

Ministère de l'Education Nationale

République du Mali

Un Peuple-Un But-Une Foi

**Université des Sciences, des Techniques et des Technologie de
Bamako
Faculté de Pharmacie**



**Réponse immunitaire acquise naturellement contre la
protéine 12 de l'extrémité de Rhoptrie de *Plasmodium
falciparum***

Thèse présentée et soutenue publiquement le **16/05/2019** devant
la Faculté de Pharmacie

Par Mlle **FATOUMATA KASSE**

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

JURY

Président : Pr Souleymane DIALLO

Membres : Dr Yacouba CISSOKO

: Dr Saidou BALAM

Co-directeur: Dr Drissa S. KONATE

Directeur: Pr Mahamadou DIAKITE

**LISTE DES MEMBRES DE L'ADMINISTRATION ET DU CORPS ENSEIGNANT A LA
FACULTÉ DE PHARMACIE ANNEE UNIVERSITAIRE 2017-2018**

ADMINISTRATION

DOYEN : M. Boubacar TRAORE, Professeur

VICE-DOYEN : M. Ababacar MAIGA, Professeur

SECRÉTAIRE PRINCIPAL : M. Seydou COULIBALY, Administrateur Civil

AGENT COMPTABLE : M. Famalé DIONSAN, Contrôleur des Finances.

PROFESSEURS HONORAIRES

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologue
2	Mahamadou	CISSE	Biologie
3	Daouda	DIALLO	Chimie Générale et Minérale
4	Souleymane	DIALLO	Bactériologie - Virologie
5	Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
6	Ousmane	DOUMBIA	Chimie Thérapeutique
7	Boukassoum	HAÏDARA	Législation
8	Gaoussou	KANOUTE	Chimie analytique
9	Alou A.	KEÏTA	Galénique
10	Mamadou	KONE	Physiologie
11	Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
12	Brehima	KOUMARE	Bactériologie/Virologie
13	Abdourahamane S.	MAÏGA	Parasitologie
14	Elimane	MARIKO	Pharmacologie

DER: SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES

1. PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mounirou	BABY	Hématologie
2	Bakary Mamadou	CISSE	Biochimie
3	Abdoulaye	DABO	Biologie/Parasitologie
4	Mahamadou	DIAKITE	Immunologie-Génétique
5	Alassane	DICKO	Santé Publique
6	Amagana	DOLO	Parasitologie - Mycologie
7	Akory Ag	IKNANE	Santé Publique / Nutrition

8	Ousmane	KOITA	Biologie-Moléculaire
9	Boubacar	TRAORE	Parasitologie-Mycologie

2. MAITRES DE CONFÉRENCES/MAITRES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Flabou	BOUGOUDOGO	Bactériologie - Virologie
2	Abdoulaye	DJIMDE	Parasitologie-Mycologie
3	Aldjouma	GUINDO	Hématologie
4	Kassoum	KAYENTAO	Santé/Bio-statistique
5	Bourèma	KOURIBA	Immunologie Chef de DER
6	Issaka	SAGARA	Bio-statistique
7	Mahamadou Soumana	SISSOKO	Bio-statistique
8	Ousmane	TOURE	Santé Publique/Santé environnement

3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mohamed	AG BARAIKA	Bactériologie-virologie
2	Charles	ARAMA	Immunologie
3	Boubacar Tiétiè	BISSAN	Biologie clinique
4	Djibril Mamadou	COULIBALY	Biochimie clinique
5	Seydou Sassou	COULIBALY	Biochimie clinique
6	Antoine	DARA	Biologie-Moléculaire
7	Souleymane	DAMA	Parasitologie-Mycologie
8	Djénéba Koumba	DABITAO	Biologie Moléculaire
9	Laurent	DEMBELE	Biotechnologie Microbienne
10	Klétigui Casimir	DEMBELE	Biochimie clinique
11	Seydina S.A.	DIAKITE	Immunologie
12	Yaya	GOÏTA	Biochimie clinique
13	Ibrahima	GUINDO	Bactériologie-virologie
14	Aminatou	KONE	Biologie Moléculaire
15	Birama Apho	LY	Santé publique
16	Dinkorma	OUOLOGUEM	Biologie cellulaire
17	Samba Adama	SANGARE	Bactériologie
18	Fanta	SANGHO	Santé Publique/Santé communautaire

4. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Djénéba	COULIBALY	Nutrition/Diététique
2	Issa	DIARRA	Immunologie
3	Fatou	DIAWARA	Epidémiologie
4	Merepen dit Agnès	GUINDO	Immunologie
5	Oumar	GUINDO	Epidémiologie
6	Falaye	KEÏTA	Santé publique/Santé Environnement
7	N'Deye Lallah Nina	KOITE	Nutrition
8	Yacouba	MAÏGA	Bio-statistique
9	Amadou Birama	NIANGALY	Parasitologie-Mycologie
10	Oumar	SANGHO	Epidémiologie
11	Djakaridia	TRAORE	Hématologie

DER: SCIENCES PHARMACEUTIQUES

1. PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
2	Saïbou	MAÏGA	Législation
3	Rokia	SANOGO	Pharmacognosie Chef de DER

2. MAITRES DE CONFÉRENCES/MAITRES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
-	Néant	-	-

3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE

N°	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	Mahamane	HAÏDARA	Pharmacognosie
7	Hamma Boubacar	MAÏGA	Galénique
8	Moussa	SANOGO	Gestion
9	Adiaratou	TOGOLA	Pharmacognosie

4. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Seydou Lahaye	COULIBALY	Gestion pharmaceutique
2	Daouda Lassine	DEMBELE	Pharmacognosie
3	Adama	DENOU	Pharmacognosie
4	Sékou	DOUMBIA	Pharmacognosie
5	Assitan	KALOGA	Législation
6	Ahmed	MAÏGA	Législation
7	Aïchata Ben Adam	MARIKO	Galénique
8	Aboubacar	SANGHO	Législation
9	Bourama	TRAORE	Législation
10	Karim	TRAORE	Sciences pharmaceutiques
11	Sylvestre	TRAORE	Gestion pharmaceutique
12	Aminata Tiéba	TRAORE	Pharmacie hospitalière
13	Mohamed Sarmoye dit	TRAORE	Pharmacie hospitalière

DER: SCIENCES DU MÉDICAMENT

1. PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Benoît Yaranga	KOUMARE	Chimie Analytique
2	Ababacar I.	MAÏGA	Toxicologie

2. MAITRES DE CONFERENCES/MAITRES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Sékou	BAH	Pharmacologie Chef de DER

3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Dominique Patomo	ARAMA	Pharmacie chimique
2	Mody	CISSE	Chimie thérapeutique
3	Ousmane	DEMBELE	Chimie thérapeutique
4	Tidiane	DIALLO	Toxicologie
5	Hamadoun Abba	TOURE	Bromatologie

4. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
----	---------	-----	------------

1	Mahamadou	BALLO	Pharmacologie
2	Dalaye Bernadette	COULIBALY	Chimie Analytique
3	Blaise	DACKOOU	Chimie Analytique
4	Fatoumata	DAOU	Pharmacologie
5	Abdourahamane	DIARA	Toxicologie
6	Aiguerou dit Abdoulaye	GUINDO	Pharmacologie
7	Madani	MARIKO	Chimie Analytique
8	Mohamed El Béchir	NACO	Chimie Analytique
9	Mahamadou	TANDIA	Chimie Analytique
10	Dougoutigui	TANGARA	Chimie Analytique

DER: SCIENCES FONDAMENTALES

1. PROFESSEURS/DIRECTEURS DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mouctar	DIALLO	Biologie/ Chef de DER
2	Sekou F.	TRAORE	Biologie/ Entomologie
3	Mahamadou	TRAORE	Génétique

2. MAITRES DE CONFÉRENCES/MAITRES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Lassana	DOUMBIA	Chimie Appliquée

3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Abdoulaye	KANTE	Anatomie
2	Boureima	KELLY	Physiologie médicale

4. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Seydou Simbo	DIAKITE	Chimie organique
2	Modibo	DIALLO	Génétique
3	Moussa	KONE	Chimie Organique
4	Mamadou Lamine	DIARRA	Botanique-Biologie végétale
5	Massiriba	KONE	Biologie Entomologie

CHARGES DE COURS (VACATAIRES)

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Cheick Oumar	BAGAYOKO	Informatique
2	Babou	BAH	Anatomie
3	Adourahamane	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	MAÏGA	Chimie organique
13	Massambou	SACKO	SCMP/SIM
14	Modibo	SANGARE	Anglais
15	Sidi Boula	SISSOKO	Histologie-embryologie
16	Mme Fatoumata	SOKONA	Hygiène du milieu
17	Fana	TANGARA	Maths
18	Abdel Kader	TRAORE	Pathologies médicales
19	Djénébou	TRAORE	Sémiologie et Pathologie médicale
20	Boubacar	ZIBEÏROU	Physique

Louanges à **ALLAH**, le **Tout Puissant**, le **Clément**, le **Tout Miséricordieux** de m'avoir donné la santé, le courage et la chance de réaliser ce travail. Qu'**ALLAH** guide mes pas vers le droit chemin. AMEN !

Dédicaces

A mon père, Boubacar Kassé

Père, tu es le plus gentil et le plus bienveillant, toute ma vie tu as été une source d'inspiration pour moi par ta rigueur, ta persévérance et ton courage dans le travail. Tout le mérite revient à toi de m'avoir conseillé de faire des études de pharmacie. Tu as investi en moi physiquement et financière pour que je sois là aujourd'hui. Papa, les mots me manquent pour te remercier. Que Dieu te donne longue vie.

A ma mère, feu Aissata Koné

Maman, j'aurai tellement voulu que tu sois près de moi pour voir le fruit de tous les efforts que tu as fournis pour moi. Maman, je ne te remercierai jamais assez. Tu m'as appris tant de choses dans la vie sauf de vivre sans toi. Maman tu me manques beaucoup je t'aime. Repose en paix. Amen !

Remerciements

A mes sœurs, AMINA et INA Kassé, d'avoir pris soin de moi et de me chérir avec autant d'amour, je vous aime beaucoup.

A mes frères Oumar Kassé, Soumaila Kassé, Amadou Kassé, Ibrahim Kassé, Sory Kassé, pour l'encouragement et le soutien apporté.

A Sidy Karim Sanogo, d'avoir supporté toutes mes caprices durant toutes ces années, le soutien moral dont j'ai bénéficié de ta part a été d'un appui inestimable pour ce travail. Que Dieu renforce nos liens

Au Pr Mahamadou Diakité, de m'avoir accueilli à bras ouverts dans votre unité et en me confiant ce travail malgré mes faibles connaissances sur le sujet. Merci cher Professeur pour votre humilité et votre encouragement, que Dieu vous protège et vous donne longue vie.

Au docteur Drissa Konate, pour votre soutien, votre disponibilité, votre sympathie votre générosité merci pour tout.

A mes tantes Ramata et Mamou Koné, pour vos soutiens, que Dieu vous donne longue vie.

A la famille Sanogo, de m'avoir toujours accueilli à bras ouverts et de me montrer que je fais partie de la famille. Merci pour l'hospitalité.

A mes amies, Lalla Mariam Cissé, Kafoune Sanogo, Oumy Bengaly, Koudedia Camara, Mariam Traoré, Rabia Mahamane, d'avoir été présente pour moi pendant les moments difficiles qu'Allah nous lie davantage.

A toute l'équipe de l'Unité Immunogénétique et Hémoglobinopathie du MRTC : Dr Seidina Diakité, Dr Sory I. Diawara, Dr Drissa Konaté, Dr Karim Traoré, Dr Ibrahim Sanogo, Dr Mory Doumbouya, Dr Bourama Keita, Dr Fousseyni Doucouré, Dr Oumou Coulibaly, Dr Alkali Doumbia, Dr Assietou Maiga, Mrs. Nouhoum Koné, Sidy Diallo, Souleymane Maiga, Aboubacar Fomba, et Aminata Pléa. Sans vous, cette thèse ne serait pas ce qu'elle est car vous avez tous participé à sa réalisation de par vos conseils et vos

encouragements. Merci pour votre gentillesse et votre disponibilité. Recevez ici mes sincères salutations ainsi que ma reconnaissance.

Au Dr Mahamoudou Touré, Mr Hamady Coulibaly, pour votre soutien

A tout le personnel du MRTC

A tous mes camarades de la 10^e promotion du numerus clausus

A tous les membres du groupe les fiscales

A tous les enseignants et étudiants des Facultés de Pharmacie, de Médecine et d'Odontostomatologie de Bamako

Hommage aux membres du jury

A notre Maître et Président du Jury : Pr Souleymane Diallo

- Pharmacien Biologiste
- Professeur de bactériologie-virologie à la Faculté de Pharmacie
- Colonel Major des services de santé des armées
- Ex-Directeur Général du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux (CICM) de Bamako.

La spontanéité avec laquelle vous avez accepté de présider ce jury malgré vos multiples occupations, prouve votre amour pour la science et votre cordialité.

Votre rigueur scientifique, votre sens du travail bien fait font de vous un maître admiré et respecté.

Quel honneur pour nous de vous avoir comme Président de notre Jury. Que Dieu vous comble de grâces.

A notre Maître et Juge : Dr Yacouba Cissoko

- Docteur en Médecine
- Master en Immunologie
- Spécialiste en infectiologie
- Maître-assistant en infectiologie

Cher maître,

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail.

Votre désir profond de valoriser la profession fait de vous un homme respectable.

Trouvez ici, cher maître, l'expression de notre profonde reconnaissance.

A notre Maître et Juge : Dr Saïdou Balam

- Docteur en Médecine
- PhD en Immunologie
- Maître assistant en Immunologie à la FMOS/FAPH
- Chercheur associé à l'hôpital Universitaire de Rengensburg en Allemagne

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

Votre courtoisie et votre disponibilité font de vous une personnalité exceptionnelle.
Trouvez ici notre sincère admiration et notre profonde gratitude.

A notre Maître et Co-directeur : Dr Drissa Konaté

- Docteur en médecine
- Master en épidémiologie
- Chercheur au MRTC/FMOS/FAPH

Cher maître,

Tout au long de ce travail, nous avons apprécié vos qualités humaines et scientifiques.
Votre disponibilité constante et votre amour pour le travail bien fait font de vous un maître respectable.

Permettez-nous cher maître de vous adresser l'expression de notre immense gratitude et de notre sincère remerciement.

A notre Maître et Directeur de Thèse : Pr Mahamadou DIAKITE

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

Cher maître,

Vous nous avez fait un immense honneur en nous acceptant dans votre équipe de recherche médicale. Tout au long de ce travail nous avons apprécié vos grandes qualités scientifiques et humaines, vos enseignements et surtout votre sens élevé de la responsabilité et de la rigueur dans le travail font de vous un exemple à suivre.

Cher Maître veuillez recevoir en toute modestie l'expression de notre immense gratitude.

Table des matières

2. Objectifs	3
2.1. Objectif général	3
2.2. Objectifs spécifiques	3
3. Généralités sur le paludisme	4
3.1. Epidémiologie	4
3.2. Agents pathogènes	7
3.3. Vecteurs	8
3.4. Cycle de developement	9
3.4.1. Cycle de developement chez l'homme	9
3.4.2. Cycle de developement chez l'Anophèle femelle	10
3.5. Physiopathologie [18]	11
3.5.2. Accès palustres graves et compliqués	12
3.6. Immunité antipalustre	15
3.6.1. Immunité innée ou naturelle	15
3.6.2. Immunité adaptative ou acquise	16
3.6.3. Antigènes du parasite (figure 2).....	17
3.6.4. Immunité cellulaire	24
3.7. Diagnostic biologique du paludisme	25
3.8. Prise en charge du paludisme	25
3.8.1. Actions préventives	25
3.8.2. Action curative	26
4. Méthodologie	28
4.1. Cadre d'étude	28
4.2. Lieu d'étude	28
4.2.1. Situation géographique	28
4.2.2. Végétation/hydrographie/climat	29
4.2.3. Infrastructures socio-sanitaires	30
4.2.4. Activités socio-économiques et culturelles	31
4.3. Période et type d'étude	33
4.4. Population et échantillonnage	33
4.4.1. Critères d'inclusion.....	34
4.4.2. Critères de non-inclusion	34
4.5. Collecte et traitement des échantillons de recherche	34
4.6. Variables mesurées	34
4.7. Techniques de laboratoire utilisées	35
4.7.2. Goutte épaisse	35
4.7.3. Technique d'ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).....	35
4.7.4. Mesure des taux de cytokines	36
4.7.5. Caractérisation et localisation du PfRON12 (Figure 7).....	36
4.9. Considérations éthiques	38
4.10. Déroulement de l'étude	39
4.11. Définitions opératoires.....	40
5. Résultats	41
5.1. Résultats globaux	41

5.2. Résultats descriptifs et analytiques.....	41
6. Commentaires et discussion.....	50
6.1. Cadre et lieu d'étude.....	50
6.2. Méthodes et techniques utilisées.....	50
6.3. Résultats descriptives.....	52
6.4. Résultats analytiques.....	53
7. Limites de notre étude et perspectives	58
8. Conclusion et recommandations	60
8.1. Conclusion.....	60
8.2. Recommandations.....	60
9. Références bibliographiques	61
10. Annexes	67
10.1. Détermination du taux d'hémoglobine	67
10.2. Technique de goutte épaisse	68
10.3. Technique ELISA	72
10.4. Mesure des taux de cytokines.....	78
10.5. Détermination du taux des anticorps IgG et IgM.....	78
10.6. Caractérisation et méthode de localisation du PfRON12 (Figure 7).....	80
10.7. Numération formule sanguine	82
11. Fiche signalétique	84
Résumé	84
Summary	86
Serment de Galien.....	88

Liste des tableaux

Tableau I : classification des niveaux d'endémicité de la transmission du paludisme	5
Tableau II : répartition des enfants selon les classes d'âge dans le village de Kéniéroba en janvier 2011	41

Liste des figures

Figure 1 : Cycle biologique du <i>Plasmodium spp.</i> chez l'homme et chez le moustique selon le CDC (Centers for Disease Control and Prevention, 2012, http://www.cdc.gov/malaria/about/biology)	11
Figure 2. Antigènes du <i>Plasmodium falciparum</i>	24
Figure 3: carte du Mali avec la situation du village de Bancoumana	33
Figure 4 : situation du village de Kéniéroba dans la commune rurale de Bancoumana	33
Figure 5. Prévalence de l'infection palustre en fonction des classes d'âge dans le village de Kéniéroba en janvier 2011	42
Figure 6. Incidence du paludisme en fonction des classes d'âge dans le village de Kéniéroba au cours de la saison de transmission 2010.....	43
Figure 7. Localisation sous-cellulaire du PfRON12 dans les schizontes matures et les mérozoïtes libérés par un dosage immunofluorescent	43
Figure 8. Activité inhibitrice d'invasion in vitro des IgG spécifiques et la séropositivité de l'antigène PfRON12 dans les échantillons de sérum testés	44
Figure 9. Influence de l'infection palustre sur l'indice de réactivité des IgG et IgM spécifiques anti-PfRON12 dans les échantillons de sérum testés	45
Figure 10. Fréquence des sous-classes d'IgG positives anti-PfRON12 dans les échantillons de sérum des individus testés	46
Figure 11. Corrélation multivariée entre les taux de cytokines et les paramètres sanguins chez les personnes infectées et non infectées	47
Figure 12. Taux des cytokines IL-2 et IL-10 en fonction de la réactivité des échantillons de sérum testés contre PfRON12.....	48
Figure 13. Taux des cytokines IL-6 (c) et IL-4 (d) en fonction de la réactivité des échantillons de sérum testés contre PfRON12.....	49
Figure 14. Taux de cytokines IFN- γ et TNF- α en fonction de la réactivité des échantillons de sérum testés contre PfRON12.....	49
Figure 15. Analyseur et Microcuvette HemoCue	67
Figure 16. Mécanisme de mesure du taux d'Hb par l'appareil HemoCue 201+	68
Figure 17. Technique de la goutte épaisse.....	70

Liste des abréviations

ADCI	Antibody Dependant cellular Inhibition (Inhibition cellulaire dépendante des anticorps)
AQ	Amodiaquine
CD35	<i>Cluster of differentiation 35</i> (Agrégat de différenciation 35)
CR1	<i>Complement Receptor-1</i> (Recpteur-1 du Complement)
CRF	<i>Case Report Form</i> (Formulaire de rapport des cas)
CSA	Chondroïtin Sulfate A
CSREF	Centre de Santé de Référence
CTA	Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
DC	Cellules dendritiques
DO	Densité Optique
EBA175	<i>Erythrocyte Binding Antigen 175</i> (Antigène d'adhésion érythrocytaire 175)
EDM	Electron-Dense- Material (Matériel dense en électrons)
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i> (Test Immunoenzymatique)
ET	<i>Ecart Type</i>
FAPH	Faculté de Pharmacie
GIA	<i>Growth Inhibition Assay</i> (Test d'Inhibition de Croissance)
GIS	<i>Geographic Information System</i> (système d'information géographique)
GLURP	<i>Glutamate Rich Protein</i> (Protéine riche en acide glutamique)
GPI	<i>Glycosylphosphatidylinositol</i> (Glycosyle phosphatidyle inositol)
GST	glutathione S-transferase
Hb	Hémoglobine
HRP	Histidine Rich Protein
ICAM	<i>Inter Cellular Adhesion Molecule1</i> (Molécule d'adhésion intercellulaire 1)
IEM	Immune Electron Microscopy (Microscopie Immuno-Electronique)
IFA	Immunofluorescence Assay (dosage Immunofluorescent)
IFN γ	Interféron gamma
IG	Indice Gamétozytaire
IgG	Immunoglobuline G
IgM	Immunoglobuline M
IL	Interleukines
IM	Intramusculaire
IP	Indice plasmodique
IS	Indice splénique
IV	Intraveineux
KAHRP	<i>Knob-Associated Histidin-Rich Protein</i> (Protéine riche en histidine associée aux protubérances)
KDA	<i>Kilos Dalton</i>
MRTC	<i>Malaria Research and Training Center</i> (Centre de Recherche et de Formation sur le Paludisme)

MSP-1	<i>Merozoite Surface Protein 1</i> (protéine 1 à la surface du mérozoïte)
MSP-2	<i>Merozoite Surface Protein 2</i> (protéine 2 à la surface du mérozoïte)
MSP-3	<i>Merozoite Surface Protein 3</i> (protéine 3 à la surface du mérozoïte)
MTIP	Myosine A Tail Domaine Interacting Protein
NIAID	<i>National Institute of Allergy and Infectious Diseases</i> (Institut National d'Allergologie et de Maladies Infectieuses)
NHS	N-hydroxysuccinimide
NIH	<i>National Institutes of Health</i> (<i>Institut Nationaux de la Santé</i>)
NO	Monoxyde d'azote
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS	Phosphate Buffered Saline (solution saline tamponnée au phosphate ou tampon phosphate salin)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Réaction en Chaîne par polymérase)
PECAM-1	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i> (Molécule-1 d'adhésion aux cellules endothéliales des plaquettes)
PfEMP1	<i>Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein</i> (Protéine membranaire de <i>P. falciparum</i> à la surface de l'érythrocyte)
PfHRP-1	<i>Plasmodium falciparum Histidin Rich Protein</i> (Protéine 1 riche en histidine de <i>P. falciparum</i>)
RESA	Ring Erythrocyte Surface Antigen (Antigène de surface érythrocytaire des formes en anneaux)
RI	Reactivity Index (indice de Réactivité)
RN	Route Nationale
SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS)
TIE	Taux d'Inoculation Entomologique
TLR	Toll-like Receptor (récepteurs semblables au Toll)
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Facteur nécrosant des tissus)
TPI	Traitement Préventif Intermittent
USTTB	Université des Sciences, des Techniques et des Technologie de Bamako
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesing Molecular</i> (Molécule d'adhésion aux cellules vasculaires)

1. Introduction

Le paludisme reste toujours une priorité de santé publique en dépit des moyens déployés dans sa lutte à travers le monde. C'est la maladie parasitaire la plus répandue au monde avec 219 millions de cas et 435 milles décès dont la grande majorité est enregistrée dans la région africaine [1].

Au Mali, le paludisme représente 40% des motifs de consultation dans les centres de santé, sa prévalence nationale est estimée à 36% chez les enfants de moins de 5 ans [2]. Ces derniers constituent avec les femmes enceintes les couches les plus vulnérables de cette maladie dans les zones d'endémie [1, 3].

Face à l'adaptation continue du *P. falciparum* aux interventions de lutte, les espoirs se tournent alors vers le développement d'un vaccin efficace et durable contre le paludisme. Les antigènes utilisés dans le cadre des essais vaccinaux servent de cible pour le système immunitaire [4-6]. Bien que des progrès aient été réalisés dans la connaissance de la nature précise des réponses immunitaires protectrices contre *P. falciparum*, en termes de mécanismes immunitaires, d'antigènes cibles spécifiques et du taux d'acquisition de l'immunité, la compréhension actuelle reste encore limitée sur le plan immunitaire [7-9].

Au cours des dernières décennies, les recherches ont permis d'identifier plusieurs antigènes de *P. falciparum* comme candidats vaccins contre le paludisme [10]. Les antigènes les plus étudiés sont MSP-1, MSP-2, MSP-3 (protéines de surface du mérozoïte), AMA-1 (Antigène-1 membranaire apical), GLURP (Protéine riche en acide glutamique), EBA175 (Antigène d'adhésion érythrocytaire 175) [9-11]. Ces antigènes produits au stade sanguin du cycle cellulaire induisent la production des anticorps notamment, les immunoglobulines (Ig) G qui sont associées à la protection contre le paludisme [11]. En plus des anticorps, l'immunité innée joue un rôle essentiel dans le développement des lymphocytes (cellules T CD4⁺) et la réponse adaptative, en produisant les cytokines immunorégulatrices comme les interleukines (IL-10, IL-12), TNF- α (*tumor necrosis factor*- α) et l'interféron gamma (IFN γ) [11, 12] qui sont associées à une susceptibilité plus faible aux infections palustres [12]. Cependant, les efforts déployés dans la recherche de candidats vaccins efficaces n'ont pas abouti à des résultats

escomptés à cause de la complexité génétique du parasite. Cette complexité génétique offre également la possibilité de proposer d'autres antigènes à potentiel vaccinal [13].

La protéine 12 du col de rhoptrie de *P. falciparum* (PfRON12) a récemment été décrite comme une protéine spécifiquement exprimée par les schizontes et localisée dans le col de rhoptrie des mérozoïtes. La PfRON12 est un antigène du stade sanguin qui joue un rôle clé pendant l'invasion érythrocytaire de *P. falciparum* [14, 15]. C'est dans l'optique d'identifier les antigènes parasitaires les plus immunogènes susceptibles d'induire une réaction immunitaire protectrice, bien tolérée et durable que cette étude a été initiée. Il s'agissait d'étudier les réponses humorales et cellulaires contre l'antigène PfRON12 afin de contribuer à la recherche d'un candidat efficace contre le paludisme pour le bon développement de notre continent.

2. Objectifs

2.1. Objectif général

Etudier la réponse immunitaire naturelle contre la protéine 12 du col de rhoptrie de *P. falciparum* en tant que candidat vaccin dans les échantillons provenant du Mali et de la Thaïlande.

2.2. Objectifs spécifiques

- Déterminer l'activité biologique d'IgG spécifiques anti-PfRON12 sur l'invasion des érythrocytes par le parasite ;
- Déterminer l'influence de l'infection palustre sur l'indice de réactivité d'IgG et IgM anti-PfRON12 dans les échantillons provenant du Mali et de la Thaïlande ;
- Déterminer la fréquence des sous classes d'IgG positive dans les échantillons de personnes atteintes de paludisme ;
- Comparer le taux des cytokines en fonction de la réactivité d'IgG contre la protéine PfRON12 dans les échantillons provenant du Mali et de la Thaïlande.

3. Généralités sur le paludisme

3.1. Epidémiologie

Le paludisme est une parasitose due à la présence et à la multiplication d'un hématozoaire du genre *Plasmodium* transmis à l'homme par la piqûre infectante d'un moustique, appelé *Anophèles* femelle. Cinq espèces plasmodiales sont responsables du paludisme chez l'homme : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi*. Ces espèces diffèrent par leurs caractéristiques biologiques et cliniques, la répartition géographique et par leurs capacités à développer des résistances aux antipaludiques [16].

La distribution géographique des espèces plasmodiales est extrêmement variable d'une zone à l'autre. Cette variabilité est sous la dépendance de certains facteurs comme la distribution des anophèles et leur capacité vectorielle, les caractéristiques biologiques des espèces plasmodiales, les facteurs environnementaux et humains. Le paludisme est très répandu en Afrique sub-saharienne où les quatre espèces existent avec une nette prédominance de *P. falciparum*. En Amérique centrale et du sud, la transmission est assurée principalement par *P. falciparum* et *P. vivax*. En Asie, les espèces retrouvées sont essentiellement *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. knowlesi*. La transmission est hétérogène en Océanie et les cas de paludisme importé se rencontrent maintenant en Europe [16, 17]. L'Afrique subsaharienne supporte la charge mondiale du paludisme (92%) loin devant la région sud-est Asiatique (5 %) et la région Méditerranée orientale (2 %) [18].

Près de la moitié de la population mondiale était exposée au risque du paludisme en 2018. Ce risque est beaucoup plus élevé chez certains groupes comme les enfants de moins de 5 ans, les femmes enceintes, les personnes atteintes du sida, les migrants non immunisés et les voyageurs [1].

Le cycle de transmission du paludisme implique trois acteurs principaux: le *Plasmodium*, l'anophèle et l'homme. Ces facteurs sont en relation dynamique avec les facteurs environnementaux et socio-économiques, et conditionnent l'épidémiologie du paludisme.

Les indices paludométriques qui permettent de déterminer l'endémicité du paludisme sont :

- **Indice plasmodique (IP)** indique le pourcentage de personnes examinées ayant des hématozoaires dans le sang. Il reflète l'endémicité de la maladie c'est-à-dire le taux d'infection dans une région donnée ;
- **Indice splénique (IS)** représente le pourcentage de personnes examinées présentant une splénomégalie. Il est le reflet du niveau d'immunité anti palustre dans une région donnée chez les enfants de 2 à 9 ans ;
- **Indice gamétoctaire (IG)** est le pourcentage de personnes dans une population donnée présentant les formes sexuées du parasite dans le sang. Il Indique le potentiel infectant de l'homme vis-à-vis de l'anophèle.
- **Taux d'inoculation entomologique (TIE)** est le nombre de piqûres infectantes que reçoit un sujet en un temps donné. C'est le produit du taux de piqûre et de l'indice circumsporozoïtique. Il reflète directement le niveau de la transmission du paludisme dans une région donnée [16].

Tableau I : classification des niveaux d'endémicité de la transmission du paludisme

Niveau d'endémicité	Transmission	Indice plasmodique Chez les enfants de 2-9 ans (%)	Commentaires
Paludisme Hypo-endémique	Faible : sub-périodique ou sporadique	Généralement ≤ 10	Les moustiques sont instables, généralement difficiles à détecter ; des épidémies sérieuses peuvent survenir
Paludisme méso-endémique	Saisonnière, périodique suivant une bonne saison pluvieuse	11-50 en fonction du temps de surveillance	Les moustiques fluctuent, détectables en fonction des saisons, une fenêtre saisonnière peut survenir ;

			Les habitants acquièrent une certaine immunité
Paludisme hyper-endémique	Intense (saisonnier) Chaque année	51-75	Fluctuation saisonnière des cas de paludisme ; Séquelles fréquentes et sévères chez les jeunes enfants ; une certaine immunité chez les adultes
Paludisme holoendémique	La transmission peut survenir à travers l'année avec des pics de transmission	> 75	On peut détecter les moustiques toute l'année avec des pics ; des taux élevés d'anémie chez les très jeunes enfants et la prémunité chez les adultes

Source. Rapport sur le paludisme de l'Organisation Mondiale de la Santé, 1963

Au Mali, il y a une extrême variabilité de la situation épidémiologique du paludisme en fonction des faciès géo-climatiques. La transmission du paludisme est particulièrement stable dans les régions du sud et instable dans les régions du nord du pays. Cinq modalités épidémiologiques de transmission du paludisme ont été décrites au Mali [19] :

- La zone de transmission saisonnière longue de quatre à six mois au sud du pays. Elle correspond 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 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% et dépend fortement de la pluviométrie;
- 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 méso-endémique avec un indice plasmodique inférieur à 40% ; et Le milieu urbain, en particulier Bamako et Mopti, qui est impropre à l'impaludation (pollution des gîtes larvaires, automédication élevée, etc.). Le paludisme y est de type hypoendémique avec un indice plasmodique inférieur à 10%.

3.2. Agents pathogènes

L'agent pathogène du paludisme est un hématozoaire du genre *Plasmodium*, appartenant à la famille des *Plasmodidae*, à l'embranchement des *Sporozoa* et à l'ordre des *haemosporidae*. Il existe environ 172 espèces de *Plasmodium* qui ont été répertoriées et possèdent des cycles biologiques similaires, parmi lesquelles cinq sont inféodées à l'Homme à savoir :

- ❖ *Plasmodium falciparum* : c'est l'espèce plasmodiale qui provoque plus de formes cliniques graves et est responsable de la majorité de décès lié au paludisme 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.
- ❖ *Plasmodium vivax* : sévit surtout en Asie et en Amérique Latine ainsi que certaines régions d'Afrique. Sa période incubation est de 11 à 13 jours, mais on peut observer des rechutes tardives (accès de reviviscence) pendant 3 voire plus de 4 ans. Il est responsable de la fièvre tierce bénigne. Sa transmission s'arrête en dessous d'une température à 15°C.

- ❖ *Plasmodium ovale* sévit surtout en Afrique intertropicale et dans certaines régions du Pacifique. Son incubation est de 15 jours mais peut être plus longue. Cette espèce est aussi responsables de formes dormantes appelées hypnozoïtes (reviviscence).
- ❖ *Plasmodium malariae*, cette espèce se rencontre en Afrique de façon sporadique. Sa période d'incubation est plus longue (que les 3 autres espèces précédentes) et varie entre 15 et 21 jours. Il est responsable de fièvre quarte bénigne. Parfois, cette espèce peut entraîner des complications rénales.
- ❖ *Plasmodium knowlesi* sévit en Asie du sud-est, en zone forestière car il est étroitement lié à la répartition des singes, son hôte habituel. Il est morphologiquement proche de *P. malariae*. Il se différencie des autres espèces par un cycle érythrocytaire de 24 heures responsable d'une fièvre quotidienne [16].

3.3. Vecteurs

Le paludisme est transmis à l'homme par la piqure d'un moustique du genre *Anopheles* au moment de son repas sanguin. Seule la femelle, hématophage, transmet la maladie. Les anophèles appartiennent au Phylum des Arthropoda, à la classe des Insecta, à la sous-classe des Neoptera, à l'ordre des Diptera, au sous-ordre des Nematocera, à la famille des Culicidae, à la sous-famille des Anophelinae qui compte 3 genres : Chagasia, Bironella et le genre Anopheles. Ce dernier genre comprend environ 500 espèces dont certaines sont regroupées en complexes d'espèces. Parmi la soixantaine d'espèces de vecteurs potentiels, une vingtaine est couramment incriminée dans la transmission du paludisme. La nature des sols, le régime des pluies, la température, la végétation naturelle ou l'agriculture rendent les collections d'eau plus ou moins propices au développement des espèces vectrices. Certaines espèces ont ainsi pu s'adapter à des milieux particuliers comme le milieu urbain. Le développement et la longévité des anophèles dépendent de la température avec un optimum entre 20 et 30°C pour une durée de vie de l'ordre de 30 jours [16, 20] .

Les espèces d'anophèle les plus dangereuses sont celles qui sont anthropophiles et/ou endophiles. La répartition des espèces à travers le monde est fonction des conditions favorables à son implantation et beaucoup de facteurs climatiques et environnementaux

peuvent influencer la transmission du paludisme (sécheresse, variations de température, construction des barrages, etc.).

Au Mali, la transmission est assurée par le complexe d'*Anopheles gambiae* et d'*Anopheles funestus* [21].

3.4. Cycle de développement

Le cycle de développement du *Plasmodium* est complexe, il comprend deux phases : une phase asexuée chez l'homme (hôte intermédiaire) et l'autre sexuée chez l'anophèle femelle (hôte définitif).

Le cycle asexué qui se déroule chez l'homme est divisé en deux phases :

3.4.1. Cycle de développement chez l'homme

3.4.1.1. Phase hépatique ou exo-érythrocytaire

Les sporozoïtes inoculés par l'anophèle femelle lors de son repas sanguin restent pendant une trentaine de minutes maximum dans la peau, la lymphe et le sang. Beaucoup sont détruits par les macrophages mais certains parviennent à gagner les hépatocytes. Ils se transforment en schizontes pré-érythrocytaires ou « corps bleus » (formes multinucléées) qui, après 7 à 15 jours de maturation, éclatent et libèrent des milliers de mérozoïtes dans le sang (10 000 à 30 000 mérozoïtes en fonction des espèces). Dans les infections à *P. vivax* et *P. ovale*, certains sporozoïtes intrahépatiques restent quiescents (hypnozoïtes) et sont responsables d'une schizogonie hépatique retardée, qui entraîne la libération dans le sang de mérozoïtes plusieurs mois ou années après la pique infectante du moustique, expliquant ainsi les reviviscences tardives observées avec ces deux espèces. Elle correspond à la phase d'incubation, cliniquement asymptomatique et dure environ 6 jours pour *P. falciparum*, 8 jours pour *P. vivax*, 9 jours pour *P. ovale*, 9-12 jours pour *P. knowlesi* 15 jours pour *P. malariae* [16].

3.4.1.2. Phase sanguine ou érythrocytaire

Après leur libération suite à l'éclatement des schizontes hépatiques, les mérozoïtes pénètrent dans les globules rouges et se transforment en trophozoïte jeune. Celui-ci se développe en important le contenu de l'érythrocyte et en le digérant dans sa vacuole

digestive interne. Les produits de dégradation de l'hémoglobine donnent un pigment appelé hémozoïne. La maturation de trophozoïte en schizonte se fait en 24, 48 ou 72 heures et contient 8 à 30 mérozoïtes en fonction de l'espèce plasmodiale. Ces mérozoïtes sont identiques d'un point de vue morphologique à ceux de la phase hépatique.

Après l'éclatement de l'hématie et la rupture des schizontes érythrocytaires, les mérozoïtes et les substances pyrogènes issues de la dégradation de l'érythrocyte sont libérés dans la circulation sanguine. Les mérozoïtes libérés pénètrent dans les globules rouges sains environnants et débutent un nouveau cycle de réplication érythrocytaire.

Tous les schizontes érythrocytaires arrivent à maturation au même moment. La destruction des hématies se fait de façon synchrone : toutes les 24 heures pour *P. knowlesi*, toutes les 48 heures pour *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* et toutes les 72 heures pour *P. malariae*. Cette phase correspond à la phase clinique de la maladie. Après un certain nombre de cycles, certains trophozoïtes au lieu de se transformer en schizonte, donnent naissance à des gamétocytes mâles ou femelles ce qui correspond à la première étape du cycle sexué (chez l'anophèle femelle) [16].

3.4.2. Cycle de développement chez l'Anophèle femelle

Ingérés par le moustique lors d'un repas sanguin sur un sujet infecté, les gamétocytes se transforment en gamètes dans l'estomac de l'anophèle (les gamétocytes femelles se transforment en macrogamètes tandis que les gamétocytes mâles subissent une exflagellation et donnent plusieurs microgamètes). Les gamètes mâles et femelles s'unissent pour donner un œuf mobile ou ookinète. Celui-ci quitte la lumière du tube digestif du vecteur, se fixe sur la paroi externe de l'estomac et se transforme en oocyste. L'oocyste donne naissance à des centaines de sporozoïtes qui gagnent les glandes salivaires du moustique. Ces sporozoïtes sont les formes infectantes prêtes à être inoculées avec la salive du moustique, lors d'un repas sanguin sur un hôte [22].

Le cycle sexué chez le moustique dure environ une à deux semaines lorsque les conditions environnementales sont optimales. Cependant, la durée de cette phase est

étroitement liée à l'espèce de *Plasmodium* ainsi qu'à la température et peut donc être beaucoup plus longue.

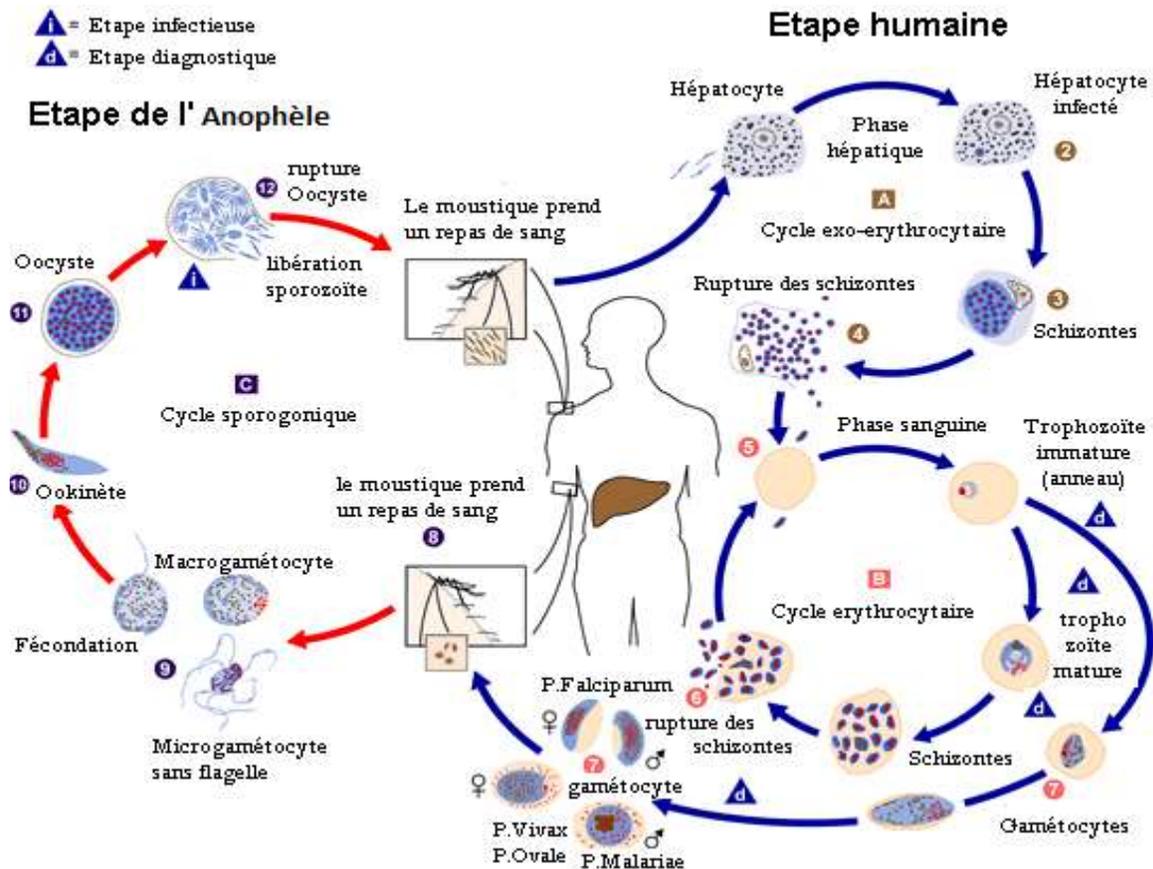


Figure 1 : Cycle biologique du *Plasmodium spp.* chez l'homme et chez le moustique selon le CDC (Centers for Disease Control and Prevention, 2012, <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology>)

3.5. Physiopathologie [18]

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

3.5.1. Accès palustre simple

Les manifestations cliniques du paludisme surviennent lors de la phase sanguine de son cycle de développement. La fièvre résulte de la libération dans la circulation de l'hémozoïne (pigment malarique) ayant des propriétés pyrogènes à la suite de la lyse des hématies. Les cytokines proinflammatoires libérées par les macrophages telles que l'IL-1, l'IL-6, la lymphotoxine β et le TNF- α , et les cellules endothéliales de l'hôte jouent aussi un rôle dans l'apparition de la fièvre [23]. Ces cytokines se comportent comme des pyrogènes endogènes en stimulant les centres thermorégulateurs hypothalamiques.

La fièvre n'apparaît que lorsque la parasitémie atteint le seuil pyrogène, son allure est variable d'une personne à l'autre et d'une espèce plasmodiale à l'autre. Au cours des accès de primo-invasion, le cycle érythrocytaire est généralement non synchronisé. Lorsque les cycles se synchronisent progressivement, la fièvre prend alors son caractère de type intermittente, tierce ou quarte [23]. La phase de schizogonie érythrocytaire entraîne une hémolyse responsable d'une anémie d'installation progressive, une hémolyse importante peut aussi être à l'origine d'un ictère. Au niveau de la rate et accessoirement du foie, l'hyperplasie des cellules macrophagiques destinées à la phagocytose des hématies parasitées est à l'origine de l'hépto-splénomégalie.

3.5.2. Accès palustres graves et compliqués

P. falciparum est l'espèce la plus dangereuse puisqu'elle est à l'origine des formes graves et compliquées qui s'observent généralement chez les sujets non immuns (jeunes enfants, femmes enceintes, expatriés, sujets vivants en zone hypo-endémique) [11].

Tous les mécanismes physiopathologiques n'ont pas encore pu être élucidés mais plusieurs théories coexistent. La séquestration des hématies parasitées par des formes matures du *Plasmodium* entre elles, l'adhésion des hématies infectées aux cellules endothéliales au niveau des micro-vaisseaux (micro-agglutinations dans les vaisseaux capillaires du cerveau, rein, poumons, etc.) et la formation d'agrégats d'hématies parasitées et non parasitées (formations de rosettes ou rosetting) sont à l'origine d'un ralentissement de la circulation sanguine avec comme conséquence une hypoxie des tissus nobles. D'autre part, l'intervention de cytokines pro-inflammatoires et autres médiateurs produits durant la maladie s'associe probablement au phénomène de blocage

circulatoire [24, 25]. Les concepts physiopathologiques du paludisme grave font intervenir deux phénomènes interdépendants : la séquestration des hématies parasitées et le phénomène immunologique.

3.5.2.1. Séquestration

Elle aboutit à une obstruction du microcapillaire par les globules rouges. Trois mécanismes concourent à ce phénomène : l'auto-agglutination, la formation de rosettes « rosetting » et la cytoadhérence.

3.5.2.2. Phénomène de l'auto-agglutination

L'auto-agglutination des hématies parasitées a été observée avec 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. Ce phénomène a été observé chez les patients porteurs de forte parasitémie en dehors de tout phénotype d'adhésion. Les mécanismes moléculaires qui prédisposent à sa survenue sont encore mal connus [24] .

3.5.2.3. Phénomène de formation des rosettes ou « rosetting »

Les hématies parasitées ont la faculté d'attirer au tour d'elles des hématies saines pour former des rosettes : c'est le phénomène de « rosetting ». La formation des rosettes est la conséquence de la liaison entre des ligands parasitaires (PfEMP1) présents à la surface des hématies infectées et leurs récepteurs sur les globules rouges non infectés. Plusieurs récepteurs pour les ligands parasitaires (PfEMP1) ont été décrits à la surface des globules rouges comme le récepteur 1 du complément (CR1/CD35), les tri-saccharides des groupes sanguins (A et B), le CD36 et le PECAM-1/CD31. Les anticorps (IgM et IgG) et certains composants du complément (C3b et C4b) jouent aussi un rôle dans ce phénomène à travers le récepteur 1 du complément. Ce phénomène aboutit à la formation d'un agrégat qui contribue à l'obstruction des petits vaisseaux sanguins. Il varie d'une souche plasmodiale à l'autre et est corrélé au degré de sévérité du paludisme. La formation de rosettes constitue un mode de protection pour le parasite contre le système phagocytaire de la rate et exerce un effet délétère pour l'hôte par blocage du flux sanguin [26, 27].

3.5.2.4. Phénomène de cytoadhérence [28]

La cytoadhérence des hématies parasitées à l'endothélium vasculaire ou aux cellules trophoblastiques placentaires est le mécanisme qui a été le mieux étudié ces dernières années. Ce phénomène permet au *Plasmodium* de se développer plus facilement grâce à un environnement gazeux favorable et d'échapper à la clairance splénique. Les hématies parasitées expriment à leur surface des protubérances (knobs) qui semblent jouer un rôle important dans leur adhésion aux cellules endothéliales. Il s'agit de protubérances protéiniques auxquelles sont incorporés des antigènes plasmodiques comme la PfEMP-1 et 2 (*Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1 et 2*), la PfHRP-1 (*Plasmodium falciparum Histidin Rich Protein*), le KAHRP (*Knob-Associated Histidin-Rich Protein*), le RESA (*Ring Erythrocyte Surface Antigen*) et l'EDM (*Electron-Dense- Material*).

Parmi ces protéines parasitaires associées aux knobs, PfEMP-1 est le ligand parasite le mieux caractérisé. PfEMP-1 interagit avec des récepteurs spécifiques au niveau des cellules endothéliales vasculaires et du syncytiotrophoblaste, comme l'ICAM-1 (*Inter Cellular Adhesion Molecule-1*), le CD36, le VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesing Molecular-1*) le CD31 ou PECAM-1. Le CSA (*Chondroitin Sulfate A*), la sélection. L'adhésion des hématies parasitées à ces récepteurs entraîne leur séquestration à l'intérieur de la microcirculation. La séquestration permet aux hématies parasitées d'échapper à la clairance splénique et contribue à la gravité du paludisme. Elle entraîne aussi une obstruction des micro-vaisseaux surtout au niveau cérébral qui semble être la principale cause du neuropaludisme. La séquestration entraînerait une dilatation des microvaisseaux par la libération du monoxyde d'azote (NO), qui est responsable de l'œdème cérébral et pulmonaire [28].

3.5.2.5. Mécanisme immunologique

Le système immunitaire à médiation cellulaire, impliquant les lymphocytes CD4⁺ et les macrophages, joue un rôle très important dans la pathogénèse du neuropaludisme. Les antigènes plasmodiaux facilitent le recrutement des macrophages et la libération de nombreuses cytokines proinflammatoires dont l'Interféron gamma (IFN γ), le TNF- α , l'IL-

1 et l'IL-6. Parmi ces cytokines libérées par les macrophages, le TNF- α est un acteur important. Expérimentalement, l'injection du TNF- α chez les souris reproduit la plupart des manifestations cliniques et biologiques du paludisme grave. On pense aussi que la libération du TNF- α stimulerait l'expression des récepteurs des knobs au niveau endothélial, donc contribuant à la séquestration.

Il faut rappeler que la fièvre observée au cours des accès palustres serait due à la libération dans le sang de l'hémozoïne (substance pyrogène résultant de la dégradation de l'hémoglobine par le *Plasmodium*) après éclatement des schizontes. Cette fièvre peut également être due à la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 et l'IL-6 [29, 30].

3.6. Immunité antipalustre

Dans les zones d'endémie palustre où la population est quasiment exposée en permanence à des infections plasmodiales, l'hôte développe progressivement des réponses immunitaires qui protègent contre la maladie. Les réponses immunitaires sont régulées aussi bien par le système immunitaire non spécifique dit inné, par le système immunitaire spécifique ou acquis, que par des facteurs environnementaux.

3.6.1. Immunité innée ou naturelle

L'immunité innée se mobilise dès le début de l'infection en attendant la mise en place de celle acquise. L'immunité innée ou naturelle est assurée par les cellules phagocytaires, les molécules et les enzymes (lysozymes). Les mécanismes cellulaires et humoraux de cette défense dite « non spécifique » ne sont pas très bien connus. De récentes études ont permis de démontrer qu'une famille de protéines codée par la lignée germinale (Toll-Like récepteurs ou TLR) serait importante pour la défense innée de l'hôte, aussi bien chez les vertébrés que chez les invertébrés [31], et que l'infection palustre induit l'activation des récepteurs Toll-like, TLR1, TLR2, TLR4 et TLR9 [32, 33].

Parmi les cellules en première ligne dans la réponse immunitaire innée contre l'infection palustre, on distingue les cellules dendritiques (DC), les lymphocytes $\gamma\delta$ et les cellules tueuses naturelles (cellules NK). Ces cellules sont impliquées dans la clairance des

parasites et des érythrocytes infectés ainsi que dans l'élimination des hépatocytes infectés [12]. D'autres cellules comme les neutrophiles, les monocytes et les macrophages jouent également un rôle important dans la clairance parasitaire par la phagocytose, la cytotoxicité et l'inhibition du parasite. Les cellules NK stimulent la production d'IFN γ qui active à son tour le macrophage conduisant ainsi à la lyse des cellules parasitées [34, 35].

3.6.2. Immunité adaptative ou acquise

Cette immunité s'acquiert progressivement en situation d'exposition continue et joue un rôle essentiel dans la protection contre le paludisme. Elle n'empêche pas d'être de nouveau contaminé ou la clairance totale du parasite, mais empêche la survenue des formes graves du paludisme. L'immunité acquise dépend des espèces parasitaires, le stade de développement du parasite ainsi que la répétition de l'exposition [36]. L'immunité acquise n'est pas stérilisante car en zone d'endémie palustre ou la transmission est stable, le portage du parasite sans manifestations cliniques est fréquent. Cet état immunitaire permet de contrôler la parasitémie à un seuil qui n'entraîne pas les manifestations cliniques du paludisme.

De nombreux travaux en zone d'endémie palustre ont démontré que l'induction de l'immunité antipaludique adaptative nécessite une exposition longue. Elle se met en place progressivement avec l'âge et les expositions répétées. Elle fait intervenir non seulement la réponse humorale mais aussi la réponse à médiation cellulaire [37]. L'immunité humorale acquise est principalement dirigée contre le stade érythrocytaire asexué, les cibles principales étant les mérozoïtes extracellulaires en circulation, mais le stade pré-érythrocytaire est également visé par les réponses immunitaires protectrices [37].

L'infection par le paludisme induit à la fois une production d'immunoglobulines polyclonales et spécifiques par les cellules lymphocytaires B. Ces anticorps produits au cours de l'infection palustre sont constitués essentiellement par des immunoglobulines G (IgG), mais aussi d'autres isotypes d'immunoglobuline. Bien que des anticorps d'isotypes différents puissent avoir des fonctions protectrices, le rôle des IgG dans la protection contre l'infection palustre a été largement évoqué [38, 39]. Les sous-classes cytophiliques

IgG1 et IgG3 ont été fréquemment rencontrées dans le sérum des personnes protégées contre le paludisme. L'augmentation de la concentration de ces anticorps IgG peut être associée à une diminution du risque d'infection palustre. La sous-classe IgG4 qui est non cytophilique tout comme IgG2 peut inhiber les mécanismes effecteurs par inhibition des anticorps cytophiliques [38].

Le rôle protecteur des immunoglobulines IgM et IgA contre le paludisme n'est pas bien élucidé. De même, aucune fonction spécifique antipaludique n'a été attribuée aux IgA [40]. Cependant, une élévation d'anticorps anti-paludisme IgE a été observée au laboratoire chez l'homme et les animaux au cours de l'infection paludique, traduisant le passage des activités régulatrices des cellules T de Th1 à Th2 en raison de l'exposition répétée des cellules du système immunitaire aux parasites du paludisme [41]. Il a été mentionné dans les études d'une part, que l'élévation de la concentration d'IgE pourrait être associée à l'apparition du paludisme cérébral [40], et d'autre part, une association positive entre la faible parasitémie et le taux élevé d'IgE spécifique d'antigènes de *P. falciparum* [42].

Tous les mécanismes par lesquels les anticorps agissent contre le *Plasmodium* ne sont pas connus, mais les plus évoqués sont l'inhibition de l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes par opsonisation, l'inhibition de l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes, l'inhibition de la croissance intra-érythrocytaire du parasite, la clairance des érythrocytes infectés par ADCI «*Antibody Dependant Cellular Inhibition* : l'inhibition cellulaire dépendante des anticorps» [43].

3.6.3. Antigènes du parasite (figure 2)

3.6.3.1. Antigène Apical 1 de la Membrane

Antigène Apical de la Membrane 1 (AMA1) est une protéine membranaire de type 1 du mérozoïte, localisée dans le micronème (organelle présente dans la région apicale du mérozoïte) et contenant des ligands pour des récepteurs des globules rouges. La protéine comporte une région ectoplasmique de 546 acides aminés, un segment transmembranaire de 21 acides aminés et un domaine cytoplasmique de 55 acides aminés. AMA1 est retrouvé à la fois à la surface du sporozoïte hépatocytaire et du

mérozoïte érythrocytaire, jouant un rôle essentiel dans l'invasion des cellules hôtes [11]. Lors de l'invasion de l'érythrocyte par le parasite, AMA1 se répartit sur toute la surface externe de l'organisme et subit une série de coupure protéolytique. Son précurseur (83 kDa) est transporté au niveau du pôle apical du mérozoïte où il subit une maturation protéolytique qui le convertit en une protéine de 66 kDa. Au moment de l'invasion dans le globule rouge, cette protéine (AMA1 66 kDa) est délocalisée à la surface du mérozoïte lors de la rupture des schizontes [11, 44].

Le rôle de l'AMA1 a été mentionné récemment dans la liaison du mérozoïte avec le globule rouge, en interagissant avec des protéines de la famille RON (rhoptry neck Protein). Cet antigène formerait un complexe permettant la liaison au mérozoïte. La compréhension de ce mécanisme permet d'envisager l'inhibition de cette étape cruciale [45].

AMA1 est exprimée essentiellement pendant la phase asexuée ou sanguine de *P. falciparum* et l'examen des séquences d'AMA1 dans les infections naturelles à *P. falciparum* a montré l'extrême diversité de ce gène [46, 47]. Les études menées sur l'AMA1 dans le cadre de l'essai vaccinal ont rapporté l'existence des anticorps naturels anti-AMA1 en grande proportion dans une zone d'endémie palustre. L'immunisation active de la souris et du singe par l'AMA1 confère une protection contre le paludisme de la souris et du singe [46, 48].

Un des obstacles à la mise en place d'un vaccin efficace basé sur AMA1 est que cet antigène possède un important polymorphisme génétique. Une étude longitudinale menée au Mali a examiné la diversité génétique des souches infectantes et a rapporté plusieurs formes d'AMA1 différentes sur 506 infections. Ces polymorphismes étaient situés près du site de fixation impliqué dans le phénomène d'invasion [47].

3.6.3.2. Protéine-1 à la surface du mérozoïte (MSP-1)

La protéine-1 de surface du mérozoïte constitue l'une des protéines parasitaires les plus exprimées à la surface du mérozoïte. Elle est synthétisée au stade précoce du développement du schizonte et subit une première maturation protéolytique dont est issu un complexe formé de 4 polypeptides ayant approximativement pour tailles 83 kDa, 38 kDa, 30 kDa et 42 kDa [49]. Une seconde protéolyse se déroule au moment de l'invasion

dans le globule rouge. Le fragment de 42 kDa est clivé en un fragment de 33 kDa qui n'est plus accessible et en un autre fragment de 19 kDa (MSP1-19) qui reste fixé à la membrane du parasite. L'inhibition de cette étape essentielle pour le parasite par des inhibiteurs ou des anticorps diminue les phénomènes d'invasion érythrocytaire et de multiplication du parasite [50]. Le fragment de 19 kDa est composé de 2 domaines *Epidermal Growth Factor* (EGF) like reliés entre eux par des résidus qui lui confèrent une forme rigide et compacte [51].

Le MSP1 est une des cibles de la réponse immunitaire développée contre l'infection à *Plasmodium*. Une forte protection contre les cas létaux de paludisme a été observée chez le singe *Aotus* avec des protéines MSP1 issues d'isolats [51, 52] mais aussi contre les formes virulentes de *Plasmodium* chez la souris pour des préparations variées de protéines recombinantes dérivées de MSP1 contenant les 2 domaines EGF like [51]. Chez l'homme, certaines études n'ont pas rapporté d'association entre la protection et la présence d'anticorps anti-MSP1-19 [53]. Par contre, un effet protecteur a été rapporté contre la parasitémie et les formes cliniques en présence d'anticorps anti-MSP1-19 chez les enfants [54], avec une prédominance de la réponse protectrice d'anticorps IgG1 anti-MSP1-19 [55, 56].

3.6.3.3. Protéine-2 à la surface du mérozoïte (MSP-2)

La MSP2 est également une des protéines les plus abondantes à la surface du mérozoïte. Elle est ancrée à la membrane parasitaire par une GPI ayant une masse d'environ 30 kDa [57]. A l'inverse de MSP1 et de nombreuses protéines de surface du mérozoïte, il n'a pas été décrit de phénomène de maturation protéolytique de MSP2. MSP2 est hautement polymorphe et constituée de domaines N- et C-terminaux conservés encadrant une région centrale variable. Cette région est constituée de séquences en tandem répétées qui varient en taille, en nombre de répétitions et en séquence. Ainsi, il est possible de distinguer 2 grandes familles alléliques possédant des caractéristiques différentes notamment au niveau des parties variables : 3D7 et FC27 [7, 58, 59]. A l'inverse de MSP1-19 ou d'AMA1 qui sont riches en cystéines et avec de multiples ponts disulfures intramoléculaires qui les stabilisent, MSP2 ne possède qu'un seul pont

disulfure [11] . Le rôle de MSP2 a été peu évalué quant à ses capacités d'induire une réponse protectrice chez les rongeurs ou les primates.

Les études menées chez l'homme ont montré que le faible taux d'anticorps spécifiques de MSP2 est associé à une augmentation de la susceptibilité au paludisme alors qu'un taux élevé est associé à une protection clinique [9, 60]. Cette observation sur l'association entre l'immunité clinique et la forte production d'anticorps spécifiques de MSP2 a été confirmée dans d'autres études [61, 62], et que ces anticorps se composent généralement des IgG3 de courte durée, requérant ainsi une stimulation répétée pour se maintenir longtemps [33, 62]. Cette réponse immunitaire spécifique anti-MSP2 est fortement corrélée à l'âge et à l'exposition répétée au paludisme [9].

Les études menées sur l'MSP2 au cours des essais vaccinaux ont rapporté une diminution significative de la densité parasitaire chez ces enfants ayant un taux d'anticorps anti-MSP2 détectable [63], mais que la réponse humorale dirigée spécifiquement contre une famille allélique ne protège pas contre la seconde famille allélique et suggèrent de compléter le vaccin avec une protéine recombinante représentant la deuxième famille allélique de MSP2 ce qui devrait améliorer son efficacité [9].

3.6.3.4. Protéine-3 à la surface du mérozoïte (MSP-3)

Le MSP3 est une protéine du stade sanguin qui joue un rôle dans la croissance de *P. falciparum*. Sa structure n'est pas totalement élucidée, sa masse est d'environ 45 kDa et ne possède pas d'ancrage GPI ni de domaine transmembranaire. Elle est composée d'une partie C-terminale relativement conservée, possédant néanmoins des domaines « leucine zipper like » variables responsables de la dimérisation de la protéine [11]. La partie N-terminale est une région hautement polymorphe contenant 3 motifs « heptad » répétés riches en alanine. Ces motifs sont une association de 7 acides aminés H P P H C P C (H : acide aminé hydrophobe, P : acide aminé hydrophile et C : acide aminé chargé). La plupart des polymorphismes de séquence sont localisés au niveau de ces régions qui sont présumées exposées à la réponse immune [64, 65].

Les immunisations chez le singe avec des protéines recombinantes MSP3 entières entraînent une protection contre les formes graves du paludisme [66] , mais aussi permet

de contrôler partiellement la parasitémie chez les singes « *Saimiri sciureus* » avec différentes combinaisons de fragments de la région conservée de MSP3/adjuvant [11, 66]. Cependant, l'immunisation de souris et de lapins par la protéine complète ou par la partie N-terminale (24 kDa) ne semble pas inhiber l'invasion du mérozoïte ni le développement intra-érythrocytaire, mais réduit la croissance parasitaire *in-vitro*.

Chez l'homme, les essais vaccinaux réalisés sur la partie C-terminale conservée de MSP3 ne semblent pas stimuler la réponse humorale après immunisation [67]. Par contre, la corrélation entre la production des anticorps spécifiques des régions conservées de MSP3/GLURP et la protection contre les formes cliniques a été rapportée en Asie du sud et que les anticorps cytophiles produits contre les régions conservées de MSP3 et GLURP étaient corrélés à cette protection [11]. Partant des observations, la réponse humorale contre la partie conservée de MSP3/GLURP semble prometteuse.

3.6.3.5. Antigène d'adhésion Erythrocytaire 175

L'*Erythrocyte Binding Antigen 175* (EBA175) est un ligand pour l'invasion des mérozoïtes dans les érythrocytes humains [68]. EBA175 est une protéine de *P. falciparum* de 175 kDa, située dans le micronème à l'extrémité apicale des mérozoïtes. L'antigène se lie aux résidus d'acide sialique sur la glycophorine A pour faciliter l'entrée dans l'érythrocyte [68, 69]. Le domaine de liaison aux récepteurs de l'EBA175 a été localisé à l'extrémité N-terminale riche en cystéine, appelé région RII [68, 70]. Cette région hautement conservée parmi plus de 30 isolats de laboratoire a été établie comme un candidat vaccin [71]. Elle se compose de deux régions (F1 et F2) qui sont riches en cystéine. Ces deux régions (F1 et F2) sont homologues à la protéine de liaison Duffy de *P. vivax* et sont donc appelés les domaines *Duffy binding-like* (DBL) [68]. Les domaines DBL (F1 et F2) sont propres aux *Plasmodium* et constituent donc une bonne cible thérapeutique [68]. La région F2 est plus particulièrement concernée par la liaison aux récepteurs. Il a été démontré que les anticorps dirigés contre F2 bloquent l'invasion des globules rouges par *P. falciparum in-vitro* en inhibant sa liaison à l'acide sialique sur le domaine de mucine de la glycophorine A [70].

Les études menées sur cet antigène ont rapporté des taux élevés des anticorps protégeant contre le paludisme symptomatique et la parasitémie élevée, mais pas sur le

risque de réinfection [45]. Ces anticorps étaient composés essentiellement des sous-classes IgG1 et IgG3, reflétant ainsi les caractéristiques structurales des régions spécifiques de ces protéines. Aux vues de ces résultats, L'EBA-175 semble être une cible importante de l'immunité protectrice acquise et constitue un potentiel en tant que candidats vaccins.

3.6.3.6. Protéine riche en acide glutamique (GLURP)

La GLURP est une protéine de 220 kDa exprimée lors du stade schizonte hépatique et à la surface du mérozoïte érythrocytaire [72]. Elle est constituée d'une région N-terminale ayant une diversité limitée nommée R0 et de 2 régions répétées polymorphes annotées R1 et R2 [73].

Les études post-immunisation avec la GLURP27-500, ont montré un contrôle partiel de la parasitémie mais aussi sur les formes cliniques du paludisme [74]. Les anticorps spécifiques des régions R0 ou R2 purifiés à partir d'un pool de sérum d'adultes n'ont pas d'effet inhibiteur direct sur l'invasion mais inhibent la croissance parasitaire *in-vitro* en collaboration avec les monocytes, et que les IgG spécifiques de la région R2 ont un effet inhibiteur plus important que celle de la région R0 [51]. L'association entre les anticorps de type IgG2 et IgG3 spécifiques de la région R0, d'IgG3 spécifiques de la région R2 d'anti-GLURP et la protection clinique a été établi dans les études cliniques [75]. Les anticorps produits après l'immunisation des volontaires avec un long peptide synthétique dérivé de la région R0 sont principalement les IgG1 qui inhibent la croissance parasitaire *in-vitro* en coopération avec des monocytes [76]. Ces résultats semblent particulièrement prometteurs dans le cadre de la recherche vaccinale utilisant cet antigène.

3.6.3.7. Protéine 12 de l'extrémité de rhoptrie de *P. falciparum*

La protéine 12 de l'extrémité de Rhoptrie de *P. falciparum* (*PfRON12*) est un antigène du stade sanguin qui joue un rôle clé au cours de l'invasion érythrocytaire par *P. falciparum*. La *PfRON12* a été récemment décrite comme une protéine spécifiquement exprimée dans les schizontes et localisée dans le col de rhoptrie des mérozoïtes [77]. Les protéines recouvrant la surface du mérozoïte du *Plasmodium* et sécrétées par ses organites apicaux sont considérées comme des candidats vaccins prometteurs contre les stades sanguins du *Plasmodium* [78].

Les apicomplexes, y compris le *Plasmodium*, sont caractérisées par la conservation de trois organites sécrétoires apicaux : les micronèmes, les rhoptries et les granules denses, qui sont nécessaires pour l'infection de nouvelles cellules hôtes. Dans le *Plasmodium*, les micronèmes existent dans toutes les formes de parasites invasifs, les mérozoïtes, les ookinètes et les sporozoïtes, mais les rhoptries ne se rencontrent que dans les mérozoïtes et les sporozoïtes qui envahissent les cellules hôtes avec la formation concomitante d'une vacuole parasitophore [15, 79]. Les rhoptries chez les mérozoïtes sont composées de deux régions distinctes, un canal apical connu sous le nom de rhoptrie (le cou) et un corps plus grand en forme de bulbe. Chaque compartiment contient un constituant protéique distinct. Cette protéine a été signalée comme essentielle à la survie du parasite au stade sanguin dans les conditions expérimentales [15]. La capacité des anticorps anti-PfRON12 à inhiber l'invasion des parasites dans les érythrocytes est dose dépendante [14].

Le micronème sécrète les protéines établissant des interactions avec les récepteurs de la cellule hôte et induisent l'exocytose de l'organite de rhoptrie, les protéines de rhoptrie sont impliquées dans l'invasion des cellules cibles ainsi que dans la formation de la vacuole parasitophore dans laquelle les parasites résident pendant le développement dans la cellule hôte. Dans les mérozoïtes du *Plasmodium*, la protéine de cou de rhoptrie, le complexe (RON) se compose de RON2, RON4 et RON5 et interagit avec l'antigène 1 de la membrane apicale (AMA1) en tant que structure critique de la jonction en mouvement invasion [14]. La PfRON12 est connue pour sa localisation dans le cou de rhoptrie des mérozoïtes, mais sa fonction reste obscure. Les rôles des protéines RON sont en grande partie inconnus chez les sporozoïtes, la deuxième forme invasive de *Plasmodium* qui possède une structure sécrétoire à extrémité apicale conservée.

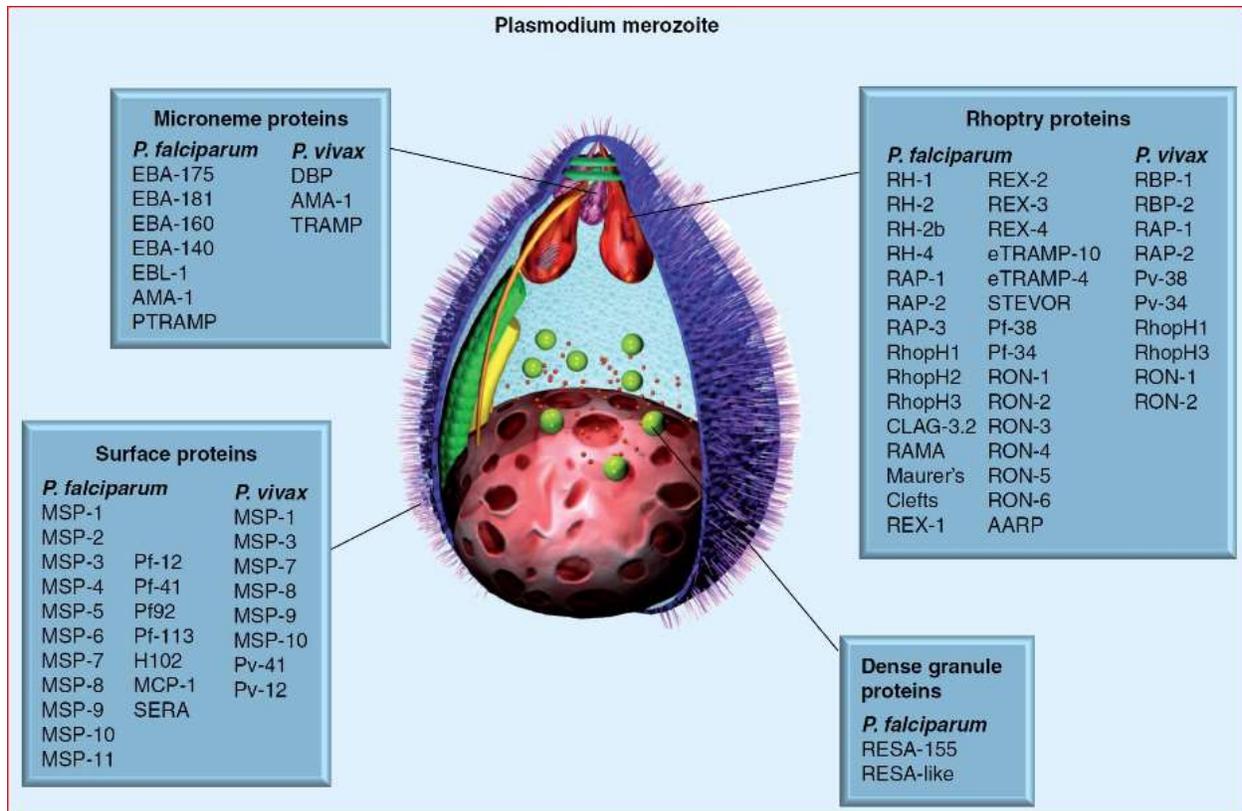


Figure 2. Antigènes du *Plasmodium falciparum*

Source : <https://www.miguelprudencio.com/Plasmodium%20merozoite-4.jpg> (consulté le 22 avril 2019)

3.6.4. Immunité cellulaire

Les cellules T CD4⁺ (T helper) et les T CD8⁺ (T cytotoxiques) interviennent dans l'immunité anti-palustre. Il est actuellement établi que les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ reconnaissent des peptides antigéniques du *Plasmodium* présentés respectivement par les molécules du CMH classe II et Classe I exprimés à la surface des hépatocytes infectés [80]. Les lymphocytes T CD4⁺ peuvent par le biais des cytokines activer les cellules T cytotoxiques contre les hépatocytes infectés. Ils sont essentiels à la protection contre les formes asexuées sanguines du *Plasmodium* chez l'homme. La vaccination avec les sporozoïtes atténués a prouvé que les cellules T cytotoxiques infiltraient le foie et pouvaient intervenir dans la destruction des hépatocytes infectés par le *Plasmodium* [81].

Les lymphocytes T cytotoxiques sont responsables de la cytotoxicité sur l'hépatocyte infecté exprimant l'antigène parasite en surface par l'intermédiaire du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I. L'immunité anti-sporozoïte comme l'immunité anti-mérozoïte pourrait agir indirectement sur le parasite et sur sa cellule hôte, respectivement au début et à la fin du développement du schizonte, au moment où les antigènes spécifiques de ces stades sont exprimés par l'hépatocyte infecté : sécrétion de cytokines, particulièrement l'interféron gamma (IFN- γ) et l'interleukine 6 (IL-6).

3.7. Diagnostic biologique du paludisme

La goutte épaisse et le frottis mince sanguin sont les deux examens de référence permettant la mise en évidence du parasite dans le sang au microscope. Ces techniques permettent le repérage rapide du *Plasmodium* dans le sang, la quantification de la charge parasitaire et la détermination de l'espèce plasmodiale.

Les tests de diagnostic rapide immunochromatographiques sont utilisés aussi pour le diagnostic du paludisme. Le principe de ces tests consiste à détecter les protéines spécifiques de *Plasmodium* (HRP-2) ou enzymes (pLDH, aldolase), en chromatographie sur un support solide. Actuellement, la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) s'affirme comme une technique plus prometteuse utilisée surtout dans le domaine de la recherche. Elle est la plus sensible et permet de détecter de très faible parasitémie.

Le diagnostic biologique ou diagnostic de certitude vient confirmer le diagnostic clinique. Il existe deux types d'examen biologiques utilisés au Mali (i) la microscopie (GE/FM) et (ii) le Test de Diagnostic Rapide (TDR).

Tout cas suspect de paludisme doit être systématiquement confirmé par TDR ou GE/FM avant un traitement. Cette confirmation se fera à tous les niveaux (du site du centre de santé jusqu'au niveau hôpital).

3.8. Prise en charge du paludisme

3.8.1. Actions préventives

Les mesures préventives visent à protéger soit contre l'infection, soit contre le développement de la maladie chez les personnes infectées. Il n'existe actuellement

aucun vaccin autorisé sur le marché contre le paludisme, mais un essai vaccinal contre *P. falciparum* est en cours d'évaluation en Afrique sub-saharienne. Ce candidat vaccin, connu sous le nom de RTS, S/AS01, est en bonne voie selon l'OMS. En 2015, l'Agence européenne du médicament a donné un avis favorable pour la poursuite des études sur ce vaccin RTS, S/AS01 (Mosquirix®) en Afrique, qui est un vaccin contre le paludisme et l'hépatite virale B, le « S » situé après la virgule désignant l'antigène HBs. L'OMS a confirmé en 2016 que le vaccin RTS, S/AS01 sera déployé en Afrique subsaharienne, dans le cadre de projets pilotes dès 2018. Toutefois, ce vaccin n'étant que partiellement efficace viendra renforcer les mesures de prévention, de diagnostic et de traitement recommandées par l'OMS, auxquelles il ne se substituera pas [82].

Les différentes stratégies de prévention mise en œuvre au Mali selon les recommandations de l'OMS et du Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) sont la lutte antivectorielle (utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides, l'utilisation de biolarvicides pour la destruction des gîtes larvaires ; la pulvérisation intradomiciliaire), le Traitement Préventif Intermittent (TPI) avec la Sulfadoxine-Pyriméthamine au cours des consultations prénatales ; la Chimio-prévention du paludisme saisonnier chez les enfants de 3 à 59 mois qui consiste à administrer quatre doses de SP et Amodiaquine (AQ) à un mois d'intervalle au cours de la période de haute transmission [1].

3.8.2. Action curative

Pour le traitement curatif du paludisme simple, l'utilisation des Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA) est recommandée par l'OMS depuis 2004. Au Mali, le traitement du paludisme est gratuit pour les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes. En cas d'accès palustre simple, l'association l'artéméther-luméfántrine (Coartem®) ou l'association artésunate-amodiaquine (ASAQ®) sont recommandées par le PNL.

Le paludisme simple se caractérise essentiellement par une fièvre (température axillaire \geq à 37,5°C) ou antécédent de fièvre avec souvent des maux de tête, des douleurs musculaires, de la faiblesse articulaire, des troubles digestifs, des frissons et des

courbatures, confirmés par un examen biologique (TDR ou GE/FM positif). Le paludisme simple se traite efficacement par voie orale. Les traitements les plus efficaces aujourd'hui sont les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA). Ils permettent de traiter efficacement le paludisme simple en 3 jours.

Au Mali, le paludisme simple est traité avec l'association l'Artéméther + Luméfantrine (Coartem[®]) et l'association artésunate + amodiaquine (ASAQ[®]). Pour les enfants de 2 mois à 6 ans (5 kg à 24 kg) les comprimés dispersibles sont utilisés.

Le paludisme grave se caractérise par une confirmation biologique (TDR ou GE/FM positif) avec la présence de *P. falciparum* associé à l'une ou plusieurs des manifestations cliniques : Troubles de la conscience ou coma, Prostration (incapable de marcher ou de s'asseoir sans assistance, Convulsions multiples (Deux ou plus dans les 24 heures), Détresse respiratoire (acidose), etc.) et /ou biologiques (Hypoglycémie (glycémie < 2,2 mmol/l ou 0,4g/l), Acidose métabolique (bicarbonates plasmatiques <15 mmol/l), Anémie sévère ou pâleur extrême (Hb < 5 g/dl ou hématocrite < 15%), Hyperparasitémie (>100 000/ μ l), etc.).

Au Mali, le paludisme grave se traite avec (i) l'artésunate injectable, (ii) l'artéméther injectable, ou (iii) Quinine injectable. Il faut passer à la voie orale dès que l'état du patient le permet.

D'autres médicaments (antipyrétiques, anticonvulsivants, etc.) seront donnés en fonction des manifestations cliniques comme la fièvre, les convulsions et l'hypoglycémie.

4. Méthodologie

4.1. Cadre d'étude

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB) et les instituts nationaux de la santé des Etats-Unis d'Amérique (NIAID/NIH) sur un projet de recherche sur le paludisme au Mali.

4.2. Lieu d'étude

4.2.1. Situation géographique

L'étude s'est déroulée dans le village de Kéniéroba, dans la commune rurale de Bancoumana (cercle de Kati). La commune de Bancoumana est située à 55 km à l'ouest de Bamako sur la route nationale 15 (RN15) dans la zone soudano-guinéenne. Elle est limitée au nord par celle de Siby, à l'est par la commune rurale du Mandé, au sud-ouest par la commune rurale du Minindian et au sud-est le fleuve Djoliba qui la sépare des communes de Niagadina et de Kourouba. C'est une zone d'endémie palustre où la transmission saisonnière est intense et longue allant de juin à décembre. Il existe un partenariat depuis 1993 entre le Centre de Recherche et de Formation sur le Paludisme (MRTC) et la commune rurale de Bancoumana dans le cadre de la recherche biomédicale de façon générale.

Notre village d'étude, Kéniéroba est situé au sud-ouest de Bamako, à 65 km sur la route RN15 de Kangaba (figures 2 et 3). Refondé par Maré Famissa KEITA après son déclin pendant le règne de Samory Touré, qui fit réunir ses frères dispersés sur la terre de leurs ancêtres d'où le nom de Kéniéroba. Il est limité au sud-est par le hameau de pêche Fourda, au nord par le village de Nanguilabougou et à l'ouest par le village de Ticko. Il compte environ 2 593 habitants, qui sont essentiellement des Malinkés (90%), des Peulhs (6%) et des Bambaras (4% ; recensement MRTC/FMPOS 2014).

4.2.2. Végétation/hydrographie/climat

Le village de Kéniéroba est situé le long du fleuve Niger (Djoliba) qui constitue le principal réseau hydrographique. La couverture végétale originale rencontrée sous un climat soudano-guinéen marque la transition entre la savane arborée et la forêt guinéenne. Ce type de végétation existe encore à l'état délictuel au niveau des bois sacrés et le long du fleuve Niger par endroit.

Les feux de brousse, l'exploitation du bois de chauffage, les défrichements nécessaires aux cultures vivrières ont profondément dégradé cette végétation, devenant propice à l'implantation des moustiques. La savane arborée constitue la principale formation végétale mais aussi quelques galeries forestières, on distingue :

- Une strate arborée avec les espèces telles que *Bombax costatum* (kapokier), *Vitellaria paradoxa* C.F. Gaertn. (Karité), *Parkia biglobosa* Jacq. (Néré), *Tamarindus indica* L. (tamarinier), *Mangifera indica* L. (manguier) ;
- Une strate arbustive composée de *Combretum micranthum* G. Don (Kinkeliba) ; *Guieras senegalensis* JF. Gmel (N'kundiè en bambara), *Cassia sieberiana* DC (case de sieber, sindja (Pular));
- Une strate herbacée ou savane de graminées dont *Cymbopogon giganteus* Chiov. (Tièkala ou Citronnelle de brousse), *Pennisetum pedicellatum* Trinet *Andropogon* sp (Ouaga ou paille à balai) ;
- Une galerie forestière caractéristique de la savane guinéenne se forme le long du fleuve Niger.
-

Le village de Kéniéroba est situé dans une zone climatique soudano-guinéenne. Deux grandes saisons se succèdent dans cette zone : la saison des pluies de juin à octobre et la saison sèche de novembre à mai. Une courte saison de transition s'étalant de novembre à janvier que les communautés rurales désignent sous l'appellation vernaculaire de fôbônda qui se caractérise par un rafraîchissement des vents des côtes et redoutée par la population.

L'habitat de type traditionnel est constitué de cases rondes et rectangulaires en terre battue et aux toitures en chaumes coniques, mais des maisons avec des toitures en tôle existent de plus en plus dans le village. Ces différents types de maisons propices au repos des moustiques, favorisent une densité et une agressivité anophélienne élevées. L'environnement physique des villages est propice à la transmission du paludisme. Les villages sont situés dans une grande plaine qui s'étend jusqu'au fleuve Niger. La plaine présente de nombreuses retenues d'eau pendant la saison des pluies. C'est une plaine de riziculture. Les retenues d'eau avec des crevasses naturelles du sol peuvent être des gîtes larvaires potentiels. Pendant la saison des pluies, il existe des cultures intra domiciliaires et une prolifération d'herbes sauvages dans le village, contribuant ainsi à augmenter la densité et l'agressivité des moustiques.

La température la plus élevée se situe à - 40°C au mois de mai et la plus basse est voisine de 18°C aux mois de décembre-janvier. La température moyenne annuelle est autour de 23°C. D'une manière générale, le climat y est assez agréable et la végétation est luxuriante.

La faune entomologique est constituée d'invertébrés et d'arthropodes. *Anophèles gambiae sl* et *An. funestus* abondent dans le village où ils assurent la transmission du paludisme et de la filariose de Bancrofti surtout en saison des pluies. Les simulis transmettent l'onchocercose durant l'hivernage tandis que les glossines (mouche tsé-tsé) transmettent la maladie du sommeil. *Anophèles gambiae sl* est le vecteur majeur du paludisme rencontré dans la zone d'étude.

4.2.3. Infrastructures socio-sanitaires

La commune de Bancoumana dispose :

- Dans le domaine de l'éducation
 - Dix (10) écoles publiques dont 4 seconds cycles
 - Trois (03) écoles communautaires
 - Sept (07) medersas communautaires

- Dix Huit (18) centres d’alphabétisation.
- Dans le domaine de la santé
 - Quatre (04) dispensaires (Kéniéroba, Djiguidala, Ouoronina et Niamé)
 - Cinq (05) maternités
 - Huit (08) dépôts pharmaceutiques
 - Un (01) CSCom (centre de santé communautaire) : celui de Bancoumana
 - Une pharmacie (Officine privée)

4.2.4. Activités socio-économiques et culturelles

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

L’agriculture constitue la principale activité économique des populations. La plaine de Bancoumana est propice aux cultures vivrières et industrielles. Aux abords du village, dans les retenues d’eau (deux digues), la culture du riz (*Oryza sativa L.*, *O. glaberrima S.*) est très développée. Celle du sorgho (*Sorghum vulgare J.et Sorgho commun*), du mil (*Pennisetum glaucum Stapf. & Hubb*), du maïs (*Zea mays L.*), du haricot (*Vigna unguiculata L.*), du papaye (*Carica papaya L. ou Melon des Tropiques*), de l’orange (*Citrus sinensis L.*) et du citron (*Citrus limonum RISSO.*) a lieu surtout dans les alentours des concessions ou dans des jardins. La culture du dah (*Hibiscus sabdariffa L ou Oseille de Guinée, également appelé Bissap ou Roselle*), du coton (*Gossypium barbadense L. ou cotonnier créole*), de l’arachide (*Arachis hypogaea L.*) ou cacahuète.), de la courge (*Cucurbita pepo L.*), du melon (*Cucumis melo L.*), de concombre (*Cucumis sativus L.*) de l’oignon (*Allium cepa L.*), de la patate douce (*Ipomoea batatas L.*), de la pomme de terre (*Solanum tuberosum L.*), du piment (*Pimenta officinalis Lindl.*), de la poivre de guinée (*Capsicum annum L.*), du tabac (*Nicotiana tabacum L.*), du cotonnier (*Gossypium herbaceum L.*), du sésame (*Sesamum indicum L.*), de la tomate (*Solanum lycopersicum L.*), de la banane (*Musa paradisiaca L.*) ainsi que d’autres produits maraîchers constituent d’importantes sources de revenu pour la population. La taille des exploitations est très

variable et dépend de la capacité de travail potentiel de la famille ainsi que du patrimoine foncier.

L'élevage des ovins, des caprins et des bovins y est pratiqué comme une activité économique secondaire. On y retrouve aussi quelques équidés (ânes et chevaux) utilisés comme animaux de trait. La plupart des villageois thésaurisent leurs revenus dans l'élevage et dans les cultures industrielles.

L'artisanat local est peu développé (cordonnerie, forgerie, maçonnerie, poterie). En dehors de la commercialisation des produits agricoles, le commerce des produits de consommation courante y est pratiqué surtout le jour de la foire hebdomadaire qui a lieu chaque jeudi à Kéniéroba.

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

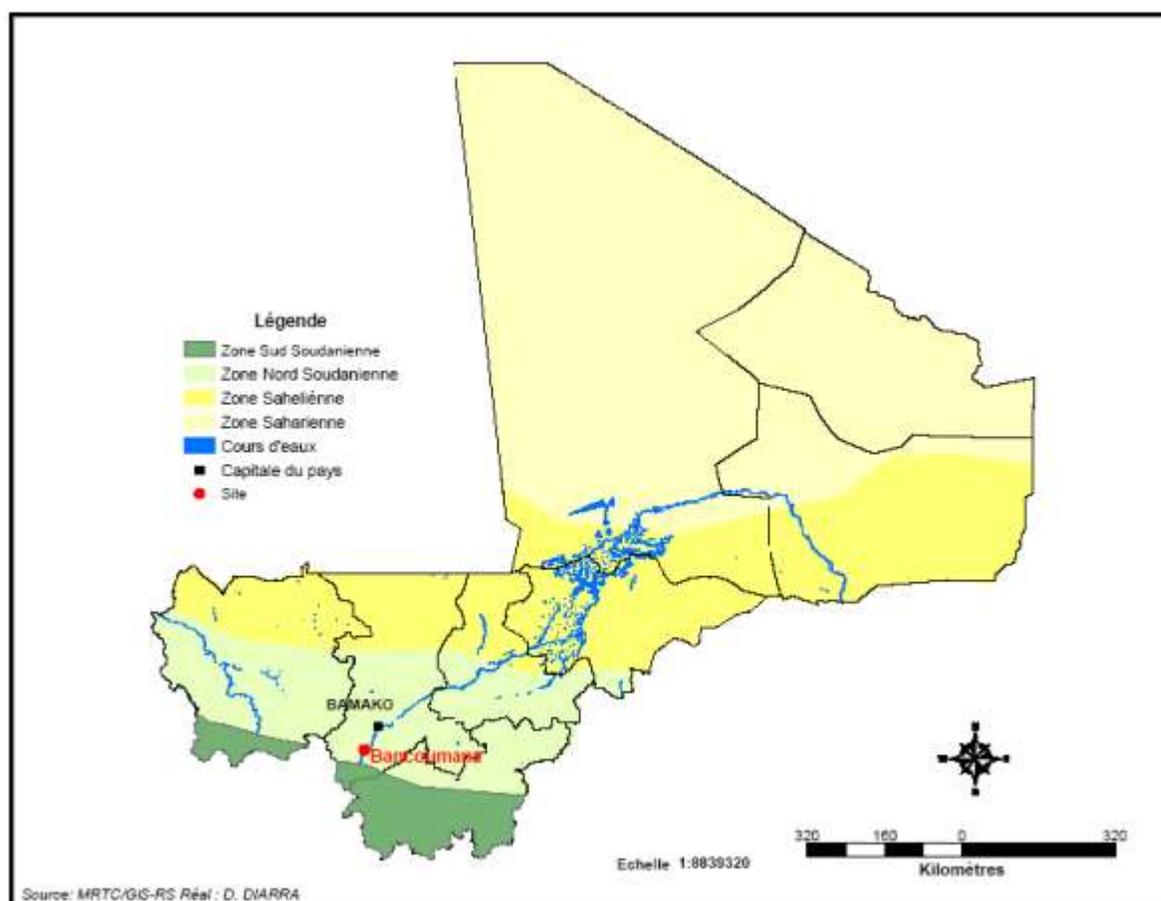
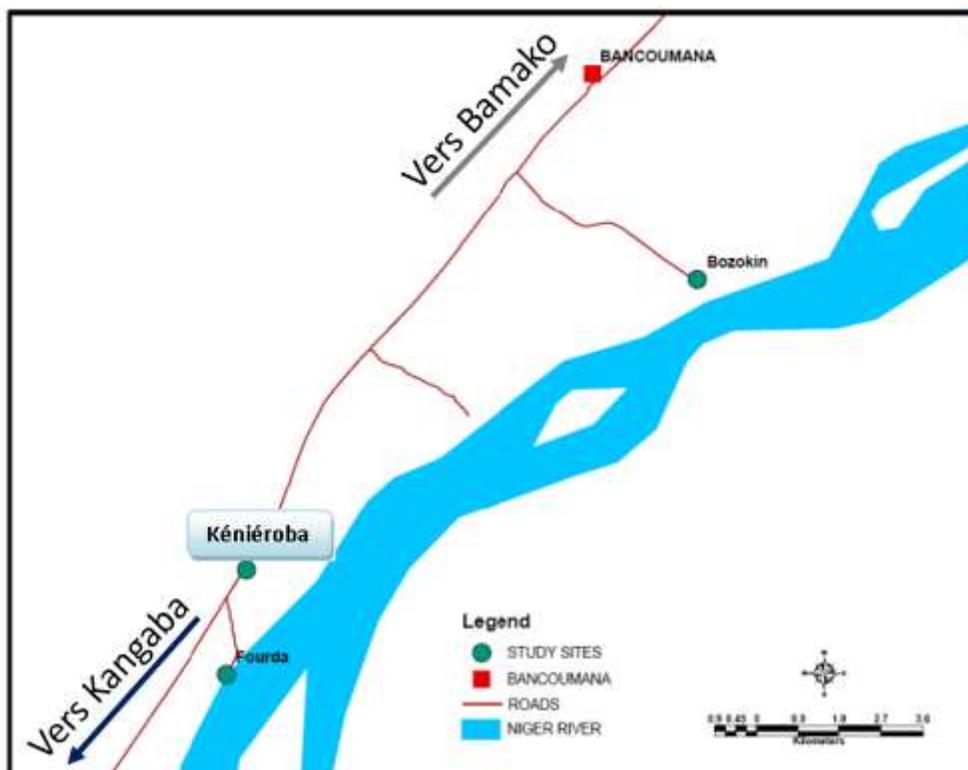


Figure 3: carte du Mali avec la situation du village de Bancoumana



Source : Unité GIS MRTC/FMPOS

Figure 4 : situation du village de Kéniéroba dans la commune rurale de Bancoumana

4.3. Période et type d'étude

Nous avons mené une étude transversale qui consistait à collecter les données chez les enfants en janvier 2011 au sein d'une cohorte d'étude dont le suivi a commencé depuis 2008.

4.4. Population et échantillonnage

La population d'étude était constituée par tous les enfants inclus dans la grande cohorte dont le suivi a commencé en mai 2008. L'échantillonnage a été fait au hasard, une sélection des enfants âgés de 3 à 12 ans a été faite pour constituer notre échantillon chez qui les informations ont été collectées (n=169). Les échantillons de sérum ont été

collectés aussi dans deux zones d'endémie palustre de Thaïlande et ont été utilisés pour la comparaison avec les échantillons du Mali afin d'avoir une idée générale sur la réponse immunitaire dans des populations différentes.

4.4.1. Critères d'inclusion

- accepter de participer
- avoir le consentement libre et éclairé des parents/tuteurs ;
- avoir un âge entre 3 et 12 ans pour les enfants ;
- résider à Kéniéroba ;
- avoir un taux d'hémoglobine ≥ 8 g/dl.

4.4.2. Critères de non-inclusion

- refus de participer à l'étude ;
- maladie chronique connue (hémophilie, maladie psychiatrique etc...)

4.5. Collecte et traitement des échantillons de recherche

Après avoir obtenu le consentement des participants (auprès des parents/tuteurs pour les enfants), chaque participant a bénéficié de l'examen clinique suivi d'un prélèvement capillaire au bout du doigt pour déterminer le taux d'hémoglobine et la parasitémie. Ensuite, un prélèvement veineux était effectué dans le tube avec héparine. Les échantillons de sang étaient acheminés au laboratoire à Bamako immédiatement après le prélèvement. Les tubes étaient transvasés sous hotte dans d'autres tubes pour la centrifugation. Le plasma était collecté dans des cryotubes stériles de 1,8 ml et conservés ensuite dans le congélateur à -80°C avant les tests. Les prélèvements et le traitement des échantillons ont été effectués selon les bonnes pratiques cliniques et de laboratoire.

4.6. Variables mesurées

Au cours de notre étude, nous avons mesuré les variables suivantes :

- sociodémographique : âge,
- parasitologique : parasitémie,

- immunologique : taux d'anticorps IgG et IgM, taux des cytokines IL-2 IL-6, IL4, IL-10, INF- γ et TNF- α ;
- hématologique : plaquettes, globules rouges, l'hématocrite, l'hémoglobine

4.7. Techniques de laboratoire utilisées

4.7.1. Détermination du taux d'hémoglobine par l'appareil HemoCue Hb201+

C'est une technique qui permet de doser le taux d'Hb dont le principe est basé sur une réaction modifiée de formation d'azoture de méthémoglobine. Les érythrocytes sont hémolysés pour libérer l'hémoglobine. L'hémoglobine est convertie en méthémoglobine, laquelle réagit avec de l'azoture pour donner de l'azoture de méthémoglobine dont l'absorbance est mesurée dans l'analyseur. Cette absorbance est directement proportionnelle à la concentration de l'Hb. La lecture se fait directement sur l'appareil HemoCue® (cf. annexe1)

4.7.2. Goutte épaisse

C'est une technique de concentration permettant un repérage rapide des parasites dans le sang et l'identification des différentes espèces (frottis sanguin ;cf. annexe 2).

4.7.3. Technique d'ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*)

La technique d'ELISA a été réalisée selon la procédure standard normalisée (SOP, *Standard Operating Procedure*) de NIAID/NIH. Le principe de cette technique consiste à détecter la présence d'un anticorps ou d'un antigène dans un échantillon en utilisant une enzyme et un lecteur de plaque d'ELISA. Tous les échantillons de plasma ont été testés contre l'antigène PfRON12. Les séropositivités ont été déterminées par le seuil de la moyenne + 2 écarts-types des valeurs de DO par rapport à PfRON12 des sérums des sujets naïfs.

La capacité des anticorps anti-PfRON12 à inhiber l'invasion parasitaire des érythrocytes a été testée dans un test d'inhibition de croissance (GIA) à cycle unique. Les anticorps anti-EBA175 région 3-5 et anti-GST ont été utilisés, respectivement, comme témoins

positifs et négatifs. L'antigène PfRON a été fourni par nos partenaires du NIH et qui nous ont assistés dans la réalisation de la technique d'ELISA et le dosage des anticorps dans leur laboratoire. Comme les taux d'anticorps n'étaient pas normalement distribués, des tests non paramétriques ont été utilisés. La corrélation de Spearman a été appliquée pour évaluer l'association entre les taux d'anticorps et les paramètres suivants : âge, parasitémie, plaquettes, GR, hémocrite, hémoglobine, IL-6, IL-2, IL-10, IL-4, TNF et IFN- γ . Les anticorps IgG et IgM acquis naturellement contre rPfRON12 ont été mesurés dans les échantillons de sérum par dosage immuno-enzymatique direct (ELISA ; cf. annexe 3).

4.7.4. Mesure des taux de cytokines

Les taux sériques des cytokines IL-6, IL-10, IFN- γ et TNF ont été quantifiés par cytométrie de flux en utilisant le BD IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF Human Flex Set (BD Bioscience Pharmingen, San Diego, Ca, USA) selon les instructions fournies par le fabricant. Ces analyses ont été faites au LMVR avec l'aide de nos collaborateurs américains.

Les analyses de données ont été réalisées à l'aide du logiciel FACSDiva (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Les concentrations de cytokines dans chaque échantillon ont été déterminées à partir de courbes standard. Les concentrations plasmatiques de cytokines pour chaque échantillon ont été extrapolées à partir de la courbe standard et les données ont été exprimées en pg/mL.

4.7.5. Caractérisation et localisation du PfRON12 (Figure 7)

Le PfRON12 recombinant a été exprimé avec succès dans les cellules STAR d'*E. coli* comme protéine de fusion GST. La pureté et la qualité de la protéine recombinante ont été vérifiées par SDS-PAGE, qui a révélé une seule bande d'environ 56 kDa. La protéine recombinante générée (rPfRON12) a été reconnue par le plasma de patients infectés par *P. falciparum*, confirmant son immuno-réactivité. Ces analyses ont été faites avec nos collaborateurs japonais.

Pour caractériser PfRON12, nous avons d'abord généré un PfRON12 recombinant fusionné à la GST comme décrit [8]. Brièvement, un fragment codant pour PfRON12 mais

dépourvu du peptide signal (PF3D7_1017100 : positions des acides aminés [aa] 26-310) a été amplifié par PCR à partir d'ADNc obtenu à partir de schizonte *P. falciparum* 3D7 en utilisant une amorce de détection avec le site XhoI et une amorce antisens avec le site NotI (PfRON12-F1 : 5'-ctcgagAAGACACAACA AAAAAAATGAAGGAATTATTG-3', PfRON12-R1 : 5'- gcggccggcCTAT TCTTGTGTTAAATCGGGAAACGTTCTC-3'). Le fragment d'ADN amplifié a été cloné dans le plasmide pEU-E01-GST-TEV-MCS-N2 (CellFree Sciences, Matsuyama, Japon) et GST-PfRON12 a été exprimé en utilisant le système de traduction sans germes de blé (CellFree Sciences). Le GST-PfRON12 exprimé (Fig. 7A, pointe de flèche de la ligne 1, environ 70 kDa) a été purifié par affinité à l'aide de la colonne Glutathion-Sepharose 4B (GE Healthcare, Camarillo, CA, USA) et, la fraction PfRON12 purifiée a été éluée par clivage sur colonne avec la protéase AcTEV (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (Fig. 1A, flèche voie 5, environ 40 kDa).

A) l'analyse SDS-PAGE des protéines exprimées par le système sans cellules germinales du blé, **B)** Analyses par transfert Western Blot utilisant des antisérums contre PfRON12, **C)** Localisation sous-cellulaire de PfRON12 dans les schizontes et les mérozoïtes libres par immunofluorescence indirecte **D)** Localisation sous-cellulaire de PfRON12 dans le mérozoïte de *P. falciparum* au stade schizontale par immunomicroscopie électronique.

4.7.6. Numération formule sanguine

La numération formule sanguine est faite au moyen d'une simple prise de sang, puis l'analyse est effectuée par un automate qui mesure les différents paramètres.

L'appareil XT-1800i réalise l'analyse du nombre total des leucocytes en utilisant un bloc détecteur photosensible dont le fonctionnement repose sur la méthode de cytométrie de flux et l'utilisation d'un laser à semi-conducteur. Les taux d'érythrocytes et de plaquettes sont analysés par le compteur GR qui emploie la méthode de focalisation hydrodynamique. L'hémoglobine est analysée par le compteur de l'hémoglobine sur la base de la méthode spectrophotométrie. Elle fournit des résultats pour les paramètres suivants: globule rouge, hémoglobine, hématocrite, plaquette etc....

4.8. Gestion et l'analyse des données

Les données ont été enregistrées sur un formulaire de rapport de cas (CRF, *Case Report Form*). La saisie des données a été faite sur Microsoft Excel 2007 et l'analyse a été faite en utilisant le GraphPad Prism 8 et le logiciel STATA 14. Les résultats ont été présentés sous forme de figures et tableaux. Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les variables continues non paramétriques, le test de Kruskal-Wallis suivi du test de Dunn pour les comparaisons multiples et le test de Chi-carré pour le ratio de la positivité des lames entre les groupes d'âge. Le seuil de signifiante statistique a été fixé pour une valeur du $p \leq 0.05$. Pour le test d'inhibition de la croissance du parasite, le test Kruskal-Wallis et le test de comparaison multiple de Dunn ont été utilisés pour comparer le pourcentage d'inhibition par les anticorps anti-GST et anti-PfRON12 dans trois concentrations différentes d'IgG. La corrélation de Spearman a été appliquée pour évaluer l'association entre l'indice de réactivité de PfRON12 et certains indicateurs comme l'âge, la parasitémie et les paramètres ; et des réseaux de corrélation ont été créés par analyse du rapport entre chaque médiateur mesuré dans les échantillons de plasma du groupe a, b du groupe infecté et c, d du groupe non-infecté. Chaque ligne de connexion (bord) représente une interaction significative ($p < 0,05$) détectée par l'analyse du réseau à l'aide du logiciel R. La force de corrélation est représentée par la transparence et la largeur de la couleur des carreaux ou des bords. Les corrélations positives sont représentées par des carreaux/bords rouges et les corrélations négatives par des carreaux/bords bleus. Le test de Fisher a été utilisé pour comparer les réponses entre les sous-classes d'IgG.

4.9. Considérations éthiques

Cette étude découle de la grande cohorte dont le protocole de recherche a été soumis à l'approbation du comité d'éthique des Facultés de Médecine et d'Odontostomatologie et de la faculté de Pharmacie de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (cf. Lettre N°09-39/FMPOS du 11 mai 2009), ainsi qu'aux Instituts Nationaux de Santé des Etats-Unis d'Amérique.

L'autorisation communautaire a été obtenue auprès des chefs coutumiers (Chef du village, conseillers, organisations des femmes et des jeunes) ainsi que des autorités administratives et sanitaires ; le consentement individuel a été obtenu auprès des parents/tuteurs d'enfants. Une copie des fiches de consentement a été remise à chaque participant. Les activités ont été réalisées selon les bonnes pratiques de recherche clinique sur l'homme telles énoncées dans les différentes conventions internationales (déclaration d'Helsinki, Conférence internationale d'harmonisation des bonnes pratiques de recherche biomédicale, etc.).

Les investigateurs ont été tous formés sur les bonnes pratiques cliniques et de laboratoire. La confidentialité et la sécurité des données ont été assurées durant toute la période de l'étude par les investigateurs, seul le numéro d'identification individuelle était porté sur le CRF et les échantillons. En outre, l'équipe clinique a utilisé du matériel à usage unique. Les investigateurs ont veillé à la bonne gestion des déchets générés au cours de l'étude.

4.10. Déroulement de l'étude

Au début de ce projet de recherche en 2008, une autorisation a été obtenue auprès du chef de village, des chefs de famille et des autorités communautaires, administratives et sanitaires avec une l'explication détaillée du protocole de l'étude. Avant le 1^{er} passage, une explication a été donnée aux mêmes autorités, le consentement libre et éclairé a été obtenu de chaque répondant d'enfant suivi d'un examen physique. Un prélèvement capillaire au bout du doigt était ensuite effectué pour déterminer le taux d'hémoglobine et la goutte épaisse. En fonction du taux d'hémoglobine, un prélèvement veineux était fait pour le dosage du taux d'anticorps et des cytokines. Les données étaient enregistrées sur CRF comportant uniquement le numéro de participation du volontaire. Les échantillons étaient acheminés au laboratoire à Bamako pour centrifugation, et le plasma était congeler à - 80°C. Les échantillons ont été ensuite envoyés sous condition à nos partenaires du NUH/NIAID des Etats-Unis d'Amérique pour réaliser les tests nécessaires. Les échantillons provenant dans deux zones de la Thaïlande ont été utilisés comme des témoins afin d'évaluer la variabilité de la réponse à la protéine PfRON12 au cours de ce travail.

4.11. Définitions opératoires

- ✚ L'indice de réactivité était considéré comme positif si la valeur de DO est >1 , négatif si $OD < 1$ et pas de réaction si $OD=1$;
- ✚ L'anémie était définie comme un taux d'hémoglobine inférieur à 13 g/dl chez les hommes, à 12 g/dl chez les femmes et 11g/dl chez les enfants.

5. Résultats

5.1. Résultats globaux

Au total, 169 enfants ont été inclus dans cette étude. Les enfants âgés de 6-8 ans étaient majoritaires avec 39%. L'indice plasmodique était de 34,9% et l'incidence du paludisme était de 1,1 épisode/personne au cours de la saison de transmission 2010. L'indice de réactivité des IgG anti-PfRON12 était significativement plus élevé chez les individus non infectés par le *P. falciparum* comparés à ceux infectés, soit 19% contre 33%.

Les taux de cytokines IL-2 et IL-10 étaient significativement plus élevés dans les échantillons de sérum dont la réactivité était négative contre l'antigène PfRON12 ($p=0,019$; $p=0,006$, respectivement).

5.2. Résultats descriptifs et analytiques

Tableau II : répartition des enfants selon les classes d'âge dans le village de Kéniéroba en janvier 2011

Classes d'âge	Effectifs	Pourcentage
3-5 ans	40	23,7
6-8 ans	66	39,0
9-12 ans	63	37,3
Total	169	100,0

Les enfants âgés de 6-8 ans étaient majoritaires (39%) suivis par ceux de 9-12 ans (37.3%).

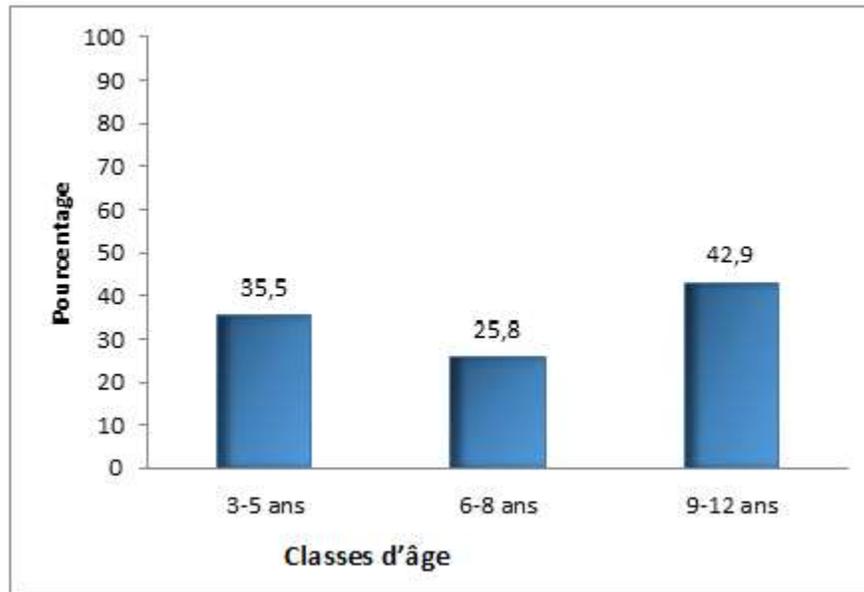


Figure 5. Prévalence de l'infection palustre en fonction des classes d'âge dans le village de Kéniéroba en janvier 2011

La prévalence de l'infection palustre était élevée chez les enfants de 9-12 ans (42,9%) comparés à ceux de 6-8 ans (25,8%) ($p > 0,05$), mais elle était similaire à la classe d'âge 3-5 ans.

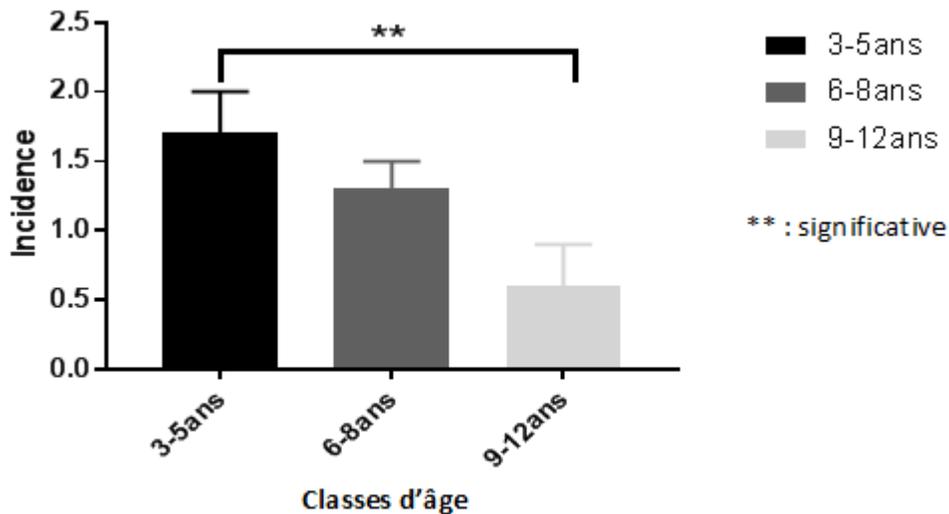


Figure 6. Incidence du paludisme en fonction des classes d'âge dans le village de Kéniéroba au cours de la saison de transmission 2010

L'incidence du paludisme était plus élevée chez les enfants de 3-5 ans comparativement à ceux de 9-12 ans ($p < 0.001$) mais elle était comparable à celle des enfants de 6-8 ans ($p > 0.05$).

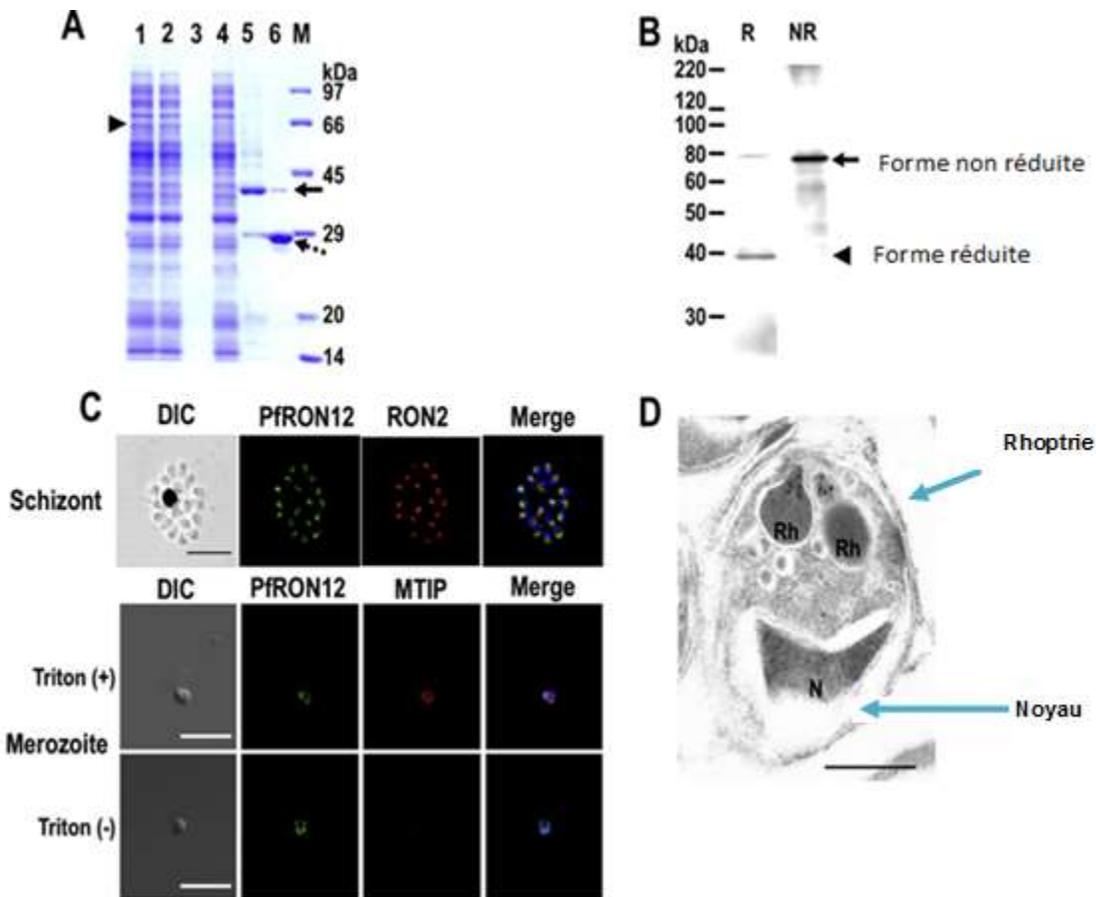


Figure 7. Localisation sous-cellulaire de PfRON12 dans les schizontes matures et les mérozoïtes libérés par un dosage immunofluorescent

A) l'analyse SDS-PAGE montre des protéines exprimées par le système sans cellules germinales du blé, **B)** Analyses par transfert Western Blot des protéines en utilisant des antisérums contre PfRON12, **C)** Localisation sous-cellulaire de PfRON12 dans les schizontes et les mérozoïtes libres par la technique immunofluorescence indirecte **D)**

Localisation sous-cellulaire de PfRON12 dans le mérozoïte de *P. falciparum* au stade schizontale par immunomicroscopie électronique.

Dans les schizontes, les signaux fluorescents de l'anti-PfRON12 ont été détectés comme un motif de ponctuation dans chaque mérozoïte en vert qui se chevauchait partiellement avec ceux de l'anti-RON2 (Fig. 7C, panneaux supérieurs). De plus, les mérozoïtes libérés et perméabilisés ont montré une distribution périphérique du PfRON12 et du MTIP (Fig. 7C, panneaux centraux). Les mérozoïtes non perméabilisés ont montré un signal négligeable du MTIP en raison de sa localisation intracellulaire (Fig. 7C, panneaux inférieurs).

Des particules d'or correspondant à la localisation PfRON12 ont été détectées sur la partie du mérozoïte située dans le col de la rhoptry et démontrent que le PfRON12 est stocké dans le col des mérozoïtes de rhoptries avant la sortie et transloqué à la surface du mérozoïte libéré (Fig. 7D).

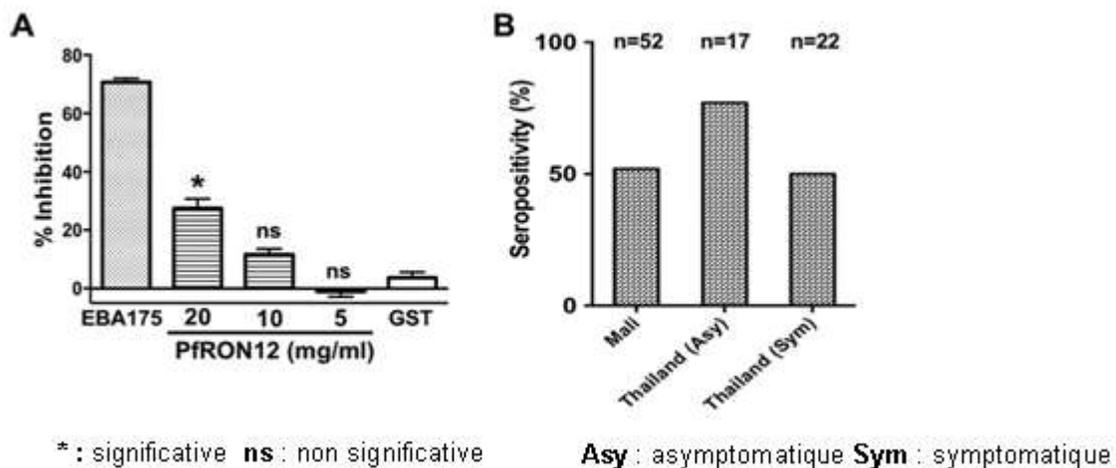


Figure 8. Activité inhibitrice d'invasion in vitro des IgG spécifiques et la séropositivité de l'antigène PfRON12 dans les échantillons de sérum testés

A) représente l'activité inhibitrice d'invasion in vitro des anticorps anti-PfRON12 de lapin. La capacité des anticorps anti-PfRON12 à inhiber l'invasion parasitaire des érythrocytes a été testée en utilisant un test GIA à cycle unique. Les anticorps anti-EBA175 région 3-5 (EBA175) et anti-GST (GST) ont été utilisés comme témoins positifs et négatifs,

respectivement. L'activité inhibitrice d'IgG spécifiques anti-PfRON12 dans l'invasion du parasite dépendait de la dose et était significativement plus élevée que celle de l'anti-GST à la dose finale de 20 mg/ml.

B) représente la séropositivité à la protéine PfRON12 des échantillons de sérums provenant des zones d'endémie palustre au Mali et en Thaïlande par la technique d'ELISA. Plus de la moitié (51,9 %) des échantillons des individus asymptomatiques provenant du Mali (n=52), 76,5 % de ceux asymptomatiques de Thaïlande (Asy : n=17) et 50 % des patients symptomatiques de Thaïlandais (Symp : n=22) ont montré une réactivité positive à la PfRON12 mais il n'y avait pas de différence statistique entre les groupes.

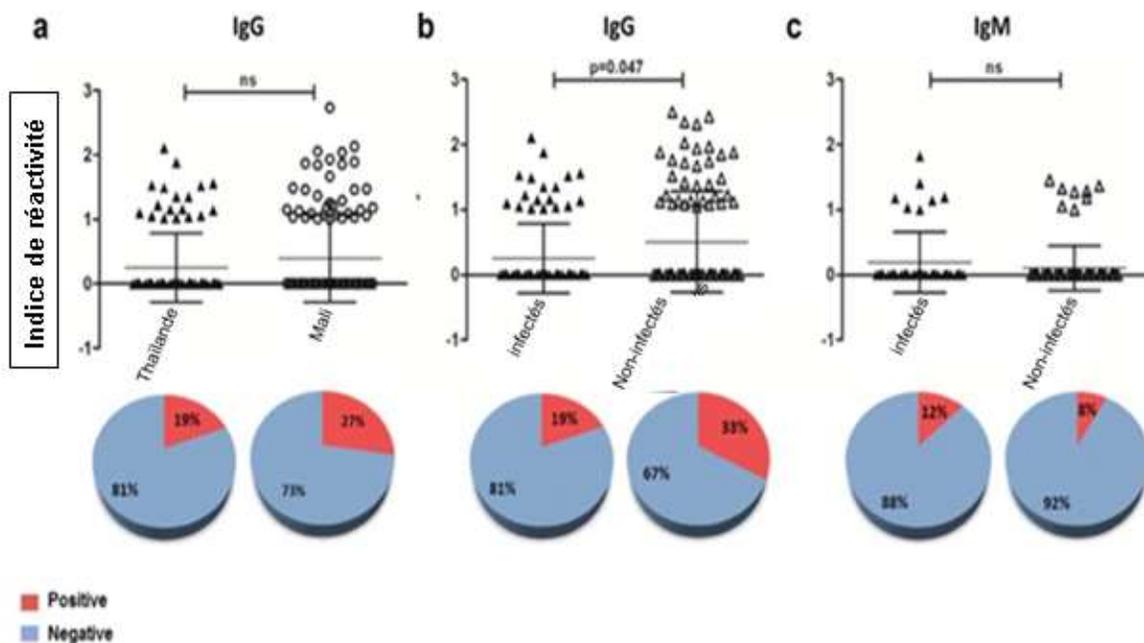


Figure 9. Influence de l'infection palustre sur l'indice de réactivité des IgG et IgM spécifiques anti-PfRON12 dans les échantillons de sérum testés

L'indice de réactivité des IgG anti-PfRON12 ne variait pas significativement en fonction des échantillons de sérum des individus infectés de Thaïlande et de Kéniéroba au Mali, soit respectivement 19% (n=93) et 27% (n =124) (Fig. 10a).

L'indice de réactivité d'IgG anti-PfRON12 était significativement plus élevé chez les individus non infectés par le *P. falciparum* comparés à ceux infectés, soit 19% (n = 93) et 33% (n=97) respectivement (Fig. 10b). Par contre, cet indice pour IgM anti-PfRON12 ne variait pas significativement en fonction de l'infection palustre (Fig. 10c).

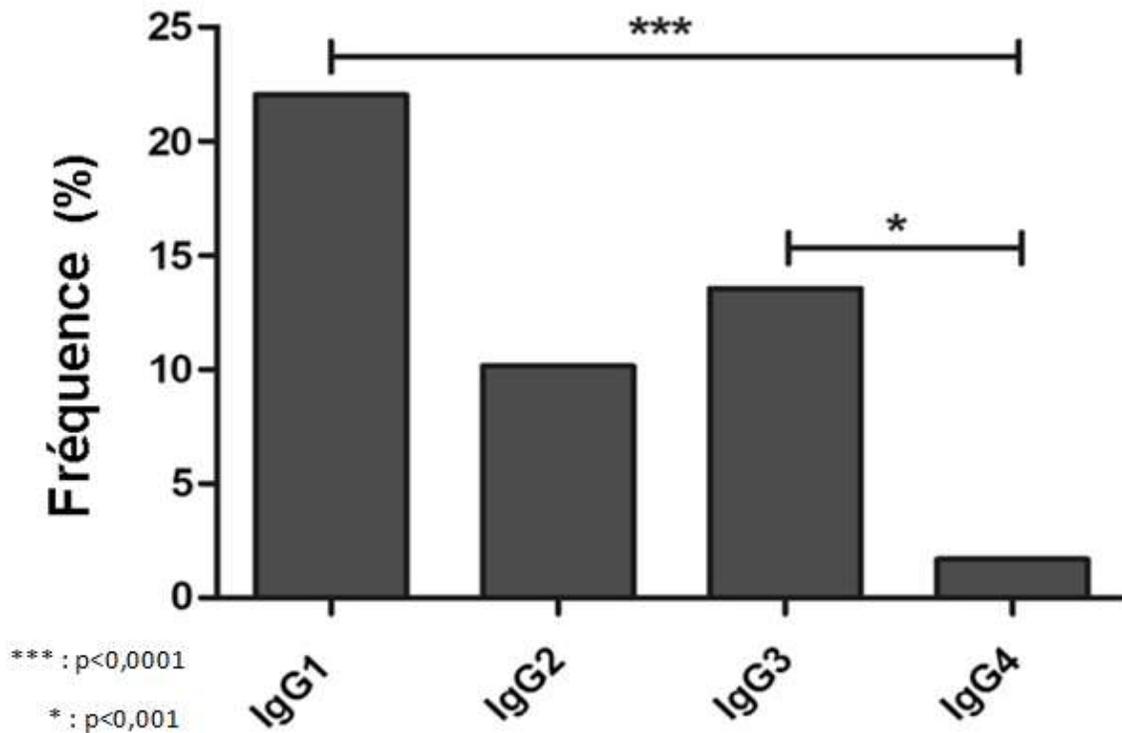


Figure 10. Fréquence des sous-classes d'IgG positives anti-PfRON12 dans les échantillons de sérum des individus testés

Parmi les sous-classes d'IgG anti-PfRON12, la fréquence d'IgG1 était significativement plus élevée que les autres sous-classes ($p < 0,0001$). Celle de la sous-classe IgG3 était significativement aussi élevée que d'IgG4 ($p < 0,001$) mais similaire à celle d'IgG2 ($p > 0,05$). *($p < 0,001$) ; *** ($p < 0,0001$)

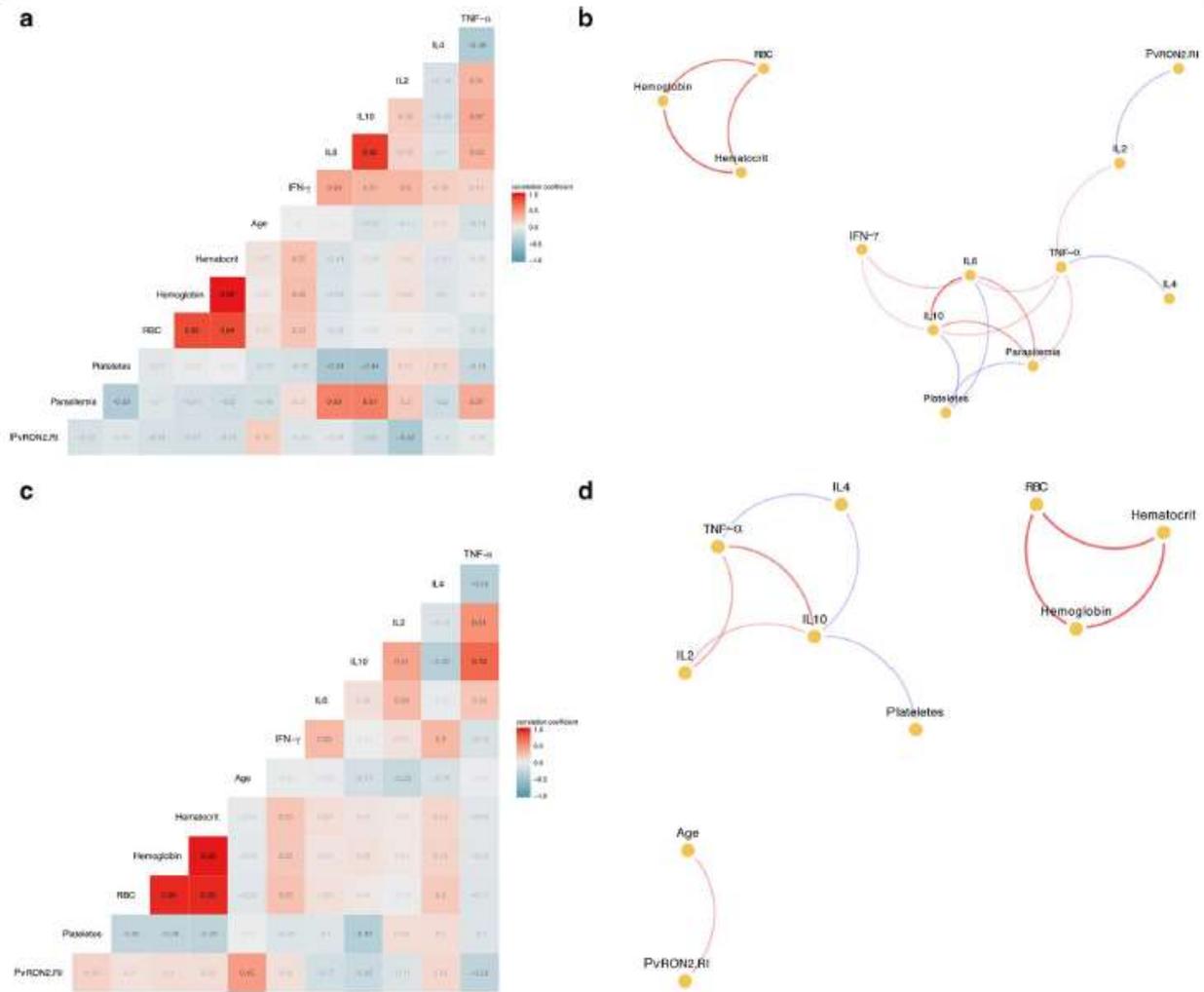


Figure 11. Corrélation multivariée entre les taux de cytokines et les paramètres sanguins chez les personnes infectées et non infectées

La force de corrélation est représentée par la transparence et la largeur de la couleur des carreaux ou des bords. Les corrélations positives sont représentées par des carreaux/bords rouges et les corrélations négatives par des carreaux/bords bleus.

Les taux de cytokines ont été associés positivement à l'âge, à la parasitémie, aux plaquettes, aux globules rouges, à l'hématocrite et à l'hémoglobine. Une corrélation négative significative a été observée entre l'indice de réactivité rPFRON12 et d'IL-2 ($p < 0,05$; $r = -0,58$) chez les individus infectés (Fig. 11a, b). Nous n'avons pas observé de corrélation significative entre l'indice de réactivité rPFRON12 et les concentrations

plasmatiques du TNF, d'IFN- γ , d'IL-6 et d'IL-10 dans les groupes non infectés et infectés. De plus, une corrélation positive significative entre l'indice de réactivité et l'âge a été observée chez les personnes non infectées (Fig. 11c, d).

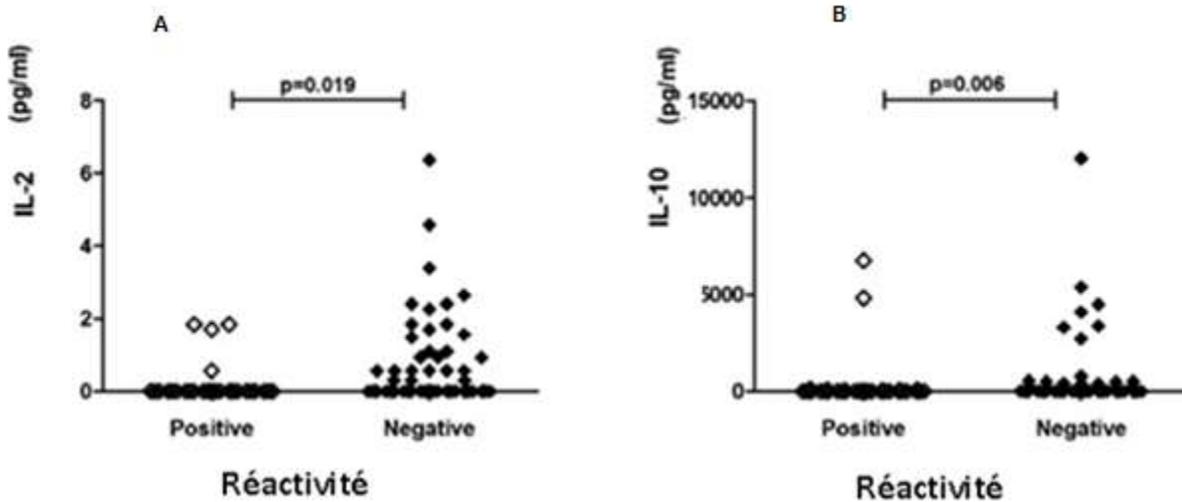


Figure 12. Taux des cytokines IL-2 et IL-10 en fonction de la réactivité des échantillons de sérum testés contre PfRON12

Les taux de cytokines IL-2 et IL-10 étaient significativement plus élevés dans les échantillons de sérum dont la réactivité était négative contre l'antigène PfRON12 ($p=0,019$; $p=0,006$, respectivement).

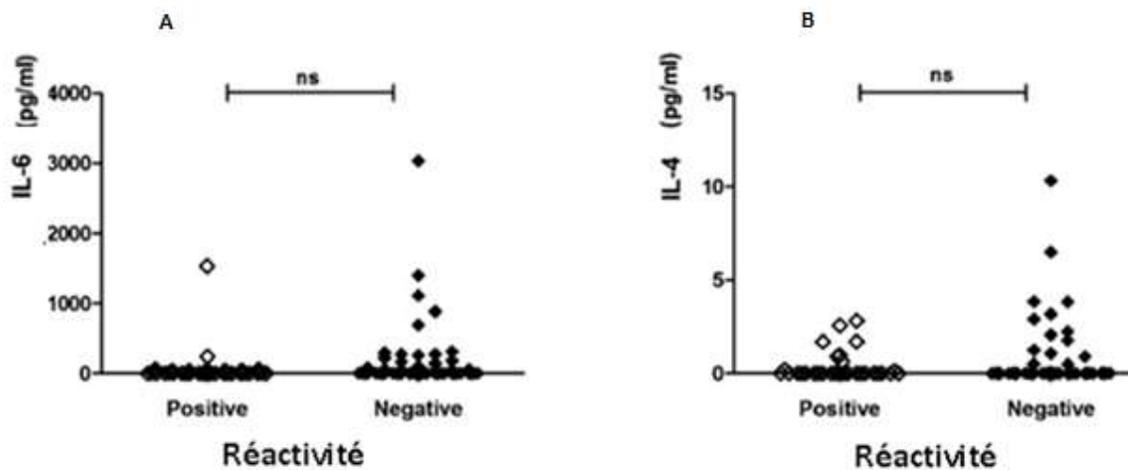


Figure 13. Taux des cytokines IL-6 (c) et IL-4 (d) en fonction de la réactivité des échantillons de sérum testés contre PfRON12

Les taux des cytokines IL-6 et IL-4 ne variaient pas significativement en fonction de la réactivité des échantillons de sérum testés contre l'antigène PfRON12 ($p > 0,05$).

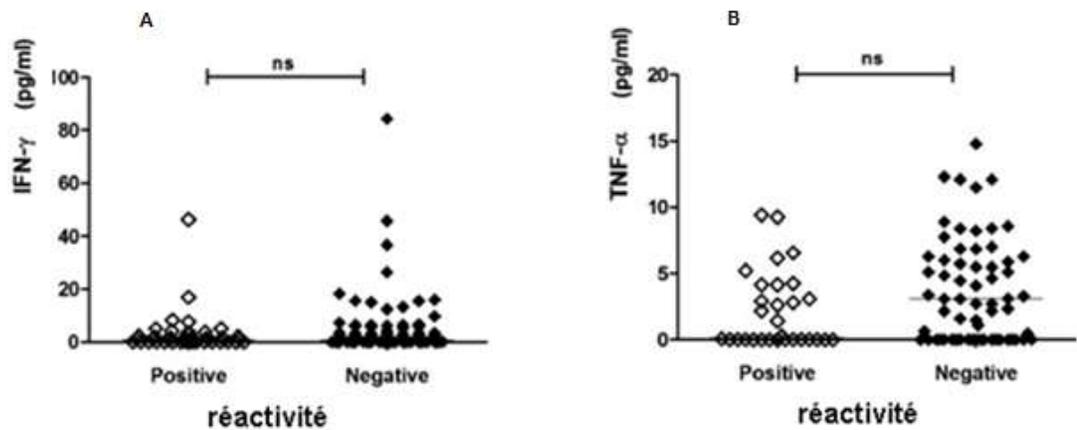


Figure 14. Taux de cytokines IFN- γ et TNF- α en fonction de la réactivité des échantillons de sérum testés contre PfRON12

Nous n'avons pas observé une variation significative du taux de l'IFN- γ et du TNF- α en fonction de la réactivité des échantillons de sérum testés contre l'antigène PfRON12 ($p > 0,05$).

6. Commentaires et discussion

6.1. Cadre et lieu d'étude

Notre étude s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche qui vise à déterminer les mécanismes de protection innée et acquise contre le paludisme. Elle avait pour but d'étudier les réponses humorales et cellulaires anti-PfRON12 en tant que candidat vaccin chez les enfants. Elle s'est déroulée dans le village de Kéniéroba en janvier 2011 (fin de saison de transmission 2010), dans la commune rurale de Bancoumana. Le choix de Kéniéroba s'explique par sa proximité avec nos laboratoires de Bamako. Le village est accessible en toute saison et est à environ une heure de Bamako par voiture. Notre équipe de recherche entretient de bonne relation de travail depuis 2008. Un passage transversal a été effectué en janvier 2011 pour collecter les échantillons chez les participants au Mali, et ces échantillons ont été envoyés aux partenaires de NIH pour réaliser les différents tests. Les échantillons ont été collectés aussi en Thaïlande, et qui ont servi de témoin de notre des échantillons du Mali.

6.2. Méthodes et techniques utilisées

A) Afin de déterminer la localisation intra-cellulaire du PfRON12 dans les mérozoïtes, un dosage immunofluorescent (IFA) a été effectué sur les schizontes matures et les mérozoïtes libérés. Brièvement, les frottis sanguins infectés ont été fixés sur des lames de verre avec de l'acétone glacée pendant 5 minutes et bloqués avec du PBS contenant 5% de lait non gras à 37 °C pendant 1 h. La lame a ensuite été incubée avec des anticorps de lapin anti-PfRON12 (1:500) et de souris anti-RON2 (PF3D7_1452000) (1:100) comme marqueur du col des rhoptries [2], puis incubée avec Alexa Fluor 488 - IgG (Invitrogène) conjugué avec les anti-IgG anti-souris de chèvre (1:500) à 37°C pendant 30 mn. Les noyaux ont été colorés avec 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI ; 2 µg/ml). Les lames ont été montées dans ProLong Gold Antifade (Invitrogen) et observées à l'aide d'un microscope laser à balayage confocal (LSM710 ; Carl Zeiss MicroImaging, Thornwood, NY).

Des mérozoïtes libres ont été isolés et fixés avec 4% de paraformaldéhyde - 0,0075% de glutaraldéhyde dans le PBS tel que décrit [6] puis doublement colorés avec de l'anti-

PfRON12 (1:500) de lapin et de l'anti-myosine A de souris (MTIP ; PF3D7_1246400) en présence ou en absence du traitement préalable avec Triton-X100, comme marqueur complexe interne à membrane. Dans les schizontes, les signaux fluorescents de l'anti-PfRON12 ont été détectés comme un motif de ponctuation dans chaque mérozoïte qui se chevauchait partiellement avec ceux de l'anti-RON2 (Fig. 71C, panneaux supérieurs).

De plus, les mérozoïtes libérés et perméabilisés ont montré une distribution périphérique du PfRON12 et du MTIP (Fig. 71C, panneaux centraux). Les mérozoïtes non perméabilisés ont montré un signal négligeable du MTIP en raison de sa localisation intracellulaire (Fig. 71C, panneaux inférieurs). Parmi les mérozoïtes non perméabilisés, 63% (n=22) ont montré le signal de fluorescence de surface de l'anti-PfRON12 (Fig. 71C, panneaux inférieurs) et 37% (n=10) ont montré un signal faible d'anti-PfRON12 (données non montrées). Ces résultats démontrent clairement que le PfRON12 est transloqué à la surface des mérozoïtes libérés. Le sérum préimmun de lapin n'a montré aucun signal avec les deux échantillons de parasite (données non montrées).

Pour confirmer la localisation précise du PfRON12 dans les mérozoïtes, nous avons réalisé une microscopie immuno-électronique (IEM). Les parasites cultivés ont été fixés, enrobés dans de la résine LR White (Polysciences, Warrington, PA), et les sections ultrafines ont été immuno-colorées comme décrit [10]. Plus précisément, l'anti-PfRON12 de lapin a été utilisé à une dilution de 1:4000. Les échantillons ont été examinés au microscope électronique à transmission (JEM-1230 ; JEOL, Tokyo, Japon). Des particules d'or correspondant à la localisation PfRON12 ont été détectées sur la partie du mérozoïte située dans le col de la rhoptrie (Fig. 71D). Ces résultats démontrent clairement que le PfRON12 est stocké dans le col des mérozoïtes de rhoptries avant la sortie et transloqué à la surface du mérozoïte libéré. Bien que le PfRON12 ait été clairement prouvé comme étant une protéine sécrétée [7], la façon dont il se localise à la surface des mérozoïtes doit faire l'objet d'études plus poussées.

La localisation de PfRON12 à la surface du mérozoïtes nous a fortement incités à évaluer l'activité inhibitrice de croissance du parasite. Afin de vérifier si les anticorps dirigés contre PfRON12 pouvaient bloquer l'invasion parasitaire, on a testé l'inhibition de la croissance

du parasite sur un cycle de réplication par cytométrie de flux [6,11] pour les IgG totales du lapin contre PfRON12.

B) Nous avons ensuite examiné l'immunogénicité de PfRON12 chez l'homme. Des échantillons de sérum humain provenant de Thaïlande ont été prélevés sur des porteurs asymptomatiques de *P. falciparum*, sur des participants atteints de paludisme symptomatique non compliqué à *P. falciparum* et sur des individus naïfs, comme décrit [12]. Des échantillons de sérum humain ont également été prélevés sur des adultes maliens immunisés en bonne santé [13,14]. Les approbations éthiques pour les études thaïlandaises et maliennes ont déjà été décrites [12,14]. Les mesures des anticorps par dosage immuno-enzymatique (ELISA) contre le PfRON12 recombinant dans les échantillons thaïlandais ou maliens ont été effectuées comme décrit [6]. Les échantillons séropositifs ont été définis par un seuil de coupure de la moyenne + 2 écarts-types (ET) des valeurs de densité optique (DO) à l'anti-PfRON12 dans les sérums naïfs de paludisme du thaïlandais (n=10).

C) Nous avons également utilisé le test d'inhibition de croissance pour évaluer l'activité fonctionnelle réelle des anticorps anti-PfRON12 induits par des infections naturelles chez l'homme. Les échantillons de sérum prélevés sur 4 participants immunisés maliens ont été regroupés (16 ml au total) et les IgG spécifiques de l'antigène ont été isolés à l'aide d'une colonne de Sépharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) activée par NHS, couplée à la protéine PfRON12 recombinante. Environ 50 µg d'IgG anti-PfRON12-spécifiques ont été isolés dans les 16 ml de sérums. Le mélange réactionnel GIA a été incubé pendant 40 h en présence d'IgG test pour permettre à la plupart des parasites envahisseurs de se développer jusqu'au stade schizonte, et ensuite a été déterminée par un test biochimique spécifique du lactate déshydrogénase du parasite, tel que décrit [15].

6.3. Résultats descriptives

Les enfants âgés de 6-8 ans étaient majoritaires avec 39% suivis par ceux de 9-12 ans et 3-5 ans soit respectivement 37,3% et 23,7% (Tab. II). La proportion de l'infection palustre était plus élevée chez les enfants de 9-12 ans avec 42,9% que ceux de 3-5 ans et de 6-8 ans, soit respectivement 35,5% et 25,8%, mais cette variation n'était pas

significative ($p > 0,05$) (Fig. 5). Dans les zones d'endémie palustre, les individus développent progressivement une immunité en situation d'exposition continue avec l'âge. Cette immunité protège contre les formes cliniques du paludisme, mais n'empêche pas d'être de nouveau infecté par le parasite. Ce qui explique le portage du parasite dans le sang surtout chez les grands enfants et les adultes qui ne développent pas la maladie fréquemment [18, 45, 83]. L'incidence du paludisme était plus élevée chez les enfants de 3-5 ans comparativement à ceux de 9-12 ans ($p < 0.001$) mais elle était comparable à celle des enfants de 6-8 ans ($p > 0.05$) (Fig. 6). Dans les zones d'endémie palustre, l'immunité acquise naturellement avec l'âge protège contre la survenue des formes cliniques du paludisme en contrôlant la parasitémie à un seuil sans manifestation clinique [36, 84-86].

6.4. Résultats analytiques

Lorsque les IgG anti-PfRON12 ont été testés à une concentration finale de 20, 10 et 5 mg/ml, ils ont inhibé l'invasion (moyenne \pm SEM) 27,5% \pm 3,3%, 11,6% \pm 1,9%, et 1,0% \pm 1,8%, respectivement (Fig. 8A). Des IgG anti-EBA175_R3-5 (PF3D7_0731500) (70,7% \pm 1,3%) et anti-GST (3,7% \pm 1,9%) ont été utilisés comme témoins positifs et négatifs à une concentration finale de 20 mg/ml. L'activité inhibitrice de l'invasion des IgG anti-PfRON12 dépendait de la dose et était significativement plus élevée que celle de l'anti-GST à la dose finale de 20 mg/ml.

Plus de la moitié (51,9%) des participants maliens asymptomatiques ($n = 52$), 76,5% des participants thaïlandais asymptomatiques ($n = 17$) et 50% des patients thaïlandais symptomatiques ($n = 22$) ont montré une réactivité positive au PfRON12 (Fig. 8B). Il n'y avait cependant aucune différence statistique entre les groupes, probablement en raison de la taille limitée de l'échantillon.

En évaluant l'activité fonctionnelle des anticorps anti-PfRON12, les IgG humaines spécifiques de PfRON12 ont montré une inhibition de 41,7% à 1,27 mg/ml (à la concentration la plus élevée pouvant être testée) dans le GIA. Dans d'autres évaluations, le polymorphisme génétique du PfRON12 obtenu à partir de PlasmoDB indique que PfRON12 est très bien conservé avec seulement 4 mutations non synonymes dans la séquence codante d'environ 200 isolats déposés à ce jour. Il est important de noter que

99% d'entre eux étaient des séquences d'acides aminés identiques à celle de la souche de référence 3D7. L'ensemble de ces résultats suggère que le PfRON12 est hautement conservé et immunogène pendant l'infection palustre chez l'homme et que ses anticorps anti-PfRON12 contribuent au moins en partie à l'immunité acquise naturellement.

Les échantillons de Thaïlande ont été prélevés dans deux régions différentes. Dans les régions minières ayant un taux de migration élevé de travailleurs qui ont souvent été exposés auparavant au vecteur du paludisme. L'afflux massif d'humains et la déforestation ont eu un impact considérable sur l'écosystème, ce qui a favorisé une plus grande prolifération des moustiques et augmenté le nombre de cas de paludisme [59-61]. En revanche, dans l'autre région Thaïlandaise, la transmission du paludisme se caractérise par la migration des personnes des régions rurales vers les régions urbaines et périurbaines [61]. Cependant, lorsque la réponse humorale naturelle acquise a été évaluée, il n'y avait pas de différences significatives dans la prévalence des anticorps IgG PfRON12 entre les échantillons des deux régions. De plus, l'analyse des sous-classes d'IgG dans une partie des échantillons (n=59), incluant des échantillons des deux régions, a révélé une prévalence significativement plus élevée des IgG1 et IgG3 (Fig. 10). Ces anticorps sont prédominants dans les réponses immunitaires naturellement acquises contre d'autres antigènes du *Plasmodium* dans les régions endémiques du paludisme [62-64].

Par la suite, les patients infectés de Thaïlande ont été comparés à un groupe de personnes non infectées de la même région. Fait intéressant, cette analyse a révélé que les personnes non infectées avaient une réponse IgG significativement plus élevée, ce qui indique un indice de réactivité durable contre l'antigène PfRON12. En l'absence d'informations précises, il n'a pas été possible de corrélérer l'indice de réactivité avec le nombre d'expositions antérieures au paludisme. Chez les personnes non infectées, une corrélation positive entre un indice de réactivité et l'âge a été observée. Ce type d'association a été décrit pour plusieurs antigènes du *Plasmodium* [65-68], suggérant une dépendance à l'âge et une maturation possible du système immunitaire avec le temps. Une prévalence plus faible des IgM que des IgG a été observée dans tous les groupes. La prévalence était encore plus faible chez les personnes non infectées que chez les

personnes infectées de Thaïlande, mais cette différence n'était pas significative. On s'attendait à une faible réactivité, car les IgM sont généralement produites au cours des premières semaines suivant la reconnaissance de l'antigène et diminuent avec le temps après la première activation, alors que les réponses IgG peuvent augmenter après une exposition ultérieure à l'antigène [40, 71, 85, 87-89], souvent en raison de la mémoire immunologique humorale [87-89] (Fig. 9).

Le seul travail publié évaluant l'antigénicité de PfRON12 a analysé la réponse immunitaire naturellement acquise contre quatre épitopes prédits *in silico* de PfRON12 des cellules B, dont aucun n'est situé dans les régions fonctionnelles RI ou RII. Bien qu'il y ait eu une réponse immunitaire contre ces épitopes, la réponse était faible [70].

Des taux plus élevés d'IL-10 sont associés positivement à une parasitémie élevée [71, 72]. Dans la présente étude, les sujets qui présentaient un indice de réactivité positif contre PfRON12 présentaient des concentrations plasmatiques plus faibles de l'IL-10. Cependant, ce groupe se composait principalement de personnes non infectées qui étaient auparavant infectées par le paludisme (sans parasitémie). Il est donc possible que de faibles concentrations de cette cytokine soient associées à la faible parasitémie dans ce groupe et non directement associées à la réactivité contre PfRON12.

Le RON12 de *P. falciparum* était auparavant spécifiquement exprimé aux stades schizontes et localisé dans le col rhoptrie du mérozoïte sur la base d'IFA et IEM. Il a également été réfractaire aux tentatives d'élimination des gènes, ce qui suggère que le PfRON12 n'est pas essentiel à la survie du parasite au stade sanguin. Toutefois, le PfRON12 n'a pas encore fait l'objet d'une caractérisation expérimentale en tant que candidat vaccin au stade sanguin. Ici, nous avons caractérisé le PfRON12 comme candidat vaccin au stade sanguin en utilisant le PfRON12 recombinant exprimé dans le système sans cellules germinales du blé. Nos résultats du Western blotting en conditions réductrices (Fig. 7B) sont en accord avec le rapport précédent [7]. Le PfRON12 natif a formé une multimère putative dans des conditions non réductrices (Fig. 7B, voie NR).

De plus, nos résultats de la microscopie immuno-électronique (IEM) (Fig. 7D) ont confirmé l'étude précédente selon laquelle PfRON12 est effectivement localisé dans le col rhoptrie du mérozoïte. Nos résultats IFA obtenus avec des mérozoïtes libérés ont

démontré pour la première fois que le PfRON12 transloque à la surface du mérozoïte (Fig. 7C, panneaux inférieurs). Ces différences de réactivité des anticorps dans cette étude et dans la précédente [7] peuvent s'expliquer en partie par la différence de pliage des protéines recombinantes. Nous avons utilisé le système d'expression eucaryote sans cellules germinales du blé, mais Knuepfer, et al. [7] ont utilisé un système procaryote basé sur *Escherichia coli*. Comme la séquence d'acides aminés de PfRON12 contient quatre résidus de cystéine, les épitopes conformationnels formés par liaison disulfure et multimérisation disulfure-dépendante présumée peuvent être mieux recréés par les systèmes d'expression eucaryote que procaryote.

Les antigènes immunoréactifs impliqués dans l'invasion des érythrocytes sont considérés comme des candidats potentiels pour un vaccin antipaludique au stade sanguin [16]. Nous avons confirmé que le PfRON12 est immunogène dans les deux zones (Fig. 8B). Comme le PfRON12 se transloque à la surface du mérozoïte comme les protéines micronémiques connues comme l'AMA1 et le GAMA [17], nous nous attendions à ce que le PfRON12 soit impliqué dans une invasion érythrocytaire. Dans cette étude, nous avons démontré que non seulement les anticorps de lapin contre PfRON12 ont une activité inhibitrice d'invasion, mais que les IgG humaines spécifiques de PfRON12 d'adultes maliens ont également inhibé la croissance parasitaire *in vitro* (Fig. 8A). Ces résultats suggèrent que PfRON12 contient l'épitope ou les épitopes inhibiteurs de l'invasion du mérozoïte et l'anticorps humain anti-PfRON12 contre l'épitope ou les épitopes se développent suite à une infection naturelle dans les zones endémiques de paludisme.

Pour évaluer une corrélation possible entre les taux de cytokines et plusieurs paramètres, les taux plasmatiques du TNF, de l'IFN- γ , de l'IL-2, de l'IL-4, de l'IL-6 et d'IL-10 ont été mesurés chez tous les participants. Les taux de cytokines ont été associés positivement à l'âge, à la parasitémie, aux plaquettes, aux globules rouges, à l'hématocrite et à l'hémoglobine ; une corrélation négative significative a été observée entre l'indice de réactivité rPfRON12 (RI) et d'IL-2 ($p < 0,05$; $r = - 0,58$) chez les individus infectés (Fig. 11a, b). Aucune corrélation significative n'a été observée entre l'indice de réactivité rPfRON12 et les concentrations plasmatiques du TNF, d'IFN- γ , d'IL-6 ou d'IL-10 lorsqu'elles ont été analysées dans les groupes non infectés et infectés. De plus, une

corrélation positive significative entre l'indice de réactivité et l'âge a été observée chez les personnes non infectées (Fig. 11c, d).

Lorsque les taux de cytokines ont été comparés entre des individus avec un indice de réactivité positif et un indice de réactivité négatif, une différence significative a été observée pour l'IL-2 ($p=0,019$) et l'IL-10 ($p=0,006$) ; les individus avec des anticorps anti-PfRON12 avaient des taux inférieurs d'IL-2 et d'IL-10 comparativement aux individus avec un indice négatif (Fig. 12). Par contre, les taux de cytokines IL-6, IL-4, TNF et d'IFN- γ ne variaient pas significativement en fonction de l'indice de réactivité (Fig. 13 & 14). Ces résultats suggèrent la mise en place d'une réponse immunitaire innée, impliquant en partie des cellules à capacité cytotoxique au cours de la phase précoce de l'infection palustre et indique l'importance du rôle de l'immunité cellulaire [90-93].

Dans l'ensemble, nos résultats indiquent que le PfRON12 est très bien conservé et qu'il s'agit d'un antigène immunogène chez l'homme, et que les anticorps anti-PfRON12 peuvent contribuer au moins en partie à l'immunité acquise naturellement. Par conséquent, le PfRON12 pourrait être un antigène candidat potentiel de *P. falciparum* au stade sanguin. La protéine recombinante PfRON12 a produit non seulement des anticorps fonctionnels chez le lapin, mais elle a également été utilisée avec succès pour isoler des anticorps fonctionnels spécifiques de l'antigène dans le sérum humain. Les résultats prouvent une fois de plus que le système sans cellules germinales du blé peut être un système optimal d'expression des protéines recombinantes pour la recherche fondamentale sur le paludisme et la découverte de vaccins candidats [18].

7. Limites de notre étude et perspectives

Le paludisme sévit chez l'homme depuis des milliers d'années et, malgré les efforts déployés pour l'éradiquer par le biais de programmes concertés de traitement antipaludique et de lutte contre les vecteurs de la maladie, l'agent causal s'est adapté à ces défis. Des efforts importants sont en cours pour développer de nouveaux médicaments antipaludiques et un vaccin. En raison de son caractère unique, l'invasion des érythrocytes par le mérozoïte représente une cible attrayante pour les deux aspects. Il est essentiel que nous comprenions le rôle des différentes protéines exprimées sur le mérozoïte et des protéines hôtes dans l'invasion des érythrocytes afin de fournir une base rationnelle solide pour l'identification des cibles vaccinales et pharmaceutiques. De nombreuses questions importantes subsistent au sujet de l'invasion des érythrocytes, dont certaines ont déjà été soulevées dans la présente étude : Qu'est-ce qui intervient dans l'attachement primaire ? S'agit-il de grands complexes ? Quels sont les signaux et les médiateurs qui relient l'attachement primaire aux étapes suivantes ? Les intermédiaires conformationnels jouent-ils un rôle dans la liaison des récepteurs ? Comment les adhésifs secondaires clés (EBA et Rh5) sont-ils liés au moteur ? Comment la polymérisation de l'actine est-elle régulée ?

S'attaquer à de telles questions fonctionnelles pose des problèmes particuliers, notamment en ce qui concerne l'obligation d'effectuer des études de génétique moléculaire en hémoculture continue. Les manipulations génétiques qui sont nuisibles au développement de *P. falciparum* au stade sanguin ne sont pas possibles à ce stade. Par conséquent, des progrès technologiques dans le domaine du *Plasmodium* sont nécessaires, d'autant plus que de nombreuses questions importantes sont spécifiques au *Plasmodium* et ne peuvent être abordées dans d'autres systèmes. Pour ce faire, il faudra améliorer les systèmes de mutagenèse, tant chimique que génétique, comme le marquage des transposons du génome entier [94]. Une possibilité importante maintenant disponible avec l'utilisation de la mutagenèse conditionnelle chez *P. falciparum* [95] est la capacité de construire des mutations dominantes négatives et/ou des délétions conditionnelles qui bloquent efficacement le processus d'invasion à des endroits spécifiques. Une adaptation réussie de cette technologie permettrait non seulement

d'identifier le point auquel la protéine d'intérêt joue son rôle, mais aussi de caractériser des conformateurs et des complexes transitoires importants sur le plan fonctionnel. De telles perspectives sont susceptibles d'ouvrir de nombreuses avenues pour l'élaboration de nouvelles stratégies d'intervention contre le paludisme.

Il serait intéressant dans l'avenir de tester cette protéine à grande échelle pour déterminer son rôle dans la protection clinique du paludisme, de prévoir des essais précliniques et cliniques et d'associer cette protéine avec d'autres candidats vaccins pour évaluer l'effet polyvalent.

8. Conclusion et Recommandations

8.1. Conclusion

L'indice de réactivité des IgG anti-PfRON12 était significativement plus élevé chez les individus non infectés par le *P. falciparum*. Les taux de cytokines IL-2 et IL-10 étaient significativement plus élevés dans les échantillons de sérum dont la réactivité était négative contre l'antigène PfRON12. La fréquence d'IgG1 était plus élevée en analysant les sous classes d'IgG.

Dans l'ensemble, nos résultats indiquent que le PfRON12 est très bien conservé et qu'il s'agit d'un antigène immunogène chez l'homme, et que les anticorps anti-PfRON12 peuvent contribuer au moins en partie à l'immunité acquise naturellement. Par conséquent, le PfRON12 pourrait être un antigène candidat potentiel de *P. falciparum* au stade sanguin.

8.2. Recommandations

Au terme de notre étude et au vu de nos résultats, nous formulons les recommandations suivantes :

Aux autorités sanitaires et administratives

- d'encourager et de financer d'avantage la recherche biomédicale sur le paludisme afin de développer un vaccin efficace contre le cette maladie.

Aux chercheurs

- de mener d'autres études sur l'antigène PfRON12 en termes de variabilité génétique en tenant compte de l'âge et de la saisonnalité dans différentes zones ;
- de tester d'autres antigènes de la même famille que PfRON12 dans la même population pour comparer son effet potentiel en tant que candidat vaccin

A la population

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

9. Références bibliographiques

1. OMS. *Rapport sur le paludisme dans le monde 2018*. 2018 [cited; Available from: <https://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2018/fr/> (consulté 11/02/2019).
2. MIS. *Enquête sur les Indicateurs du Paludisme (EIPM) 2015*. 2015 [cited; Available from: <http://www.dhsprogram.com/pubs/pdf/MIS24/MIS24.pdf> (access 27/02/2017).
3. DHS. *Enquête Démographique et de Santé au Mali 2012-2013 (EDSM-V)*. 5: p. 577. 2014 [cited; Available from: <http://dhsprogram.com/pubs/pdf/FR286/FR286.pdf>. (consulté le 25/02/2019).
4. Carvalho, L.J., C.T. Daniel-Ribeiro, and H. Goto, *Malaria vaccine: candidate antigens, mechanisms, constraints and prospects*. *Scand J Immunol*, 2002. **56**(4): p. 327-43.
5. Greenwood, B., *Malaria vaccines. Evaluation and implementation*. *Acta Trop*, 2005. **95**(3): p. 298-304.
6. Hill, A.V., *Pre-erythrocytic malaria vaccines: towards greater efficacy*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(1): p. 21-32.
7. Beeson, J.G., *Characteristics of Plasmodium falciparum-infected-erythrocyte adhesion to chondroitin sulfate*. *Infect Immun*, 2008. **76**(6): p. 2808; author reply 2808-9.
8. Richards, J.S. and J.G. Beeson, *The future for blood-stage vaccines against malaria*. *Immunol Cell Biol*, 2009. **87**(5): p. 377-90.
9. Stanisic, D.I., et al., *Acquisition of antibodies against Plasmodium falciparum merozoites and malaria immunity in young children and the influence of age, force of infection, and magnitude of response*. *Infect Immun*, 2014. **83**(2): p. 646-60.
10. Moran, D.M., et al. *The malaria product pipeline: planning for the future*. 2007 [cited; Available from: http://www.policycures.org/downloads/The_malaria_product_pipeline_planning_for_the_future.pdf (consulté le 25/2/2019).
11. Dechavanne, c. *Construction de la réponse anticorps spécifique du paludisme chez le jeune enfant : étude combinée de l'hôte, du parasite et de leur environnement Célia Dechavanne*. 2012 [cited; Available from: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00856581/document> (consulté le 25/2/2019).
12. Roetyneck, S., et al. *Cellules natural killer et immunité innée contre le paludisme*. 2006 [cited; Available from: <http://www.ipubli.inserm.fr/handle/10608/5846> (consulté le 25/2/2019)
13. Gardner, M.J., et al., *Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum*. *Nature*, 2002. **419**(6906): p. 498-511.
14. Ito, D., et al., *Antibodies against a Plasmodium falciparum RON12 inhibit merozoite invasion into erythrocytes*. *Parasitol Int*, 2018. **68**(1): p. 87-91.
15. Knuepfer, E., et al., *RON12, a novel Plasmodium-specific rhoptry neck protein important for parasite proliferation*. *Cell Microbiol*, 2013. **16**(5): p. 657-72.
16. ANOFEL. *paludisme*. 2014 [cited; Available from: <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/paludisme/site/html/cours.pdf> (consulter 11/02/2019).
17. Yombi, J.C., et al., *Imported malaria in a tertiary hospital in Belgium: epidemiological and clinical analysis*. *Acta Clin Belg*. **68**(2): p. 101-6.
18. Pierre Aubry and Gaüzère Bernard-Alex. *paludisme* 2018 [cited; Available from: <http://medecinetropicale.free.fr/cours/paludisme.pdf> (consulté 11/2/2019).
19. PNLN. *Plan stratégique de lutte contre le paludisme 2013-2017*. 2013 [cited; Available from: <http://mail.cnom.sante.gov.ml/docs/PStrag%202013-17PNLN.pdf> (consulté le 27/02/2019).
20. Harbach, R.E., *The classification of genus Anopheles (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships*. *Bull Entomol Res*, 2004. **94**(6): p. 537-53.

21. Toure, Y.T., et al., *The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognized taxa of the Anopheles gambiae complex in Mali, West Africa*. *Parassitologia*, 1998. **40**(4): p. 477-511.
22. WHO/CDS/CPE/SMT. *Entomologie du paludisme et contrôle des vecteurs*. 2003 [cited; Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/68376/WHO_CDS_CPE_SMT_2002.18_Rev.1_Partiel.pdf;jsessionid=0CB5D2C64B6283C426E8197D93844660?sequence=1 (consulté le 01/03/2019).
23. Angulo, I. and M. Fresno, *Cytokines in the pathogenesis of and protection against malaria*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002. **9**(6): p. 1145-52.
24. Lansche, C., et al., *The sickle cell trait affects contact dynamics and endothelial cell activation in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes*. *Commun Biol*, 2018. **1**: p. 211.
25. Sherman, I.W., et al., *The sticky secrets of sequestration*. *Parasitol Today*, 1995. **11**(10): p. 378-84.
26. Rowe, A., et al., *Plasmodium falciparum rosetting is associated with malaria severity in Kenya*. *Infect Immun*, 1995. **63**(6): p. 2323-6.
27. 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.
28. Antia, R., A. Yates, and J.C. de Roode, *The dynamics of acute malaria infections. I. Effect of the parasite's red blood cell preference*. *Proc Biol Sci*, 2008. **275**(1641): p. 1449-58.
29. Dunst, J., F. Kamena, and K. Matuschewski, *Cytokines and Chemokines in Cerebral Malaria Pathogenesis*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017. **7**: p. 324.
30. Kabyemela, E., et al., *Cytokine profiles at birth predict malaria severity during infancy*. *PLoS One*, 2013. **8**(10): p. e77214.
31. Aderem, A. and R.J. Ulevitch, *Toll-like receptors in the induction of the innate immune response*. *Nature*, 2000. **406**(6797): p. 782-7.
32. Eriksson, E.M., N.G. Sampio, and L. Schofield, *Toll-Like Receptormand Malaria-Sensing and Susceptibility*. *Journal of Tropical Diseases*, 2013. **2**: p. 126.
33. Rzepczyk, C.M., et al., *Humoral immune responses of Solomon Islanders to the merozoite surface antigen 2 of Plasmodium falciparum show pronounced skewing towards antibodies of the immunoglobulin G3 subclass*. *Infect Immun*, 1997. **65**(3): p. 1098-100.
34. Mandala, W., et al., *Cytokine Profiles in Malawian Children Presenting with Uncomplicated Malaria, Severe Malarial Anemia, and Cerebral Malaria*. *CVI*.00533-16.
35. Mohan, K., P. Moulin, and M.M. Stevenson, *Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage Plasmodium chabaudi AS infection*. *J Immunol*, 1997. **159**(10): p. 4990-8.
36. Artavanis-Tsakonas, K., J.E. Tongren, and E.M. Riley, *The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology*. *Clin Exp Immunol*, 2003. **133**(2): p. 145-52.
37. Doolan, D.L., C. Dobano, and J.K. Baird, *Acquired immunity to malaria*. *Clin Microbiol Rev*, 2009. **22**(1): p. 13-36, Table of Contents.
38. Aucan, C., et al., *High immunoglobulin G2 (IgG2) and low IgG4 levels are associated with human resistance to Plasmodium falciparum malaria*. *Infect Immun*, 2000. **68**(3): p. 1252-8.
39. Tebo, A.E., P.G. Kremsner, and A.J. Luty, *Plasmodium falciparum: a major role for IgG3 in antibody-dependent monocyte-mediated cellular inhibition of parasite growth in vitro*. *Exp Parasitol*, 2001. **98**(1): p. 20-8.
40. Leoratti, F.M., et al., *Pattern of humoral immune response to Plasmodium falciparum blood stages in individuals presenting different clinical expressions of malaria*. *Malar J*, 2008. **7**: p. 186.
41. Peter Perlmann and M. Troye-Blomberg, *Malaria and the Immune System in Humans*. 2002.

42. Farouk, S.E., et al., *Analysis of T-cell responses in malaria-exposed and non-exposed donors using Plasmodium falciparum asexual blood stages enriched by a simple centrifugation method*. Acta Trop, 2006. **97**(1): p. 42-9.
43. Bouharoun-Tayoun, H., et al., *Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of Plasmodium falciparum asexual blood stages*. J Exp Med, 1995. **182**(2): p. 409-18.
44. Howell, S.A., et al., *Proteolytic processing and primary structure of Plasmodium falciparum apical membrane antigen-1*. J Biol Chem, 2001. **276**(33): p. 31311-20.
45. Richard, D., et al., *Interaction between Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 and the rhoptry neck protein complex defines a key step in the erythrocyte invasion process of malaria parasites*. J Biol Chem, 2010. **285**(19): p. 14815-22.
46. Arnott, A., et al., *Distinct patterns of diversity, population structure and evolution in the AMA1 genes of sympatric Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax populations of Papua New Guinea from an area of similarly high transmission*. Malar J, 2014. **13**: p. 233.
47. Takala, S.L., et al., *Extreme polymorphism in a vaccine antigen and risk of clinical malaria: implications for vaccine development*. Sci Transl Med, 2009. **1**(2): p. 2ra5.
48. Dutta, S., et al., *Purification, characterization, and immunogenicity of the refolded ectodomain of the Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 expressed in Escherichia coli*. Infect Immun, 2002. **70**(6): p. 3101-10.
49. McBride, J.S. and H.G. Heidrich, *Fragments of the polymorphic Mr 185,000 glycoprotein from the surface of isolated Plasmodium falciparum merozoites form an antigenic complex*. Mol Biochem Parasitol, 1987. **23**(1): p. 71-84.
50. Woehlbier, U., et al., *Analysis of antibodies directed against merozoite surface protein 1 of the human malaria parasite Plasmodium falciparum*. Infect Immun, 2006. **74**(2): p. 1313-22.
51. Blackman, M.J. and T.J. Scott-Finnigan. *Antibodies inhibit the protease-mediated processing of a malaria merozoite surface protein*. 1994 [cited; Available from: <https://www.semanticscholar.org/paper/Antibodies-inhibit-the-protease-mediated-processing-Blackman-Scott-Finnigan/5198917e8f2c0bd72ec624730e31959c25e58d1a/> consulté le 2/9/2019).
52. Siddiqui, W.A., et al., *Merozoite surface coat precursor protein completely protects Aotus monkeys against Plasmodium falciparum malaria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(9): p. 3014-8.
53. Ogutu, B.R., et al., *Blood stage malaria vaccine eliciting high antigen-specific antibody concentrations confers no protection to young children in Western Kenya*. PLoS One, 2009. **4**(3): p. e4708.
54. Pinder, M., et al., *Immunoglobulin G antibodies to merozoite surface antigens are associated with recovery from chloroquine-resistant Plasmodium falciparum in Gambian children*. Infect Immun, 2006. **74**(5): p. 2887-93.
55. Branch, O.H., et al., *Anti-merozoite surface protein-1 19-kDa IgG in mother-infant pairs naturally exposed to Plasmodium falciparum: subclass analysis with age, exposure to asexual parasitemia, and protection against malaria*. V. The Asembo Bay Cohort Project. J Infect Dis, 2000. **181**(5): p. 1746-52.
56. Egan, A.F., et al., *Serum antibodies from malaria-exposed people recognize conserved epitopes formed by the two epidermal growth factor motifs of MSP1(19), the carboxy-terminal fragment of the major merozoite surface protein of Plasmodium falciparum*. Infect Immun, 1995. **63**(2): p. 456-66.
57. Gerold, P., et al., *Structural analysis of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the merozoite surface proteins-1 and -2 of Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol, 1996. **75**(2): p. 131-43.

58. Ojurongbe, O., et al., *Allelic diversity of merozoite surface protein 2 gene of P falciparum among children in Osogbo, Nigeria*. West Indian Med J. **60**(1): p. 19-23.
59. Smythe, J.A., et al., *Structural diversity in the Plasmodium falciparum merozoite surface antigen 2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(5): p. 1751-5.
60. Polley, S.D., et al., *High levels of serum antibodies to merozoite surface protein 2 of Plasmodium falciparum are associated with reduced risk of clinical malaria in coastal Kenya*. Vaccine, 2006. **24**(19): p. 4233-46.
61. Metzger, W.G., et al., *Serum IgG3 to the Plasmodium falciparum merozoite surface protein 2 is strongly associated with a reduced prospective risk of malaria*. Parasite Immunol, 2003. **25**(6): p. 307-12.
62. Taylor, R.R., et al., *Human antibody response to Plasmodium falciparum merozoite surface protein 2 is serogroup specific and predominantly of the immunoglobulin G3 subclass*. Infect Immun, 1995. **63**(11): p. 4382-8.
63. McCarthy, J.S., et al., *A phase 1 trial of MSP2-C1, a blood-stage malaria vaccine containing 2 isoforms of MSP2 formulated with Montanide(R) ISA 720*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e24413.
64. Burgess, B.R., P. Schuck, and D.N. Garboczi, *Dissection of merozoite surface protein 3, a representative of a family of Plasmodium falciparum surface proteins, reveals an oligomeric and highly elongated molecule*. J Biol Chem, 2005. **280**(44): p. 37236-45.
65. McColl, D.J. and R.F. Anders, *Conservation of structural motifs and antigenic diversity in the Plasmodium falciparum merozoite surface protein-3 (MSP-3)*. Mol Biochem Parasitol, 1997. **90**(1): p. 21-31.
66. Carvalho, L.J., et al., *Immunization of Saimiri sciureus monkeys with a recombinant hybrid protein derived from the Plasmodium falciparum antigen glutamate-rich protein and merozoite surface protein 3 can induce partial protection with Freund and Montanide ISA720 adjuvants*. Clin Diagn Lab Immunol, 2005. **12**(2): p. 242-8.
67. Nebie, I., et al., *Humoral and cell-mediated immunity to MSP3 peptides in adults immunized with MSP3 in malaria endemic area, Burkina Faso*. Parasite Immunol, 2009. **31**(8): p. 474-80.
68. Badiane, A.S., et al., *Inhibitory humoral responses to the Plasmodium falciparum vaccine candidate EBA-175 are independent of the erythrocyte invasion pathway*. Clin Vaccine Immunol, 2013. **20**(8): p. 1238-45.
69. Orlandi, P.A., F.W. Klotz, and J.D. Haynes, *A malaria invasion receptor, the 175-kilodalton erythrocyte binding antigen of Plasmodium falciparum recognizes the terminal Neu5Ac(alpha 2-3)Gal- sequences of glycophorin A*. J Cell Biol, 1992. **116**(4): p. 901-9.
70. Mamillapalli, A., et al., *Sequence polymorphisms in the receptor-binding domain of Plasmodium falciparum EBA-175: implications for malaria vaccine development*. Mol Biochem Parasitol, 2006. **146**(1): p. 120-3.
71. Jones, T.R., et al., *Protection of Aotus monkeys by Plasmodium falciparum EBA-175 region II DNA prime-protein boost immunization regimen*. J Infect Dis, 2001. **183**(2): p. 303-312.
72. Borre, M.B., et al., *Primary structure and localization of a conserved immunogenic Plasmodium falciparum glutamate rich protein (GLURP) expressed in both the preerythrocytic and erythrocytic stages of the vertebrate life cycle*. Mol Biochem Parasitol, 1991. **49**(1): p. 119-31.
73. de Stricker, K., et al., *Conservation and heterogeneity of the glutamate-rich protein (GLURP) among field isolates and laboratory lines of Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol, 2000. **111**(1): p. 123-30.
74. Carvalho, L.J., et al., *Immunization of Saimiri sciureus monkeys with Plasmodium falciparum merozoite surface protein-3 and glutamate-rich protein suggests that protection is related to antibody levels*. Scand J Immunol, 2004. **59**(4): p. 363-72.

75. Oeuvray, C., et al., *Cytophilic immunoglobulin responses to Plasmodium falciparum glutamate-rich protein are correlated with protection against clinical malaria in Dielmo, Senegal*. Infect Immun, 2000. **68**(5): p. 2617-20.
76. Hermsen, C.C., et al., *Glutamate-rich protein (GLURP) induces antibodies that inhibit in vitro growth of Plasmodium falciparum in a phase 1 malaria vaccine trial*. Vaccine, 2007. **25**(15): p. 2930-40.
77. Cowman, A.F. and B.S. Crabb, *Invasion of red blood cells by malaria parasites*. Cell, 2006. **124**(4): p. 755-66.
78. Ito, D., et al., *RALP1 is a rhoptry neck erythrocyte-binding protein of Plasmodium falciparum merozoites and a potential blood-stage vaccine candidate antigen*. Infect Immun, 2013. **81**(11): p. 4290-8.
79. Baum, J., et al., *Host-cell invasion by malaria parasites: insights from Plasmodium and Toxoplasma*. Trends Parasitol, 2008. **24**(12): p. 557-63.
80. Hoffman, S.L., et al., *T lymphocytes from mice immunized with irradiated sporozoites eliminate malaria from hepatocytes*. Bull World Health Organ, 1990. **68 Suppl**: p. 132-7.
81. Overstreet, M.G., et al., *Protective CD8 T cells against Plasmodium liver stages: immunobiology of an 'unnatural' immune response*. Immunol Rev, 2008. **225**: p. 272-83.
82. Vandoolaeghe, P. and L. Schuerman, *[The RTS,S/AS01 malaria vaccine in children aged 5-17 months at first vaccination]*. Pan Afr Med J. **30**: p. 142.
83. Samassa, F. *Etude de la saisonnalité du paludisme à Plasmodium falciparum en milieu urbain de Bamako*. 2010 [cited; Available from: <http://www.keneya.net/fmpos/theses/2010/med/pdf/10M294.pdf> (access 27/02/2019).
84. Coulibaly, D., et al., *Stable malaria incidence despite scaling up control strategies in a malaria vaccine-testing site in Mali*. Malar J, 2014. **13**: p. 374.
85. Miura, K., et al., *Relationship between malaria incidence and IgG levels to Plasmodium falciparum merozoite antigens in Malian children: impact of hemoglobins S and C*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e60182.
86. Ogouyemi-Hounto, A., et al., *Prevalence of the molecular marker of Plasmodium falciparum resistance to chloroquine and sulphadoxine/pyrimethamine in Benin seven years after the change of malaria treatment policy*. Malar J, 2013. **12**: p. 147.
87. Buchholz, U., et al., *Multiplicity of Plasmodium falciparum infection following intermittent preventive treatment in infants*. Malar J, 2010. **9**: p. 244.
88. Kinyanjui, S.M., et al., *IgG antibody responses to Plasmodium falciparum merozoite antigens in Kenyan children have a short half-life*. Malar J, 2007. **6**: p. 82.
89. Kobbe, R., et al., *Seasonal variation and high multiplicity of first Plasmodium falciparum infections in children from a holoendemic area in Ghana, West Africa*. Trop Med Int Health, 2006. **11**(5): p. 613-9.
90. Clark, I.A. and B. Vissel, *The meteorology of cytokine storms, and the clinical usefulness of this knowledge*. Semin Immunopathol, 2017. **39**(5): p. 505-516.
91. Moore, J.M., et al., *Immunity to placental malaria. I. Elevated production of interferon-gamma by placental blood mononuclear cells is associated with protection in an area with high transmission of malaria*. J Infect Dis, 1999. **179**(5): p. 1218-25.
92. Ndiaye, M., et al., *[Profile of cytokines associated with protection against malaria episodes during pregnancy in hypo-endemic area in Senegal]*. Bull Soc Pathol Exot, 2014. **107**(3): p. 159-64.
93. Nmorsie, O.P., et al., *Pro-and anti-inflammatory cytokines profiles among Nigerian children infected with Plasmodium falciparum malaria*. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2010. **3**: p. 41-44.

94. Balu, B., et al., *High-efficiency transformation of Plasmodium falciparum by the lepidopteran transposable element piggyBac*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(45): p. 16391-6.
95. Meissner, M., et al., *Tetracycline analogue-regulated transgene expression in Plasmodium falciparum blood stages using Toxoplasma gondii transactivators*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(8): p. 2980-2985.

10. Annexes

10.1. 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 : www.hemocue.com

✓ Principe de la méthode

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

- ✓ Matériel et réactifs
- Appareil analyseur
 - Microcuvette HemoCue
 - Lancette
 - Alcool 70°C
 - Coton

✓ Technique

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

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

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

-Après avoir enlevé minutieusement toute trace de sang présente à la surface de la microcuvette, la mettre sur son support et l'insérer ensuite dans le photomètre. Le résultat est exprimé en gramme d'hémoglobine par décilitre de sang (g/dl).



Figure 16. Mécanisme de mesure du taux d'Hb par l'appareil HemoCue 201+

Source : www.hemocue.com

10.2. Technique de goutte épaisse

✓ Principe

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

Taux d'hémoglobine

✓ 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, chiffon de coton propre, crayon noir à mine grasse ou marqueur indélébile, stylo à bille, bacs de coloration, éprouvette graduées, râtelier, chronomètre, huile d'immersion, registre ou formulaire de notification, un compteur manuel et gant.

✓ Lieu du prélèvement

Face latérale à l'extrémité d'un doigt (en général gauche, 3^e doigt après le pouce), sur le lobe de l'oreille après avoir réchauffé avec les doigts, au niveau du talon ou gros orteil chez le nourrisson.

✓ Réalisation 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 :

- 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) ;
- 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 ;
- Avec le chiffon de coton propre, essuyer le doigt en appuyant fermement pour stimuler la circulation du sang ;
- Avec un vaccino style stérile, piquer le bout du doigt d'un seul geste ;
- 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 ;
- Appuyer doucement sur le doigt et recueillir une petite goutte de sang au milieu de la lame (**cf. figure 6(a)**) ;
- Essuyer le sang restant sur le bout du doigt avec un tampon de coton ;
- Tenir la lame supérieure par les bords ;
- Placer le coin de l'autre lame au centre de la goutte de sang ;
- Étendre légèrement la surface de la goutte par des mouvements spiralés appuyés de la lame (**cf. figure 6(b)**) ;
- Assurer cette défibrination mécanique pendant quelques secondes et étendre la goutte sur environ 1 cm de diamètre ;
- 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 6**).

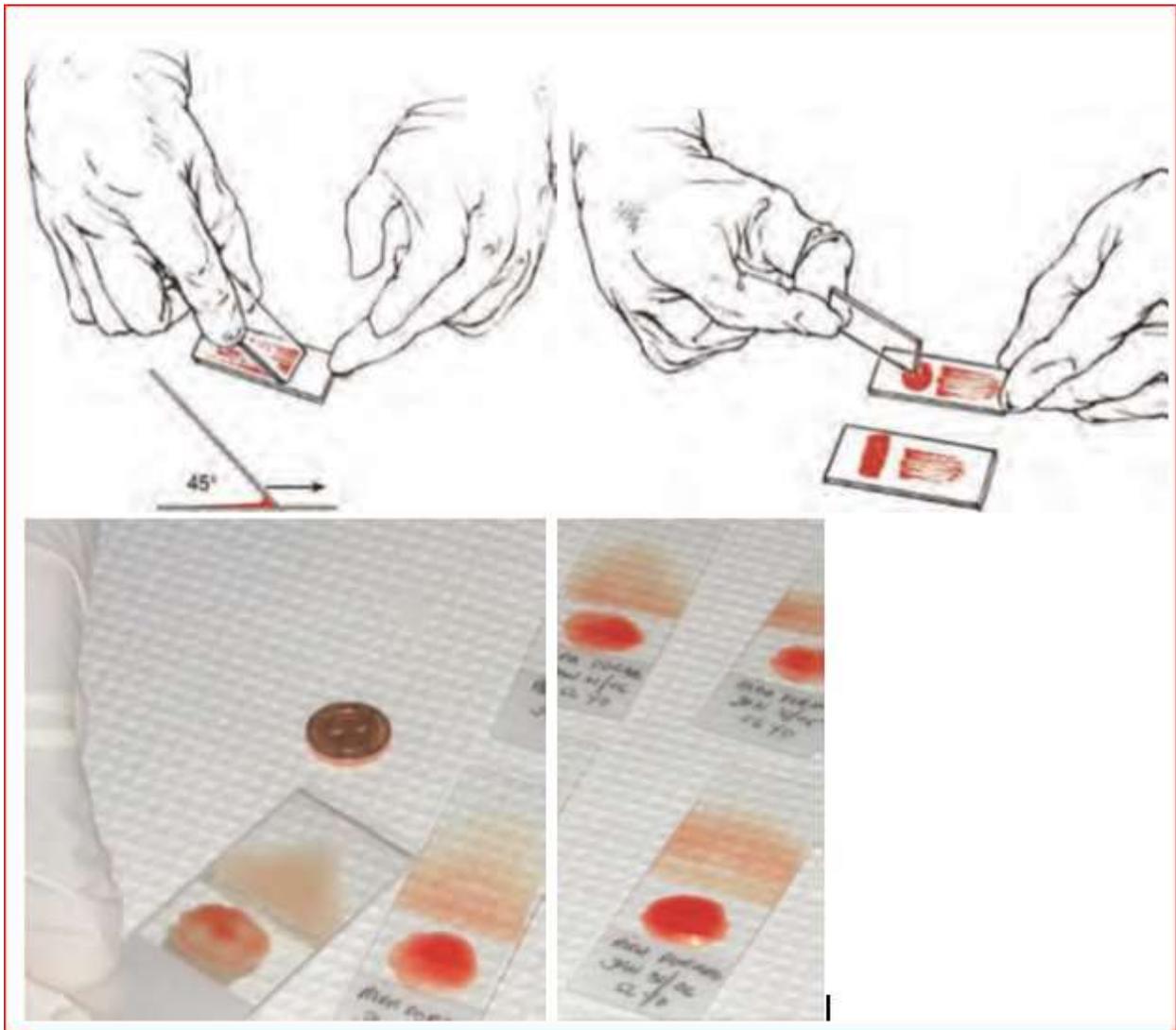


Figure 17. Technique de la goutte épaisse

Source :

https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/164472/9789242547825_fre.pdf;jsessionid=E91A5F3B156FD17C40C695BEED177FFB?sequence=1

✓ **Coloration au 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.

✓ Aspects

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

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

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

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 de sang. 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 0,25gr 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 est 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 μ par la simple formule mathématique suivante :

$$\frac{\text{Nombre de parasites} \times 7\,500}{\text{Nombre de leucocytes}} = \text{parasites par } \mu\text{l}$$

10.3. Technique ELISA

➤ **Matériel et réactifs**

-Matériel - Machine de lavage des plaques d'ELISA (ELISA Ultrawash ELISA Plus, Dynex Technologies),

- Lecteur de microplaques, (Spectramax 340PC Molecular Devices) - Agitateur (Daigger Vortex Genie 2, A Daigger & Co., Inc, Cat # 22220A ou équivalent) - Pipetboy, Integra Biosciences, ou l'équivalent,

- Agitateur Magnétique muni de système de chauffage (modèle PC-420 ou l'équivalent) - Micropipette multicanal 50-300 μ l, 5-50 μ l,

- Micropipette 2 μ l, 20 μ l, 200 μ l, 1000 μ l,

- Microplaque à fond plat

- Plaques de dilution ELISA 2ml,

- bassin de solution pour les micropipettes multicanaux, - Embout de micropipette jetables de 1000 μ l, 200 μ l, 20 μ l, 10 μ l et 2 μ l,

- Flacon Erlenmeyer stérile jetable 250 ml,
- Tubes coniques jetables avec bouchon à vis stérile 50 ml et 15 ml - Tubes coniques jetables avec bouchon à vis stérile 15 ml, Stardsted # 62.554.00 - filtre de stérilisation à usage unique 0,2 μ m, 150ml, la société Nalgen© 155-0020, ou équivalent,
- Tube Eppendorf 1,5 ml,
- Barreaux magnétiques,
- Feuille d'aluminium,
- Mouchoir de nettoyage jetable,
- Eprouvettes graduées, 100ml, 500ml, 1000ml,
- gants stériles
- Chronomètre approprié pour mesurer 20 min à 2 heures d'intervalle

➤ **Réactifs**

- Antigène de revêtement,
- Sérum (E.1: 1000),
- Carbonate de Sodium,
- Bicarbonate de sodium,
- Trinitrite de sodium (N3Na),
- eau déminéralisée purifiée, des fournitures de laboratoire, - Eau distillée,
- Lait,
- Solution tampon Tris (TBS) 10X,
- Comprimé de substrat pour la Phosphatase alcaline, - Tween-20,
- glycérol ultra pur,
- Anticorps de chèvre anti-IgG humain marqué avec la Phosphatase alcaline,

➤ **Préparation des solutions**

- Tampon de revêtement (10X) : (Carbonate de Sodium 0.15M + Bicarbonate de sodium 0.35M), pH = 9,6,

Pour préparer 1000 ml de Tampon de revêtement (10X), dissoudre 15.74g du carbonate de sodium (Na) $2CO_3$ et 29.4g de bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$) dans 1000 ml d'eau distillée.

* Note : Pour préparer une solution 1X à partir d'une solution 10X mélangée à 100ml solution 10X et 900 ml d'eau distillée. - Tampon de lavage : 0,1% de Tween-TBS.

Pour 1000 ml de tampon de lavage, mélanger 100 ml TBS (10x), 900 ml eau distillée et 1ml de Tween-20. Mélanger avec un agitateur magnétique pendant au moins 20 min à température ambiante avant utilisation.

- Tampon de Dilution / Blocage : 5% de lait dans du TBS (1X).

Pour préparer 300 ml de Tampon de dilution/blocage, mélanger 15g lait écrémé en poudre et 300 ml de TBS (1x) dans un Erlenmeyer sur l'agitateur magnétique pendant 20 minutes ou jusqu'à dissolution complète. Conserver à 4 ° C pour un maximum de cinq jours. Facultatif :

1) faire des aliquotes de 50 ml pour préparer du blocage / tampon dilution et conserver à -20°C

2) Ajouter le trinitride de Sodium (0,01% final) au tampon de Dilution/ de la manière suivante et le lait peut être stocké pendant 2-3 semaines.

Pour obtenir le tampon de dilution/ blocage (1x) au trinitride de Sodium (0,01%): Mélanger 500 ml de tampon Dilution/ blocage (1x) et 2,5 ml de Trinitride de Sodium à 2%. Le tampon de dilution/ blocage (1x) au trinitride de Sodium doit être gardé dans l'obscurité.

- glycérol (50%) pour la dilution secondaire des anticorps : mélanger 5 ml glycérol (100%) et 5 ml d'eau distillée. Stériliser par filtration et le garder en aliquotes de 1.5 ml à -20°C.

- solution d'anticorps secondaire :

Note : * Les lyophilisés des anticorps secondaires sont reconstitués à 1 mg/ml avec 50% dans du glycérol (50%) et stockés à -20°C.

Mélanger 10 µl de la solution d'anticorps secondaires marqués avec de la phosphatase alcaline (1mg/ml) avec 10 ml de du Tampon de dilution/ blocage (1x). Cette solution peut être préparée pendant que les plaques sont en incubation avec les anticorps primaires.

➤ **Solution de substrat.**

Pour 10 ml de solution de substrat, dissoudre 2 comprimés de substrat Phosphatase dans du tampon de revêtement (1x). Utiliser 10 ml de solution de substrat par plaque. Cette solution doit être Préparée juste avant la fin de l'incubation avec les anticorps secondaires.

➤ **Procédures**

Revêtement des plaques avec l'antigène

* Note : Les plaques revêtu avec l'antigène doivent être conservées à 4°C et doivent être utilisées dans un délai d'une semaine.

- Identifier chaque plaque avec le nom de l'antigène et la date de revêtement avec marqueur indélébile sur le côté de la plaque.

- Le revêtement de chaque plaque nécessite 10 ml de solution de revêtement. Déterminer le volume total de solution de revêtement nécessaire pour revêtir le nombre de plaques Utilisées.

- Diluer l'antigène de revêtement dans le tampon de revêtement (1x) à une concentration de 1µg/ml dans un tube de 50 ml ou un Erlenmeyer de 250 ml. La dilution souhaitée de l'antigène est déterminée par la concentration de la solution mère d'antigène.

- Mélanger la solution en retournant le tube ou le flacon, puis versez la solution dans le bassin de solution pour micropipette multicanal.

- En utilisant une micropipette multicanale, mettre chaque puits 100 µl de la solution de revêtement.

- empilez soigneusement les plaques en utilisant une plaque vide comme fermeture de l'autre, et les envelopper dans une pellicule en plastique ou en aluminium. Laissez les plaques pendant au moins une nuit au réfrigérateur à 4 °C.

➤ **Plaques de blocage**

- Prendre un nombre désiré de plaques du réfrigérateur. Marquer chaque plaque avec un marqueur indélébile.
- Laver les plaques à l'aide de la machine de lavage des plaques ELISA ((ELISA Ultrawash ELISA Plus, Dynex Technologies). Prendre soin de s'assurer que les plaques ne sont pas complètement séchées avant d'ajouter le tampon de blocage. - A l'aide d'une pipette multicanal, mettre dans chaque puits 200 µl de tampon de blocage et de placer les plaques dans la chambre humidifiée (Square BioAssay-vaisselle) ou les couvrir d'une pellicule en plastique et laisser pendant 2 heures 15min à température ambiante.
- Laver les plaques. Remplir les plaques avec le tampon de lavage si les anticorps primaires ne sont pas prêts à être appliqués immédiatement.
- Mettre les plaques dans une chambre humidifiée jusqu'à ce que les anticorps primaires soient prêts à être appliqués.

Préparation des sérums à tester et préparation des plaques

* NOTE: 24 sérums en triple exemplaire, à une seule dilution peuvent être testés sur une plaque.

Sérum standard de dilution. Une série de dilution en double exemplaire, des sérums de référence sont inclus dans chaque plaque d'ELISA.

➤ **Application des anticorps primaire (sérums)**

- Veiller à ce que toutes les plaques revêtues, les plaques de dilution des sérums test et les plaques de sérums standard soient disponibles et à la température ambiante. Régler le volume de deux pipettes (STANDARD et TEST) multicanaux 50-300 µl à 100 µl
- Régler le chronomètre à 2 heures.
- A l'aide de la pipette multicanal TEST, mélanger le contenu des puits de la ligne A de la plaque de dilution et ensuite transférer 100 µl dans les puits de la ligne A de la plaque ELISA correspondante. Ne pas changer d'embout, utiliser le même embout pour l'ensemble des trois rangées A, B et C. Mélanger le contenu des puits de la ligne B de la

plaque de dilution et transférer 100 µl dans les puits de la ligne B de la plaque ELISA correspondante. Mélanger le contenu des puits de la ligne C de la plaque de dilution et transférer 100 µl dans les puits de la ligne C de la plaque ELISA correspondante.

- Changer les embouts. A l'aide de la pipette multicanal "TEST", mélanger le contenu des puits de la ligne D de la plaque de dilution et ensuite transférer 100 µl dans les puits de la ligne D de la plaque ELISA correspondante. Ne changer pas l'embout, utiliser le même embout pour l'ensemble des trois rangées D, E et F. Changer les embouts, mélanger le contenu de la ligne G de la plaque de dilution et ensuite transférer 100 µl de la ligne E de la plaque ELISA correspondante. Mélanger le contenu de la ligne H de la plaque de dilution et ensuite transférer de 100 µl dans les puits de la ligne F de la plaque ELISA correspondante. - Lorsque 6 lignes de la première plaque ELISA ont été pourvus, en utilisant la micropipette "STANDARD", et en prenant soin que la pipette est toujours utilisée dans la même orientation, transférer 100 µl d'une rangée de la plaque de dilution standard à la ligne G de la plaque ELISA. Sans changer d'embout, transférer 100 µl des puits de la ligne suivante de la plaque de dilution standard aux puits de la ligne H de la plaque ELISA.

- Premier démarrer le chronomètre et mettre la plaque ELISA dans une chambre humide.
- Le temps d'incubation des sérums (anticorps primaires) est de 2 heures à la température ambiante.

➤ **Lavage et application des anticorps secondaires**

- Pendant l'incubation avec les anticorps primaires, réorganiser les plaques dans la chambre humide de sorte que la première plaque soit plus accessible, seconde suivante, etc. Préparer anticorps secondaires. Veiller à ce que la machine de lavage des plaques soit allumée et qu'un volume suffisant de tampon de lavage soit préparé.

- A 2 heures commencer à laver la plaque. Dès que la plaque est lavée, régler le chronomètre à 2 heures et ajouter 100 µl de dilution des anticorps secondaires dans chaque puits, en utilisant les micropipettes multicanales de 50-300 µl. Démarrer le chronomètre

- Le temps d'incubation des anticorps secondaires est de 2 heures à la température ambiante.

➤ **Lavage et l'addition du substrat**

- Pendant l'incubation avec un anticorps secondaire, au moins 30 minutes avant la fin de l'incubation, allumer le lecteur de la plaque ELISA (SpectraMAX ELISA Reader). À 10 minutes avant la fin de l'incubation préparer la solution de substrat. A la fin de l'incubation (2 heures) commencer à laver la plaque,

- Régler le chronomètre à 20 minutes. Dès que la plaque est lavée, s'assurer que le fond de la plaque est propre (essuyer soigneusement avec un tissu si nécessaire). En utilisant une micropipette multicanale, ajouter 100 µl de substrat par puits. Démarrer le Chronomètre. Recouvrir la plaque avec du papier aluminium. Lecture des plaques ELISA

- A la fin des 20 minutes, lire la plaque à 405 nm sur SpectraMAX ELISA Reader. Le lecteur doit être programmé pour agiter la plaque pendant 5 secondes avant de lire. - Enregistrer les données sous forme de fichier PDF.

10.4. Mesure des taux de cytokines

Les taux sériques des cytokines IL-6, IL-10, IFN-γ et TNF ont été quantifiés par cytométrie de flux en utilisant le BD IL-6, IL-10, IFN-γ, TNF Human Flex Set (BD Bioscience Pharmingen, San Diego, Ca, USA) selon les instructions fournies par le fabricant. Ces analyses ont été faites au LMVR avec l'aide de nos collaborateurs américains.

Les analyses de données ont été réalisées à l'aide du logiciel FACSDiva (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Les concentrations de cytokines dans chaque échantillon ont été déterminées à partir de courbes standard. Les concentrations plasmatiques de cytokines pour chaque échantillon ont été extrapolées à partir de la courbe standard et les données ont été exprimées en pg/mL.

10.5. Détermination du taux des anticorps IgG et IgM

Les anticorps IgG et IgM acquis naturellement contre rPFRON12 ont été mesurés dans les échantillons de sérum par dosage immuno-enzymatique direct (ELISA). Des

échantillons de plasma provenant d'individus infectés (n = 93) et non infectés (n = 97) de Thaïlande et d'individus infectés de Kéniéroba (n = 124) ont été testés pour la présence d'anticorps IgG contre rPfRON12. Les mêmes groupes ont été évalués pour la présence d'anticorps IgM dirigés contre le rPfRON12, comme suit : individus infectés de Thaïlande (n = 56), individus non infectés de Thaïlande (n = 97), et les individus infectés de Kéniéroba (n = 68). Des échantillons provenant de personnes non infectées d'une région non endémique ont été utilisés comme témoins négatifs (n = 21).

Des plaques ELISA à 96 puits à liaison protéique élevée ont été enduites de 50 µL de rPfRON12 à 5 µg/ml dans du bicarbonate carbonate 0,05 M, pH 9,6, pendant la nuit à 4°C. Ensuite, des échantillons de plasma (100 µL) dilués à 1:100 ont été ajoutés dans chaque puits et incubés pendant 1h à température ambiante. Pour la détection des anticorps liés, les échantillons ont été incubés avec une dilution de 1:2000 d'IgG ou d'IgM antihumaines de chèvre conjuguées à la peroxydase (Sigma). La densité optique (OD) a été mesurée à 490 nm à l'aide de l'analyse des données CLARIOstar®.

Afin d'éviter un biais dans les résultats causé par la réactivité possible de l'étiquette GST lors de l'expression des protéines, l'excès de taille de bande a été mesuré sur le gel SDS PAGE avec ImageJ. Pour calculer l'excédent de protéines, les plaques ont été enduites de GST. Les valeurs obtenues dans chaque réaction de l'échantillon à la GST ont été soustraites de la valeur obtenue dans la réaction contre PfRON12.

Toutes les plaques testées ont été normalisées en utilisant les valeurs des contrôles anti-GST (4 puits par plaque). La valeur limite a été calculée comme étant la moyenne plus trois écarts-types du témoin négatif. Les indices de réactivité (RI) ont été obtenus à partir du rapport des valeurs d'absorbance de chaque échantillon et de la valeur limite. La prévalence des IgG et des IgM contre l'antigène rPfRON12 était considérée comme positive si les valeurs (RI) étaient supérieures à 1,0. La détection des sous-classes d'IgG a été effectuée comme indiqué ci-dessus, à l'exception des IgG1 (HRP), IgG2 (HRP), IgG3 (HRP) et IgG4 (HRP) spécifiques des anticorps monoclonaux secondaires anti-humains (Abcam) dilués au 1:2000. Les résultats ont été exprimés en RI ± SEM (erreur-type de la moyenne) (cf. annexe4).

10.6. Caractérisation et méthode de localisation du PfRON12 (Figure 7)

Le PfRON12 recombinant a été exprimé avec succès dans les cellules STAR d'*E. coli* comme protéine de fusion GST. La pureté et la qualité de la protéine recombinante ont été vérifiées par SDS-PAGE, qui a révélé une seule bande d'environ 56 kDa. La protéine recombinante générée (rPfRON12) a été reconnue par le plasma de patients infectés par *P. falciparum*, confirmant son immuno-réactivité. Ces analyses ont été faites avec nos collaborateurs japonais.

Pour caractériser PfRON12, nous avons d'abord généré un PfRON12 recombinant fusionné à la GST comme décrit [8]. Brièvement, un fragment codant pour PfRON12 mais dépourvu du peptide signal (PF3D7_1017100 : positions des acides aminés [aa] 26-310) a été amplifié par PCR à partir d'ADNc obtenu à partir de schizonte *P. falciparum* 3D7 en utilisant une amorce de détection avec le site XhoI et une amorce antisens avec le site NotI (PfRON12-F1 : 5'-ctcgagAAGACACAACA AAAAAAATGAAGGAATTATTG-3', PfRON12-R1 : 5'- gcggccggcCTAT TCTTGTGTAAATCGGGAAACGTTCTC-3'). Le fragment d'ADN amplifié a été cloné dans le plasmide pEU-E01-GST-TEV-MCS-N2 (CellFree Sciences, Matsuyama, Japon) et GST-PfRON12 a été exprimé en utilisant le système de traduction sans germes de blé (CellFree Sciences). Le GST-PfRON12 exprimé (Fig. 7A, pointe de flèche de la ligne 1, environ 70 kDa) a été purifié par affinité à l'aide de la colonne Glutathion-Sepharose 4B (GE Healthcare, Camarillo, CA, USA) et, la fraction PfRON12 purifiée a été éluée par clivage sur colonne avec la protéase AcTEV (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (Fig. 1A, flèche voie 5, environ 40 kDa).

Pour produire des antisérums PfRON12, 250 µg de PfRON12 purifié avec l'adjuvant complet de Freund ont été utilisés pour immuniser par voie sous-cutanée un lapin blanc japonais. Deux rappels de 250 µg du PfRON12 avec l'adjuvant incomplet de Freund ont ensuite été administrés à intervalles de 3 semaines. L'antisérum a été prélevé 14 jours après la dernière vaccination. Le travail sur les animaux a été effectué par Kitayama Labes (Ina, Japon) conformément aux directives basées sur la "Charte pour le bien-être des animaux de laboratoire" (Japanese Society for Laboratory Animal Resources). La spécificité des anticorps anti-PfRON12 a été examinée par Western blotting à l'aide de 106 extraits de parasites riches en schizontes provenant de *P. falciparum* 3D7 en culture

[9]. L'analyse immunoblot a détecté une seule bande à environ 40 kDa dans des conditions réductrices (Fig. 7B, pointe de flèche de la ligne R), ce qui concorde avec les données avec le poids moléculaire prédit. En revanche, les anticorps anti-PfRON12 ont reconnu une seule bande à environ 80 kDa dans des conditions non réductrices (Fig. 7B, flèche NR), ce qui suggère que le PfRON12 natif forme un multimère à liaison disulfure. Ces résultats indiquent que les anticorps anti-PfRON12 du lapin reconnaissent spécifiquement le PfRON12 natif.

(A) Analyse SDS-PAGE des protéines exprimées par le système sans cellules germinales du blé. Le mélange de protéines a été séparé par des gels de polyacrylamide SDS à 12,5% (SDS-PAGE) dans des conditions réductrices et coloré avec du bleu brillant Coomassie. Les échantillons de chaque ligne étaient les suivants : mélange réactionnel total (ligne 1), fractions surnageantes et précipitées après une brève centrifugation (lignes 2 et 3, respectivement), protéines non liées et purifiées par affinité (lignes 4 et 5, respectivement), protéine adsorbée restant sur la matrice d'affinité (ligne 6), et marqueur du poids moléculaire des protéines (ligne M). Les produits à base de PfRON12 fusionné à la GST et les protéines purifiées avec digestion par protéase AcTEV sont indiqués respectivement par une tête de flèche et une flèche. La GST clivée restée sur la matrice d'affinité est indiquée par une flèche en pointillés.

(B) Analyses par transfert Western utilisant des antisérums contre PfRON12. Dans chaque ligne, les protéines extraites par le tampon de chargement SDS-PAGE d'environ 10^6 *P. falciparum* 3D7 schizontes ont été séparées soit sous condition réductrice (ligne R) ou non réductrice (ligne NR). Une seule bande d'environ 40 kDa dans des conditions réductrices (pointe de flèche) correspond au poids moléculaire prévu du PfRON12. Une seule bande à environ 80 kDa dans des conditions non réductrices (flèche) représente le PfRON12 natif qui forme un multimère à liaison disulfure.

(C) Localisation sous-cellulaire de PfRON12 dans les schizontes et les mérozoïtes libres par immunofluorescence indirecte. PfRON12 : coloration avec des anticorps polyclonaux anti-PfRON12 de lapin, RON2 : coloration avec des anticorps polyclonaux anti-RON2 de souris, MTIP : coloration avec des anticorps polyclonaux anti-MTIP de souris, Merge :

image fusionnée comprenant le noyau coloré DAPI, DIC : image microscopique à contraste différentiel. Triton (+) ; perméabilisé avec 0,1% de Triton X-100 ; barres 5 µm.

(D) Localisation sous-cellulaire de PfRON12 dans le mérozoïte de *P. falciparum* au stade schizontale par immunomicroscopie électronique. La localisation de PfRON12 a été indiquée par des particules d'or de 15 nm observées sur l'extrémité de la rhoptrie. Rh : Rhoptry, N : noyau ; barre 500 nm.

10.7. Numération formule sanguine

La numération formule sanguine est faite au moyen d'une simple prise de sang, puis l'analyse est effectuée par un automate qui mesure les différentes paramètres.

➤ Principe

L'appareil XT-1800i réalise l'analyse du nombre total des leucocytes en utilisant un bloc détecteur photosensible dont le fonctionnement repose sur la méthode de cytométrie de flux et l'utilisation d'un laser à semi-conducteur. Les taux d'érythrocytes et de plaquettes sont analysés par le compteur GR qui emploie la méthode de focalisation hydrodynamique. L'hémoglobine est analysée par le compteur de l'hémoglobine sur la base de la méthode spectrophotométrie. Elle fournit des résultats pour les paramètres suivants: globule rouge, hémoglobine, hématocrite, plaquette etc....

➤ Matériel et réactifs

La numération formule sanguine est effectuée sur l'appareil sysmex XT-1800i qui est un analyseur automatique d'hématologie utilisé pour les diagnostics in vitro en laboratoires cliniques. Elle est capable d'analyser et de livrer les résultats de 21 paramètres d'un échantillon sanguin.

Les différents réactifs utilisés par l'appareil sysmex XT-1800i sont :

CELLPACK : diluant qui sert à nettoyer l'aiguille après l'aspiration d'un Echantillon

STROMATOLYSER-FB Réactif lytique : l'analyse des leucocytes

STROMATOLYSER-4DL : diluant d'une partie du sang total après l'aspiration.

STROMATOLYSER- 4DS : colore les leucocytes dans un échantillon de sang lysé

SULFOLYSER : lyse les érythrocytes et agit sur la globine de l'hémoglobine pour former un complexe stable.

RET SEARCH: dilue et colore en même temps les réticulocytes, pour déterminer la concentration sanguine en réticulocytes effectuée sur l'appareil.

CELLCLEAN : détergent alcalin puissant qui supprime les réactifs lytiques, les résidus cellulaires et les protéines sanguines restées dans l'automate.

➤ **Prélèvement**

Après s'être assuré de la disponibilité de tous les nécessaires pour le prélèvement, le numéro du participant est écrit sur le tube plus la date et l'heure du prélèvement. Le prélèvement peut être effectué sur du sang capillaire ou sur du sang veineux en tube contenant une substance anticoagulante EDTA (éthylène diamine tétra acétique) qui va empêcher le sang de se "gélifier" et permet une meilleure conservation des cellules. Dès que la prise de sang est terminée il faut homogénéiser le prélèvement par des mouvements de retournement doux pour éviter l'apparition de caillot. Les tubes de prélèvement (la couleur du bouchon est normalisée en fonction de l'anticoagulant, en l'occurrence, le violet) utilisés dans la plupart des cas ont un volume de 5 ml et sont calibrés pour des prélèvements de 4 ml de sang + 1 ml d'EDTA. Ce prélèvement se fait selon les bonnes pratiques de laboratoire.

➤ **Mode d'analyse**

En mode manuel, après que les échantillons aient été agités manuellement, les bouchons des tubes sont retirés à la main et l'échantillon est aspiré via l'aiguille d'aspiration de sang total. La lecture se fait automatiquement et les résultats sont sauvegardés dans l'automate.

11. Fiche signalétique

Nom : KASSE **Prénom :** FATOUMATA

Email : fatichakasse2@gmail.com **Pays d'origine :** MALI

Titre de la thèse : Réponse immunitaire acquise naturellement contre la protéine 12 de l'extrémité de Rhoptrie de *Plasmodium falciparum*

Année universitaire : 2018– 2019 - **Ville de soutenance :** Bamako

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

Source d'intérêt : Immunologie, Santé Publique et Parasitologie

Résumé

Les protéines recouvrant la surface du mérozoïte du *Plasmodium* et sécrétées par ses organites apicaux sont considérées comme des candidats vaccins prometteurs pour le paludisme au stade sanguin. La protéine 12 du col de rhoptrie de *Plasmodium falciparum* (PfRON12) a récemment été signalée comme une protéine spécifiquement exprimée dans les schizontes et localisée dans le col de rhoptrie des mérozoïtes. Dans cette étude, nous avons évalué son potentiel en tant que vaccin candidat. Nous avons exprimé une protéine PfRON12 recombinante par un système sans cellules germinales de blé pour obtenir un anticorps anti-PfRON12. L'analyse immunoblot des lysats de schizontes a détecté une seule bande à environ 40 kDa dans des conditions réductrices, ce qui correspond au poids moléculaire prévu. De plus, l'anticorps anti-PfRON12 a reconnu une seule bande autour de 80 kDa dans des conditions non réductrices, ce qui suggère que le PfRON12 natif forme un multimère à liaison disulfure. L'essai d'immunofluorescence et la microscopie immunoélectronique ont révélé que le PfRON12 était localisé dans le col de mérozoïtes de la rhoptrie des schizontes et à la surface des mérozoïtes libres. L'activité biologique de l'anticorps anti-PfRON12 a été testée par un test in-vitro d'inhibition de la croissance (GIA), et les anticorps de lapin ont inhibé significativement l'invasion des érythrocytes par le mérozoïte. Nous avons ensuite cherché à savoir si PfRON12 est immunogène chez les personnes infectées par *P. falciparum*.

Les sérums de personnes infectées par *P. falciparum* en Thaïlande et au Mali ont réagi avec le PfRON12 recombinant. De plus, les anticorps humains anti-PfRON12 purifiés par affinité à partir d'échantillons de sérum maliens ont inhibé l'invasion des érythrocytes par le mérozoïte in-vitro. De plus, l'analyse de la réponse anticorps chez des personnes qui n'étaient pas atteintes de paludisme de manière aiguë, mais qui avaient été infectées par le paludisme dans le passé, a révélé que 32 patients (33 %) présentaient une réponse immunitaire IgG contre PfRON12. De plus, le PfRON12 est très bien conservé avec seulement 4 mutations non synonymes dans la séquence codante d'environ 200 isolats déposés dans PlasmoDB. Les taux de cytokines IL-2 et IL-10 étaient significativement plus élevés chez les enfants non infectés par le *Plasmodium* que chez ceux infectés. La présence d'anticorps naturellement acquis contre cette protéine en l'absence de la maladie suggère que PfRON12 induit une réponse anticorps à long terme. Ces résultats suggèrent que le PfRON12 pourrait être un antigène candidat potentiel au stade sanguin contre *P. falciparum*.

Mots clés : *Plasmodium falciparum*, RON12, Immunité naturellement acquise, Mali

Summary

Naturally acquired immune response against protein 12 of the Rhoptry end of *Plasmodium falciparum* in children of the village of Kéniéroba in the rural commune of Bancoumana, Mali

Proteins coating *Plasmodium* merozoite surface and secreted from its apical organelles are considered as promising vaccine candidates for blood-stage malaria. The rhoptry neck protein 12 of *Plasmodium falciparum* (PfRON12) was recently reported as a protein specifically expressed in schizonts and localized to the rhoptry neck of merozoites. Here, we assessed its potential as a vaccine candidate. We expressed a recombinant PfRON12 protein by a wheat germ cell-free system to obtain anti-PfRON12 antibody. Immunoblot analysis of schizont lysates detected a single band at approximately 40 kDa under reducing conditions, consistent with the predicted molecular weight. Additionally, anti-PfRON12 antibody recognized a single band around 80 kDa under non-reducing conditions, suggesting native PfRON12 forms a disulfide-bond-mediated multimer. Immunofluorescence assay and immunoelectron microscopy revealed that PfRON12 localized to the rhoptry neck of merozoites in schizonts and to the surface of free merozoites. The biological activity of anti-PfRON12 antibody was tested by in vitro growth inhibition assay (GIA), and the rabbit antibodies significantly inhibited merozoite invasion of erythrocytes. We then investigated whether PfRON12 is immunogenic in *P. falciparum*-infected individuals. The sera from *P. falciparum* infected individuals in Thailand and Mali reacted with the recombinant PfRON12. Furthermore, human anti-PfRON12 antibodies affinity-purified from Malian serum samples inhibited merozoite invasion of erythrocytes in vitro. Additionally, the analysis of the antibody response in individuals who were not acutely infected with malaria, but had been infected with malaria in the past indicated that 32 patients (33%) exhibited an IgG immune response against PfRON12. Moreover, PfRON12 is highly conserved with only 4 non-synonymous mutations in the coding sequence from approximately 200 isolates deposited in PlasmoDB. The cytokines IL-2 and IL-10 levels were significantly higher in children uninfected by *Plasmodium* than those infected. The presence of naturally acquired antibodies to this protein in the absence of the disease suggests that PfRON12 induces a long-term antibody response. These

results suggest that PfRON12 might be a potential blood-stage vaccine candidate antigen against *P. falciparum*.

Keywords: *P. falciparum*, RON12, Acquired immunity, Mali

Serment de Galien

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

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

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'honneur, de 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 couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.
Je le jure !