASSISTANTS / ATTACHE DE RECHERCHE

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Djénéba	COULIBALY	Nutrition/Diététique
2	Djibril Mamadou	COULIBALY	Biochimie Clinique
3	Souleymane	DAMA	Parasitologie Entomologie méd
4	Issa	DIARRA	Immunologie
5	Mamadou Lamine	DIARRA	Botanique – Biologie végétale
6	Fatou	DIAWARA	Epidémiologie
7	Merepen dit Agnès	GUINDO	Immunologie
8	Oumar	GUINDO	Epidémiologie
9	Falaye	KEITA	Santé Publique/Santé Environ.
10	N'Deye Lallah Nina	KOITE	Nutrition
11	Yacouba	MAIGA	Biostatistique
12	Amadou Birama	NIANGALY	Parasitologie-Mycologie

13	Oumar	SANGHO	Epidémiologie
14	Djakaridia	TRAORE	Hématologie

➤ **DER : SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

1. PROFESSEURS / DIRECTEUR DE RECHERCHE

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
2	Saïbou	MAIGA	Législation
3	Rokia	SANOGO	Pharmacognosie Chef de DER

2. MAITRES DE CONFERENCES / MAITRES DE RECHERCHE

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
-	Néant	-	-

3. MAITRES ASSISTANTS / CHARGE DE RECHERCHE

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Loséni	BENGALY	Pharmacie Hospitalière
2	Bakary Moussa	CISSE	Galénique
3	Yaya	COULIBALY	Législation
4	Issa	COULIBALY	Gestion
5	Balla Fatogoma	COULIBALY	Pharmacie Hospitalière
6	Hamma Boubacar	MAIGA	Galénique
7	Moussa	SANOGO	Gestion
8	Adiaratou	TOGOLA	Pharmacognosie

4. ASSISTANTS / ATTACHE DE RECHERCHE

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Seydou Lahaye	COULIBALY	Gestion Pharmaceutique
2	Antoine	DARA	Sciences Pharmaceutiques
3	Daouda Lassine	DEMBELE	Pharmacognosie
4	Adama	DENOU	Pharmacognosie
5	Sékou	DOUMBIA	Pharmacognosie
6	Mahamane	HAIDARA	Pharmacognosie
7	Assitan	KALOGA	Législation
8	Ahmed	MAIGA	Législation
9	Aichata Ben Adam	MARIKO	Galénique
10	Aboubacar	SANGHO	Législation
11	Bourama	TRAORE	Législation
12	Karim	TRAORE	Sciences Pharmaceutiques
13	Sylvestre	TRAORE	Gestion Pharmaceutique
14	Aminata Tièba	TRAORE	Pharmacie Hospitalière
15	Mohamed dit Sarmoye	TRAORE	Pharmacie Hospitalière

DER : SCIENCES DU MEDICAMENT

1. PROFESSEURS / DIRECTEUR DE RECHERCHE

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Ousmane	DOUMBIA	Pharmacie Chimique
2	Bénoît Yaranga	KOUMARE	Chimie Analytique
3	Ababacar I.	MAIGA	Toxicologie

2. MAITRES DE CONFERENCE / MAITRE DE RECHERCHE

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Sékou	BAH	Pharmacologie Chef de DER

3. MAITRES ASSISTANTS / CHARGE DE RECHERCHE

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Dominique Patomo	ARAMA	Pharmacie Chimique
2	Mody	CISSE	Chimie Thérapeutique
3	Tidiane	DIALLO	Toxicologie
4	Hamadoun Abba	TOURE	Bromatologie

4. ASSISTANTS / ATTACHE DE RECHERCHE

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mahamadou	BALLO	Pharmacologie
2	Dalaye Bernadette	COULIBALY	Chimie Analytique
3	Blaise	DACKOUO	Chimie Analytique
4	Fatoumata	DAOU	Pharmacologie
5	Ousmane	DEMBELE	Chimie Thérapeutique
6	Abdourahamane	DIARA	Toxicologie
7	Aiguerou dit Abdoulaye	GUINDO	Pharmacologie
8	Madani	MARIKO	Chimie Analytique
9	Mohamed El Béchir	NACO	Chimie Analytique
10	Mahamadou	TANDIA	Chimie Analytique
11	Dougoutigui	TANGARA	Chimie Analytique

➤ DER : SCIENCES FONDAMENTALES

1. PROFESSEURS / DIRECTEUR DE RECHERCHE

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mouctar	DIALLO	Biologie Chef de DER
2	Cheick F.	TRAORE	Biologie / Entomologie
3	Mahamadou	TRAORE	Génétique

2. MAITRES DE CONFERENCES / MAITRE DE RECHERCHE

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Lassana	DOUMBIA	Chimie Appliquée

3. MAITRES ASSISTANTS / CARGE DE RECHERCHE

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Abdoulaye	KANTE	Anatomie
2	Boureïma	KELLY	Physiologie Médicale

4. ASSISTANTS / ATTACHE DE RECHERCHE

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Seydou Simbo	DIAKITE	Chimie Organique
2	Modibo	DIALLO	Génétique
3	Moussa	KONE	Chimie Organique
4	Massiriba	KONE	Biologie Entomologie

➤ CHARGES DE COURS (VACATAIRES)

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Cheick Oumar	BAGAYOKO	Informatique
2	Babou	BAH	Anatomie
3	Abdourahamane	COULIBALY	Anthropologie Médicale
4	Souleymane	COULIBALY	Psychologie
5	Bouba	DIARRA	Bactériologie
6	Modibo	DIARRA	Nutrition
7	Moussa I.	DIARRA	Biophysique
8	Babacar	DIOP	Chimie
9	Atimé	DJIMDE	Bromatologie
10	Yaya	KANE	Galénique
11	Boubacar	KANTE	Galénique

12	Aboubakary	MAIGA	Chimie Organique
13	Massambou	SACKO	SCMP / SIM
14	Modibo	SANGARE	Anglais
15	Sidi Boula	SISSOKO	Histologie-Embryologie
16	Fatoumata	SOKONA	Hygiène du Milieu
17	Fana	TANGARA	Maths
18	Abdel Kader	TRAORE	Pathologies Médicales
19	Boubacar	ZIBEIROU	Physique

Dédicaces

Je dédie ce travail

À Dieu le Tout Puissant, le Clément, le Seigneur de l'univers et de tous les hommes Que Sa grâce, Son salut et se Son pardon soient sur son prophète Mohamed SAW. **Dieu**, merci de m'avoir protégé et de m'avoir donné le courage et l'inspiration nécessaires pour effectuer ce travail. Gloire à Toi aujourd'hui et pour l'éternité.

À mon père Feu Cheick Hamed Doumbia

Papa, j'aurais tellement voulu que tu sois près de moi aujourd'hui pour voir le fruit de tous les efforts que tu as fournis pour moi ; tu m'as appris tant de chose dans la vie, le courage, la persévérance, le partage, le respect... Une chose est sûre, tous ceux-ci vont me servir dans la vie. Je suis si fier de toi Papa, tu me manques, je t'aime !!!

Repose en paix (Amen) !!!

À ma mère Salimata Sanogo

N'na, tu es la plus gentille et la plus bienveillante de toutes les mamans. Je te suis redevable de la chose la plus importante qui soit « la vie » ; car c'est à toi que Dieu a confié cette lourde tâche de me mettre au monde. Tu as pris soin de nous, tu nous as toujours protégé, choyé et réconforté. Merci N'na pour tout l'amour que tu nous portes au sein de la famille. Qu'Allah te prête une longue vie couronnée de santé pour que nous puissions bénéficier longtemps de tes conseils et Qu'il nous donne la force de prendre bien soin de toi. Tu es un amour. Je t'aime !!!

Remerciements

À Tonton Daouda Doumbia

Tu as été pour moi un grand soutien depuis mon enfance jusqu'au jour où tu as rendu l'âme. Je me couche tous les jours avec tes souvenirs. Que Dieu t'accorde ses miséricordes (Amen).

À Tonton Drissa Coulibaly

Aucun mot ne pourrait exprimer ma profonde gratitude, ta générosité et ton humilité font de toi une personne hors du commun. Je n'ai passé que des moments agréables avec toi. Que dieu te prête longue vie. Je n'oublierai jamais tes bienfaits.

À tante Mariam Magassouba

Les mots me manquent pour te dire tout ce que je ressens. Tu es si aimable. Tu donnes toujours sans rien attendre en retour. Sois rassurée de ma présence à tes côtés à chaque fois que le besoin se fera sentir. Que dieu t'accorde une longue vie !!!

À mes frères Mohamed Doumbia et Moussa Doumbia

Vous me comblez de votre générosité, de vos soutiens tant physique, moral que financier. Qu'Allah nous lie d'avantages. Je vous aime.

À ma sœur Zeinabou Doumbia : Merci pour tes considérations et tes conseils. C'est toujours agréable d'échanger avec toi et ton mari. Bon vent pour tes projets. Je te remercie pour tout.

À mes cousins et cousines : Amir coulibaly, Aboubacar Coulibaly, Mohamed Doumbia, Mariam Doumbia. Je vous remercie et qu'Allah renforce nos liens.

À ma Chérie Moussokoura Fofana : de m'avoir aimé tel que je suis. Je compte beaucoup sur toi pour un avenir meilleur. Je te souhaite que du succès dans toutes tes entreprises.

À mes amis : Barasse Coulibaly, Hamidou Cisse, Daoud Ourde Ousmane, Assiétou Maiga, Arkiétou Maiga, Gouro Cisse, Salia Drame, Yamadou, Nema Dembele etc. pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble. Qu'Allah nous bénisse.

Au 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.

À toute l'équipe de l'Unité immunogénétique et Hémoglobinopathie du MRTC (Dr Karim Keita, Dr Ibrahima Sanogo, Dr Mory Doumbouya, Mr Abdoul Salam Keita, Dr Oumou Coulibaly, Dr Saibou Doumbia, Dr Bourama Keita, FEU Amadou Cisse, Dr Fousseyni Doucouré, Interne Fatoumata Kassé, Nouhoum Koné, Sidy Diallo, Aboubacar Fomba, Souleymane Maiga) : je vous remercie pour vos participations dans l'élaboration de ce travail.

Hommages aux membres du jury

À notre maître et président du jury

Professeur Sekou Fantamady Traore

- PhD en entomologie médicale
- Directeur du département d'entomologie médicale du MRTC
- Responsable de l'enseignement Zoologie à la FAPH

Cher maître,

La promptitude avec laquelle vous avez accepté de présider ce jury malgré vos multiples occupations, prouve votre amour pour la science et votre cordialité. J'ai admiré votre simplicité depuis la première année lors de vos cours de zoologie. Veuillez agréer cher maître l'expression de nos sentiments les plus distingués.

À notre maître et juge

Docteur Antoine Dara

- Docteur en Pharmacie de l'Université de Bamako
- PhD en microbiologie moléculaire et immunologie à l'Université de Maryland
- Maître-assistant de parasitologie à la FAPH
- Chercheur aux MRTC

Cher maître,

Votre dynamisme ainsi que vos qualités humaines m'ont enthousiasmé. Nous vous remercions vivement de l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail.

**À notre maître et co-directeur
Docteur Seidina A S Diakité**

- Docteur en Pharmacie de l'Université de Bamako
- PhD en Immunologie USTTB/UMPC (Paris 6)
- Maître-Assistant d'immunologie à la PAPH
- Chercheurs à l'unité Immunogénétique (MRTC)

Cher maître

Vous m'avez appris tant de choses, la rigueur dans le travail, l'assiduité. Vous communiquez toujours sans vous énerver. Vous avez été disponible tout au long de ce travail. Je ne peux que vous remercier et vous souhaiter tous le bonheur du monde.

À notre maître et Directeur de thèse
Professeur Mahamadou Diakite

- Docteur en Pharmacie de l'Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie de Bamako
- PhD 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 des Affaires Adjoint du Centre Universitaire de Recherche clinique
- Secrétaire Permanent du Comité d'Ethique (FMOS/FAPH)

Cher maître

Tous les hommages à votre endroit ne sauraient suffire pour vous exprimer notre gratitude. Votre amour du travail bien fait, votre clairvoyance et votre humilité font de vous un maître qui inspire respect et admiration. Soyez en sûr cher maître, je vous emboîterai le pas Inch Allah.

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 (Domaines fixant le Domaine Duffy)

DC: Dendritiques Cell

EBA175: Erythrocyte Binding Antigen 175 (Antigène lié aux erythrocyte)

ELISA: Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay (Dosage immuno- enzymatique)

EPCR : Endothelial Protein C Receptor (récepteur de protéine c endothélial)

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

GR : Globule Rouge

GYPA: glycophorine A

HB : Hémoglobine

HBC : Hémoglobine

HbS : Hémoglobine S

IAN : Immunité Acquise 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 (Tueuse naturelle)

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)

pRBC : Globule rouge parasité

STEVOR: Subtelomeric Variant Open Reading Frame (Cadre de Lecture Ouvert au variant sous télomérique)

SURFIN : Surface-Associated Interspersed Protein (Proteine incrustée associée à la surface)

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 (Récepteur de reconnaissance)

TNF: Tumor Necrosis Factor (Facteur de nécrose tumorale)

TSP: thrombospondin

VCAM1 : vascular cell adhesion molecule-1

Table des matières

1. Introduction.....	23
2. Objectifs.....	26
2.1. Objectif général.....	26
3. GENERALITES	27
3.1. Définition du paludisme	27
3.2. Epidémiologie.....	27
3.3. Agents pathogènes	29
3.4. Cycle du <i>Plasmodium</i>	30
3.4.1. Cycle chez le moustique (Sporogonie)	30
3.4.2. Cycle chez l'homme.....	31
3.5. Physiopathologie du paludisme.....	32
3.5.1. Accès palustre simple.....	33
3.5.2. Accès palustre grave ou compliqué	34
3.6. Immunité anti palustre.....	36
3.6.1. Immunité naturelle ou innée contre le paludisme.....	38
3.6.2. Immunité acquise ou adaptative contre le paludisme.....	40
3.6.3. Familles multigéniques de <i>P. falciparum</i>	45
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>	50
3.6.7. Réponse immunitaire spécifique à PfEMP-1	54
3.7. Hémoglobinopathies et paludisme.....	55
3.7.1 Hypothèse d'Haldane.....	55
3.7.2. Hémoglobine S et le paludisme	56
3.7.3. Hémoglobine C et paludisme	57
3.7.4. Alpha-thalassémie et paludisme	57
4. Méthodologie	58
4.1 Cadre d'étude.....	58
4.2. Type et période d'étude	59
4.3. Echantillon	59
4.3.1. Critères d'inclusion.....	59
4.3.2. Critères de non-inclusion	60

4.4. Variables mesurées.....	60
4.5. Collecte des données	60
4.6. Techniques de laboratoire utilisés	60
4.6.1. Dosage des anticorps anti PfEMP1/varO	60
4.6.2. Détermination du type d'hémoglobine	61
4.6.3. Détermination du groupe sanguin ABO	61
4.6.4. Détection de l'alpha-thalassémie.....	61
4.6.5. Diagnostic biologique du paludisme.....	61
4.7. Déroulement de l'étude.....	62
4.8. Gestion et analyse statistique des données.....	64
4.9. Considérations éthiques	64
5. Résultats.....	65
6.....	65
5.1. Résultats globaux	65
5.2 Résultats descriptifs	65
5.3. Résultats analytiques.....	70
6. Commentaires et Discussion	78
7. Limites de notre étude.....	84
8. Conclusion et Recommandations.....	85
8.1. Conclusion	85
8.2. Recommandation	85
9. Références bibliographiques.....	86
10. Annexes	99
10.1. Détermination du type d'Hémoglobine avec le D-10	99
S'assurer que les codes-barres sur les échantillons sont tournés vers l'arrière	99
10.1.1. Principe de la procédure du D-10.....	99
10.1.2. Prélèvement et manipulation des échantillons	99
10.1.3. Type d'échantillon	99
10.1.4. Précautions relatives au prélèvement des échantillons	100
10.1.5. Conservation des échantillons	100
10.1.6. Préparation des échantillons	100
10.2. Procédures standard opératoires (SOP) de la goutte épaisse.....	100
10.2.1. Procédure.....	100
10.2.2. Matériel.....	100

10.2.3. Lieu de prélèvement	101
10.2.4. Technique de la goutte épaisse	101
10.2.5. Technique de coloration de Giemsa	103
10.2.6. Aspect	103
10.2.7. Méthodes de numération des parasites du paludisme dans les gouttes épaisses.....	103
10.3. Procédures Standard Opératoires (SOP) : Frottis Mince.....	104
10.3.1. Matériel	104
10.3.2. Lieu du prélèvement	105
10.3.3. Technique.....	105
10.3.4. Coloration avec l'Hemacolor®.....	106
10.3.5. Méthode de la numération des parasites du paludisme dans les frottis mince.....	106
10.4. Détermination du Taux d'hémoglobine	107
10.4.1. Principe de la méthode.....	108
10.4.2. Matériel et réactifs.....	108
10.4.3. Technique.....	108
10.5. Détermination du groupe sanguin ABO	109
10.5.1. Principe.....	109
10.5.2. Matériel et réactifs.....	109
10.5.3. Mode opératoire	109
10.5.4. Résultat.....	110
10.6. Détection de la délétion 3.7-kb responsable de l'alpha-thalassémie par PCR.....	110
10.6.1. Matériel et réactifs:.....	110
10.6.2. Procédure	111
10.6.3. Migration du produit de PCR.....	112
10.6.4. Interprétation.....	112
10.7 Protocole d'ELISA VarO	112
10.7.1 Matériels et réactifs.....	112
10.7.2 Procédure	113
11. FICHE SIGNALÉTIQUE	115
Summary.....	117

Liste des tableaux

Tableau I: Classification des niveaux d'endémicité de la transmission du paludisme au Mali.....	28
Tableau II : Familles multigéniques dans les régions subtélomériques de <i>Plasmodium falciparum</i>	48
Tableau III: Répartition des participants en fonction du sexe	66
Tableau IV: Répartition des participants en fonction des ethnies.....	66
Table V : Répartition des participants en fonction du statut α - thalassémie	67
Tableau VI : Tableau descriptif des variables quantitatives	69
Tableau VII : Proportion du nombre des épisodes palustres.....	69
Tableau VIII: Taux moyens des anticorps anti-PfEMP-1/VarO en amont de la saison de transmission en fonction des variants génétiques du globule rouge et du nombre des épisodes palustres.....	70
Tableau IX: Taux moyen des anticorps anti-PfEMP-1/VarO en amont et en aval de la saison de transmission en fonction des tranches d'âge.....	71
Tableau X : Taux moyens des anticorps anti-PfEMP-1/VarO en amont et en aval de la saison de transmission en fonction du sexe.....	72
Tableau XI : Taux moyens des anticorps anti-PfEMP-1/VarO en amont et en aval de la saison de transmission en fonction du type d'hémoglobine.	73
Tableau XII: Taux moyens des anticorps anti-PfEMP-1/VarO en amont et en aval de la saison de transmission en fonction du groupe sanguin ABO.....	74
Tableau XIII : Taux moyens des anticorps anti-PfEMP-1/VarO en amont et en aval de la saison de transmission selon le statut d' α - thalassémie.....	75
Tableau XIV : Taux moyens des anticorps anti-PfEMP-1/VarO en amont et en aval de la saison de transmission selon le groupe Rhésus.	76
Tableau XV : Moyenne du nombre des épisodes palustres selon l'âge et le type d'hémoglobine	77

Liste de figures

Figure 1 : Cycle de développement de <i>P. falciparum</i> (source : www.cdc.gov).....	32
Figure 2 : Immunité contre le paludisme indépendant des cellules T [47].....	40
Figure 3: Liaison entre l'immunité innée et adaptative au paludisme au stade sanguin [47].....	42
Figure 4 : Illustration de la séquestration des globules rouges parasités au cours du cycle de vie de <i>P. falciparum</i> [99]......	49
Figure 5: Organisation chromosomique des gènes var de <i>P. falciparum</i> et du domaine architectural de <i>P. falciparum</i> erythrocyte membrane protein-1 (PfEMP1) [99].....	52
Figure 6 : Localisation du site d'étude au Mali	58
Figure 7 : Plan de masse des trois villages d'étude dans la commune rurale de Bancoumana.....	59
Figure 8: Schéma de la procédure de l'étude	63
Figure 9: Répartition des participants en fonction des classes d'âge.....	65
Figure 10: Répartition des participants en fonction du type d'hémoglobinique.....	67
Figure 11: Répartition des participants en fonction du groupe sanguin ABO	68
Figure 12: Proportion du groupe Rhésus dans notre étude	68
Figure 13. Technique de la goutte épaisse	102
Figure 14 : Technique du frottis mince	107
Figure 15 : Analyseur et Microcuvette HemoCue.....	108
Figure 16: Mécanisme de mesure du taux d'Hb par l'appareil HemoCue 201+	109

1. Introduction

Le paludisme est une maladie dangereuse contre laquelle il n'existe pas encore de vaccin efficace. Au Mali, le paludisme est la première cause de consultation, d'hospitalisation et de mortalité dans les formations sanitaires (EIPM 2015). Cette situation préoccupante du paludisme est rendue encore plus compliquée par l'émergence des résistances de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques les plus usuels. Dans les zones à endémicité forte, les personnes développent une immunité contre le paludisme avec l'âge [1]. Cependant, cette immunité protège seulement très souvent contre les accès graves du paludisme et non contre l'infection palustre [2]. Plusieurs facteurs peuvent influencer l'immunité contre le paludisme incluant les facteurs humains innés et acquis. Parmi les facteurs humains innés, les polymorphismes du globule rouge occupent une place de choix notamment le trait drépanocytaire (HbAS), l'hémoglobine (HbAC) et l' α -thalassémie. Les effets protecteurs de ces polymorphismes contre diverses manifestations du paludisme sont connus [3]. Cependant, les mécanismes de ces protections ne sont pas bien élucidés.

La réduction de la cytoadhérence [4], du phénomène de rosetting [5], de la phagocytose des globules rouges infectés par les macrophages [6], et l'acquisition précoce des anticorps contre les antigènes de *P. falciparum* [7] ont été décrites. L'acquisition de l'immunité anti palustre dépend fortement de l'exposition aux différents antigènes parasitaires et est, à ce titre, influencée par la grande diversité génétique des parasites notamment la variation antigénique [8, 9]. Les antigènes de *P. falciparum* exprimés à la surface des érythrocytes infectés dont le chef de file est le PfEMP-1 (*Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein) sont des plus polygéniques et polymorphiques. Le PfEMP-1 constitue une famille de protéines parasitaires codées par une soixantaine de gènes regroupés en complexe de gènes et connus sous le nom de gènes *var* [10]. Ils sont très immunogènes et jouent un rôle très important dans la physiopathologie de la maladie.

Les protéines de PfEMP-1 sont composées d'une partie extracellulaire, segment N-terminal composé de domaines fixant le Domaine Duffy appelés DBL (duffy binding-like) entre lesquels sont insérées des régions inter-domaine riches en cystéine appelées CIDR (Cystein-rich interdomain region). Les variants de PfEMP-1 diffèrent les uns des autres par le mode d'arrangement particulier des domaines DBL et CIDR de leur segment N terminal (NTS) extracellulaire. Certains variants de PfEMP-1 se distinguent par leur plus grande virulence notamment le variant PfEMP-1/VarO. Le PfEMP-1/VarO est un variant du PfEMP1 décrite

chez la souche Palo Alto 89F5 VarO de *P. falciparum*. 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 suivant directement le segment N-terminal. Cette structure NTS-DBL1 α est impliquée dans la formation des rosettes [12, 13]. Ce variant de PfEMP1 est bien immunogène et des titres élevés des anticorps anti-PfEMP-1/VarO ont été décrits chez les sujets âgés au Bénin [14] et au Sénégal [12]. Ces anticorps ont aussi été associés à une protection contre le paludisme en général et les cas graves du paludisme en particulier [11]. L'immunité antipalustre liée à l'âge présente des similitudes avec la protection antipalustre conférée par les polymorphismes du globule rouge. En effet, ces deux statuts confèrent chacun une protection contre les formes graves du paludisme et l'incidence palustre. Il n'y a pas d'évidence quant à leur rôle dans la protection contre l'infection palustre.

Nous nous proposons d'étudier l'effet des polymorphismes érythrocytaires sur les titres des anticorps anti-PfEMP-1/VarO chez des enfants maliens de 4 à 15 ans vivant dans une zone endémique du paludisme au Mali. Une réponse accrue des anticorps anti-PfEMP-1/VarO des porteurs des polymorphismes érythrocytaires pourrait partiellement expliquer la protection conférée par ces traits contre le paludisme.

Hypothèses de travail

Les variants de l'hémoglobine sont associés à des taux élevés des anticorps anti-PfEMP-1/VarO et à une faible incidence du paludisme chez les enfants vivant à Kéniéroba.

2. Objectifs

2.1. Objectif général

Etudier l'influence des polymorphismes érythrocytaires sur la réponse humorale anti-PfEMP-1/VarO et l'incidence du paludisme entre mai 2011 et janvier 2012 dans une cohorte d'enfants vivant à Kéniéroba.

2.2 Objectifs spécifiques

- Déterminer la prévalence de l'HbAS, l'HbAC, de l' α -thalassémie et des groupes sanguins érythrocytaires dans une cohorte d'enfants vivant à Kéniéroba
- Mesurer le taux des anticorps anti-PfEMP-1/VarO dans ladite cohorte au début et à la fin de la saison de transmission du paludisme ;
- Comparer les taux moyens des anticorps anti-PfEMP-1/VarO mesurés au début et à la fin de la saison de transmission chez les enfants vivant à Kéniéroba en fonction du portage des variants de l'hémoglobine et du groupe sanguin ABO ;
- Comparer le nombre moyen des épisodes palustres recensés au cours de la saison de transmission chez les enfants de Kéniéroba en fonction des variants de l'hémoglobine.

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 infectante d'un moustique femelle du genre *Anopheles*.

3.2. Epidémiologie

Le paludisme est un problème majeur de santé publique, selon le dernier rapport de l'Oms publié en novembre 2017, il y a eu 216 millions de cas de paludisme dans le monde et 445000 décès en 2016 [15].

L'Afrique sub-saharienne est la zone la plus touchée où 90% des cas et 92% des décès sont survenus [15].

Dans une population donnée, un certain nombre de variables permet de quantifier rapidement la situation du paludisme : l'indice splénique et 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. Au Mali, le paludisme est particulièrement endémique dans les régions du centre et du sud et épidémique dans les régions désertiques du nord. Il y'a une extrême variabilité de la situation épidémiologique en fonction des faciès géo-climatiques.

Il existe cinq modalités épidémiologiques de transmission du paludisme au Mali [16] :

- 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 Manantali) 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% ;
- 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 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 retrouvées en pathologie chez l'homme [17]. Il s'agit de ***Plasmodium falciparum***, ***Plasmodium vivax***, ***Plasmodium malariae***, ***Plasmodium ovale***, ***Plasmodium knowlesi***. 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 malaria, est 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 [18].

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 (***vecteur***).

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 familles : 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'exflagellation 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 en formant l'oocyste. Cette brève phase diploïde s'achève par une division méiotique suivie par plusieurs milliers de mitoses qui conduisent 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 infectante. 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 [19].

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 [20].

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 infecté pique un homme, il injecte le parasite avec sa salive sous la forme de sporozoïtes, éléments infectants, vermiformes de 4 à 5µm 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 [21]. Les sporozoïtes du *Plasmodium*, une fois chez l'homme, atteignent le foie et migrent à travers les cellules de Küpffer et finissent par infecter un hépatocyte grâce à leur complexe apical [22]. Dans le foie, les sporozoïtes se multiplient (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 infectés et à la mise en circulation de plusieurs milliers de mérozoïtes capables d'envahir par endocytose 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 prêts à infecter une autre personne (figure 1).

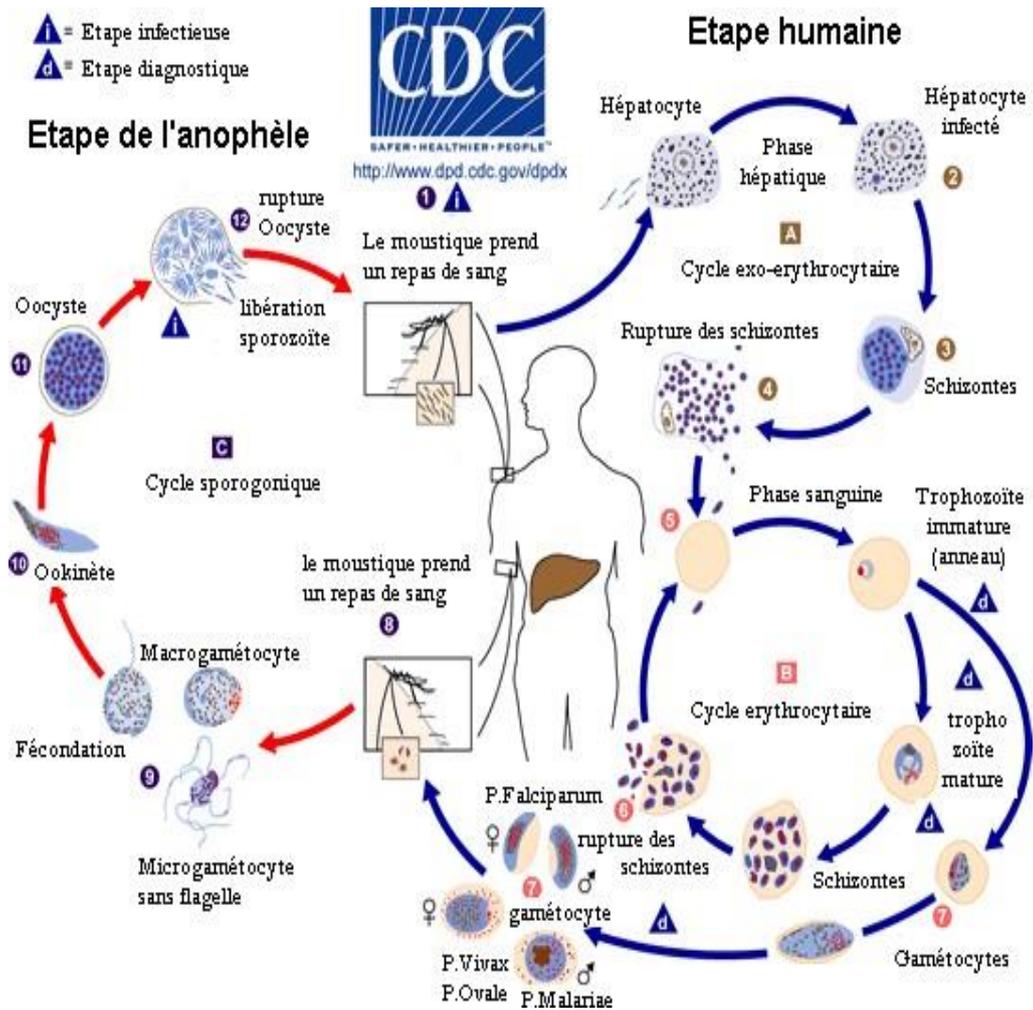


Figure 1 : Cycle de développement de *P. falciparum* (source : www.cdc.gov)

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 au coma et à la mort très rapidement. Les personnes qui

résident en zones d'endémie sont exposées constamment aux infections palustres. Dans ces zones, la majorité des cas restent asymptomatiques, seule une minorité des cas évolue vers le paludisme symptomatique et 1 à 2% vers les formes graves et compliquées [23].

Trois éléments déterminent la pathogénicité du *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 intra 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 [24]. 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 [25, 26]. 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 [27]. 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 [24].

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 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 anti palustre [23].

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* [28, 29]. 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'hépatosplénomégalie [30].

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 graves 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 [31].

La physiopathologie du paludisme grave repose sur deux phénomènes indissociables :

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

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

3.5.2.1. 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.

3.5.2.2. Phénomène de formation des rosettes « ou rosetting »

Les érythrocytes parasités ont la capacité de drainer autour 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 [32, 33] 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 [13, 34]. Le rosetting a été impliqué dans les complications du paludisme sévère au cours de nombreuses études [35].

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 [36]. Le rosetting a aussi été observé *in vitro* avec *P. vivax* [37, 38]. 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.

3.5.2.3. Phénomènes de cytoadhérence

La cytoadhérence est un mécanisme dans 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 [39]. Ce phénomène permet au *Plasmodium* de se développer plus facilement grâce à un environnement gazeux favorable et d'échapper à la clairance splénique [39] .

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-selectin, la Thrombospondine, le PECAM (Platelet-Endothelial cell Adhesion Molecule), l'antigène du groupe sanguin A, les IgM non-immunes, le CD36 [40, 41]. Enfin, PfEMP-1 apparaît comme le plus important ligand parasitaire impliqué dans ce mécanisme [42, 43].

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 [44].

3.6. Immunité anti palustre

L'immunité naturelle 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 taux d'apparition de l'immunité acquise ou sur ce qui constitue les principaux déterminants de la protection ; encore moins sur le(s) mécanisme(s) de protection. 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 d'hyperendémicité à holoendémicité 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 ou adaptative contre les plasmodies ont été définis : (ii) l'immunité antiparasitaire, qui confère une protection contre la parasitémie, qui affecte la densité des parasites ; et (iii) la prémuniton, qui offre une protection contre les nouvelles infections en maintenant une parasitémie de faible densité et généralement asymptomatique [45]. 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°C) avec une parasitémie et des densités parasitaires plus faibles.

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.

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 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 plus de 40 000 personnes (259). L'exposition systématique au paludisme hyperendémique 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.

Cette revue résume ce que l'on comprend de l'immunité acquise naturellement et induite expérimentalement contre le paludisme, avec l'aide des connaissances évolutives fournies par la biotechnologie, et place ces connaissances dans le contexte d'observations historiques, cliniques et épidémiologiques. Outre l'importance pratique de comprendre l'IAN en ce qui concerne la lutte contre le paludisme holoendémique, nous estimons que l'IAN peut être un bon modèle pour le développement de vaccins. Songez à un vaccin qui permet aux nourrissons et aux jeunes enfants de bénéficier de la même immunité que celle dont jouissent leurs frères et sœurs plus âgés et leurs parents : pas de maladie avec une stimulation naturelle et à vie. Même si ce concept était rendu superflu par une stratégie d'éradication sans

danger, une compréhension plus approfondie de l'IAN permettrait presque certainement aux vaccinologues d'explorer d'autres concepts et de s'adapter à des populations spécifiques. L'exploration de l'IAN est essentielle à la mise au point et au déploiement rationnel de vaccins et d'autres outils de lutte contre le paludisme pour presque toutes les populations à risque et, en fin de compte, une base nécessaire pour élaborer des stratégies d'éradication par tous les moyens.

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 ces protéines changent 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 parasites 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 [46].

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 cellules T extrathymiques primitives [*Natural Killer* (NK) 1.1, les récepteurs de cellules T (TCR) intermédiaires (TCRint)] et les cellules B-1 productrices d'anticorps ont été considérées 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 glycosylphosphatidyl inositol (GPI), ce de *P. falciparum* 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 [45].

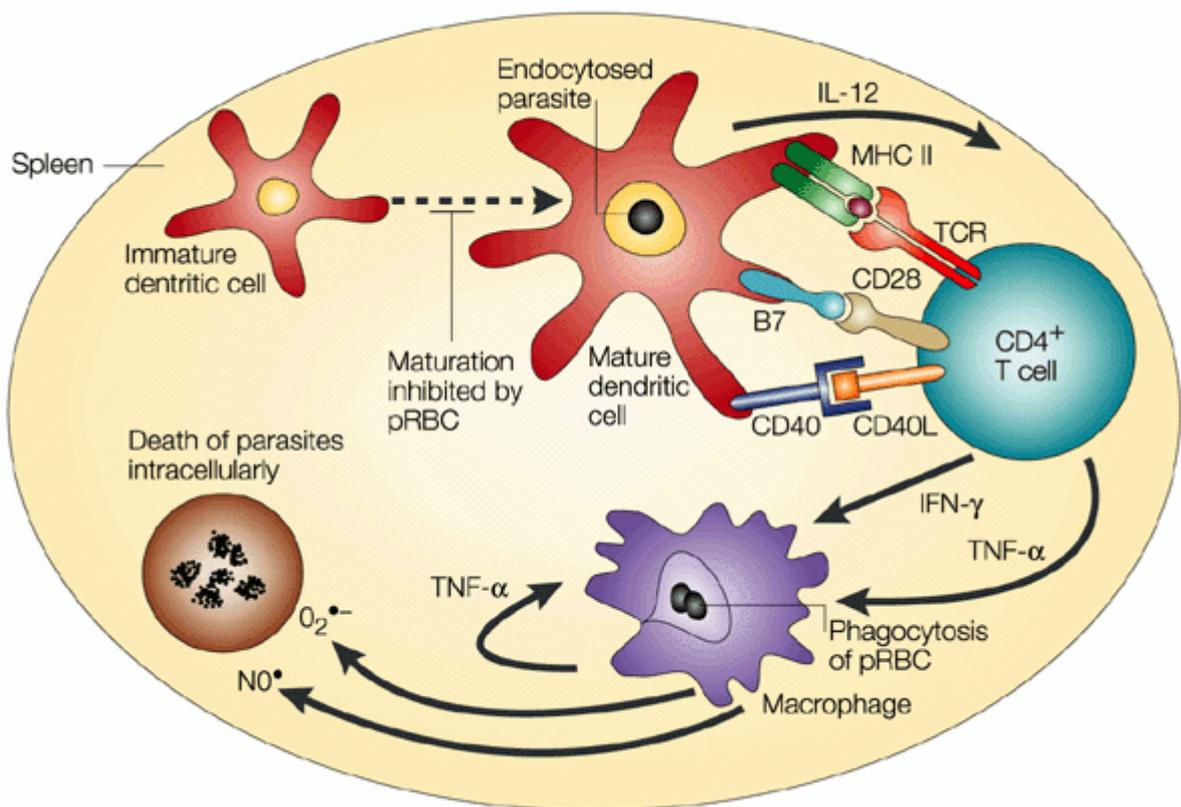


Figure 2 : Immunité contre le paludisme indépendant des cellules T [47]

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 l'élaboration de cytokines et de petites molécules inflammatoires (comme l'oxyde nitrique et les radicaux libres d'oxygène) [47]

3.6.2. 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 maladies cliniques), immunité antiparasitaire (protège contre les parasitémiées 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 [45].

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 variantes 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 [48]. 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 2 à 5 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 [49]. Ainsi, le niveau d'immunité antipaludique influence l'issue clinique de la maladie dans différents endroits et groupes d'âge.

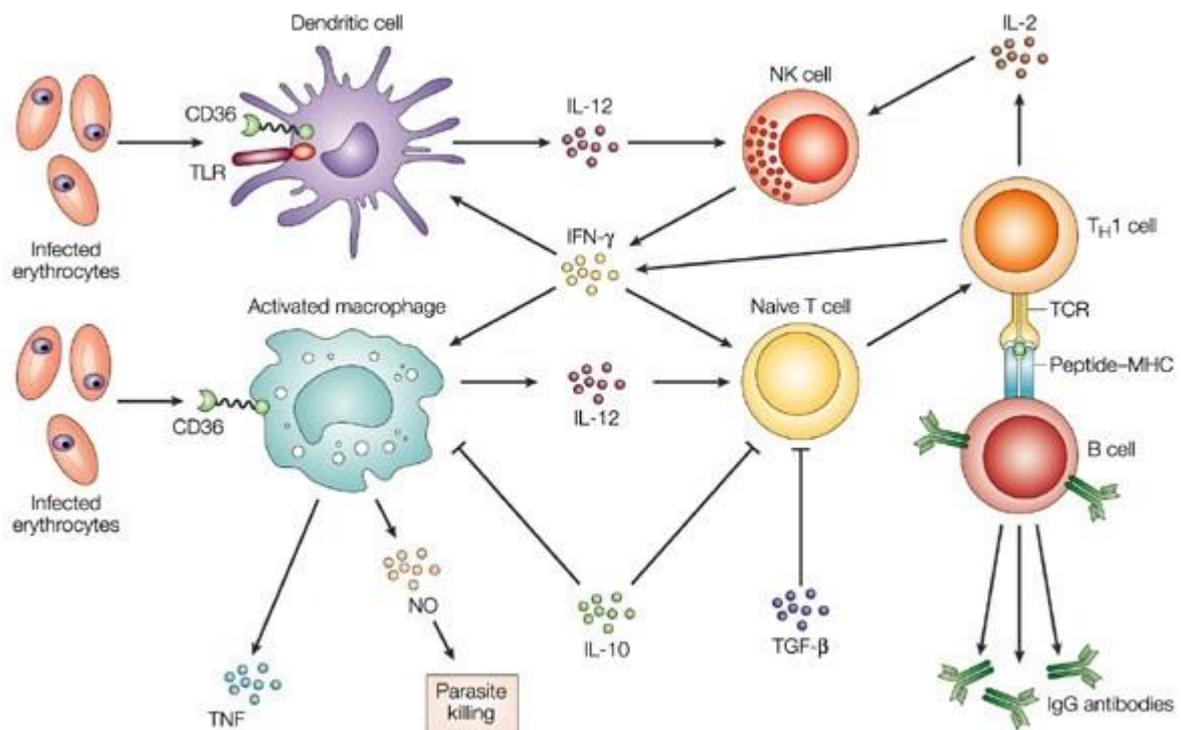


Figure 3: Liaison entre l'immunité innée et adaptative au paludisme au stade sanguin [47]

NO = l'oxyde nitrique ; TCR = récepteur des cellules T ; TNF = facteur de nécrose tumorale

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 patterns (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 DC 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 DC 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 [50].

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 asexuel (mérozoïte) et sexuel (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 [51].

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 microvaisseaux et de l'oxyde nitrique (NO) causée par les complexes immuns contenant des IgE [52].

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 [52].

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 [53].

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, 53].

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 palustre sévère. 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 [54].

L'immunosuppression dans le VIH/SIDA augmente également les risques de paludisme clinique, de complications et de décès [55].

3.6.3. Familles multigéniques de *P. falciparum*

P. falciparum possède un génome nucléaire haploïde d'environ 23 Mb qui est réparti entre 14 chromosomes [10]. 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 [10, 56].

La variation de séquence se développe par la transposition des variantes génétiques [57], des mutations [58], des délétions, des translocations et des duplications segmentaires [59, 60] pendant la croissance mitotique [61], et pendant la fusion des parasites au stade sexuel chez le moustique [57]. 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-télomériques consistent en un "patchwork" de blocs répétitifs qui sont placés au centre des répétitions télomériques. Plus précisément, six répétitions non codantes de taille variable, connues sous le nom d'éléments répétitifs associés aux télomères (TARE), sont situées à côté des répétitions télomères [57].

Cette région est suivie d'un membre du gène var qui code pour PfEMP1 [42, 43], suivi des gènes *rif* et *stevor* qui codent pour RIFINs [62-65] et STEVORs [66, 67], et d'autres familles multigènes [68, 69], comme la protéine membranaire transcrite tôt (etramp) [70], gène intercalé associé à la surface (surfin) (Winter, G. et al. 2005), sous-télomère (phist) [71],

protéine asexuée liée à la cytoadhérence [72, 73], qui présentent une localisation subtélomérique [59] (TABLEAU 2).

P. falciparum est à l'origine de la plupart des décès liés au paludisme de toutes les espèces de *Plasmodium* qui infectent les humains [74]. *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 [57, 75]. 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 [42, 43, 62, 63, 65, 66], dont beaucoup sont des médiateurs de l'adhésion aux cellules hôtes.

Ces gènes se trouvent principalement dans les régions subtélomériques et sont présents sous forme de copies multiples [10]. 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 (pRBCs). La progression des parasites du paludisme tout au long de leur cycle de développement modifie la forme des pRBCs de biconcave à une forme plus arrondie, et s'accompagne de changements dans la rigidité et la perméabilité de la membrane [76-78]. Par conséquent, les pRBCs bloquent partiellement la circulation sanguine et sont reconnus comme défectueux et éliminés par la rate [79].

Cependant, ils évitent la clairance splénique en se liant aux cellules endothéliales de la microvasculature [80, 81] et en formant des agrégats (aussi connus sous le nom de rosettes) avec d'autres globules rouges [82-84]. 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 [36], alors que les auto-agglutinants ne sont composés que de globules rouges infectés [85]. 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 [86, 87]. La fixation excessive de pRBCs dans le placenta peut conduire à l'anémie, à un faible poids à la naissance et à un risque d'avortement [88-90]. 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 [91], mais avec les RIFINs [64, 92] et/ou les STEVORs [93], et ces adhésines interviennent probablement dans la séquestration des pRBCs.

Tableau II : Familles multigéniques dans les régions subtélomériques de *Plasmodium falciparum*

Famille de gène	Protéine	Nombre de gènes	Sous-types et/ou types d'adhésion	Récepteur hôte et/ou fonction	Référence
<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, IgG, PECAM1, TSP et VCAM1.	[42, 43]
<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	[64, 65, 94]
<i>stevor</i>	STEVOR	30	Initie l'invasion par les mérozoïtes ou le rosetting	Acide sialique sur GYPC	[66, 95]
<i>surf</i>	SURFIN	10	A et B ; initiation de l'invasion par les mérozoïtes	Non déterminé	[96]
<i>phist</i>	PHIST	70	Oui	ATS de PfEMP1	[71]
<i>clag</i>	CLAG (RhopH)	7	Plusieurs sous-types ; canal ionique et médiation de l'invasion par les mérozoïtes	Prise en charge par le biais d'un canal	[72]
<i>etramp</i>	ETRAPM	15	Aucun sous-type connu	Non déterminé	[70]
<i>fikk</i>	FIKK kinase	10	Oui, lié au stade	Phosphorylation de la membrane du globule rouge infecté	[73]
<i>pfmc-2tm</i>	PfMC-2TM	15	Non déterminé	Non déterminé	[97]
Proposés	Plusieurs	Plusieurs	Non déterminé	Non déterminé	[60, 98]

ATS, segment terminal acide ; CLAG, protéine asexuée liée à la cytoadhérence ; CR1, récepteur-1 du complément ; CSA, sulfate de chondroïtine A ; EPCR, récepteur de la protéine C endothéliale ; ETRAMP, protéine membranaire transcrite précocement ; GYPA, glycophorine A ; ICAM1, molécule d'adhésion intercellulaire-1 ; IgA, immunoglobuline A ; PECAM1, molécule d'adhésion des cellules endothéliales plaquettaires-1 ; PfEMP1, *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 ; PHIST, *Plasmodium helical interspersed subtelomeric* ; pRBC, globules rouges infectés par des parasites ; RIFIN, *P. falciparum*-encoded repetitive interspersed families of polypeptides ; STEVOR, *subtelomeric variant open reading frame* ; SURFIN, *surface-associated interspersed protein* ; TSP, thrombospondin ; VCAM1, vascular cell adhesion molecule-1

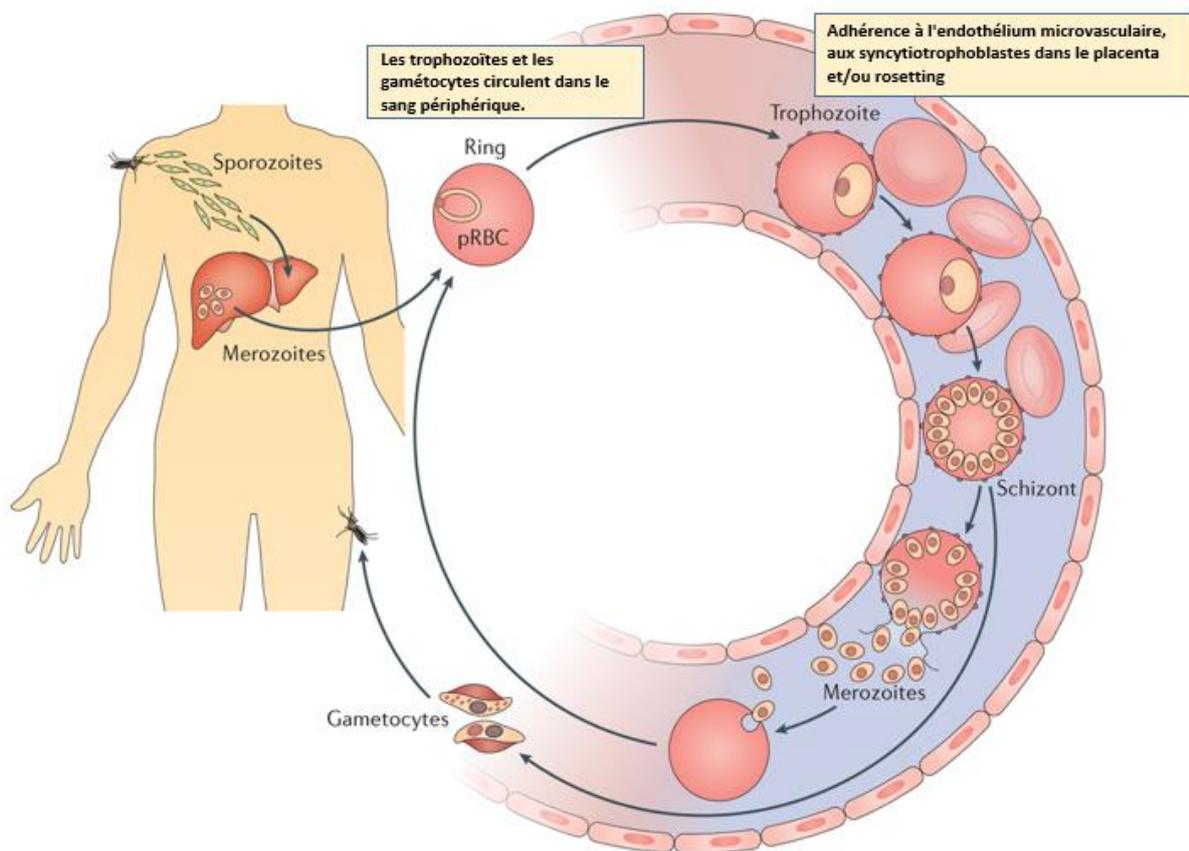


Figure 4 : Illustration de la séquestration des globules rouges parasités au cours du cycle de vie de *P. falciparum* [99].

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 (pRBCs) ne circulent pas mais sont séquestrés dans la microvasculature par des polypeptides adhésifs, tels que les familles répétitives de polypeptides (RIFIN), les variantes sous-télomériques (STEVOR) et *P. falciparum erythrocyte membrane protein 1* (PfEMP1), qui initient l'adhésion des pRBCs 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 pRBCs 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 (figure 4)

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, entre 200 et 400 kDa 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 pathogénèse du paludisme, les réponses immunitaires spécifiques au PfEMP1 et la

perspective d'une vaccination spécifique au PfEMP1 contre le paludisme également ont faits l'objet d'importants travaux.

Plusieurs espèces de parasites du paludisme rendent les érythrocytes qu'ils infectent collants [100]. 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 [101]. 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 [81, 102].

Cet événement pathophysiologique clé peut avoir des conséquences désastreuses lorsqu'il se produit dans des organes comme le cerveau ou le placenta [88]. 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 [103-106] 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 et publiées dos à dos ont démontré que PfEMP1 était en fait une famille de protéines codées par la famille multigènes des var [42, 107] [43].

3.6.6.1. Structure des gènes var et des protéines PfEMP1

PfEMP1 est une famille de protéines de poids moléculaire élevé (environ 200-400 kDa) 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* [10]. 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 a).

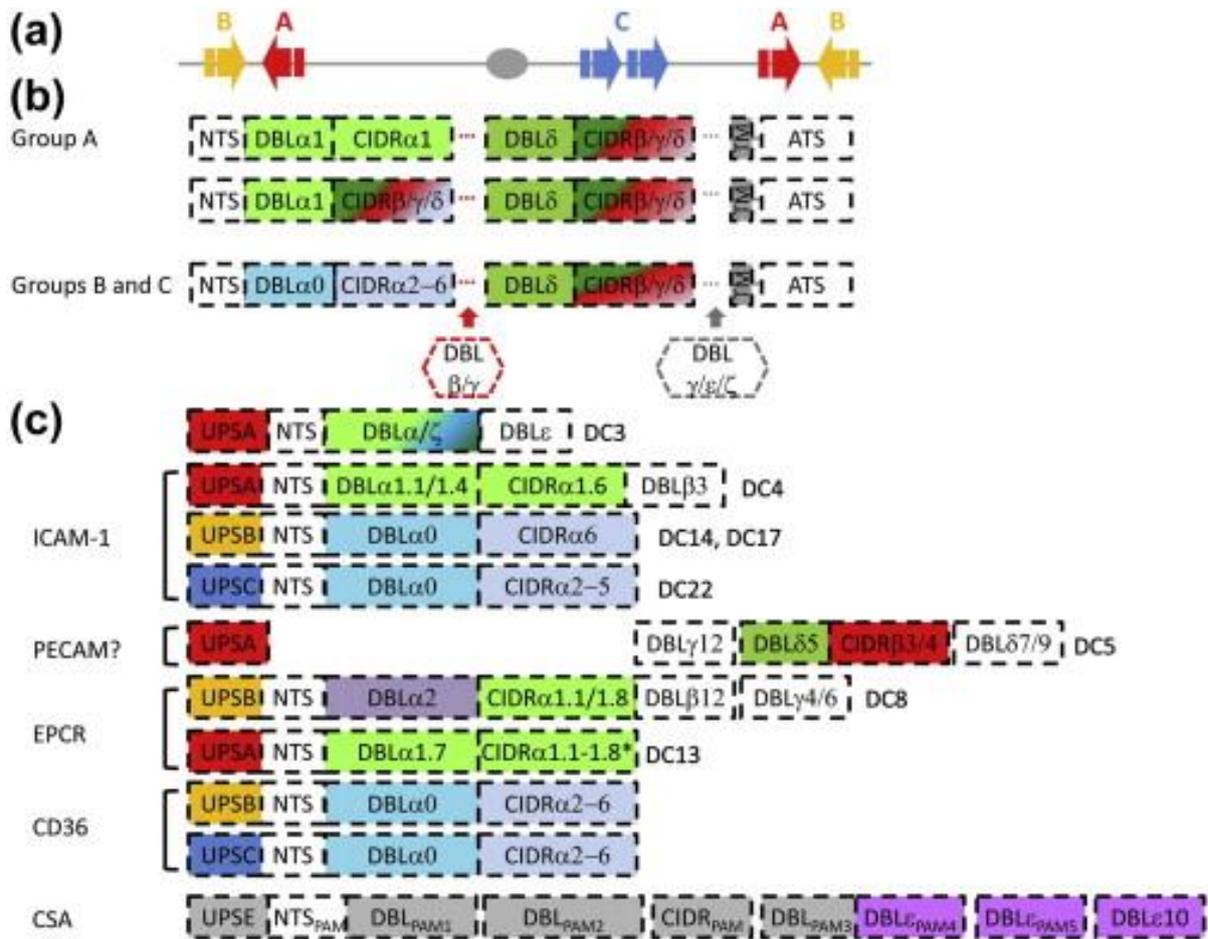


Figure 5: Organisation chromosomique des gènes var de *P. falciparum* et du domaine architectural de *P. falciparum* erythrocyte membrane protein-1 (PfEMP1) [99]

TM = thrombomoduline ; ATS = séquence terminale acide ; UPS = séquence promoteur en amont. (Figure modifiée à partir de [108]).

(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 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.

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 [109, 110]. Également, la fonction première des protéines PfEMP1 est d'assurer cette séquestration des érythrocytes infectés [111]. La diversité de PfEMP1 est limitée par leur rôle de ligands pour l'adhésion via les récepteurs. Cela les distingue des autres familles de variantes 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 (Horn, 2014).

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 [40, 112], ce qui permettrait l'adhésion d'un érythrocyte infecté donné à plusieurs récepteurs hôtes, simultanément ou successivement [113]. 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 [114].

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 [115].

Ces résultats nous rappellent des études similaires sur les glycoprotéines de surface des variantes du trypanosome [116] 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 [117]. 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 vaccin et d'autres vaccins à base de PfEMP1 pourraient jouer un rôle important pour combler les lacunes dans la lutte contre le fléau ancien et récalcitrant du paludisme [118-120].

3.6.7. Réponse immunitaire spécifique à PfEMP-1

Les anticorps dirigés contre les antigènes de surface des pRBCs 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 [121-125]. La séquestration des pRBCs peut être évitée par une immunisation préalable avec un PfEMP1 homologue chez les rongeurs et les primates non humains [45].

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 [45]. Une réactivité croisée partielle des anticorps avec la surface des pRBCs contenant des

parasites qui expriment des variantes distinctes 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)[126-128], PfEMP1 [129] ou PfEMP1 adhérent à l'ICAM1 [130].

Cependant, le rôle des anticorps contre les RIFINs et les STEVORs dans le blocage de la liaison des pRBCs aux RBCs doit également être considéré [125], car de tels anticorps ont été détectés dans des cohortes d'adultes semi-immuns du Gabon [131]. (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 [132]. 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.

3.7. Hémoglobinopathies et paludisme

3.7.1 Hypothèse d'Haldane

Haldane est l'un des trois fondateurs de la génétique populationnelle. Il est surtout connu pour avoir été le premier a suggéré que les maladies pourraient constituer un facteur d'évolution du génome humain. En 1949, Haldane notait que la fréquence extrêmement élevée de la thalassémie chez certains groupes raciaux dans les régions méditerranéennes pourrait refléter un taux de mutation inhabituellement élevée comme conséquence d'une exposition prolongée au paludisme [133]. L'association entre le paludisme et la thalassémie a été aussi confirmée dans d'autres régions du monde. Par exemple, il a été démontré chez les habitants des régions endémiques de Papouasie Nouvelle-Guinée et certaines parties de la Mélanésie, une fréquence du gène d' α -thalassémie proportionnelle à la fréquence du paludisme [134].

Il est reconnu que le paludisme représente une force sélective évolutionnaire derrière la sélection de plusieurs variant génétiques, incluant les variants structuraux du gène de la beta globine, qui encode la chaîne beta globine et conduit à la survenue des hémoglobines atypiques, telles que HbS, HbC [135, 136]. Alors le paludisme a été considéré comme la plus

grande force sélective dans l'histoire évolutive récente du génome humain [137]. Ainsi, pendant plus de 10.000 ans, le paludisme a eu comme conséquence, la sélection de centaines, voire de milliers de variantes génétiques qui confèrent un certain degré de protection contre les formes mortelles de la maladie [138].

3.7.2. Hémoglobine S et le paludisme

Beet a été le premier à observer en Rhodésie du nord le lien entre le paludisme et la drépanocytose, car ses observations montraient que les parasites du paludisme étaient moins fréquents dans le sang des sujets ayant le trait drépanocytaire [139]. Ensuite, Allison a rapporté que les personnes ayant le trait drépanocytaire développaient un paludisme moins fréquent et moins sévère que les personnes normales [140]. Allison observa le premier dès 1949 qu'il y avait une fréquence élevée du trait drépanocytaire HbAS (au moins 20%) dans les populations vivant près des zones côtières Kenyanes et autour du lac Victoria à l'opposé d'une faible fréquence de l'hémoglobine S sur les autres terres où le paludisme n'existe pas. Il proposait alors que le trait drépanocytaire conférait un certain degré de protection contre le paludisme à *Plasmodium falciparum*. Pour mettre en évidence cette hypothèse, il étudia chez les enfants de 4 mois, chez lesquels la morbidité et la mortalité du paludisme sont très grande et trouva que les enfants drépanocytaires ougandais de cette classe d'âge avaient une faible prévalence du paludisme, comparés à ceux ne portant pas ce trait drépanocytaire et avaient une hémoglobine normale AA [141]. Cette observation a été confirmée dans plusieurs régions Africaines, et les manifestations potentiellement létales du paludisme (atteinte cérébrale et l'anémie sévère) sont rares chez les sujets avec traits drépanocytaires [142, 143]. De façon générale, l'HbAS est associée à près de 50% de réduction de risque de faire un épisode de paludisme non compliqué, cette réduction pouvant atteindre jusqu'à 80% concernant le paludisme grave ou compliqué [144, 145]. En plus de la réduction du risque de paludisme chez les sujets HbAS, une étude a rapporté qu'il y a un retard de plus de 30 jours dans l'apparition du premier épisode de paludisme chez eux, au cours d'une saison de transmission, comparé à un groupe témoins HbAA vivant dans les mêmes conditions d'exposition au paludisme [146]. Il a été aussi rapporté dans une étude au Mali en 2015 qu'il y a une réduction de 150 parasites/microlitre de la parasitémie chez les sujets HbAS comparés aux sujets HbAA [147].

3.7.3. Hémoglobine C et paludisme

Le lien entre le paludisme et l'Hémoglobine C a été décrit pour la première fois au Mali chez les dogons, une population caractérisée par une forte prévalence d'HbC. En effet, il a été démontré que dans cette population que les sujets porteurs d'HbC présentaient 29% de moins de risque de faire un neuropaludisme que les sujets normaux HbAA. Dans cette étude aucun des 7 sujets HbCC inclus n'a développé de neuropaludisme [135]. Après Modiano a confirmé ces résultats dans une étude réalisée au Burkina Faso dans laquelle il a rapporté que l'HbAC et l'HbCC étaient respectivement associées à 29% et 93% de réduction de risque de paludisme [136]. Cependant, May et ses collaborateurs avaient rapporté que la protection conférée par l'HbC contre le paludisme, concernait seulement le neuropaludisme et non les autres aspects du paludisme comme le paludisme simple ou l'anémie sévère palustre [142]. Dans une autre étude menée au Mali chez les enfants de 0 à 6 ans, il a été rapporté que l'HbC réduisait de 183 jours le temps médiant que passaient les enfants sans paludisme comparé à l'HbAA [148].

3.7.4. Alpha-thalassémie et paludisme

Beaucoup d'investigations ont été menées pour faire le lien entre l' α - thalassémie et le paludisme. Si certains résultats rapportent qu'il n'y a pas d'association significative entre la forme hétérozygote de l' α - thalassémie et une protection contre le neuropaludisme [142], presque toutes sont unanimes que les sujets α - thalassémiques hétérozygotes et homozygotes sont protégés contre l'anémie sévère palustre [149, 150]. Cependant, une étude a rapporté que ni la forme α - thalassémie homozygote, ni la forme hétérozygote ne confère de protection contre l'accès palustre simple [144]; aussi beaucoup d'étude n'ont pu observer l'association entre l' α - thalassémie et une réduction de la prévalence du paludisme asymptomatique [151, 152] ou même de la parasitémie [153].

4. Méthodologie

4.1 Cadre d'étude

Notre étude s'est déroulée dans le village de Kéniéroba, situé dans la commune rurale de Bancoumana à environ 65 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 grande étude de cohorte du MRTC menée en partenariat avec les Instituts Nationaux de la Santé des Etats-Unis d'Amérique (NIH).

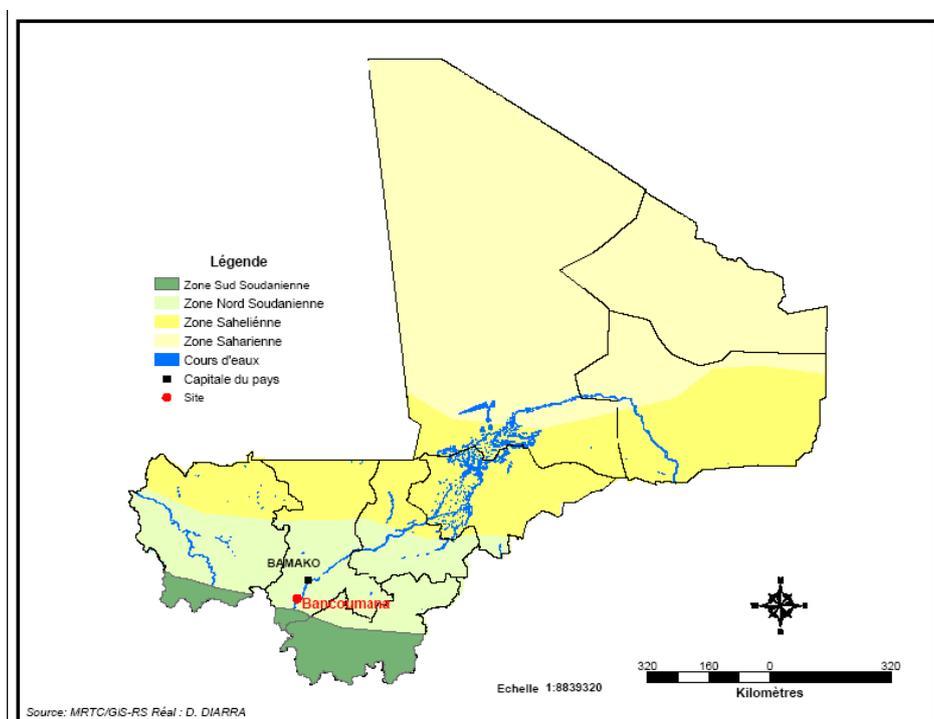


Figure 6 : Localisation du site d'étude au Mali

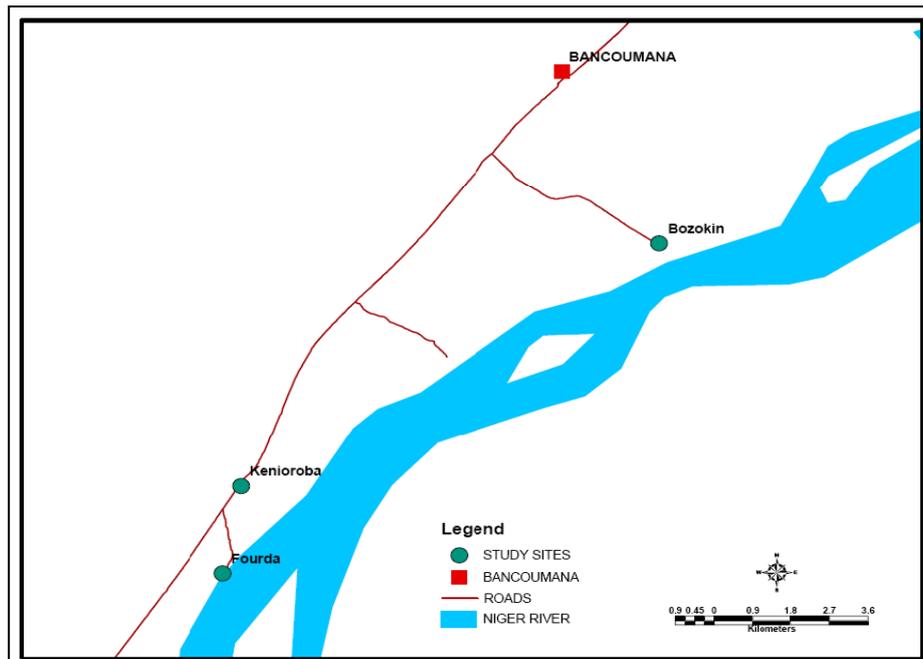


Figure 7 : Plan de masse des trois villages d'étude dans la commune rurale de Bancoumana
Source : Unité GIS MRTC/FMPOS.

4.2. Type et période d'étude

Nous avons mené une étude de cohorte portant sur l'immunité innée et acquise au paludisme. Elle s'est déroulée de mai 2011 à janvier 2012.

4.3. Echantillon

L'échantillon d'étude était constitué par 230 enfants, âgés de 4 à 15 ans et vivants dans l'un des trois villages d'étude.

4.3.1. Critères d'inclusion

Pouvaient être inclus dans la cohorte d'étude, tous les enfants répondant aux critères suivants:

- être résidant de Kéniéroba.
- accepter volontairement de participer à l'étude comme attesté par le consentement libre et éclairé obtenu des parents ou des tuteurs de l'enfant.
- être âgé de 4 à 15 ans.

4.3.2. Critères de non-inclusion

Nous avons exclu de cette étude les enfants qui étaient dans des conditions les rendant incapable de suivre le protocole (par exemple : maladie psychiatrique, hémophilie).

4.4. Variables mesurées

Les variables suivantes ont été mesurées :

- Variables sociodémographique : âge et le sexe
- Variables biologiques : taux d'hémoglobine, type d'hémoglobine, statut α -thalassémique, groupe sanguin ABO et taux d'anticorps anti-PfEMP-1/VarO.
- Variable parasitologique : parasitémie

4.5. Collecte des données

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

4.6. Techniques de laboratoire utilisés

4.6.1. Dosage des anticorps anti PfEMP1/varO

Chaque aliquot de plasma a été testé en duplicata par la méthode Immuno-enzymatique ELISA contre une protéine recombinante de l'antigène PfEMP-1/VarO [14]. De façon succincte, 0,1 μ g 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 200 μ l de lait (5% Regilait) à 37°C pendant 1 heure, 100 μ l 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 PBS1X 0.1% Tween. Les puits étaient ensuite incubés avec 100 μ l d'anticorps secondaire anti- IgG humain de mouton (dilué au 1/7.500 dans du PBS 1X 0.1%Tween) couplé à la peroxydase puis lavés. Une réaction bolométrique était provoquée par addition de 100 μ l d'une solution de substrat de peroxydase.

Après 10 minutes, la réaction était arrêtée par l'ajout 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 témoins 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 témoins était calculée et utilisée pour la correction des DO des échantillons testés sur la même plaque. La correction consistait à retrancher la DO moyenne des sérums témoins négatifs de la plaque de la DO moyenne de chaque échantillon testé sur la même plaque. Les DO corrigées ont été utilisées dans l'analyse des données. Nous avons déterminé la DO dans les plasmas 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) (cf. Annexes).

4.6.2. Détermination du type d'hémoglobine

Le taux d'hémoglobine a été testé en utilisant l'appareil D-10 de Bio-Rad dont le principe est basé sur la chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

4.6.3. Détermination du groupe sanguin ABO

Nous avons utilisé le test d'agglutination en utilisant des kits commerciaux à base d'anticorps monoclonaux (*Linear Chemical*) pour déterminer le groupe sanguin ABO.

4.6.4. Détection de l'alpha-thalassémie

Elle a été effectuée en utilisant la réaction de polymérisation en chaîne nichée (Nested-PCR) afin d'identifier les enfants hétérozygotes et homozygotes (cf. Annexes).

4.6.5. Diagnostic biologique du paludisme

La recherche des hématozoaires du paludisme a été faite en utilisant la technique de la goutte épaisse (cf. Annexes).

4.7. Déroulement 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.

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 aliquote 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 (janvier 2012). 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 (fièvre, céphalées, etc.) 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 (frottis sanguins et dosage des anticorps anti-PfEMP1/var0).

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 au Service de pédiatrie à Bamako pour une meilleure prise en charge.

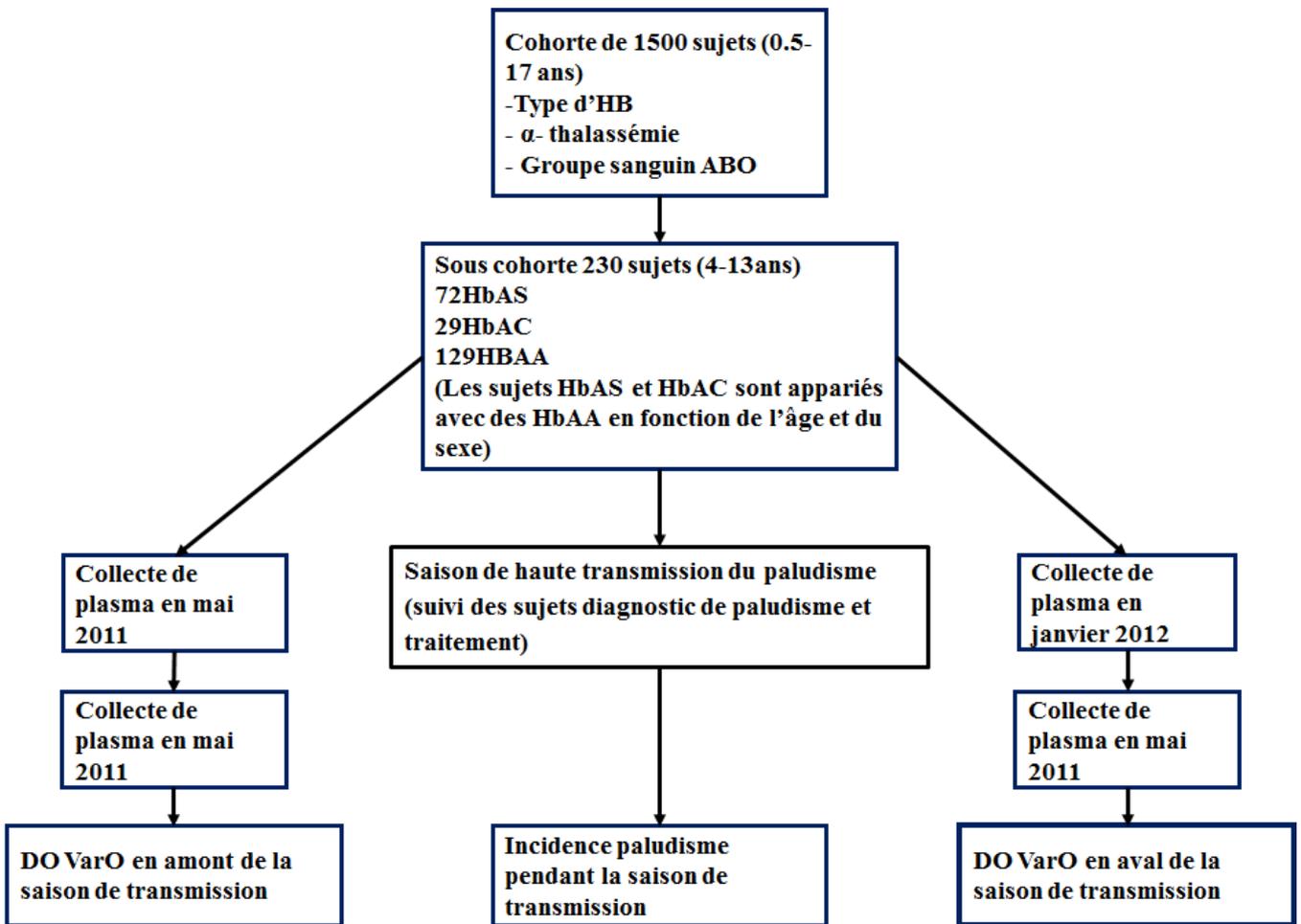


Figure 8: Schéma de la procédure de l'étude

4.8. Gestion et analyse statistique des données

Les données ont été saisies sur Microsoft Excel 2007 et analyses en utilisant le logiciel SPSS version 22. Pour chaque enfant porteur d'une anomalie d'hémoglobine (HbAS ou HbAC), 1 ou 2 enfants ayant une hémoglobine normale (HbAA) étaient appariés en fonction de l'âge et du sexe et aussi que possible en fonction des autres polymorphismes de globule rouge (α -thalassémie, groupe sanguin ABO). Les résultats ont été présentés sous forme de tableaux et de figures. Le test de Khi2 de Pearson et le test d'ANOVA ont été utilisés pour comparer les différentes fréquences et moyennes. Le seuil de signification statistique a été fixé à 5%.

4.9. Considérations éthiques

L'étude a été approuvée par le comité d'éthique de la FMPOS de l'Université de Bamako ainsi que par le comité d'éthique institutionnel de l'Institut National des allergies et des maladies infectieuses des Etats unis d'Amérique (NIAID/NIH). Un consentement éclairé a été obtenu des parents ou tuteurs de chaque participant à l'étude. En outre, nous avons sollicité un assentiment de tous les enfants âgés de 12 à 17 ans. 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. Résultats

6.

5.1. Résultats globaux

Au total, notre étude a porté sur 230 enfants incluant 72 enfants HbAS et 29 enfants HbAC. . Le sexe ratio était de 0,97 (113/117) en faveur du sexe masculin. L'ethnie majoritaire était les Malinkés avec 94,3%. La proportion du trait drépanocytaire (HbAS) était de 31,3% contre 12.6% d'HbAC.

5.2 Résultats descriptifs

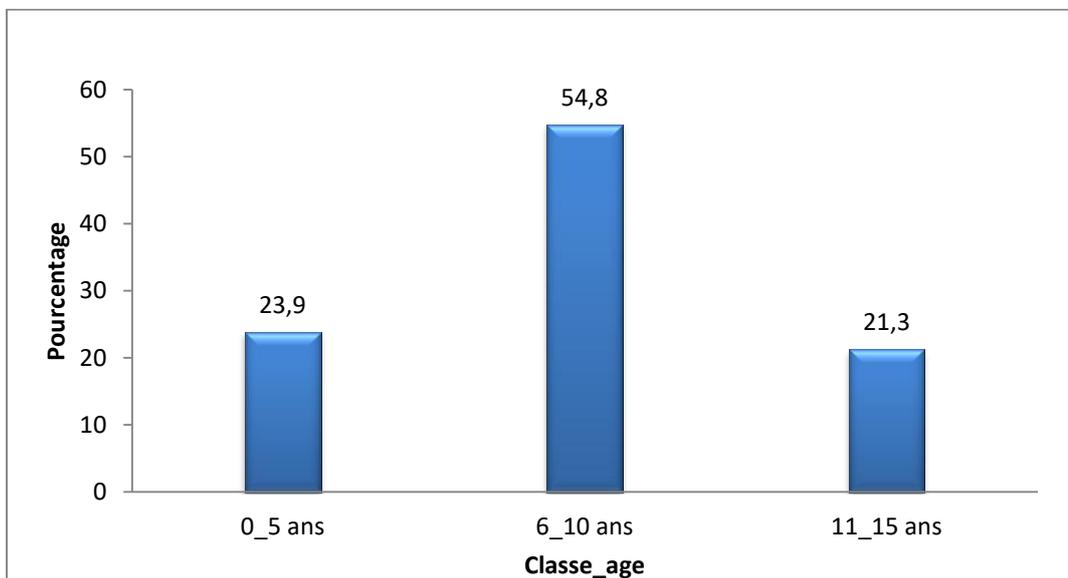


Figure 9: Répartition des participants en fonction des classes d'âge

Les enfants d'âge compris entre 6 et 10 ans étaient les plus représentés dans cette étude avec 54,8%.

Tableau III: Répartition des participants en fonction du sexe

Sexe	Nombre	Pourcentage
Féminin	113	49,1
Masculin	117	50,9
Total	230	100

Les deux sexes avaient des proportions similaires avec un sexe ratio de 0,97.

Tableau IV: Répartition des participants en fonction des ethnies

Ethnie	Effectif	Pourcentage
Bambara	7	3,1
Fula	4	1,7
Malinke	217	94,3
Sarakole	2	0,9
Total	230	100

La grande majorité de nos participants était des malinkés (94,3%) alors que les Sarakolés ne représentaient que 0,9%.

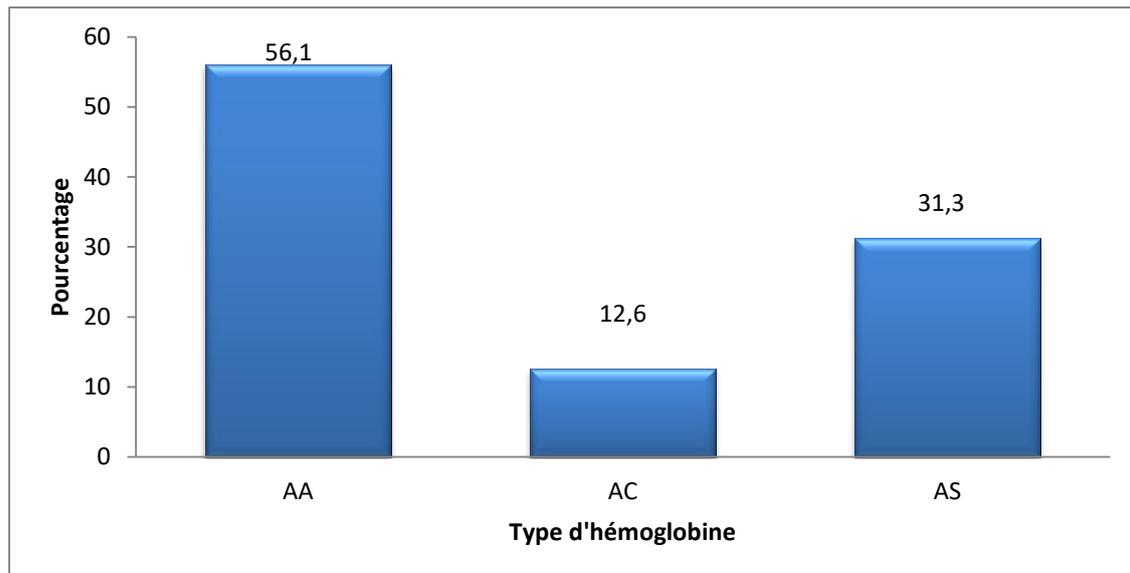


Figure 10: Répartition des participants en fonction du type d'hémoglobinique

Les participants porteurs du trait drépanocytaire (HbAS) étaient de 31,3% contre 12,6% d'HbAC

Table V : Répartition des participants en fonction du statut α - thalassémie

α - thalassémie	Effectif	Pourcentage
Normal	173	75,8
Hétérozygote	53	23,2
Homozygote	2	1
Total	228	100

Les sujets α - thalassémie hétérozygotes représentaient 23,2% contre 1% d'homozygote

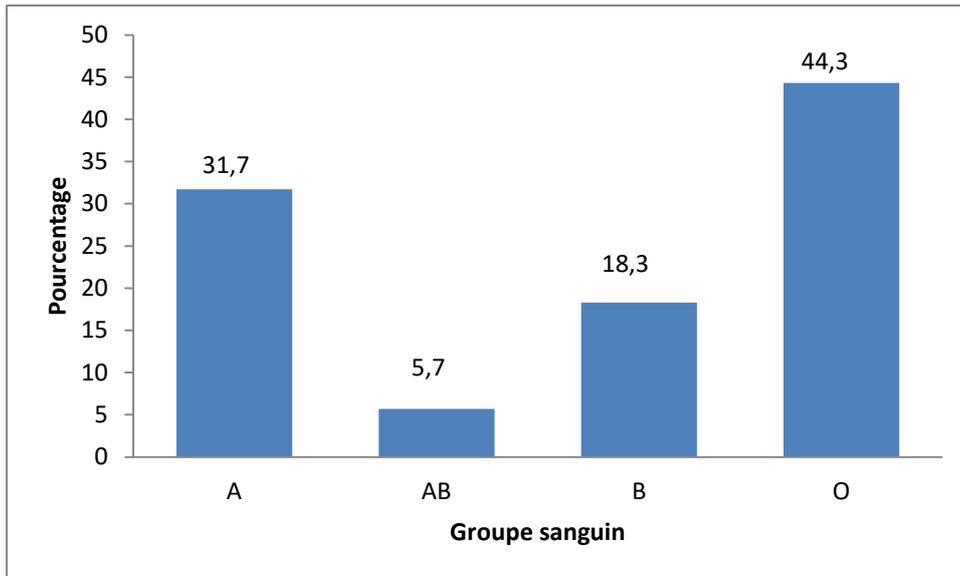


Figure 11: Répartition des participants en fonction du groupe sanguin ABO

Le groupe sanguin O était majoritaire dans notre étude avec 44,3% alors le groupe sanguin AB ne représentait que 5,7%.

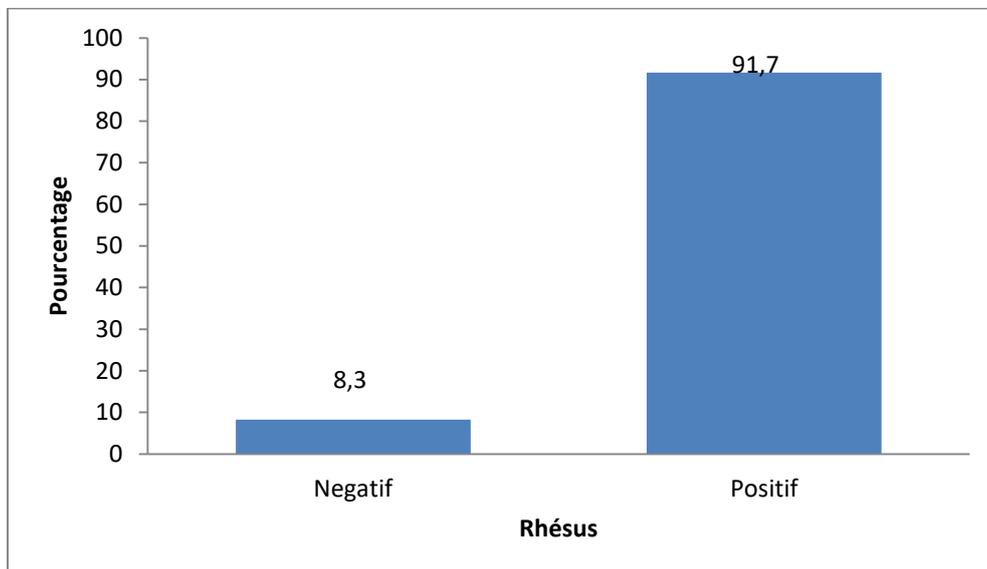


Figure 12: Proportion du groupe Rhésus dans notre étude

Les enfants rhésus positif représentaient 91,7% des participants.

Tableau VI : Tableau descriptif des variables quantitatives

Variabes	Moyenne ± écart-type	Maximum	Minimum
Episode	1,14±1,20	7	0
VarO en amont	2,24±1,03	3,41	0,00
VarO en aval	2,40±0,94	3,44	0,00
Age	8±2	13	4

En moyenne, les participants ont fait 1,14 épisode au cours de la saison de transmission avec un maximum de 7. Les taux d'anticorps ont varié de 0 à 3,41 en amont de la saison et 3,44 en aval de la saison avec des valeurs moyennes respectives de 2,24 et 2,40. Les participants étaient âgés de 4 à 13 ans avec une moyenne d'âge de 8±2.

Tableau VII : Proportion du nombre des épisodes palustres

Nombre d'épisode	Effectifs	Pourcentage (%)
0	84	36.5
1	74	32.2
2	44	19.1
3 et plus	28	12.2
Total	230	100

La majorité des participants (36,5%) n'ont pas fait un seul cas d'épisode palustre au cours de l'étude. Par contre, 12,2% de nos participants ont fait au moins 3 épisodes palustres.

5.3. Résultats analytiques

Tableau VIII: Taux moyens des anticorps anti-PfEMP-1/VarO en amont de la saison de transmission en fonction des variants génétiques du globule rouge et du nombre des épisodes palustres

	DO Moyen± écart type				
Type d'hémoglobine					
	Epi0	Epi1	Epi2	Epi3 et plus	p
AA	2,63±0,89	2,61±0,80	2,29±1,04	1,21±1,04	0,001
AC	2,33±0,55	2,81±0,25	1,68±1,17	1,19±1,03	0,06
AS	2,56±0,89	1,81±1,11	1,35±0,90	1,19±0,33	0,002
Alpha-thalassémie					
	Epi0	Epi1	Epi2	Epi3 et plus	p
Normal	2,57±0,86	2,40±0,90	2,13±1,06	1,32±0,97	0,0001
Hétérozygote	2,55±0,93	2,39±1,02	1,94±1,16	0,92±0,84	0,01
Homozygote			0,94±1,33		
Groupe sanguine					
	Epi0	Epi1	Epi2	Epi3 et plus	p
O	2,47±0,95	2,36±1,02	1,78±1,19	1,34±1,04	0,007
A	2,86±0,26	2,14±1,13	2,20±0,89	1,15±0,85	0,001
B	2,27±1,21	2,51±0,81	1,91±1,28	0,32±0,24	0,03
AB	2,85±0,12	2,58±0,45	2,87±0,27	2,28±0,00	0,7

Epi0= aucune épisode palustre

Le taux des anticorps anti-PfEMP1/VarO élevés en amont de la saison de transmission étaient significativement associés à un nombre réduit des épisodes palustres au cours de la saison de transmission à l'intérieur de tous les groupes étudiés à l'exception des participants du groupe sanguin AB et des porteurs d'HbAC

Tableau IX: Taux moyen des anticorps anti-PfEMP-1/VarO en amont et en aval de la saison de transmission en fonction des tranches d'âge

Classe d'âge	Saison de transmission		p
	Amont	Aval	
	M ± ET	M ± ET	
0 - 5	1,08 ± 1,18	1,53 ± 1,23	0,05
6 - 10	2,61 ± 0,55	2,72 ± 0,51	0,28
11 - 15	2,76 ± 0,53	2,69 ± 0,62	0,69
	P = 10 ⁻³	P = 10 ⁻³	

M = moyenne de la densité optique de l'anticorps, ET = écart-type

Nous avons observé une augmentation significative du taux des anticorps anti-PfEMP-1/VarO avec l'âge en amont et en aval de la saison de transmission ($p = 10^{-3}$). Chez les enfants âgés de 0 à 5 ans, nous avons constaté une augmentation significative du taux des anticorps anti-PfEMP-1/VarO en aval de la saison de transmission par rapport au début de la saison ($p = 0,05$).

Tableau X : Taux moyens des anticorps anti-PfEMP-1/VarO en amont et en aval de la saison de transmission en fonction du sexe.

Genre	Saison de transmission		p
	Amont	Aval	
	M ± ET	M ± ET	
Féminin	2,05 ± 1,13	2,31 ± 1,01	0,08
Masculin	2,42 ± 0,89	2,49 ± 0,84	0,6
	P = 0,01	P = 0,21	

M = moyenne de la densité optique de l'anticorps, ET = écart-type

Nous avons constaté que le taux moyen des anticorps anti-PfEMP-1/VarO était significativement plus élevé chez les hommes ($p = 0,01$) en amont de la saison de transmission alors qu'elle n'était pas significative en aval de la saison de transmission ($p = 0,21$). Aucune augmentation significative du taux des anticorps anti-PfEMP-1/VarO a été observée quel que soit le sexe en aval de la saison de transmission par rapport au début ($p = 0,6$).

Tableau XI : Taux moyens des anticorps anti-PfEMP-1/VarO en amont et en aval de la saison de transmission en fonction du type d'hémoglobine.

Hb Type	Saison de transmission		p
	Amont	Aval	
	M ± ET	M ± ET	
AA	2,36 ± 1,01	2,41 ± 0,93	0,71
AC	1,99 ± 0,99	2,23 ± 1,09	0,42
AS	2,12 ± 1,05	2,50 ± 0,85	0,03
	P = 0,16	P = 0,46	

M = moyenne de la densité optique de l'anticorps, ET = écart-type

Nous n'avons pas trouvé de différence statistiquement significative entre le taux des anticorps anti-PfEMP-1/VarO et les types d'hémoglobine ($p > 0,05$) quel que soit la période de la saison de transmission. Cependant, nous avons noté une augmentation statistiquement significative du taux des anticorps anti-PfEMP-1/VarO à la fin de la saison chez les participants porteurs d'hémoglobine AS ($p = 0,03$).

Tableau XII: Taux moyens des anticorps anti-PfEMP-1/VarO en amont et en aval de la saison de transmission en fonction du groupe sanguin ABO.

Groupe sanguin	Saison de transmission		p
	Amont	Aval	
	M ± ET	M ± ET	
A	2,27±0,97	2,52±0,81	0,15
AB	2,71±0,35	2,52±1,11	0,62
B	2,22±1,10	2,53±0,92	0,19
O	2,18±1,09	2,25±0,99	0,65
p	0,46	0,30	

M = moyenne de la densité optique de l'anticorps, ET = écart-type

Nous n'avons pas observé de différence statistiquement significative entre le taux des anticorps anti-PfEMP-1/VarO et le groupe sanguin ABO quel que soit la période de la saison de transmission. ($p > 0,05$).

Tableau XIII : Taux moyens des anticorps anti-PfEMP-1/VarO en amont et en aval de la saison de transmission selon le statut d' α - thalassémie

	Saison de transmission		p
	Amont	Aval	
α -thalassémie	M \pm ET	M \pm ET	
Normal	2,30 \pm 0,99	2,44 \pm 0,89	0,22
Hétérozygote	2,15 \pm 1,10	2,33 \pm 1,02	0,42
Homozygote	0,94 \pm 1,32	1,43 \pm 1,73	0,70
p	0,12	0,29	

M = moyenne de la densité optique de l'anticorps, ET = écart-type

En début et en fin de saison, les participants normaux avaient des proportions d'anticorps anti-PfEMP-1/VarO similaires que les participants α - thalassémiques (homozygotes et hétérozygotes ; p > 0,05).

Tableau XIV : Taux moyens des anticorps anti-PfEMP-1/VarO en amont et en aval de la saison de transmission selon le groupe Rhésus.

Saison de transmission			
	Amont	Aval	
Rhésus	M ± ET	M ± ET	p
Positif	2,25 ± 1,03	2,40 ± 0,93	0,16
Négatif	2,26 ± 0,96	2,43 ± 0,89	0,62
p	0,46	0,90	

M = moyenne de la densité optique de l'anticorps, ET = écart-type

Aucune différence statistiquement significative du taux des anticorps anti-PfEMP-1/VarO n'a été observée selon le groupe rhésus.

Tableau XV : Moyenne du nombre des épisodes palustres selon l'âge et le type d'hémoglobine

Type d'Hémoglobine	Classe d'âge (ans)	Nombre d'Episode	
		Moyen ± écart type	Effectif p
AA	0 à 5	2.17 ±1.391	29
	6 à 10	1.08 ±1.191	74
	11 à 15	0.77 ±0.951	26
AC	0 à 5	2.67 ±1.211	6 0,34
	6 à 10	1.39 ±1.092	18 0,27
	11 à 15	1.00 ±1.225	5 0,6
AS	0 à 5	1.20 ± 0.951	20 0,004
	6 à 10	0.65 ± 0.917	34 0,051
	11 à 15	0.39 ± 0.608	18 0,17

Le nombre moyen des épisodes palustres diminuait significativement dans chez les participants HbAS âgés de moins de 10 ans.

6. Commentaires et Discussion

Le paludisme à *P. falciparum* joue un rôle prééminent dans la mortalité infantile dans les régions tropicales depuis 5000 ans. Cette infection transmise par les moustiques passe la majeure partie de son cycle de vie chez l'homme dans les globules rouges, où elle se multiplie environ dix fois tous les deux jours jusqu'à ce qu'elle soit contrôlée par l'immunité ou par un traitement. Les épisodes chroniques asymptomatiques et répétés de paludisme non compliqué provoquent des niveaux élevés d'anémie infantile et de dénutrition dans les zones d'endémie palustre, alors que le paludisme grave - y compris l'anémie palustre sévère, le paludisme cérébral et la détresse respiratoire - est associé à une mortalité aiguë élevée [154]. Le paludisme a eu un effet majeur sur le génome humain par la sélection de polymorphismes associés à une meilleure survie [137]. Certains de ces polymorphismes comprennent les variants classiques du trait drépanocytaire et α -thalassémie des cellules rouges. Cependant, la protection contre le paludisme semble également être assurée par d'autres polymorphismes [155].

Nous décrivons ici l'effet de l'hémoglobine AS, de l'hémoglobine AC et de l' α -thalassémie sur la réponse humorale anti-PfEMP-1/VarO chez les enfants résidant à Kéniéroba au Mali. L'objectif de notre étude était de vérifier l'importance de ces facteurs génétiques spécifiques qui pourraient fournir des informations sur la pathophysiologie du paludisme et qui pourraient être utilisées de manière plausible pour étayer le développement de nouvelles approches de prévention et de traitement de cette maladie grave.

6.1. Polymorphismes du GR et nombre des épisodes palustres

Depuis l'Hypothèse d'Haldane [133], les effets de protection contre le paludisme de plusieurs polymorphismes du GR ont été testés par plusieurs auteurs. Ces différentes études ont concerné plusieurs aspects de la protection contre le paludisme allant de la protection contre l'infection asymptomatique [141, 146] à la protection contre les manifestations graves [142, 156] en passant par une réduction de l'incidence palustre [144, 148]. Nous avons trouvé que seul l'HbAS était associée à une réduction significative du nombre d'épisode palustre enregistré au cours de l'étude. L'effet de protection de l'HbAS contre l'incidence palustre et bien d'autres manifestations du paludisme est presque systématiquement rapporté par les

études sur le paludisme [143, 145, 147]. Cet effet est même en passe de devenir un élément de contrôle de qualité des études épidémiologiques sur le paludisme.

6.2. Taux des anticorps anti-PfEMP-1/VarO et nombre des épisodes palustres

La formation des rosettes ou *rosetting*, c'est-à-dire la liaison entre les globules rouges parasités et les globules rouges non parasités, a été décrite comme un important facteur de virulence de *P. falciparum*. Le *rosetting* a été associé au paludisme grave dans de nombreuses études en Afrique [157, 158] [159, 160], a été décrit comme conduisant à une obstruction microvasculaire [86, 161] et a été suggéré comme l'un des facteurs les plus importants provoquant une maladie grave [162, 163].

Au cours du *rosetting*, le ligand parasitaire, *P. falciparum erythrocyte membrane protein 1* (PfEMP1) se lie aux protéines sériques et aux récepteurs à la surface des globules rouges humains. Jusqu'à présent, les protéines sériques, telles que les immunoglobulines non immunes, le fibrinogène et l'albumine ainsi que l'antigène des groupes sanguins A et B, le sulfate d'héparane [164-166] et le récepteur-1 du complément (CR1) [13, 167] ont été identifiés comme étant impliqués dans les phénomènes de *rosetting*.

La famille de protéines PfEMP1 est le groupe de loin le mieux caractérisé de ligands parasitaires liés à la capacité du parasite à cytoadhérer [168-170] et à la formation de rosettes [12, 13, 171], mais d'autres molécules ont été suggérées pour être impliquées dans ces événements adhésifs. Les protéines PfEMP1 partagent une structure commune de domaines Duffy Binding Like (DBL) et de régions inter-domaines riches en cystéine (CIDR). PfEMP1 varie en taille entre 200 et 400 kDa et est codé par un répertoire d'environ 60 gènes var par génome [172] responsable de la variation antigénique à la surface du globule rouge parasite (pRBC) [43, 107].

Le domaine N-terminal NTS-DBL1 α de la molécule de PfEMP1 est central dans l'événement de liaison au globule rouge [12, 13, 40, 173]. Jusqu'à présent, trois différentes variétés de NTS-DBL1 α impliquées dans le *rosetting* ont été analysées en détail : NTSDBL1 α -R29var1 [13], NTSDBL1 α -PAvarO [12] et NTSDBL1 α -FCR3S1.2var2 [171]. Ces trois variants sont codés par les gènes var du groupe A. Cette observation basée sur des souches parasitaires de laboratoire a été soutenue dans les isolats de patients infectés par *P. falciparum*, où il existe une corrélation entre le *rosetting* et la transcription des gènes var du groupe A [174-177].

Bien que le rôle central des variantes de PfEMP1 dans l'acquisition des anticorps antipaludiques ait été souligné dans un certain nombre d'études [178-182], peu ont spécifiquement étudié les anticorps anti-rosetting. Il existe des preuves que les anticorps capables de perturber la formation des rosettes sont impliqués dans la protection contre le paludisme sévère [36, 183] et les anticorps ciblant les domaines impliqués dans le rosetting peuvent promouvoir l'opsonisation des globules rouges parasités [14, 184, 185]. De plus, il a été démontré que les anticorps polyclonaux dirigés contre les domaines DBL1 α associés aux rosettes peuvent perturber les rosettes par les souches homologues [12, 13, 171] et récemment aussi par les souches de parasites hétérologues [184], générant des données contradictoires, que les épitopes exposés par le rosetting des globules rouges parasités soient spécifiques de variants [186] ou partagés par des parasites présentant un phénotype adhésif similaire [184].

Des taux élevés des anticorps anti-PfEMP-1/VarO ont été associés à une réduction du risque de paludisme grave au Bénin [14]. Cette observation repose sur le phénotype de formation de rosette associée au variant PfEMP-1/VarO [12, 13]. Cependant, en ce qui concerne l'effet des anticorps anti-PfEMP-1/VarO sur l'incidence du paludisme, nous avons observé au cours de notre étude que le taux élevé des anticorps anti-PfEMP-1/VarO au début de la saison de transmission sont fortement associés à une réduction très significative du nombre des épisodes palustres au cours de la saison de transmission (tableau VII). Cette situation a été observée chez les sujets quel que soit le type d'hémoglobine, le groupe sanguin et le statut thalassémique. Cependant, il faut noter la faible proportion des porteurs d'HbAC et du groupe sanguin AB dans notre étude. Ces résultats corroborent l'étude de Vigan-Womas et ses collaborateurs, qui ont rapporté que les réponses des anticorps IgG, IgG1 et IgG3 aux domaines PfEMP1-VarO étaient significativement plus élevées chez les enfants asymptomatiques que chez les enfants atteints de paludisme clinique [14]. Dans notre étude, le groupe sanguin O était prédominant avec 44,3% (figure 11) confirmant son rôle protecteur contre les maladies infectieuses [187-189]. Néanmoins, aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre le taux des anticorps anti-PfEMP-1/varO et les différents groupes sanguins ABO (tableau XI).

6.3. Taux des anticorps anti-PfEMP-1/VarO selon les classes d'âge

De façon globale, nous avons observé dans notre étude, que le taux moyen des anticorps anti-PfEMP-1/VarO augmentait significativement avec l'âge (tableau VIII). En zone d'endémie palustre, l'âge est surrogatoire de l'immunité antipalustre. L'exposition naturelle continue des enfants aux différents antigènes plasmodiaux booste la production des anticorps correspondants. Ces anticorps protègent contre l'incidence palustre et surtout les manifestations graves du paludisme. Cependant, cette immunité n'empêche pas les infections asymptomatiques et parfois même des épisodes de paludisme simple. Nos résultats confirment ceux d'une étude menée en 2010 par Guillote et ses collaborateurs, dans laquelle ils ont rapporté que les adultes avaient un taux d'anticorps anti-PfEMP-1/VarO légèrement plus grand que les enfants [190]. Dans la même étude, ils ont observé des réponses anti-PfEMP-1/VarO beaucoup plus faibles chez les enfants atteints de paludisme clinique par rapport aux enfants asymptomatiques. Dans une autre étude rapportée par la même équipe en 2015, il a été constaté que les souris produisaient un taux d'anticorps anti-PfEMP-1/VarO suffisant pour réagir efficacement avec l'antigène PfEMP-1/VarO [191].

Les titres élevés des anticorps perturbateurs de la formation des rosettes mis en évidence dans les modèles murins diffèrent nettement de nos observations dans les zones endémiques. En effet, tous les plasmas d'enfants testés au Sénégal [12, 186] ou au Bénin [14] manquaient d'anticorps perturbateurs du rosetting, bien que les anticorps VarO des globules rouges infectés réagissant en surface aient été facilement détectés et avec une séroprévalence élevée. Cela suggère que la vaccination utilisant les domaines fonctionnels DBL1 ou « tête » peut tout à fait exploiter l'immunité naturelle (réactivité de surface) et mettre en œuvre un mécanisme effecteur supplémentaire (perturbation de la formation des rosettes).

6.4. Taux des anticorps anti-PfEMP-1/VarO et protection conférée par les polymorphismes du GR contre le paludisme

La protection conférée par les polymorphismes du globule rouge contre le paludisme couvre un large spectre de manifestations cliniques allant de l'infection asymptomatique à la mortalité palustre [144, 146, 148]. Les mécanismes biologiques qui sont à la base de ces protections restent encore mal élucidés malgré les annonces d'hypothèses de plus en plus nombreux [192-194]. L'une des hypothèses discutées suggère le rôle primordial de l'acquisition de l'immunité spécifique antipalustre. Dans les zones d'endémie palustre où les polymorphismes

du globule rouge ont des proportions élevées dans les populations exposées au paludisme, les enfants acquièrent rapidement la prémunition contre le paludisme [195]. Une étude menée au Kenya a rapporté un effet de protection élevé du trait drépanocytaire contre le paludisme chez les sujets plus âgés suggérant le rôle de ce trait dans l'établissement de l'immunité antipalustre [196]. Cependant, des études réalisées sur différents antigènes plasmodiaux pour prouver cette hypothèse ont rapporté des résultats contradictoires aussi bien concernant la magnitude que le spectre antigénique de la réponse humorale [197]. Ces études ont surtout concerné des antigènes classiques de la phase érythrocytaire du cycle de vie de *P. falciparum* (Comme AMA1, MSP1, MSP2 et EBA175).

La protection conférée par les polymorphismes du GR étant plus forte contre les formes graves de la maladie, il nous a paru intéressant de déterminer si les anticorps dirigés contre le variant VarO du PfEMP-1 joue un rôle dans cette protection. Le PfEMP-1\VarO est impliqué dans les phénomènes de rosetting, un phénotype associé à des manifestations graves du paludisme. Aucun des polymorphismes de GR étudié n'a été associé à des niveaux élevés d'anticorps anti-PfEMP-1\VarO ni en amont ni en aval de la saison de transmission (Tableau XV). Ces résultats suggèrent que ces anticorps ne sont pas responsables de la protection conférée par l'HbAS contre la survenue du paludisme dans notre étude.

Une étude récente a démontré le rôle clé de l'oxygène dans la protection conférée par l'HbS contre le paludisme [198]. Les auteurs ont constaté que les parasites dans les globules rouges AS maintenus à de faibles concentrations d'oxygène stagnent à un stade spécifique au milieu de la croissance intracellulaire avant la réplication de l'ADN. Ils ont démontré que la polymérisation de l'hémoglobine falciforme (HbS) est responsable de l'arrêt de croissance intraérythrocytaire des parasites de *P. falciparum*, avec une digestion normale de l'hémoglobine et une croissance restaurée en présence du monoxyde de carbone, un agent gazeux anti-falciforme. La modélisation de l'inhibition de la croissance et de la séquestration a révélé que l'inhibition de la croissance induite par la polymérisation de l'HbS après cytoadhérence est le facteur critique de la réduction des densités parasitaires observées dans les infections paludéennes chez les personnes porteuses d'HbAS. Ainsi, l'effet protecteur de l'HbAS découle en grande partie de la séquestration efficace des GR infectés dans la microcirculation hypoxique. L'étude de Sanogo en 2011 dans le même village a démontré que les types d'hémoglobine AS et AC n'ont pas un effet bénéfique sur la réponse humorale à certains antigènes de *P. falciparum* (AMA1, MSP1, EBA175 et MSP2), par rapport au type

d'hémoglobine normal AA [199]. Verra et ses collaborateurs ont également rapporté en 2007 au Burkina Faso qu'il n'existait pas de différence significative entre le taux des anticorps IgG et les différents types hémoglobiniques [200]. Goheen et ses collaborateurs ont aussi rapporté en 2016 que l'anémie offre un pourcentage de protection plus élevé que le trait drépanocytaire [201]. Nos observations suggèrent que la protection contre le paludisme procuré par l'HbAS repose sur un mécanisme différent de celle liée à l'âge qui repose sur l'acquisition de l'immunité spécifique due à des expositions successives.

Les titres élevés des anticorps perturbateurs de la formation des rosettes mis en évidence dans les modèles murins diffèrent nettement de nos observations dans les zones endémiques. En effet, tous les plasmas d'enfants testés au Sénégal [12, 186] ou au Bénin [14] manquaient d'anticorps perturbateurs du rosetting, bien que les anticorps VarO des globules rouges infectés réagissant en surface aient été facilement détectés et avec une séroprévalence élevée. Cela suggère que la vaccination utilisant les domaines fonctionnels DBL1 ou « tête » peut tout à fait exploiter l'immunité naturelle (réactivité de surface) et mettre en œuvre un mécanisme effecteur supplémentaire (perturbation de la formation des rosettes). Dans notre étude, nous n'avons pas observé d'effet de protection associé à d'autres polymorphismes du GR à l'exception de l'HbAS. Ce constat d'absence de protection lié à ces polymorphismes et couplé à l'absence d'association entre ces polymorphismes et une réduction de l'incidence palustre ne nous permet pas d'exclure la responsabilité de ces anticorps dans la protection associée à ces polymorphismes dans d'autres études.

Nous avons aussi observé une augmentation significative du taux d'anticorps anti-PfEMP-1/VarO à la fin de la saison de transmission comparé au début de la saison chez les sujets HbAS. Cette observation pourrait s'expliquer par une exposition prolongée de ces sujets à *P. falciparum* au cours de la saison. En effet des études ont rapporté une persistance de *P. falciparum* chez les sujets HbAS à cause de la tolérance induite par cet état [202]. Les sujets HbAS constitueraient même un réservoir de transmission de la maladie dans les zones d'endémie palustre [203]. En outre, on ne dispose à ce jour d'aucune information sur les épitopes ciblés par ces anticorps et sur leur localisation dans les différents antigènes parasitaires. Les variétés de PfEMP1 liées au rosetting sont, en raison de la forte association entre le rosetting et le paludisme grave, des candidats vaccins prometteurs. Le développement d'un vaccin basé sur un domaine recombinant dérivé du PfEMP1 doit être initié par l'analyse détaillée de la réponse immunitaire protectrice induite par le vaccin dans un modèle animal,

même si les réponses immunologiques dans de tels modèles ne sont souvent qu'indicatives de ce qui sera observé chez l'hôte humain.

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 parasitaires de terrain ainsi que de la durée de l'immunité induite par le vaccin, une question critique pour un vaccin à l'ère de l'élimination du paludisme.

7. Limites de notre étude

Notre étude s'est intéressée uniquement au lien entre les polymorphismes du globule rouge (Hb (HbS, HbC, l' α -thalassémie et le groupe sanguin) et l'acquisition des anticorps anti-PfEMP-1/VarO dirigés contre *P. falciparum* chez les enfants. Dans cette étude, nous n'avons exploré ces anticorps chez les enfants âgés de plus de 15 ans. Une étude élargie aux anticorps dirigés contre d'autres antigènes du parasite apporterait plus d'informations pour éclairer notre hypothèse. Il serait aussi intéressant d'analyser nos données en tenant compte de la gravité de la maladie en plus de l'incidence de la maladie.

Nous n'avons pas testé l'opsonisation des globules rouges infectés, bien que la production des anticorps opsonisants se soit avérée parallèle à la production des anticorps réagissant en surface contre les domaines PfEMP1 formant des rosettes [191, 204].

Nos résultats doivent être interprétés avec précaution vu la taille limitée de l'échantillon d'étude.

8. Conclusion et Recommandations

8.1. Conclusion

Au terme de notre étude, il ressort que les anticorps anti-PfEMP-1/VarO protège contre le paludisme et sont significativement corrélé à l'âge. De tous les polymorphismes étudiés, seul l'HbAS était associé à une réduction significative du nombre des épisodes palustres au cours de notre étude. Nos résultats suggèrent que les anticorps anti-PfEMP-1/VarO ne sont pas responsables de la protection conférée par le trait drépanocytaire.

8.2. Recommandation

A la fin de notre étude et vu nos résultats, nous pouvons formuler les recommandations suivantes

- aux chercheurs, de continuer à investiguer la production des anticorps contre les autres variants de PfEMP-1 afin de faciliter la mise au point un vaccin anti-PfEMP-1/VarO et pour une meilleure compréhension de l'immunité naturelle acquise contre le paludisme.

9. Références bibliographiques

1. Goriely, S., et al., *A defect in nucleosome remodeling prevents IL-12(p35) gene transcription in neonatal dendritic cells*. J Exp Med, 2004. **199**(7): p. 1011-6.
2. Teo, A., et al., *A Robust Phagocytosis Assay to Evaluate the Opsonic Activity of Antibodies against Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes*. Methods Mol Biol, 2015. **1325**: p. 145-52.
3. Opi, D.H., et al., *Mechanistic Studies of the Negative Epistatic Malaria-protective Interaction Between Sickle Cell Trait and alpha-thalassemia*. EBioMedicine, 2014. **1**(1): p. 29-36.
4. Ponsford, M.J., et al., *Sequestration and microvascular congestion are associated with coma in human cerebral malaria*. J Infect Dis. **205**(4): p. 663-71.
5. Carlson, J., et al., *Natural protection against severe Plasmodium falciparum malaria due to impaired rosette formation*. Blood, 1994. **84**(11): p. 3909-14.
6. Rigat-Brugarolas, L.G., et al., *A functional microengineered model of the human splenon-on-a-chip*. Lab Chip. **14**(10): p. 1715-24.
7. Dobano, C., et al., *Age-dependent IgG subclass responses to Plasmodium falciparum EBA-175 are differentially associated with incidence of malaria in Mozambican children*. Clin Vaccine Immunol, 2012. **19**(2): p. 157-66.
8. Barrera, S.M., et al., *[Genotypic survey of Plasmodium falciparum based on the msp1, msp2 and glurp genes by multiplex PCR]*. Biomedica. **30**(4): p. 530-8.
9. Rich, S.M., R.R. Hudson, and F.J. Ayala, *Plasmodium falciparum antigenic diversity: evidence of clonal population structure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(24): p. 13040-5.
10. Gardner, M.J., et al., *Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum*. Nature, 2002. **419**(6906): p. 498-511.
11. Guillotte, M., et al., *Functional analysis of monoclonal antibodies against the Plasmodium falciparum PfEMP1-VarO adhesin*. Malar J, 2016. **15**: p. 28.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Oms, *Rapport sur le paludisme*. <http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/malaria>, 2018.
16. 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.

17. Diakite, S.A.S., *Polymorphismes erythrocytaires et protections contre le paludisme a Plasmodium falciparum : exploration des mecanismes innees*. 2016.
18. Singh, B., et al., *A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings*. Lancet, 2004. **363**(9414): p. 1017-24.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. WHO., *Severe falciparum malaria*. . Trans R Soc Trop Med Hyg, 2000(World Health Organization, Communicable Diseases Cluster.): p. 94 Suppl 1: p. S1-90.
24. Angulo, I. and M. Fresno, *Cytokines in the pathogenesis of and protection against malaria*. Clin Diagn Lab Immunol, 2002. **9**(6): p. 1145-52.
25. Kwiatkowski, D., *Tumour necrosis factor, fever and fatality in falciparum malaria*. Immunol Lett, 1990. **25**(1-3): p. 213-6.
26. 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.
27. 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.
28. OMS, *Severe falciparum malaria*. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster.. . Trop Med, 2000.
29. WHO, *Severe falciparum malaria*. . Trans R Soc Trop Med Hyg, 2000(World Health Organization, Communicable Diseases Cluster.): p. 94 Suppl 1: p. S1-90. 20000.
30. 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.).
31. A, G., *Hémoglobinopathies et paludisme chez l'enfant d'âge scolaire au Mali. Impact de deux schémas de supplementation martiale*. . these Pharm, 1998.
32. Carlson, J. and M. Wahlgren, *Plasmodium falciparum erythrocyte rosetting is mediated by promiscuous lectin-like interactions*. J Exp Med, 1992. **176**(5): p. 1311-7.
33. 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.

34. Rowe, A., et al., *Plasmodium falciparum* rosetting is associated with malaria severity in Kenya. *Infect Immun*, 1995. **63**(6): p. 2323-6.
35. 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.
36. Carlson, J., et al., *Human cerebral malaria: association with erythrocyte rosetting and lack of anti-rosetting antibodies*. *Lancet*, 1990. **336**(8729): p. 1457-60.
37. Udomsanpetch, R., et al., *Rosette formation by Plasmodium vivax*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1995. **89**(6): p. 635-7.
38. Marin-Menendez, A., et al., *Rosetting in Plasmodium vivax: a cytoadhesion phenotype associated with anaemia*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013. **7**(4): p. e2155.
39. Saul, A., *The role of variant surface antigens on malaria-infected red blood cells*. *Parasitol Today*, 1999. **15**(11): p. 455-7.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. Belachew, E.B., *Immune Response and Evasion Mechanisms of Plasmodium falciparum Parasites*. *J Immunol Res*, 2018. **2018**: p. 6529681.
46. 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.
47. 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.
48. Boudova, S., et al., *Mother-Newborn Pairs in Malawi Have Similar Antibody Repertoires to Diverse Malaria Antigens*. *Clin Vaccine Immunol*, 2017. **24**(10).
49. 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.
50. Stevenson, M.M. and E.M. Riley, *Innate immunity to malaria*. *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**(3): p. 169-80.

51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. 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.
55. Feron, P., D. Dechamps, and D. Konopnicki, *[Fatal outcome in a patient coinfectd by malaria and HIV]*. *Rev Med Brux*, 2017. **38**(6): p. 515-519.
56. Larremore, D.B., et al., *Ape parasite origins of human malaria virulence genes*. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 8368.
57. Scherf, A., J.J. Lopez-Rubio, and L. Riviere, *Antigenic variation in Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol*, 2008. **62**: p. 445-70.
58. Oyola, S.O., et al., *Whole genome sequencing of Plasmodium falciparum from dried blood spots using selective whole genome amplification*. *Malar J*, 2016. **15**(1): p. 597.
59. Ribacke, U., et al., *Genome wide gene amplifications and deletions in Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 2007. **155**(1): p. 33-44.
60. 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.
61. 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.
62. Helmbj, H., et al., *Rosetting Plasmodium falciparum-infected erythrocytes express unique strain-specific antigens on their surface*. *Infect Immun*, 1993. **61**(1): p. 284-8.
63. 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.
64. 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.
65. 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.
66. 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.

67. Niang, M., et al., *STEVAR is a Plasmodium falciparum erythrocyte binding protein that mediates merozoite invasion and rosetting*. Cell Host Microbe, 2014. **16**(1): p. 81-93.
68. Sargeant, T.J., et al., *Lineage-specific expansion of proteins exported to erythrocytes in malaria parasites*. Genome Biol, 2006. **7**(2): p. R12.
69. 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.
70. 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.
71. 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.
72. 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.
73. Nunes, M.C., et al., *Plasmodium falciparum FIKK kinase members target distinct components of the erythrocyte membrane*. PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11747.
74. OMS, *Paludisme*. 2017, OMS: geneve.
75. Miller, L.H., et al., *The pathogenic basis of malaria*. Nature, 2002. **415**(6872): p. 673-9.
76. Dondorp, A.M., et al., *Abnormal blood flow and red blood cell deformability in severe malaria*. Parasitol Today, 2000. **16**(6): p. 228-32.
77. 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.
78. 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.
79. 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.
80. 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.
81. 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.
82. 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.
83. 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.

84. 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.
85. Roberts, D.J., et al., *Autoagglutination of malaria-infected red blood cells and malaria severity*. Lancet, 2000. **355**(9213): p. 1427-8.
86. 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.
87. White, N.J., et al., *The murine cerebral malaria phenomenon*. Trends Parasitol, 2010. **26**(1): p. 11-5.
88. Clark, H.C., *The Diagnostic Value of the Placental Blood Film in Aestivo-Autumnal Malaria*. J Exp Med, 1915. **22**(4): p. 427-44.
89. Milner, D.A., Jr., et al., *Severe malaria in children and pregnancy: an update and perspective*. Trends Parasitol, 2008. **24**(12): p. 590-5.
90. Rogerson, S.J., *Malaria in pregnancy and the newborn*. Adv Exp Med Biol, 2010. **659**: p. 139-52.
91. 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.
92. Goel, S., et al., *RIFINs are adhesins implicated in severe Plasmodium falciparum malaria*. Nat Med, 2015. **21**(4): p. 314-7.
93. 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.
94. Cheng, Q., et al., *stevor and rif are Plasmodium falciparum multicopy gene families which potentially encode variant antigens*. Mol Biochem Parasitol, 1998. **97**(1-2): p. 161-76.
95. McRobert, L., et al., *Distinct trafficking and localization of STEVOR proteins in three stages of the Plasmodium falciparum life cycle*. Infect Immun, 2004. **72**(11): p. 6597-602.
96. Winter, G., et al., *SURFIN is a polymorphic antigen expressed on Plasmodium falciparum merozoites and infected erythrocytes*. J Exp Med, 2005. **201**(11): p. 1853-63.
97. Lavazec, C., S. Sanyal, and T.J. Templeton, *Hypervariability within the Rifin, Stevor and Pfmc-2TM superfamilies in Plasmodium falciparum*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(22): p. 6696-707.
98. Gardner, M.J., et al., *Sequence of Plasmodium falciparum chromosomes 2, 10, 11 and 14*. Nature, 2002. **419**(6906): p. 531-4.
99. 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.
100. 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.
101. 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.

102. 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.
103. 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.
104. 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.
105. 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.
106. 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.
107. 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.
108. 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.
109. Cranston, H.A., et al., *Plasmodium falciparum maturation abolishes physiologic red cell deformability*. Science, 1984. **223**(4634): p. 400-3.
110. 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.
111. 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.
112. Janes, J.H., et al., *Investigating the host binding signature on the Plasmodium falciparum PfEMP1 protein family*. PLoS Pathog, 2011. **7**(5): p. e1002032.
113. Esser, C., et al., *Evidence of promiscuous endothelial binding by Plasmodium falciparum-infected erythrocytes*. Cell Microbiol, 2014. **16**(5): p. 701-8.
114. 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.
115. 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.
116. Blum, M., et al., *A structural motif in the variant surface glycoproteins of Trypanosoma brucei*. Nature, 1993. **362**(6421): p. 603-609.

117. 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.
118. 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.
119. Pehrson, C., et al., *Pre-clinical and clinical development of the first placental malaria vaccine*. Expert Rev Vaccines, 2017. **16**(6): p. 613-624.
120. 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.
121. 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.
122. Fried, M., et al., *Maternal antibodies block malaria*. Nature, 1998. **395**(6705): p. 851-2.
123. 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.
124. 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.
125. 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.
126. 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.
127. 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.
128. 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.
129. 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.
130. 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.
131. 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.

132. Tan, J., et al., *A LAIR1 insertion generates broadly reactive antibodies against malaria variant antigens.* Nature, 2016. **529**(7584): p. 105-109.
133. Haldane, J.B., *Suggestions as to quantitative measurement of rates of evolution.* Evolution, 1949. **3**(1): p. 51-6.
134. Flint, J., et al., *High frequencies of alpha-thalassaemia are the result of natural selection by malaria.* Nature, 1986. **321**(6072): p. 744-50.
135. Agarwal, A., et al., *Hemoglobin C associated with protection from severe malaria in the Dogon of Mali, a West African population with a low prevalence of hemoglobin S.* Blood, 2000. **96**(7): p. 2358-63.
136. Modiano, D., et al., *Haemoglobin C protects against clinical Plasmodium falciparum malaria.* Nature, 2001. **414**(6861): p. 305-8.
137. Kwiatkowski, D.P., *How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria.* Am J Hum Genet, 2005. **77**(2): p. 171-92.
138. Williams, T.N., *Red blood cell defects and malaria.* Mol Biochem Parasitol, 2006. **149**(2): p. 121-7.
139. Beet, E.A., *Sickle cell disease in Northern Rhodesia.* East Afr Med J, 1947. **24**(6): p. 212-22.
140. Allison, A.C., *The distribution of the sickle-cell trait in East Africa and elsewhere, and its apparent relationship to the incidence of subtertian malaria.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 1954. **48**(4): p. 312-8.
141. Allison, A.C., *Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection.* Br Med J, 1954. **1**(4857): p. 290-4.
142. May, J., et al., *Hemoglobin variants and disease manifestations in severe falciparum malaria.* JAMA, 2007. **297**(20): p. 2220-6.
143. Williams, T.N., et al., *Negative epistasis between the malaria-protective effects of alpha+-thalassemia and the sickle cell trait.* Nat Genet, 2005. **37**(11): p. 1253-7.
144. Taylor, S.M., C.M. Parobek, and R.M. Fairhurst, *Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis.* Lancet Infect Dis, 2012. **12**(6): p. 457-68.
145. Jallow, M., et al., *Genome-wide and fine-resolution association analysis of malaria in West Africa.* Nat Genet, 2009. **41**(6): p. 657-65.
146. Crompton, P.D., et al., *Sickle cell trait is associated with a delayed onset of malaria: implications for time-to-event analysis in clinical studies of malaria.* J Infect Dis, 2008. **198**(9): p. 1265-75.
147. Lopera-Mesa, T.M., et al., *Effect of red blood cell variants on childhood malaria in Mali: a prospective cohort study.* Lancet Haematol, 2015. **2**(4): p. e140-9.
148. Travassos, M.A., et al., *Hemoglobin C Trait Provides Protection From Clinical Falciparum Malaria in Malian Children.* J Infect Dis, 2015. **212**(11): p. 1778-86.
149. Mockenhaupt, F.P., et al., *Alpha(+)-thalassemia protects African children from severe malaria.* Blood, 2004. **104**(7): p. 2003-6.

150. Allen, S.J., et al., *alpha+-Thalassemia protects children against disease caused by other infections as well as malaria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(26): p. 14736-41.
151. Wambua, S., et al., *The effect of alpha+-thalassaemia on the incidence of malaria and other diseases in children living on the coast of Kenya*. PLoS Med, 2006. **3**(5): p. e158.
152. Mockenhaupt, F.P., et al., *The contribution of alpha+-thalassaemia to anaemia in a Nigerian population exposed to intense malaria transmission*. Trop Med Int Health, 1999. **4**(4): p. 302-7.
153. Veenemans, J., et al., *Alpha+ -thalassemia protects against anemia associated with asymptomatic malaria: evidence from community-based surveys in Tanzania and Kenya*. J Infect Dis, 2008. **198**(3): p. 401-8.
154. Aguilar, R., et al., *Assessment of the Combined Effect of Epstein-Barr Virus and Plasmodium falciparum Infections on Endemic Burkitt Lymphoma Using a Multiplex Serological Approach*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1284.
155. Mackinnon, M.J., et al., *Heritability of malaria in Africa*. PLoS Med, 2005. **2**(12): p. e340.
156. Ishii, K.J. and S. Akira, *Potential link between the immune system and metabolism of nucleic acids*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(5): p. 524-9.
157. Kun, J.F., et al., *Merozoite surface antigen 1 and 2 genotypes and rosetting of Plasmodium falciparum in severe and mild malaria in Lambarene, Gabon*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1998. **92**(1): p. 110-4.
158. Heddini, A., et al., *Fresh isolates from children with severe Plasmodium falciparum malaria bind to multiple receptors*. Infect Immun, 2001. **69**(9): p. 5849-56.
159. 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.
160. Blomqvist, K., et al., *A sequence in subdomain 2 of DBL1alpha of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 induces strain transcending antibodies*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e52679.
161. Nash, G.B., et al., *Rheological properties of rosettes formed by red blood cells parasitized by Plasmodium falciparum*. Br J Haematol, 1992. **82**(4): p. 757-63.
162. Dondorp, A.M., et al., *Direct in vivo assessment of microcirculatory dysfunction in severe falciparum malaria*. J Infect Dis, 2008. **197**(1): p. 79-84.
163. Smith, A., et al., *New classification of acute papilledema in children with severe malaria*. J Pediatr Neurol, 2009. **7**(4): p. 381-388.
164. Carlson, J., et al., *Disruption of Plasmodium falciparum erythrocyte rosettes by standard heparin and heparin devoid of anticoagulant activity*. Am J Trop Med Hyg, 1992. **46**(5): p. 595-602.
165. Barragan, A., et al., *Blood group A antigen is a coreceptor in Plasmodium falciparum rosetting*. Infect Immun, 2000. **68**(5): p. 2971-5.

166. Vigan-Womas, I., et al., *Structural basis for the ABO blood-group dependence of Plasmodium falciparum rosetting*. PLoS Pathog, 2012. **8**(7): p. e1002781.
167. Rowe, J.A., et al., *Mapping of the region of complement receptor (CR) 1 required for Plasmodium falciparum rosetting and demonstration of the importance of CR1 in rosetting in field isolates*. J Immunol, 2000. **165**(11): p. 6341-6.
168. Baruch, D.I., B. Gamain, and L.H. Miller, *DNA immunization with the cysteine-rich interdomain region 1 of the Plasmodium falciparum variant antigen elicits limited cross-reactive antibody responses*. Infect Immun, 2003. **71**(8): p. 4536-43.
169. 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.
170. Mercereau-Puijalon, O., M. Guillotte, and I. Vigan-Womas, *Rosetting in Plasmodium falciparum: a cytoadherence phenotype with multiple actors*. Transfus Clin Biol, 2008. **15**(1-2): p. 62-71.
171. Albrecht, L., et al., *var gene transcription and PfEMP1 expression in the rosetting and cytoadhesive Plasmodium falciparum clone FCR3S1.2*. Malar J, 2011. **10**: p. 17.
172. Kraemer, S.M. and J.D. Smith, *A family affair: var genes, PfEMP1 binding, and malaria disease*. Curr Opin Microbiol, 2006. **9**(4): p. 374-80.
173. Vogt, A.M., et al., *Heparan sulfate on endothelial cells mediates the binding of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes via the DBL1alpha domain of PfEMP1*. Blood, 2003. **101**(6): p. 2405-11.
174. Bull, P.C., et al., *Plasmodium falciparum antigenic variation: relationships between in vivo selection, acquired antibody response, and disease severity*. J Infect Dis, 2005. **192**(6): p. 1119-26.
175. 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.
176. Kaestli, M., et al., *Virulence of malaria is associated with differential expression of Plasmodium falciparum var gene subgroups in a case-control study*. J Infect Dis, 2006. **193**(11): p. 1567-74.
177. Warimwe, G.M., et al., *Plasmodium falciparum var gene expression is modified by host immunity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(51): p. 21801-6.
178. Newbold, C.I., et al., *Plasmodium falciparum: the human agglutinating antibody response to the infected red cell surface is predominantly variant specific*. Exp Parasitol, 1992. **75**(3): p. 281-92.
179. Doodoo, D., et al., *Antibodies to variant antigens on the surfaces of infected erythrocytes are associated with protection from malaria in Ghanaian children*. Infect Immun, 2001. **69**(6): p. 3713-8.
180. Chattopadhyay, R., et al., *Plasmodium falciparum infection elicits both variant-specific and cross-reactive antibodies against variant surface antigens*. Infect Immun, 2003. **71**(2): p. 597-604.

181. Joergensen, L., et al., *Limited cross-reactivity among domains of the Plasmodium falciparum clone 3D7 erythrocyte membrane protein 1 family*. Infect Immun, 2006. **74**(12): p. 6778-84.
182. Magistrado, P.A., et al., *Immunoglobulin G antibody reactivity to a group A Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 and protection from P. falciparum malaria*. Infect Immun, 2007. **75**(5): p. 2415-20.
183. Treutiger, C.J., et al., *Rosette formation in Plasmodium falciparum isolates and anti-rosette activity of sera from Gambians with cerebral or uncomplicated malaria*. Am J Trop Med Hyg, 1992. **46**(5): p. 503-10.
184. Ghumra, A., et al., *Induction of strain-transcending antibodies against Group A PfEMP1 surface antigens from virulent malaria parasites*. PLoS Pathog, 2012. **8**(4): p. e1002665.
185. Migot-Nabias, F., et al., *Combined effects of Gm or Km immunoglobulin allotypes and age on antibody responses to Plasmodium falciparum VarO rosetting variant in Benin*. Microbes Infect, 2011. **13**(8-9): p. 771-5.
186. Vigan-Womas, I., et al., *Allelic diversity of the Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 entails variant-specific red cell surface epitopes*. PLoS One, 2011. **6**(1): p. e16544.
187. Fry, A.E., et al., *Common variation in the ABO glycosyltransferase is associated with susceptibility to severe Plasmodium falciparum malaria*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(4): p. 567-76.
188. Degarege, A., et al., *Effect of the ABO blood group on susceptibility to severe malaria: A systematic review and meta-analysis*. Blood Rev, 2018.
189. Arend, P., *Position of human blood group O(H) and phenotype-determining enzymes in growth and infectious disease*. Ann N Y Acad Sci, 2018.
190. 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. **9**: p. 267.
191. Guillotte, M., et al., *Immunogenicity of the Plasmodium falciparum PfEMP1-VarO Adhesin: Induction of Surface-Reactive and Rosette-Disrupting Antibodies to VarO Infected Erythrocytes*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0134292.
192. Hebbel, R.P., *Sickle hemoglobin instability: a mechanism for malarial protection*. Redox Rep, 2003. **8**(5): p. 238-40.
193. Tokumasu, F., et al., *Altered membrane structure and surface potential in homozygous hemoglobin C erythrocytes*. PLoS One, 2009. **4**(6): p. e5828.
194. Yuan, J., et al., *The instability of the membrane skeleton in thalassemic red blood cells*. Blood, 1995. **86**(10): p. 3945-50.
195. Hansen, D.S. and L. Schofield, *Natural regulatory T cells in malaria: host or parasite allies?* PLoS Pathog, 2010. **6**(4): p. e1000771.

196. Williams, T.N., et al., *An immune basis for malaria protection by the sickle cell trait*. PLoS Med, 2005. **2**(5): p. e128.
197. Pegha-Moukandja, I., et al., *High Level of Specific Anti-Plasmodium Falciparum Merozoite IgG1 Antibodies in Rural Asymptomatic Individuals of Dienga, South-Eastern Gabon*. Eur J Microbiol Immunol (Bp), 2017. **7**(4): p. 247-260.
198. Archer, N.M., et al., *Resistance to Plasmodium falciparum in sickle cell trait erythrocytes is driven by oxygen-dependent growth inhibition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(28): p. 7350-7355.
199. Ibrahim, S., *Impact des polymorphismes du globule rouge et de l'hémoglobine sur la réponse humorale aux antigènes candidats vaccins de plasmodium falciparum chez les enfants maliens* 2011.
200. Verra, F., et al., *Haemoglobin C and S role in acquired immunity against Plasmodium falciparum malaria*. PLoS One, 2007. **2**(10): p. e978.
201. Goheen, M.M., et al., *Anemia Offers Stronger Protection Than Sickle Cell Trait Against the Erythrocytic Stage of Falciparum Malaria and This Protection Is Reversed by Iron Supplementation*. EBioMedicine, 2016. **14**: p. 123-130.
202. Elguero, E., et al., *Malaria continues to select for sickle cell trait in Central Africa*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(22): p. 7051-4.
203. Lawaly, Y.R., et al., *Heritability of the human infectious reservoir of malaria parasites*. PLoS One, 2010. **5**(6): p. e11358.
204. 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. Annexes

10.1. Détermination du type d'Hémoglobine avec le D-10

.Les échantillons sont stables à température ambiante pendant 1 jour. Aucune préparation particulière des échantillons n'est nécessaire. Il n'est pas nécessaire d'agiter les tubes avant le chargement. Les tubes d'échantillons sont placés dans le portoir à échantillons du D-10 puis mis dans le système D-10.

S'assurer que les codes-barres sur les échantillons sont tournés vers l'arrière

10.1.1. Principe de la procédure du D-10

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

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

10.1.2. Prélèvement et manipulation des échantillons

10.1.3. Type d'échantillon

On utilise le sang total.

10.1.4. Précautions relatives au prélèvement des échantillons

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

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

10.1.5. Conservation des échantillons

Les échantillons de sang total peuvent être conservés jusqu'à 4 jours entre 2 et 8 °C, et à -40°C si l'échantillon ne peut être traité avant une semaine.

10.1.6. Préparation des échantillons

Porter les tubes d'échantillons à température ambiante (entre 15 et 30 °C) avant l'essai de l'appareil. Utiliser des adaptateurs spéciaux pour les tubes de 12, 13 et 14 mm de diamètre. Retirer tous les adaptateurs pour les tubes de 16 mm de diamètre. Les tubes dont la hauteur est comprise entre 75 mm et 100 mm peuvent être utilisés. Si l'échantillon se trouve dans un tube de taille ou de type anormal ou si le tube contient moins de 2,0 ml d'échantillon, une pré dilution est nécessaire. Pour pré diluer, pipeter 1,5 mL de solution de lavage/dilution dans un micro tube de 1,5 mL étiqueté puis ajouter 5 µL de l'échantillon de sang total. Boucher le tube et bien mélanger. Utiliser un adaptateur pour les micro tubes de 1,5 mL.

10.2. Procédures standard opératoires (SOP) de la goutte épaisse

10.2.1. Procédure

C'est une technique de concentration permettant un repérage rapide des parasites dans le sang et l'identification des différentes espèces (frottis sanguin).

10.2.2. Matériel

- Deux (2) lames porte-objet propres et bien dégraissées
- Vaccinostyle stérile
- Alcool 70°

- Colorant de Giemsa pur
- Coton hydrophile sec
- Eau tamponnée, PH=7,2
- Boîte à lames ou couvercle pour protéger les frottis pendant le séchage
- Chiffon de coton propre et ne peluchant pas
- Crayon noir à mine grasse ou marqueur indélébile
- Stylo à bille
- Bacs de coloration
- Epruvette graduée
- Râtelier, chronomètre
- Huile d'immersion
- Registre ou formulaire de notification
- Un compteur manuel
- Gant

10.2.3. Lieu de prélèvement

A l'extrémité d'un doigt gauche (en général 3^e doigt après le pouce), sur la face latérale du doigt sain.

Au lobe de l'oreille, après l'avoir réchauffé entre les doigts.

Au talon ou gros orteil chez le nourrisson, après l'avoir réchauffé.

10.2.4. Technique de la goutte épaisse

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).

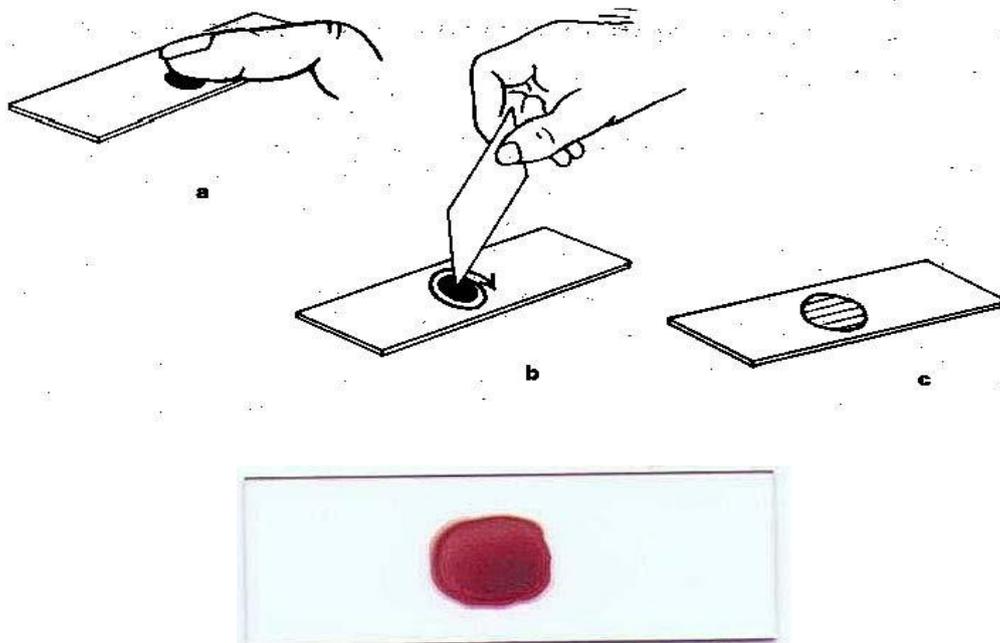


Figure 13. Technique de la goutte épaisse

10.2.5. 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.

10.2.6. 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 pâle. 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.

10.2.7. 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 7 500 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 :

$$\frac{\text{Nombre de parasite X 7500}}{\text{Nombre de leucocytes}} = \text{Nombre de parasite par } \mu\text{l}$$

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.

10.3. 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 grasses. Plus la lamelle utilisée pour faire le frottis est mince, plus fin le frottis sera.

10.3.1. Matériel

- 2 lames porte-objet dégraissées
- Vaccinostyle stérile
- Alcool 70°

- Colorant de Giemsa pur
- Coton hydrophile sec
- Eau tamponnée, pH= 7,2
- Méthanol absolu

10.3.2. 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.

10.3.3. 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.

10.3.4. Coloration avec l'Hémacolor®

- 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

10.3.5. 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.

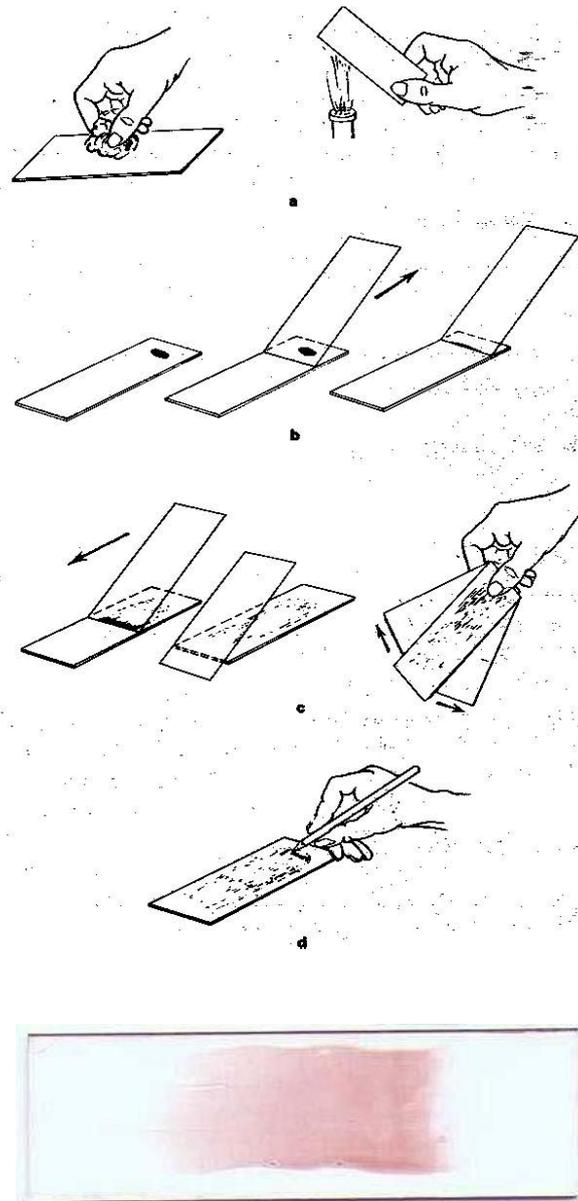


Figure 14 :Technique du frottis mince

10.4. Détermination du Taux d'hémoglobine

Le taux d'hémoglobine a été mesuré par l'appareil HemoCue Hb201+ microcuvette



Figure 15 : Analyseur et Microcuvette HemoCue

Source : Photo prise à Kéniéroba

10.4.1. Principe de la méthode

La réaction dans la micro cuvette repose sur une réaction modifiée de formation d'azoture deméthémoglobine. Les érythrocytes sont hémolysés pour libérer l'hémoglobine.

L'hémoglobine est convertie en méthémoglobine, laquelle réagit avec de l'azoture pour donner de l'azoture deméthémoglobine dont l'absorbance est mesurée dans l'analyseur. Cette absorbance est directement proportionnelle à la concentration de l'Hb.

10.4.2. Matériel et réactifs

- Appareil analyseur
- Microcuvette HemoCue
- Lancette
- Alcool 70°
- Coton

10.4.3. Technique

- Cibler un doigt, bien désinfecté avec le tampon d'alcool à 70°;
- Piquer en un coup sec avec une lancette ; nettoyer la première goutte de sang, presser le bout du doigt pour avoir une deuxième goutte ;
- Appliquer la microcuvette sur la goutte de sang. La quantité nécessaire est aspirée automatiquement dans la microcuvette par capillarité.

- Après avoir enlevé minutieusement toute trace de sang présente à la surface de la microcuvette, la mettre sur son support et l'insérer ensuite dans le photomètre
Le résultat s'affiche automatiquement en 45-60 secondes.



Figure 16: Mécanisme de mesure du taux d'Hb par l'appareil HemoCue 201+
Le résultat est exprimé en gramme d'hémoglobine par décilitre de sang (g/dl)
Source : www.hemocue.com

10.5. Détermination du groupe sanguin ABO

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

10.5.1. Principe

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

10.5.2. Matériel et réactifs

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

10.5.3. Mode opératoire

- Marquer à l'aide de crayon de papier le numéro d'identification du sujet sur trois lames porte objet en les marquant A, B et D
- Cibler un doigt
- Nettoyer le doigt avec un tampon d'alcool à 70°
- Piquer en un coup sec le bout du doigt par une lancette et nettoyer la première goutte de sang avec le coton sec;

- Presser le bout du doigt pour avoir d'autres gouttes et déposer une goutte (de 10µl) de sang sur chacune des trois lames porte objets.
- Ajouter :
 - une goutte (10µl) du sérum anti-A sur la goutte de la lame A
 - une goutte (10µl) du sérum anti-B sur la goutte de la lame B
 - une goutte (10µl) du sérum anti-D sur la goutte de la lame D ;
- Triturer les trois gouttes avec trois cure-dents différents.

10.5.4. Résultat

Observer l'agglutination avec les sérums tests :

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

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

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

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

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

10.6.1. Matériel et réactifs:

• Matériel

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

• Réactifs

- Le Tris-HCl, pH 8.5
- KCl
- Betaine (Sigma)
- dNTP (ATP, GTP, TTP, CTP)
- Taq polymerase
- Les Amorces:
 - α2/3.7F = 5'-CCCCTCGCCA AGTCCACC C-3'
 - α2R= 5'-AGACCAGGAAGGGCCGGTG-3'

- 3.7/20.5R= 5'- AAAGCACTCTAGGGTCCAG CG-3'
- A3.7F= 5'-CTTTCCCTACCCAGAGCCAGGTT -3'
- 3.7R1= 5'-CCACTTTCCCTCCTCCATCCC-3'
- α2R1= 5'-AGGAG GGCCCGTTGGGAGGC-3'

10.6.2. Procédure

10.6.2.1. Première amplification :

Il s'agit d'une PCR multiplex visant à amplifier en même temps dans la même réaction, le fragment d'ADN portant la délétion 3.7 et le fragment d'ADN normal sans délétion. Ces deux fragments ont en commun une amorce (α2/3.7F) la seconde amorce étant spécifique pour chaque fragment (α2R pour le fragment normal et 3.7/20.5R pour le fragment délétère). Il consiste à amplifier approximativement 5ng d'ADN (2.5 µl d'ADN extrait avec le Qiagen) dans un volume réactionnel de 25 µl dont la composition est la suivante:

- 20 mmol/L de Tris-HCl pH 8.5
- 50 mmol/L KCl
- 1.5 mmol/L MgCl₂
- 1 mol/L de Betaine
- 0.3µmol/l de chaque amorce (α2/3.7F, α2R et 3.7/20.5R)
- 0.2mmol/L de chaque dNTP
- 1.25 unité de platinum Taq polymerase (Invitrogen)

10.6.2.2. Deuxième amplification

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

Dans le tube de PCR N°1, les amorces spécifique pour le fragment normal (A3.7F et α2R1) sont utilisé alors que dans le tube de PCR N°2 sont introduites les amorces spécifiques pour les gènes délétères (A3.7F et 3.7R1).

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

Le programme utilisé pour l'amplification est le suivant :

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

- Dénaturation initiale : 95°C pendant 5 minutes

Suivit de 35 cycle de :

- Dénaturation : 97°C pendant 45 secondes
- Renaturation : 60°C pendant 1 minute et 15 secondes
- Extension : 72°C pendant 2 minutes et 30 secondes

Une extension Final à 72°C pendant 5 minutes

10.6.3. Migration du produit de PCR.

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

10.6.4. Interprétation

Présence d'une bande de 2 kb dans le tube N° 1 signifie que le sujet possède le gène Normal. Présence d'une bande de 1.8 kb dans le tube N° 2 signifie que le sujet possède le gène délétère. Trois scénarios sont possibles :

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

10.7 Protocole d'ELISA VarO

10.7.1 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

10.7.2 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 incubé pendant une nuit à 4 ° C.

-Après le revêtement, retirer le surnageant.

Blocage :

-Mettre dans chaque puits revêtu 200µl de lait écrémé à 5% (Regilait) et incubé 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-Tween-Milk (PBS 1X + 0,05% de Tween 20 + 2,5% de lait),

Mettre 100 ul de la dilution dans le puits bloqué et incubé 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

11. FICHE SIGNALÉTIQUE

Nom et Prénom: Doumbia Alkali

Nationalité: Malienne

Année et ville de soutenance: 11/08/2018 à Bamako

Titre: Influence des polymorphismes de globule rouge sur la réponse humorale anti-PfEMP-1/VarO chez une cohorte d'enfants résidents de Kéniéroba

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

Secteur d'intérêt: Parasitologie, Santé publique, Hématologie

Résumé

Le rôle de l'immunité acquise dans la protection des sujets porteurs de polymorphismes érythrocytaires contre le paludisme a été suggéré. Cependant aucune évidence de ce rôle n'a été rapportée. L'effet de protection des anticorps dirigés contre le Variant VarO de PfEMP-1 a été décrit. Nous avons exploré l'acquisition des anticorps anti PfEMP-1/VarO chez les sujets porteurs de polymorphismes de GR et leur impact sur la l'incidence palustre chez une cohorte d'enfant vivant en zone d'endémie palustre au Mali. 230 enfants âgés de 4 à 15 ans chez qui les polymorphismes de GR ont été recherchés, ont été enrôlés dans la cohorte. Des plasmas ont été collectés au début et à la fin de la saison de transmission et les épisodes de paludisme ont été enregistrés au cours de la saison de transmission. Les taux d'anticorps anti PfEMP-1/VarO ont été mesurés dans les plasmas par ELISA.

Globalement, Les taux d'anticorps anti PfEMP-1/varO augmentaient significativement avec l'âge ($P= 10^{-3}$). Des taux d'anticorps anti PfEMP-1/VarO élevés en amont de la saison de transmission étaient significativement associés à un nombre réduit d'épisode de paludisme au cours de la saison de transmission. De tous les polymorphismes de GR recherchés seul l'HbAS était associée à une réduction significative du nombre d'épisode de paludisme au cours de la saison de transmission chez les jeunes enfants $P=0,004$. Les polymorphismes de GR n'avaient pas d'impact sur le niveau d'anticorps anti-PfEMP-1/VarO. Nos résultats

suggèrent que les anticorps anti PfEMP-1/VarO ne sont pas responsables de la protection conférée par l'HbAS contre le paludisme chez les sujets jeunes.

Mots Clés : Paludisme ; Polymorphisme de globule rouge ; anticorps ; PfEMP-1/VarO

Summary

The acquired immunity has been cited to play an important role in the protection afforded by the RBC polymorphisms against malaria. However no evidence of this role has not been reported yet. Elsewhere related the protective effect of the antibodies directed against the VarO variant of PfEMP-1 has been reported. We have explored the impact of RBC polymorphisms carriage on the acquisition of the anti-PfEMP-1/VarO antibodies and their relationship with malaria incidence in a cohort of young subjects living in an endemic area in Mali. In total, 230 subject aged from 4 to 13 years hold have been enrolled and screened for RBC polymorphisms. Plasma samples were collected at the beginning and the end of the transmission season. All malaria cases were recorded in the cohort. The anti-PfEMP-1/VarO antibody level was measured by ELISA.

We observed that the anti-PfEMP-1/VarO antibody level increased with the age ($p= 10^{-3}$). And was associated with a decrease of malaria incidence. Of all the RBC polymorphisms studied, only HbAS was associated with significant decrease of malaria incidence. $p=0.004$. No association was found between RBC polymorphisms and anti-PfEMP-1/VarO antibody level. Ours result suggest that acquired immunity to malaria does not account for the protection afforded by HbAS against malaria in young children.

Key words: Malaria; Red blood cell Polymorphisms; antibody; PfEMP-1/VarO

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!