

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT
SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

REPUBLIQUE DU MALI

Un Peuple-Un But-Une

UNIVERSITE DES SCIENCES, DES TECHNIQUES ET
DES TECHNOLOGIES DE BAMAKO



FACULTE DE PHARMACIE



Année Universitaire 2018 – 2019

N°...../

THESE

Étude comparative des réponses anticorps IgG des différentes
visites de l'essai vaccinal Pfs230D1M-EPA/AS01 et Pfs25M-
EPA/AS01 chez les volontaires adultes à Sotuba, Mali.

Présentée et soutenue publiquement le 03/07/2019 devant la

Faculté de Pharmacie du Mali

Par **M. Adama Ouattara**

Pour Obtenir le Grade de Docteur en Pharmacie

(DIPLÔME D'ETAT)

JURY

Président : Pr Mahamadou Ali THERA
Membres : Pr Issaka SAGARA
Dr Amatigué ZEGUIME
Codirectrice : Dr Merepen dite Agnès GUINDO
Directeur : Pr Boubacar TRAORE

DEDICACES

A **Dieu**, Le Clément, Le Tout Puissant, Le Tout Miséricordieux pour l'accompagnement et la santé dont nous avons bénéficié au cours de ce travail.

A mon père : Aly Ouattara

Autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes soient-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Ta patience sans fin, ta compréhension et ton encouragement sont pour moi le soutien indispensable que tu as toujours su m'apporter. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et, je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir. Que Dieu le tout puissant te préserve, t'accorde la santé, le bonheur et te protège du mal.

A ma très chère mère : Fatoumata Sogodogo

Tu as été pour nous une mère exemplaire. Merci pour tout ce que tu nous as donné en commençant par la vie. Ton affection, tes conseils et ton dévouement pour la réussite de tes enfants n'ont jamais fait défaut. Ce travail est le fruit de ta bravoure. Je prie Dieu pour que tes souffrances endurées ne soient pas vaines et qu'il te prête longue vie et une santé de fer afin que tu puisses continuer à nous conseiller, à nous consoler comme tu l'as toujours fait. Maman que tes attentes puissent être comblées. *Amen!*

A mes frères et sœurs : Maimounata, Djakaliya, Brahima, Salif, Fatoumata, Noufou, Yaya, Mamadou, Kalilou Ouattara

Vous n'aviez pas manqué de m'entourer de la chaleur familiale, je vous en suis reconnaissant. Que **DIEU** vous donne la chance et le courage de faire toujours mieux que moi.

A ma grande famille : je cite en particulier mon oncle Seydou Ouattara, mes tantes, mes oncles ainsi que mes cousins et cousines

Je ne pourrais jamais exprimer le respect que j'ai pour vous. Vos prières, vos encouragements et votre soutien m'ont toujours été d'un grand secours. Puisse Dieu, le tout puissant vous préserver du mal, vous combler de santé, de bonheur et vous procurer une longue vie.

Aux familles Sogodogo de Magnambougou et à tous mes cousins pour tous les efforts consentis. Recevez ici l'expression de toute ma reconnaissance, soyez rassurés de mon profond attachement.

A la mémoire de mon oncle feu Ousmane Ouattara merci pour tout ce que vous avez consenti pour moi. Reposez en paix mes chers et que Dieu vous accorde son paradis éternel.

A mon ami co-chambrier Iiassé Daou ce travail est le tien, je n'oublierai jamais les moments difficiles qu'on a franchis ensemble, pendant lesquels tes qualités sont ressorties. Je ne saurais oublier les luttes farouches que nous avons menées nuit et jour pour notre réussite. Les mots me manquent aujourd'hui pour t'apprécier à ta juste valeur.

A tous les Professeurs responsables de cours à la FAPH (Faculté de Pharmacie), pour la qualité de l'enseignement que nous avons reçu d'eux.

Au Dr Amatigué Zeguime sans votre soutien et votre engagement ce travail n'aurait pu être réalisé, les mots nous manquent pour vous exprimer toute notre reconnaissance, nous vous disons un grand merci.

Au Mr Moussa Baba Kanouté et Mr M'Bouyé Doucouré cette thèse a été facilitée par votre appui technique et bienveillante. En dehors du travail votre humanisme fait de vous un modèle. Chers grand frères, je vous remercie pour tout.

Au Mr Boucary Ouologuem sans qui je ne serais pas arrivé jusque-là. Vous avez guidé mes premiers pas au sein de l'unité. Vous m'avez initié aux différentes activités de terrain et de laboratoire. Vous avez été mon maître. Merci infiniment cher aîné, votre simplicité, votre courtoisie et votre amabilité m'ont permis d'intégrer très vite la vie d'équipe de chercheurs.

Dr Mahamadou Soumana Sissoko, Dr Mahamadou Hamady Assadou Maiga, Dr Mamady Koné, Dr Kourane Sissoko, Dr Sibiri Sissoko, Dr Amadou Niangaly, Dr Cheick Oumar Guindo, Dr Abdoulaye Katilé, Dr Bourama Kamaté, Dr Sidiki Perou, Dr Bala Diarra, Dr Karim Bengaly, Dr Seydou Traoré, Dr Boubacar Dembele, Dr Sadio Diarra, Dr Seydou Sankaré, Dr Adama Coulibaly, Dr Modibo Doumbia, Dr Alassane Togola merci pour vos conseils et votre disponibilité. Trouvez ici l'expression de ma profonde gratitude.

A Dr Agnès Guindo pour son soutien, son encouragement, sa disponibilité et ses conseils qui ne m'ont à aucun moment fait défaut. Merci pour mon intégration dans l'équipe et tes contributions exceptionnelles dans la réalisation de ce travail. Que **Dieu** vous permette de gravir plein d'échelons scientifiques.

A tous les **internes** du **MRTC / DEAP**, en particulier **Abdoulaye Djiguiba, Boucary Togo, Barasse Coulibaly, Bilaly Traoré, Modibo Traoré** mes remerciements et mes encouragements.

A la mémoire de notre cher maître Professeur OGOBARA DOUMBO

La vie est éphémère, mais le souvenir d'un être cher reste. Tu étais un modèle, un soutien inlassable pour la réussite des étudiants. Une référence qui donne des frissons lorsqu'elle est citée.

Que ton âme repose en paix.

A toute la promotion «Pr N'golo Diarra» pour le climat d'entente, de gaieté et de compassion mutuelle que nous avons fait prévaloir durant notre cycle. Que **Dieu** nous accorde beaucoup de chance et de réussite à tous dans nos carrières professionnelles respectives.

A tous mes amis : je cite en particulier mon intime ami **Oumar Doumbia, Younoussé Zeguimé, Ibrahima Sylla, Dr Alaye Diah, Dr Adama Diabé Coulibaly, Dr Boubacar Sidiki Diamouténé, Salé Sidibé, Sekou Korka, Djakaria Fomba, Dr Abdoulaye Keita, Ousmane Tangara, Mohamed Keita, Fatoumata Diarra** pour votre entière disponibilité, votre soutien, et votre sympathie. Ce travail est le vôtre. Je vous en suis sincèrement reconnaissant.

A toute l'équipe du CAP-Lab du Bancoumana, Donéguébougou, Sotuba, Ouelessebougou et Immuno Lab. Je vous en suis profondément reconnaissant et soyez rassurés de mon attachement.

A mon groupe d'exercice à la FAPH, **Dr Mohamed Doumbia, Dr Abdoulaye Sogoba, Dr Adama Koné Dr Mahamadou Diarra, Dr Amadou Bouaré, Mariam Sow, Diarraou Diarra, Cheick Oumar Konaté et tous les membres du groupe Zam-Zam** Merci pour vos encouragements et vos conseils.

Vous n'aviez ménagé aucun effort pour la réussite de ce travail. Retrouvez ici notre profonde gratitude. Ce travail est le vôtre.

A toute l'équipe de l'unité de gestion des données du DEAP.

A tout le personnel du MRTC/DEAP.

A tous les chauffeurs du MRTC / DEAP

A tous les volontaires qui ont bien voulu être les pionniers.

Aux autorités et notables et à toute la population de Sotuba.

A toutes et à tous qui de près ou de loin m'ont soutenu, les mots me manquent pour vous exprimer toute ma joie, ma reconnaissance et tout mon respect.

Je vous dis un grand merci.

HOMMAGE AUX MEMBRES DU JURY

A notre Maître et Président du Jury

Professeur Mahamadou Ali THERA, MD, MPH, PhD.,

- ❖ **Professeur Titulaire de Parasitologie et Mycologie à la FMOS/USTTB,**
- ❖ **Directeur Scientifique du BMP (Bandiagara Malaria Project),**
- ❖ **Chef de l'Unité de Développement Clinique du Vaccin Antipaludique au MRTC/DEAP, Faculté de Médecine d'Odonto-Stomatologie (FMOS)**
- ❖ **Membre de l'Académie des Sciences du Mali**
- ❖ **Chevalier de l'Ordre National du Mali**

Cher Maître,

Permettez-nous de vous remercier pour ce grand honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce travail.

Nous avons toujours admiré vos qualités scientifiques et sociales.

Vous avez cultivé en nous le sens du travail bien fait et la rigueur scientifique.

Recevez ici cher maître toute notre reconnaissance et nos sincères remerciements. Soyez rassurés de notre entière disponibilité.

A notre Maitre et Juge.

Docteur Amatigué ZEGUIME, PharmD.,

- ❖ **Lab manager du laboratoire clinique (CAP-Lab) au MRTC/DEAP**
- ❖ **Pharmacien chercheur au MRTC/DEAP.**

Cher Maitre,

Nous vous remercions vivement pour l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail. Nous sommes très sensibles à votre gentillesse et à votre profond humanisme.

Que ce travail soit pour nous l'occasion de vous exprimer notre admiration ainsi que notre gratitude.

Veillez croire, chère Maître, en nos sentiments les plus respectueux.

A notre Maitre et Juge.

Professeur Issaka SAGARA, MD, MSPH, PhD,

- ❖ **Maitre de recherche**
- ❖ **Médecin chercheur au MRTC/DEAP/FMOS-FAPH,**
- ❖ **Chef de l'unité biostatistique et data management au MRTC/DEAP/FMOS de Bamako.**
- ❖ **Investigateur principal (PI) des essais vaccinaux à Bancoumana, Donéguébougou et Sotuba.**

Cher Maitre,

C'est le lieu de vous remercier pour votre modestie, votre disponibilité constante, vos qualités scientifiques et pédagogiques, votre esprit d'équipe et votre rigueur pour le travail bien fait qui font de vous un maitre apprécié.

A notre Maitre et Co-directrice de thèse.

Docteur Merepen dite Agnès GUINDO, PharmD

- ❖ **Assistante en Immunologie à la FAPH**
- ❖ **Pharmacienne chercheur au MRTC/DEAP/FMOS-FAPH**
- ❖ **Doctorante en biologie moléculaire université de Ghana et USTTB**

Cher Maitre,

Nous ne saurons jamais trouver assez de mots pour témoigner notre reconnaissance, pour l'intérêt que vous avez apporté à ce travail.

Nous avons été impressionnés par vos qualités scientifiques, votre disponibilité et la simplicité avec laquelle vous avez accepté de co-diriger ce travail.

Retrouvez ici cher maître l'expression de nos sincères remerciements.

Nous prions le Seigneur de vous rendre vos bienfaits et de nous permettre de vous rendre hommage en ayant la force, le courage et la chance de suivre vos pas.

A notre Maitre et Directeur de thèse.

Professeur Boubacar TRAORE, PharmD, PhD

- ❖ **Professeur Titulaire de Parasitologie-Mycologie à la FAPH**
- ❖ **Doyen de la Faculté de Pharmacie**
- ❖ **Directeur scientifique du laboratoire clinique du MRTC**
- ❖ **Responsable de l'unité Paludisme/Grossesse et Immuno-pathologie du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires**

Cher Maitre,

Merci pour la confiance que vous nous avez accordée du début à la fin de ce travail et pour votre disponibilité.

Votre rigueur scientifique, votre humanisme, votre souci du travail bien fait font de vous un maitre admiré de tous.

Cher maître veuillez accepter l'expression de notre grande admiration.

ABREVIATIONS

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PNLP : Programme National de Lutte contre le Paludisme du Mali

PNB : Produit National Brut

RTS, S : Fusion protéique entre l'antigène circumsporozoite protein de *Plasmodium falciparum* et HbsAg (Antigène de surface du virus de l'hépatite B)

AS01 : Adjuvant System 01

GSK : GlaxoSmithKline

EMA : Agence Européenne des Médicaments

TBV: Vaccin bloquant la transmission/transmission blocking vaccine

MRTC: Malaria Research and Training Center

USTTB : Université des Sciences, Techniques & Technologies de Bamako /University of Sciences, Techniques & Technologies of Bamako

NIAID: National Institute of Allergy and Infectious Diseases

NIH: National Institutes of Health

Pfs25: un antigène de surface du zygote et de l'ookinete au stade du développement du parasite chez le moustique

Pfs230 : un antigène parasitaire exprimé par le gamétocyte et sur la surface des gamètes émergents chez le moustique hôte.

EPA: ExoProtein A

IgG: Immunoglobuline G

Hb S: Hémoglobine S

Hb F: Hémoglobine Fœtale

G6PD: Glucose-6 Phosphate Déshydrogénase

Fc: fragment cristallisable

IFN- γ : interféron gamma

GM-CSF: Facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages

IL: Interleukine

CD: cluster of differentiation

NO: Monoxyde d'azote

ADCI: Antibody Dependant Cell-mediated Inhibition

CDs: Cellules dendritiques

NK: Cellule tueuse naturelle

NKT: Natural killer T cells

T γ δ : Lymphocyte T gamma delta
MLB: Mannose Binding Lectines
MA: Macrophage
HLA: Human Leucocyte Antigen
TCR: Récepteur du lymphocyte T
Th: T Helper
TNF: Tumor Necrosis Factor
T reg: Cellules T régulatrices
BCR: B-cell Receptor
Fab: Fragment antigen binding
PfEMP1 : Plasmodium falciparum érythrocyte membrane protein-1
PfSPZ: Plasmodium falciparum sporozoite
CSP: Circum Sporozoïte Protein
LSA1: Liver Stage specific Antigen 1
STARP: Sporozoite Threonine and Asparagine Rich Protein
SALSA: Sporozoite And Liver Stage Antigen
TRAP: Thrombospondin Related Adhesion Protein
MSP-1: Mérozoïte Surface Protein 1
AMA1: Apical Membrane Antigen 1
GLURP: Protéine riche en Glutamine
HRP- 1: Histidine-Rich Protein-1
RAP- 2: Roptry Associated Protein-2
RESA : Roseting Erythrocyte Surface Antigen
SERA : Serine repeat Antigen
QS-21 : Quillaja saponaria 21
MPL: Monophosphoryl lipide A
CPG 7909: Cytosine phosphorothioate et Guanine
TLR9: Toll-like receptors
PBS: Phosphate Buffer Saline
HSA: human serum albumin
SMFA: Standard membrane feeding assay
LMIV: Laboratory of Malaria Immunology ET Vaccinology
KDa: Kilo Dalton
USA: United States of America

HBsAg : Antigène de surface de l'Hépatite/hepatitis B surface antigen

FDA: Food ET Drug Administration

FMPOS: Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie

EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique

SST : Serum Separator Tube

IM : Intramusculaire

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

FM: Frottis mince

CSP: Circum sporozoite Protein

GPI: Glycosil Phosphatidyl Inositol

EDCTP: European Developing Country Clinical Trial Partenaireship

MMV: Malaria Médecine Venture

PCR : Polymérase Chain Réaction

ADN: Acide désoxyribonucléique

cGMP: Actuel manuel de bonnes pratiques de fabrication/current Good Manufacturing Practices

GE: Gouttes épaisses

ARN: Acide ribo-nucléique/ ribonucleic acid

DEAP: Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires

PNLP : Programme National de Lutte contre le Paludisme

Table des matières

I. INTRODUCTION	1
II. OBJECTIF	4
1. Objectif principal	4
2. Objectifs spécifiques	4
III. GÉNÉRALITÉS	5
1. Paludisme.....	5
1.1 Définition	5
1.2 Vecteur.....	5
1.3 Agents pathogènes	5
1.4 Cycle biologie de Plasmodium	9
1.5 Historique du paludisme.....	11
1.6 Répartition géographique	12
2. Immunité anti-palustre.....	13
2.1 Notion de résistance naturelle	13
2.2 Immunité innée dans le paludisme.....	14
2.2.1 Rôle des cellules	14
2.2.2 Rôle du complément	17
2.2.3 Immunité adaptative dans le paludisme.....	18
2.2.4 Rôles des lymphocytes T et B dans le paludisme :	18
2.3 Immunité humorale dans le paludisme	20
2.4 Immunité bloquant la transmission du paludisme	22
2.5 Evasion immunitaire	23
3. Vaccination anti-palustre	24
3.1 Les différents types de candidats vaccin	24
3.1.1 Les vaccins pré-érythrocytaires ou hépatiques	24
3.1.2 Les vaccins érythrocytaires	24
3.1.3 Les vaccins ciblant le stade sexuel du parasite	26
3.2 Développement clinique d'un vaccin antipaludique.....	26
3.2.1 Les essais de Phase I.....	26
3.2.2 Les essais de Phase II	27
3.2.3 Les essais de Phase III.....	27
3.2.4 Les essais de phase IV	27
3.3 Les adjuvants vaccinaux	28

3.3.1	Le QS-21 : Quillaja saponaria 21 (Stimulon™ QS-21 Adjuvant).....	28
3.3.2	Le MPL : Monophosphoryl lipide A.....	29
3.3.3	Alhydrogel®.....	29
3.3.4	AS01.....	29
3.3.5	CPG 7909.....	30
3.3.6	Les diluants : PBS et HSA.....	30
3.4	Antigène Pfs230.....	30
3.6	ENGERIX-B (vaccin contre l'hépatite B: recombinant).....	32
IV.	METHODOLOGIE.....	33
1.	Le lieu d'étude :.....	33
2.	Période d'étude :.....	35
3.	Population d'étude.....	35
	Échantillonnage.....	35
4.	Type d'étude :.....	35
5.	Sélection et recrutement des volontaires.....	37
5.1	Recrutement.....	37
5.2	Critères d'Inclusion.....	37
5.3	Critères de non inclusion.....	37
6.	Organisation pratique du travail :.....	39
6.1	Consentement.....	39
6.2	Dépistage.....	39
6.3	Vaccination.....	40
6.4	Suivi.....	41
6.5	Salle de réanimation.....	42
7.	Méthodes d'étude.....	42
7.1	Etude immunologique.....	42
7.1.1	Technique d'ELISA.....	42
7.2	Étude parasitologique.....	42
7.2.1.	Diagnostic biologique du paludisme.....	42
A.	La goutte épaisse (GE).....	42
B.	Le Frottis mince (FM).....	43
7.2.2	Test de Diagnostic rapide du paludisme.....	43
8.	Considérations éthiques.....	43
9.	Saisie et analyse des données.....	44
V.	RESULTATS.....	45

1. Caractéristiques sociodémographiques de la population d'étude.....	45
L'ethnie Bambara était la plus représentée dans notre étude soit 48%	45
2. Evaluation de l'immunogénicité.....	46
VI. DISCUSSION	51
VII. CONCLUSION	54
VIII. RECOMMANDATION	55
IX. RÉFERENCE.....	56
X. FICHE SIGNALETIQUE	63
XI. ANNEXES	67

Liste des tableaux:

Tableau I: Différents espèces et stades de plasmodium sur frottis mince.....	9
Tableau II : Calendrier de Vaccinal de Pfs230 et Pfs25	37
Tableau III: Le taux moyen d'IgG anti-Pfs25 et anti-Pfs230 en fonction du visite.....	46

Liste des Figures :

Figure 1 : Cycle du développement du Plasmodium avec les différents candidats vaccins ...	11
Figure 2: Cartographie de la répartition géographique du paludisme dans le monde.....	13
Figure 3 : Réponse immunitaire innée et adaptative	20
Figure 4: structure de gamma immunoglobuline G (IgG).....	22
Figure 5 : Carte montrant l'emplacement de Bamako, la Capitale du Mali	34
Figure 6: Carte montrant l'emplacement du site d'étude de Sotuba, une zone périurbaine de Bamako.....	34
Figure 7: Répartition de la population d'étude en fonction de l'ethnie	45
Figure 8: Répartition de la population d'étude en fonction du sexe.	45
Figure 9: Comparaison de titre d'anticorps IgG anti-Pfs25M-EPA/AS01 faible dose et forte dose.....	46
Figure 10: Comparaison de titre d'anticorps IgG anti-Pfs230 D1M-EPA/AS01 faible dose et forte dose.....	47
Figure 11: Comparaison des titres d'anticorps IgG anti-Pfs230D1M-EPA/AS01+ Pfs25M-EPA/AS01 forte dose à anti-Pfs25M-EPA/AS01 faible dose	48
Figure 12: Comparaison de titre d'anticorps IgG anti-Pfs230D1M-EPA/AS01+ Pfs25M-EPA/AS01 forte dose à anti-Pfs25M-EPA/AS01 forte dose	49
Figure 13: Comparaison de titre d'anticorps IgG anti-Pfs230D1M-EPA/AS01+ Pfs25M-EPA/AS01 forte dose à anti-Pfs230D1M-EPA/AS01 faible dose	50
Figure 14: Comparaison du titre d'anticorps IgG anti-Pfs230D1M-EPA/AS01+ Pfs25M-EPA/AS01 forte dose à anti-Pfs230D1M-EPA/AS01 forte dose.....	50
Figure 15: les différentes étapes d'ELISA	71

I. INTRODUCTION

Le paludisme demeure un problème majeur de santé publique dans le monde surtout en Afrique subsaharienne. Le paludisme touche non seulement la santé de centaines de millions d'individus à travers le monde mais affecte également l'économie des pays endémiques [1]. Globalement, on estime à 3,2 milliards le nombre de personnes à risque d'être infectées par le paludisme à travers le monde [2].

Selon les dernières données de l'Organisation Mondiale de la santé (OMS), on estime que 435.000 personnes sont décédées du paludisme en 2017. Plus de 90% de ces décès sont survenus en Afrique subsaharienne, les autres victimes se trouvant pratiquement toutes en Asie du Sud-Est et en Amérique du Sud [3]. Au Mali, le paludisme représente 39% des motifs de consultation dans les centres de santé, c'est la première cause de morbidité et de mortalité dans la population générale soit respectivement 15,6% et 13% [4]. En 2017, au Mali, sur l'ensemble du territoire national 2.097.797 cas de paludisme confirmés ont été enregistrés avec 1.424.223 (67,9%) cas simples et 673.574 (32,1%) cas graves [5].

La quasi-totalité de ces décès sont imputables à *Plasmodium falciparum* et les enfants africains de moins de 5 ans en sont les victimes les plus fréquentes [3]. Le paludisme frappe considérablement les enfants de moins de 5 ans qui constituaient 78 % de tous les cas de décès, les femmes enceintes sont aussi lourdement affectées par le paludisme [2]. En Afrique, chaque deux minutes un enfant meurt du paludisme [3]. Dans les zones rurales pendant la saison de transmission du paludisme (Juin à Décembre), chaque enfant est susceptible de faire au moins un épisode de paludisme [6].

Les individus âgés de 15-49 ans ont représenté environ 20% des décès liés au paludisme en 2010. Ces estimations récentes montrent une mortalité liée au paludisme plus forte que prévue en Afrique au sud du Sahara; mais aussi une atteinte plus importante d'autres groupes d'âges et l'impact sur la relance économique du continent [7].

Au niveau des services de santé, le paludisme constitue dans beaucoup de pays la première cause de consultation et une des principales causes d'hospitalisation. Les formes graves de paludisme constituent le gros lot des hospitalisations liées au paludisme [8] ; en plus, chez la femme enceinte le paludisme provoque une anémie, une augmentation du risque de petit poids à la naissance, de naissances prématurés et d'avortements [9].

La présentation clinique du paludisme grave chez l'enfant est le plus souvent dominée par une élévation importante de la température (40°C), associant des signes neurologiques. La mortalité du neuropaludisme s'élève parfois à 20 % chez les adultes et à 15 % chez les enfants [10]. plus de 25% des enfants rescapés de neuropaludisme peuvent présenter des séquelles neurologiques [11]. Les enfants qui se rétablissent après un accès palustre cérébral présentent des troubles de l'apprentissage et des incapacités consécutives aux lésions cérébrales [12].

Le paludisme exerce donc un impact négatif important sur la capacité économique des pays endémiques. Selon l'OMS cela représente une perte en produit national brut (PNB) de l'ordre de 2 milliards de dollars US par an pour l'ensemble des pays d'Afrique au Sud du Sahara. Sans le paludisme, ces pays auraient probablement déjà avancé de façon significative dans leur développement économique et social respectifs [7].

Les adultes qui vivent depuis l'enfance dans des zones caractérisées par une forte transmission palustre et qui continuent de résider dans ces zones ne risquent généralement pas de mourir de paludisme (Prémunition). Selon les estimations, quelque 219 millions de nouveaux accès de paludisme clinique sont survenus à l'échelle mondiale en 2017 [3].

Toutefois, des progrès considérables ont été accomplis sur la voie des objectifs respectivement définis par l'assemblée mondiale de la santé (réduire de 75% la charge du paludisme à l'horizon 2015) et par le partenariat Roll Back Malaria (réduire pratiquement à zéro le nombre de décès dus au paludisme). Ainsi, en quinze ans, la baisse du nombre de cas de paludisme est estimée à 18%, de 262 millions en 2000 à 214 millions en 2015. La mortalité associée a diminué de 48%, passant de 839000 décès en 2000 à 438000 en 2015. En tenant compte de la croissance démographique, l'incidence du paludisme aurait diminué de 37% au niveau mondial entre 2000 et 2015, et la mortalité associée de 60%. La prévalence parasitaire chez les enfants âgés de 2 à 10 ans est passée de 33% en 2000 à 16% en 2015 [13].

Les échecs des campagnes d'éradication menées jusqu'à présent sont essentiellement dus à la résistance acquise du vecteur, l'anophèle femelle, aux insecticides et celle progressive du parasite aux antipaludiques classiques notamment à la chloroquine. Aujourd'hui, pratiquement tous les médicaments antipaludiques semblent être touchés à des degrés divers par la chimiorésistance qui s'étend géographiquement et en intensité [14]. Les vaccins constituent à cet effet les outils privilégiés de lutte contre les maladies infectieuses, les outils les plus bénéfiques en santé publique.

Le développement d'un vaccin anti-palustre se heurte non seulement à la complexité du parasite à travers, son polymorphisme et sa variation antigénique, mais aussi à la complexité des interactions entre le parasite et le système immunitaire de l'hôte. La vaccination en diminuant l'incidence des accès palustres, sera un atout majeur dans la lutte contre ce fléau. Plusieurs vaccins candidats aux modes d'action distincts sont actuellement à différents stades de développement dont le plus avancé est le RTS, S en phase 3, Bien que son utilisation ne soit pas encore autorisée par les autorités réglementaires nationales en Afrique subsaharienne, le vaccin RTS,S/AS01 a reçu un avis scientifique favorable de l'Agence Européenne des Médicaments (EMA) en juillet 2015 pour la vaccination des enfants âgés de 6 semaines à 17 mois [15]. Parmi ces vaccins, figurent également les vaccins bloquant la transmission (TBV) du parasite de l'hôte humain au moustique: Ces vaccins induisent des anticorps qui empêchent la maturation des stades sexués du parasite chez le moustique.

A la surface de *Plasmodium falciparum* au stade sexuel sont exprimés des antigènes tels que ; Pfs25, Pfs48/45 et Pfs230. Les anticorps contre ces antigènes ont montré une activité de blocage du développement du parasite. Ces candidats vaccins peuvent être une stratégie réalisable pour réduire le fardeau du paludisme dans les zones endémiques. Avec une couverture large, ces vaccins pourraient réduire la transmission du paludisme dans les régions d'endémie en réduisant le nombre de moustiques infectants.

Le centre de recherche et de formation sur le paludisme (MRTC) de l'USTTB au Mali, en partenariat avec l'institut national de la santé (NIH) des Etats Unis a conduit de nombreuses études vaccinales dans ses sites.

Sotuba a été choisi pour effectuer des essais cliniques de phase de pilote des candidats vaccins dans le but d'évaluer leur tolérance, l'immunogénicité et l'efficacité protectrice chez l'homme.

Ainsi, le but de ce travail est de comparer des réponses anticorps IgG contre les antigènes Pfs230 et Pfs25 associés à l'adjuvant AS01 (Adjuvant Système 01) de différentes visites de l'essai vaccinal Pfs230D1M-EPA/AS01 et Pfs25M-EPA/AS01 chez les volontaires adultes à Sotuba au Mali. Pour atteindre ce but les objectifs suivants ont été fixés.

II. OBJECTIF

1. Objectif principal

- Evaluer les réponses anticorps IgG anti-Pfs230D1M-EPA/AS01 et anti-Pfs25M-EPA/AS01 à Sotuba en 2017.

2. Objectifs spécifiques

- Déterminer le taux moyen d'IgG anti-Pfs230D1M-EPA/AS01 et anti-Pfs25M-EPA/AS01 pendant les différentes visites à Sotuba ;
- Comparer le titre d'anticorps IgG anti-Pfs230D1M-EPA/AS01 faible dose/forte dose et anti-Pfs25M-EPA/AS01 faible dose/forte dose à Sotuba;
- Comparer le titre d'anticorps IgG anti-Pfs230D1M-EPA/AS01+anti-Pfs25M-EPA/AS01 forte dose à anti-Pfs25M-EPA/AS01 faible dose et forte dose à Sotuba ;
- Comparer le titre d'anticorps IgG anti-Pfs230D1M-EPA/AS01+anti-Pfs25M-EPA/AS01 forte dose à anti-Pfs230D1M-EPA/AS01 faible dose et forte dose à Sotuba ;

III. GÉNÉRALITÉS

1. Paludisme

1.1 Définition

Le paludisme est une érythrocytopathie fébrile, hémolysante dû à la présence et à la multiplication dans les hépatocytes puis dans les érythrocytes d'un hématozoaire du genre *Plasmodium*, transmis à l'hôte par la femelle du moustique du genre anophèle infectée [16].

Il existe aussi d'autres moyens de contaminations que sont les voies sanguines (transfusion sanguine), la transplantation d'organe et la transmission fœto-maternelle [17; 18].

Cinq espèces sont reconnues pathogènes pour l'Homme à savoir: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* et *Plasmodium knowlesi*. L'espèce *Plasmodium ovale* est constituée de deux sous-espèces *P. o. wallikeri* et *P. o. curtisi*, toutes deux également pathogènes pour l'Homme. Une étude récente a rapporté l'évidence de cas d'infection humaine par *Plasmodium cynomolgi* [19].

1.2 Vecteur

Le vecteur est un diptère nématocère de la famille des Culicidae. Environ quatre cents espèces d'anophèles ont été répertoriées, seule une quarantaine est capable de transmettre le parasite du paludisme. Les complexes anophèles gambiae comprennent les espèces douées d'une capacité de transmettre le parasite. Elles sont au nombre de sept et trois d'entre elles ont une grande capacité vectorielle : *An. Gambiae s.s*, *An.arabiensis*, *An.fenestus* [20].

Seules les femelles sont hématophages et les protéines sanguines sont nécessaires à la maturation de leurs œufs.

1.3 Agents pathogènes

Les parasites responsables de paludisme chez l'homme appartiennent :

Règne : animal

Sous règne : Protozoaires

Phylum : Apicomlexa

Classe : Sporozaea

Sous classe : Coccidia

Ordre : Eucoccidiida

Sous ordre : Haemosporina

Genre : *Plasmodium* qui renferme deux sous genres :

- Sous genre *Plasmodium* est caractérisé par des gamétocytes arrondis renferme quatre espèces responsables de paludisme chez l'homme ; *P. (p) vivax*, *P. (p) ovale*, *P. (p) malariae* et *P. (p) knowlesi* qui est un parasite simiesque, découvert récemment chez l'homme en Malaisie.

- Sous genre *Laverania* est caractérisé par des gamétocytes falciformés. Il renferme une seule espèce *P. (l) falciparum* et est l'espèce la plus redoutable pour l'homme [21].

Les différences entre les espèces pathogènes résident au niveau de leur capacité de multiplication durant la phase sanguine, la durée des cycles de schizogonies, la possibilité de séquestration des globules rouges infectés dans la microcirculation vasculaire et de leurs préférences du type de globule rouge pour l'invasion (jeunes, adultes, âgés).

Plasmodium falciparum est endémique essentiellement en zone tropicale: Afrique, Asie du sud-est, Amérique du sud, et Océanie. Il a une période d'incubation hépatique de 7-12 jours. Il provoque une fièvre tierce maligne et donne des formes graves et mortelles avec atteintes neurologiques [16]. Il est capable d'envahir les hématies quel que soit leur âge. Le cycle intra-érythrocytaire dure environ 36-48 heures. La taille des hématies parasitées est quasiment identique à celle des hématies non parasitées. A la microscopie, les parasites jeunes ont une forme en bague à chaton avec un anneau cytoplasmique mince appelés "rings ou anneaux"; les trophozoïtes âgés ont une forme en bague plus élargie voir déformée. On note des tâches jaune orangés en coup d'ongle à la surface de l'hématie parasitée appelées tâches de Maurer (Macules de formes et de dimensions inégales).

La gamétocytogénèse dure 9-12 jours et les gamétocytes ont une forme caractéristique en banane avec un diamètre moyen de 10µm à peu près (d'où le nom d'espèce falciparum), un amas central de granulation nucléaire en rouge et de pigments en noir. Les schizontes ont une forme de corps en rosace contenant 16-32 noyaux [22] .

Plasmodium vivax est le plus répandu dans le monde. Il sévit en Asie du sud-est, Amérique du sud, Océanie et en Afrique sahélienne et de l'est. Il a une période d'incubation hépatique de 11-13 jours, il provoque une fièvre tierce bénigne et est responsable de recrudescence grâce aux formes dormantes dans le foie: hypnozoïtes. Dans le sang, il préfère envahir les réticulocytes pour engager une schizogonie de 48 heures. Il provoque la déformation irrégulière et

l'augmentation considérable de la taille de la cellule hôte. A la microscopie, les anneaux ont une forme en bague avec un cytoplasme épais et un gros noyau ; les trophozoïtes âgés ont un cytoplasme digité ou fragmenté avec un gros noyau plus ou moins déformé et un pigment noir. On note des granulations de Schüffner dans l'hématie parasitée.

La gamétocytogénèse dure 7-9 jours et les gamétocytes sont arrondis (10-12 μm) avec un cytoplasme bleu pâle ou mauve et de fins pigments noirs dispersés au Giemsa. Les schizontes sont volumineux (10-14 μm) avec 12-24 noyaux fins et de pigments noirs fins plus ou moins dispersés [22]. Il a longtemps été associé à l'infestation des individus Duffy positif, mais actuellement il a été observé chez des individus Duffy négatif [23].

Plasmodium ovale sévit surtout en zone intertropicale africaine. Des études récentes ont montré l'existence de 2 sous-espèces sympatriques de *P. ovale* (*Plasmodium ovale curtisi* et *Plasmodium ovale wallikeri*) [24], présentes en Afrique et en Asie, non distinguables par la microscopie [25]. Il a une période d'incubation hépatique de 15 jours. Il provoque une fièvre tierce bénigne et produit des hypnozoïtes. Il parasite les hématies jeunes pendant 48 heures en leur donnant une forme ovale et les hématies parasitées sont plus grande par rapport aux hématies saines.

A la microscopie, les trophozoïtes jeunes ont une forme en bague avec un anneau cytoplasmique mince; les trophozoïtes âgés ont une forme régulière avec des granulations et de pigment noir. On note l'apparition précoce des granulations de Schüffner dans l'hématie parasitée (granulations volumineuses). La gamétocytogénèse est inférieure à 7 jours et les gamétocytes sont arrondis (7-8 μm) avec un cytoplasme bleu pâle ou mauve et de fins pigments noirs peu abondants. Les schizontes ont une taille moyenne de 10 μm , 8-12 noyaux volumineux et de gros pigments noirs plus ou moins dispersés [22].

Plasmodium malariae est endémique dans les climats tropicaux: Afrique, Asie du sud, Amérique du sud et Océanie. Il a une période d'incubation hépatique de 15-21 jours. Il provoque une fièvre quarte. Il préfère se développer dans les hématies âgées et la schizogonie intra-érythrocytaire dure environ 72 heures. Il est associé à des faibles parasitemies inframicroscopiques pouvant durer toute la vie [22].

A la microscopie, les trophozoïtes ont une disposition en plaque équatoriale de la cellule hôte; les trophozoïtes jeunes ont une forme en bague avec un anneau cytoplasmique épais et un gros noyau; les trophozoïtes âgés ont une forme en bague très épaisse ou forme en drapeau

(rectangulaire) avec un gros pigment noir, les schizontes ont un aspect en rosace avec 12 noyaux [22].

Plasmodium knowlesi est génétiquement proche de *P. vivax*. Mais microscopiquement il peut poser un problème de diagnostic différentiel avec *P. malariae*. Les schizontes comportent 16 noyaux. Il a une période d'incubation hépatique de 5 jours. Il est responsable de fièvre quotidienne avec une schizogonie intra-érythrocytaire de 24 heures [22].

La distribution du paludisme dans les régions endémiques du monde est définie en fonction du degré d'endémicité. Le paludisme est considéré comme endémique dans les zones où il y a une transmission constante au cours d'années successives. Le paludisme est dit hypo- endémique dans les zones où la prévalence de l'infection est inférieure à 10%, et méso-endémique dans les zones où la prévalence de l'infection se situe entre 11% et 50%. Dans les régions où la prévalence de l'infection est supérieure à 50%, les zones sont définies comme hyper-endémiques et holo-endémiques au-delà de 75% [22].

Au Mali, Pr. Doumbo *et al* ; ont décrit en 1992 cinq faciès épidémiologiques de la transmission du paludisme :

- (i) une zone à transmission saisonnière longue de 6 mois ou plus (dans la région de Sikasso avec plus de 1000mm d'eau/an)
- (ii) une zone à transmission saisonnière courte de 4 mois ou moins (correspond au Sahel avec une pluviométrie de 600 - 800mm d'eau/an)
- (iii) une zone à transmission bimodale (zone de retenue d'eau, riziculture, barrage et delta intérieur du fleuve Niger)
- (iv) une zone hypo-endémique peu propice à la transmission (dans les villes)
- (v) une zone sans transmission avec des épidémies de paludisme (correspond aux régions saharo-sahéliennes, avec une pluviométrie de moins de 200mm d'eau/an).

Tableau I: Différents espèces et stades de plasmodium sur frottis mince

Diagnostic du paludisme : *Plasmodium* à divers stades. Aspects sur frottis minces

	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Plasmodium vivax</i>	<i>Plasmodium ovale</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
Trophozoïtes jeunes				
Trophozoïtes âgés				
Schizontes rosaces				
Gamétocytes				

Source : http://www.ledamed.org/IMG/html/i811_1.jpg .Date d'accès 17-04-2018

1.4 Cycle biologie de Plasmodium

Tous les parasites du paludisme ont besoin de deux hôtes dans leur cycle de vie: l'hôte définitif où a lieu le développement sexuel (anophèle femelle) et l'hôte intermédiaire (l'homme par exemple) où se produit le développement asexuel.

Le parasite sous forme de sporozoïte est injecté dans le sang chez l'homme par la piqûre de la femelle de l'anophèle, diptère culicidé et vecteur, à l'occasion d'un repas sanguin. Les sporozoïtes gagnent le système veineux porte qui les véhicule vers le foie en trente minutes – une heure. C'est la schizogonie hépatique. Des travaux ont montré que certains sporozoïtes restent plus longtemps au niveau des ganglions lymphatiques, constituant un premier point d'interaction avec le système immunitaire de l'hôte [26]. Arrivés au niveau du foie, le sporozoïte traverse plusieurs membranes cellulaires y compris celle des cellules Küpffer et d'autres hépatocytes, pour finalement choisir un hépatocyte dans lequel le développement du parasite se poursuit [27 ;28]. Une multiplication intense se produit formant un corps bleu. Dans le cas de *P. vivax* et *P. ovale*, certains sporozoïtes restent à l'état latent sous formes dormantes,

dénommées hypnozoïtes, responsables des accès de reviviscence à distance. A maturité le corps bleu est lysé et il libère à partir de chaque sporozoïte, 20-30000 mérozoïtes. Ces mérozoïtes sont libérés en paquets sous forme d'amas nommés mérosomes qui circulent dans le sinus hépatique et arrivés au niveau du capillaire extra hépatique, les mérozoïtes individuels sont libérés dans le torrent circulatoire. Chaque mérozoïte va envahir un érythrocyte et entamer le cycle de la schizogonie érythrocytaire. A l'intérieur de l'érythrocyte, chaque mérozoïte va former un anneau, ensuite un trophozoïte mur, puis un schizonte. A maturité l'érythrocyte infecté éclate et libère les mérozoïtes de seconde génération. En fonction de l'espèce, chaque schizonte donnera 8 à 32 mérozoïtes. L'éclatement synchrone des érythrocytes infectés est accompagné de libération de médiateurs chimiques qui déclenchent l'accès fébrile. Dans le cas de *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale* cet événement se produit toutes les 48 heures donnant la fièvre tierce. Dans le cas de *P. malariae* l'éclatement synchrone survient toutes les 72 heures engendrant la fièvre quarte. Pour *P. knowlesi*, l'éclatement synchrone des schizontes survient toutes les 24 heures. Au bout d'un certain nombre de cycles érythrocytaires, certains mérozoïtes se différencient en formes sexuées : les gamétocytes mâle et femelle. Ces formes sont infectantes pour le moustique, hôte vecteur, permettent le cycle sporogonique et l'échange génétique entre les populations parasites (une des sources de diversité génétique) et la transmission à l'hôte humain.

Au moment d'un repas sanguin, en absorbant le sang la femelle anophèle ingère tous les stades parasites et les éléments du sang. Seuls les gamétocytes échapperont en partie à la digestion en se transformant en zygote/ookinète. Le gamétocyte femelle suivra un processus biologique de maturation pour se transformer en macrogamète femelle à n chromosomes. Le gamétocyte mâle va subir un processus d'exflagellation, et donner des gamètes mâles à n chromosomes. Chaque gamétocyte mâle donne naissance à 6-8 microgamètes filiformes qui vont entrer en compétition pour féconder le macrogamète femelle ; un seul y parviendra formant le zygote. Le zygote évolue en œuf mobile ou ookinète qui se déplace, traverse la membrane péritrophique et échappe ainsi à la digestion du contenu de l'estomac du moustique.

L'ookinète se fixe sur la paroi externe de l'abdomen du moustique et se transforme en oocyste. L'oocyste se développe et à maturité, éclate pour libérer plusieurs centaines de sporozoïtes. Les sporozoïtes sont fusiformes et mobiles ; ils se déplacent vers la glande salivaire du moustique qu'ils envahissent. Ici ils deviennent infectants, en l'attente d'un prochain repas de sang au cours duquel ils seront injectés avec la salive du moustique chez un hôte humain, bouclant ainsi le cycle évolutif du parasite [7].

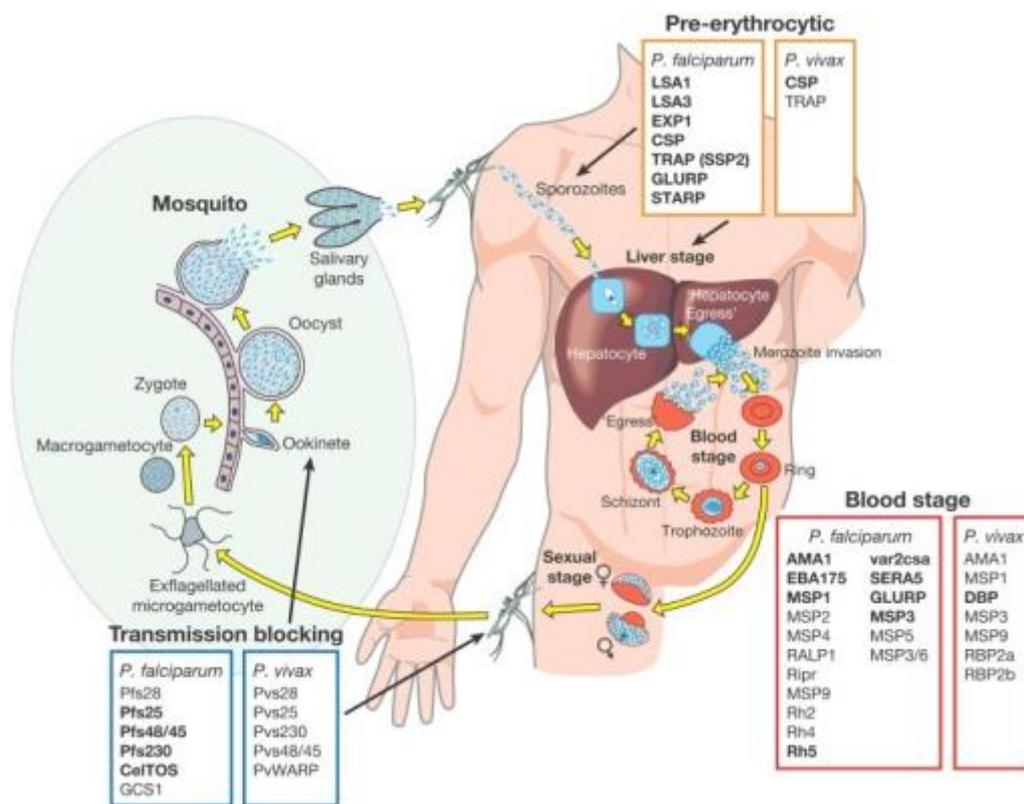


Figure 1 : Cycle du développement du Plasmodium avec les différents candidats vaccins

Source: <https://openi.nlm.nih.gov/imgs/>

1.5 Historique du paludisme

Le paludisme est connu et redouté depuis très longtemps, il est aussi connu sous le nom de malaria, venant de l'italien « mal aria » qui signifie « mauvais air ». Ce nom lui a été attribué car les personnes infectées vivaient dans des régions marécageuses dégageant des odeurs nauséabondes.

La découverte sur le paludisme débute en 1717 avec Giovanni Lacissi, un clinicien italien ayant établi le lien entre la présence des moustiques et de la maladie.

En 1880 Alphonse Laveran, grâce aux autopsies pratiquées sur les corps de paludéens, découvre des éléments pigmentés dans les GR des malades atteints de fièvre appellera alors Oscillaria Malaria. On le nommera Hématozoaire et le rangera finalement dans la classe des *Plasmodiums*.

En 1897, Ronald Ross médecin britannique démontre que la transmission du paludisme des oiseaux est assurée par des moustiques. En étudiant d'autres moustiques, il découvre des formes

de *Plasmodium falciparum* dans leur tube digestif. Cette découverte montre que c'est bien les moustiques femelles qui piquent et non les mâles.

Grassi, Giuseppe Bastianelli et Amico Bignami décrivent par la suite le cycle de développement du *Plasmodium*. En 1930 on a fait la découverte de la 5^e espèce, *Plasmodium knowlesi* chez un macaque. En 1965, premier cas de transmission naturelle à l'homme [29].

1.6 Répartition géographique

Le paludisme sévit surtout dans les pays pauvres des zones tropicales et intertropicales.

En Afrique, le paludisme est assez rare au Nord où il sévit sous forme de foyers limités avec essentiellement *P. vivax* et *P. malariae*. Dans la zone intertropicale, l'infection palustre est endémique et largement répandue, avec une coexistence des espèces *P. falciparum*, *P. malariae* et à un moindre degré *P. ovale* et une description récente de *P. vivax*.

En Asie, le paludisme existe au Proche Orient (Turquie), dans le sous-continent indien, au Sri-Lanka, en Birmanie, en Chine, en Indonésie et au Sud-Est.

En Amérique, la région du Nord est indemne de paludisme. L'affection est par contre fréquente au Centre et au Sud.

En Océanie, certaines îles sont fortement impaludées comme la Nouvelle-Guinée, les îles Salomon et le Vanuatu, alors que d'autres sont totalement indemnes de paludisme comme la Nouvelle-Calédonie, le Tahiti et la Nouvelle-Zélande.

En Europe, le paludisme a été éradiqué et a disparu de ses anciens foyers. Mais on observe le paludisme d'importation, comme en France, qui est en pleine augmentation du fait de l'essor des déplacements vers les pays tropicaux et une chimio-prophylaxie mal observée [30].

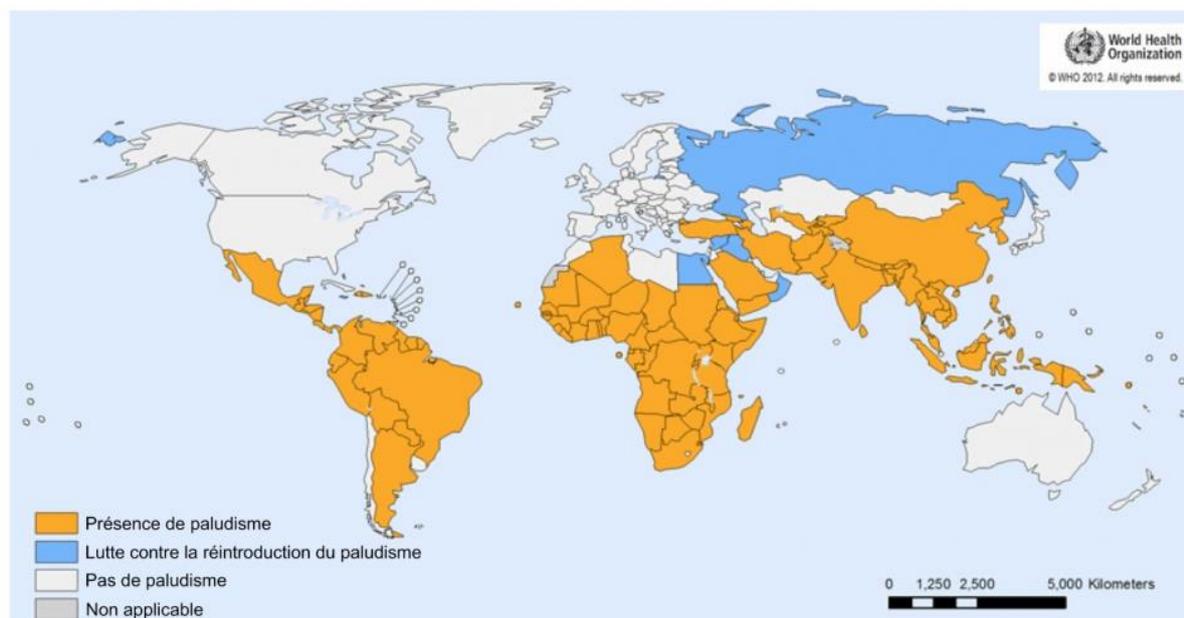


Figure 2: Cartographie de la répartition géographique du paludisme dans le monde

Source : <https://www.pharmacovigilanceiledefrance.fr/detail/items/179.html>

2. Immunité anti-palustre

Elle se développe graduellement après une longue exposition aux infections plasmodiales à répétition dans les zones où le niveau de la transmission est élevé (zone stable). L'immunité stérilisante semble très rare puisque la prévalence parasitaire chez l'adulte approche 100% dans les zones endémiques [31]. Les mécanismes exacts soutenant l'acquisition de l'immunité au paludisme sont mal compris, mais il est clair que les réponses innées jouent un rôle important [32].

Le système immunitaire humain comprend deux branches : l'immunité innée présente à la naissance, de mise en place rapide, non spécifique et l'immunité acquise, spécifique et de mise en place lente. Ces deux branches sont nécessaires et coopèrent pour assurer une réponse immunitaire anti-palustre efficace.

2.1 Notion de résistance naturelle

A l'inverse des personnes souffrant de paludisme grave, certains individus sont moins sensibles, voir même réfractaires, à l'infection primaire. Cela peut s'expliquer par :

- Certaines anomalies génétiques altérant le développement du parasite dans le globule rouge. Il s'agit de :

- Hémoglobinopathies : Ce sont des types hémoglobiniques capable d'inhiber la croissance intercellulaire de *P. falciparum*.
 - L'Hb S semble protéger les paludéens contre de fortes parasitémiés [33].
 - L'Hb F inhiberait la croissance de *P. falciparum*, ce qui expliquerait en partie, la rareté des accès palustres chez le nourrisson [34].
 - Les désordres quantitatifs portant sur une chaîne hémoglobinique (thalassémie) peuvent aussi ralentir la croissance du *Plasmodium* [33].
- La déficience en G6PD aurait aussi un rôle protecteur [35].
- L'absence de molécules de surfaces du globule rouge indispensable à la pénétration du parasite, telles que :
 - La molécule du groupe Duffy pour *P. vivax* et *P. knowlesi* [36 ;37]. Par contre une étude menée à Bandiagara a montré que des populations Duffy négatif sont de plus en plus atteints par *P.vivax* [38].
 - Le polymorphisme du complexe des groupes sanguins ABO joue un rôle dans l'évolution du paludisme. Il a été montré que les individus du groupe sanguin O étaient plus protégés contre le paludisme grave comparativement aux individus des autres groupes sanguins. Le groupe sanguin A, a quant à lui été associé au paludisme sévère (Rowe et al, 2007)
 - La glycophorine A: Des globules rouges humains déficients en une glycoprotéine de membrane (la glycophorine A) sont résistants à l'infection par *P. falciparum* [37]. Cette glycoprotéine pourrait être un des récepteurs membranaires impliqués dans l'invasion par *P. falciparum*.

Il existe probablement d'autres mécanismes naturels de protection contre les stades érythrocytaire mais aussi exo-érythrocytaire du paludisme.

Cependant, l'infection par *Plasmodium* engendre chez l'hôte des réponses immunitaires. Il s'agit de réponses non spécifiques dites innées et spécifiques ou acquises.

2.2 Immunité innée dans le paludisme

2.2.1 Rôle des cellules

2.2.1.1 Les granulocytes

Les granulocytes ou polynucléaires sont des leucocytes caractérisés par un noyau polylobé et la présence de granules dans leur cytoplasme. Il existe 3 types de granulocytes : polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles.

Les neutrophiles sont les plus nombreux et représentent les premières cellules phagocytaires. Il a été montré qu'ils sont capables de phagocyter les mérozoïtes [39]. Ils expriment à leur surface des récepteurs pour la fraction Fc des immunoglobulines et des récepteurs du complément. Ce qui facilite la phagocytose des parasites par l'intermédiaire du complément et des anticorps présents dans les sérums d'individus exposés [39]. Des cytokines telles que le TNF- α , IFN- γ , le GM-CSF et IL-1 β activent les neutrophiles et induisent significativement la phagocytose des mérozoïtes [40].

L'expression du Human Leucocyte Antigen-B35 a été aussi associée à la résistance à l'infection palustre [41].

2.2.1.2 Monocytes/macrophages

Les monocytes ont pour origine la moelle osseuse et sont libérés dans la circulation périphérique. Ce sont de grosses cellules mesurant 15 à 30 μm , avec un noyau en fer à cheval caractéristique. La membrane plasmique à un contour irrégulier et le cytoplasme contient de nombreux lysosomes. Ils représentent 5-10% des leucocytes et sont morphologiquement et fonctionnellement hétérogènes [42].

Le marqueur spécifique des monocytes est le CD14. Ils peuvent exprimer également le CD16 et la co-expression de CD14 et de CD16 permet de distinguer 3 sous-classes de monocytes :

- les monocytes CD14⁺⁺CD16⁻ dits «monocytes classiques» ; ayant pour rôle le recrutement des neutrophiles sur le site de l'inflammation.
- les monocytes CD14⁺CD16⁺ appelés «monocytes pro-inflammatoires» sécrétant de cytokines pro-inflammatoires et
- une population dite intermédiaire exprimant CD14⁺⁺CD16⁺ appelés aussi monocytes anti-inflammatoires, sécrétant principalement l'IL-10.

Les monocytes se différencient en macrophages dans les tissus. Ces macrophages sont groupés en sous-populations ayant des fonctions différentes selon leur mode d'activation.

Les monocytes/macrophages secrètent des facteurs solubles comme les cytokines et libèrent l'oxyde nitrique (NO), les radicaux libres oxygénés (O₂⁻, OH⁻) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ces monocytes peuvent également inhiber la croissance des parasites par le mécanisme d'inhibition cellulaire dépendante des anticorps (ADCI) [43].

2.2.1.3 Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (CDs) constituent la première ligne de défense du système immunitaire. Elles sont issues de la moelle osseuse et se subdivisent en deux groupes : les CDs myéloïdes et les CDs lymphoïdes [44].

Les CDs lymphoïdes dérivent de cellules précurseurs issues de la moelle osseuse et colonisent principalement et secondairement les tissus lymphoïdes (thymus, rate, foie et ganglions lymphatiques) et y résident [45].

Les CDs ont une capacité migratoire et de présentation d'antigènes au niveau des organes lymphoïdes secondaires plus accrue que les macrophages qui vivent et meurent sur place après recrutement par les tissus. Ce sont les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles [45].

Les CDs sont fondamentales pour l'initiation de la réponse immune par éducation des cellules B et T, qui sont les cellules effectrices de l'immunité acquise.

Les différents sous-groupes de CD sont réparties dans les tissus périphériques et dans le sang, reconnaissent les molécules de surface exprimées par les microbes et sécrètent des cytokines. Sous l'influence d'un stimulus inflammatoire, les CDs sont activées et entament leur processus de maturation conduisant à l'activation et à l'initiation de la réponse cellulaire T [45].

2.2.1.4 Les cellules tueuses naturelles

Les cellules tueuses naturelles (Natural killer ou NK) sont des types de lymphocytes, qui sont principalement trouvés dans le sang périphérique, la rate et dans la moelle osseuse. Elles constituent un composant important du système immunitaire inné [45].

Ces cellules jouent un rôle majeur dans la destruction des cellules infectées par les virus et des tumeurs. Leur rôle dans la protection contre l'infection palustre reste encore à être élucidé. Il a été prouvé que l'activité des NK augmente chez les sujets infectés par le *Plasmodium* et que cette activité dépend de la parasitémie et du taux d'IFN- γ . Une autre étude a montré que lorsque les cellules mononuclées du sang périphérique sont exposées aux globules rouges parasités, les NK sont les premières à produire l'IFN- γ [46]. La production d'IFN- γ semble être liée à la fois à un contact direct entre les globules rouges parasités et les cellules NK et aussi à la présence des cellules accessoires lymphoïdes et myéloïdes [45].

2.2.1.5 Les cellules T tueuses naturelles (NKT)

Les cellules T tueuses naturelles (Natural killer T cells : NKT) sont des cellules de l'immunité innée récemment décrite et ayant les mêmes caractéristiques que les cellules NK et les cellules

T. Leur capacité à produire une grande quantité de cytokines après activation leur permet d'établir une immunité innée et adaptative [47].

L'activation des cellules NKT leur permet le recrutement et l'activation des cellules dendritiques, des NK, des CD4+ et CD8+. Le rôle des cellules NKT comme cellule T helper dans la régulation de la réponse humorale anti-palustre in vivo a été confirmé plus tard par deux études indépendantes.

Les cellules NKT semblent ne pas avoir un rôle clair dans la réponse immune contre le stade érythrocytaire [45].

2.2.1.6 Les cellules T gamma-delta

Ce sont des sous-classes de lymphocytes ayant plusieurs caractéristiques des cellules de l'immunité innée, qui leur permet une activation rapide après la reconnaissance des ligands. Les cellules $T\gamma\delta$ réagissent avec une grande variété de cellules incluant les cellules de l'immunité innée, les cellules T, les cellules B aussi bien que les tissus non-immuns. Elles induisent les réponses innée et adaptative et peuvent promouvoir la réparation et la cicatrisation [48].

Elles ont les mêmes caractéristiques que les cellules NK et NKT, telle que la capacité de sécréter une grande quantité de cytokines pro-inflammatoires et une activité cytolytique contre les tumeurs et les pathogènes. Il est connu que les $T\gamma\delta$ constituent une forme de cellules à part de la réponse immune contre *Plasmodium falciparum*. Il a été observé que les cellules T $\gamma\delta$ inhibent le développement des formes asexuées sanguines de *P. falciparum* par le mécanisme de cytotoxicité dépendant de l'exocytose des granules. En plus des études ont montré que *P. falciparum* induit une expansion des T $\gamma\delta$ jusqu'à 30% des cellules T circulant chez l'homme suggérant leur rôle potentiel dans la clairance des parasites [49].

2.2.2 Rôle du complément

Le complément est présent dans le sérum d'une façon naturelle en dehors toute stimulation antigénique. Ce système nommé par C joue un rôle important dans la défense contre les pathogènes par l'opsonisation, la réponse inflammatoire, l'élimination des complexes antigène-anticorps ou par destruction des pathogènes. Il est constitué d'une trentaine de protéines membranaires et plasmatiques [50].

Le système de complément connaît trois voies d'activation :

- La voie classique ; activée par reconnaissance d'un complexe antigène-anticorps
- La voie alterne ; par fixation directe sur le pathogène

- La voie des lectines ; par fixation des polyosides sur la surface des pathogènes

Ces trois voies diffèrent par leur mode d'activation. Elles aboutissent toutes à la formation de deux complexes à activité enzymatique : C3a et C5a convertases [50].

Au cours du paludisme le système du complément est activé par les antigènes exprimés à la surface des globules rouges parasités [51 ; 52].

L'hémoglobine et l'hématine libérés par la lyse intravasculaire des érythrocytes infectés par *P. falciparum* ont des propriétés inflammatoires et peuvent activer le complément [53 ; 54].

Chez des enfants faisant le paludisme simple un taux faible de C3, C4 et C1 qui a été observé. Selon l'étude de Wenish, l'activation de la voie classique aussi bien que de la voie alterne est associée à une augmentation de C3, C5b-9 et de C4d [52].

La voie des « Mannose Binding Lectines » (MLB) quant à elle pourrait être activée par la liaison des lectines aux érythrocytes infectés. Ainsi un déficit en lectine liant les mannoses, peut compromettre la capacité de l'organisme à lutter contre le paludisme [55 ; 56]. Les fractions C3a et C5a obtenues par clivage de C ont des propriétés chimiotactiques permettant le recrutement des cellules inflammatoires [57].

2.2.3 Immunité adaptative dans le paludisme

L'immunité adaptative se caractérise par sa spécificité pour l'agent pathogène. Son apparition remonte environ à 200 millions d'années avec l'acquisition de nouveaux outils et la mise en place de mécanismes plus complexes de défense de l'organisme [50].

Les mécanismes précurseurs de cette immunité ne préexistent pas mais s'acquièrent spécifiquement face à un pathogène donné. Ainsi les effecteurs sont conservés et mis en mémoire. Le système immunitaire se construit au cours de la vie de l'individu en fonction des micro-organismes qu'il rencontre.

Les composants humoraux aussi bien que cellulaires participent à l'immunité adaptative [50].

2.2.4 Rôles des lymphocytes T et B dans le paludisme :

L'activité phagocytaire des cellules de la lignée monocyte/macrophage et des polynucléaires neutrophiles vis-à-vis des hématies parasitées, ou des parasites libres et de leurs débris, a été rapportée depuis longtemps [58]. Cette phagocytose est directe ou indirecte.

L'internalisation du matériel parasitaire ou érythrocytaire par le macrophage sera suivie d'une protéolyse des antigènes de *Plasmodium* et certains de leurs dérivés peptidiques seront sélectionnés et exprimés à la surface cellulaire, en association à des molécules de présentation des antigènes, des molécules HLA. Leur reconnaissance par le TCR des cellules T déclenche

l'activation des lymphocytes T qui possèdent un rôle critique en tant que cellule effectrices dans l'immunité contre les stades sanguins.

Les lymphocytes T CD8⁺ interviennent directement par une activité cytotoxique. Les cellules T CD4⁺ agissent indirectement par le contrôle et l'activation d'autre cellule effectrice via les lymphokines. En effet des études menées chez la souris ont montré que deux des fonctions des CD4⁺ les plus connus, à savoir la stimulation des monocytes/macrophages comme cellules effectrices de la réaction inflammatoire et la coopération avec les lymphocytes B dans la synthèse des immunoglobulines sont accomplies par deux sous populations différentes [59; 39]. Dans le premier cas il s'agit de Th1 (T helper type 1) et dans le second des Th2 (T helper type 2) ; ces différentes cellules secrètent de nombreuses cytokines [60].

Les lymphocytes Th1 seraient impliqués dans la réponse immunitaire dirigée contre les stades pré-érythrocytaires et érythrocytaires [61]. Lorsqu'elles sont activées par les Ag parasites, elles secrètent entre autres des médiateurs comme l'IL-2, l'IFN γ , la lymphotoxine ou le TNF β et l'IL-3. Les cytokines produites par les lymphocytes Th2 sont l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 et l'IL-13 qui favorisent la production d'Anticorps par les cellules B [62]. D'autres sous populations ont été décrites plus tard notamment les Th17 et les T reg. Le rôle des cellules Th17 et des T reg dans la protection contre le paludisme reste à explorer. Les cellules T CD8⁺ se subdivisent en trois sous-groupes selon l'expression de CD62 et de CD127. Les cellules T mémoires expriment à la fois CD62 et CD127L : CD62L⁺ CD127⁺ [45].

Les lymphocytes B arrivent à maturation au sein de la moelle osseuse. Lorsqu'ils quittent cette dernière, chacun exprime sur sa membrane un récepteur de liaison à l'antigène spécifique. Le récepteur des cellules B (BCR, de B-cell Receptor) est constitué principalement d'une molécule d'anticorps membranaire qui ne reconnaît qu'un seul antigène donné.

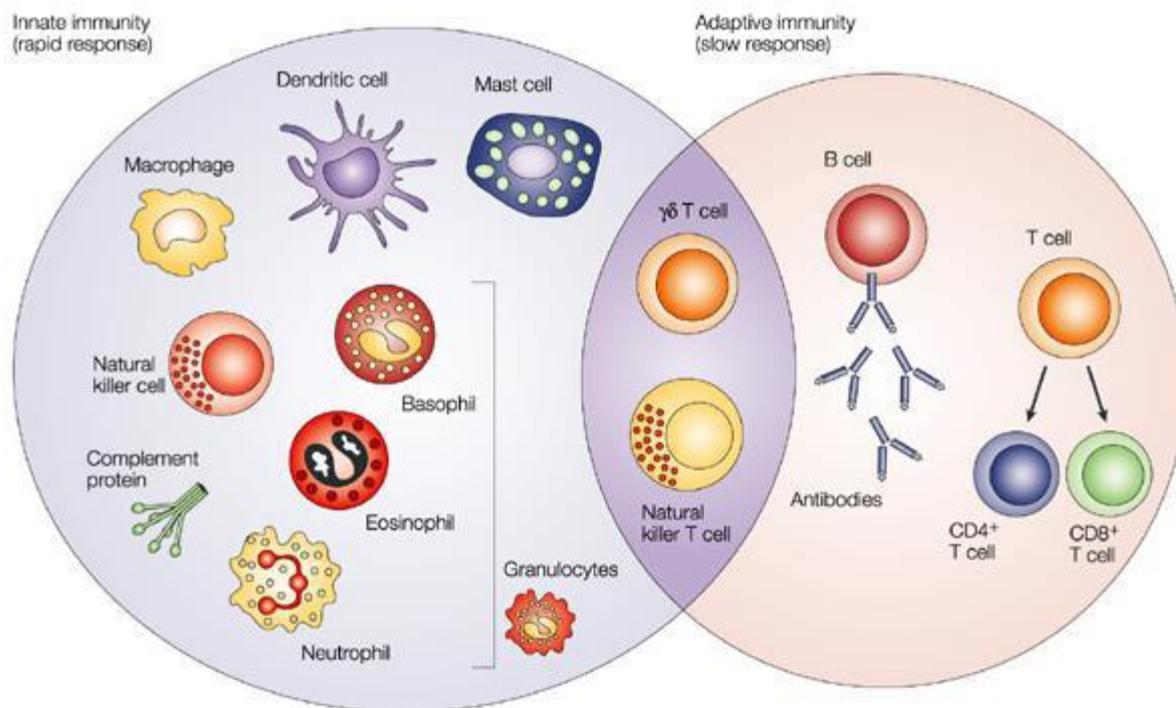


Figure 3 : Réponse immunitaire innée et adaptative

Source : *Nature Reviews Cancer 2004*

2.3 Immunité humorale dans le paludisme

Les cellules B, les seules capables de se différencier en plasmocytes sécréteurs d'anticorps, jouent un rôle important dans l'immunité humorale. Elles constituent 15% des lymphocytes [45].

Dans la rate le centre germinatif est l'un des sites essentiels pour l'initiation et la prolifération des cellules B activées. En réponse aux antigènes trois événements importants de différenciation des cellules B prennent place dans le centre germinatif : **a)** la maturation de l'affinité, **b)** la commutation isotypique des immunoglobulines et **c)** la constitution de cellules B mémoires qui se différencie rapidement dans le plasma lors d'un second contact avec l'antigène [45].

Chez les sujets vivant en zone d'endémie palustre, l'infection induit une forte réponse humorale avec production d'IgM et IgG ainsi que d'autres isotypes [63].

Plusieurs études sont en faveur d'un rôle prépondérant des anticorps dans l'immunité contre le *Plasmodium* :

Le transfert passif d'IgG purifiées de sérums immuns aux sujets non immuns protège contre le paludisme [64].

Les nourrissons sont protégés contre le paludisme pendant les premiers mois de leur vie grâce aux anticorps maternels d'isotypes IgG [65].

Dans des études longitudinales, la prévalence et le niveau des anticorps anti-plasmodiaux étaient associés à la protection contre le paludisme clinique [66].

Les mécanismes effecteurs des anticorps sont : l'opsonisation, la neutralisation ou le blocage, l'activation du complément et de la cytotoxicité anticorps dépendante. Les sous-classes d'IgG, particulièrement les sous classes cytophiliques IgG1 et IgG3 jouent un rôle important dans l'immunité anti-palustre. Ces anticorps cytophiliques se fixent par leur fragment cristallisable (Fc) aux récepteurs des monocytes, conduisant à l'activation de ces cellules lesquelles inhiberaient la croissance du parasite. C'est le mécanisme d'ADCI [67].

Par ailleurs des cas de protection liée à un taux élevé d'IgG2 ont été rapportés. Une étude plus récente a montré que le génotype FcγRII α R131H peut influencer les réponses des sous classes d'IgG à la protection contre le paludisme et les porteurs de l'allèle H ont un niveau élevé d'IgG2 chez les peulhs. Il existe une association entre le taux d'anticorps et la protection contre le paludisme. La réponse anticorps peut être influencée par l'âge, l'exposition, le taux de transmission et les facteurs génétiques de l'hôte [45].

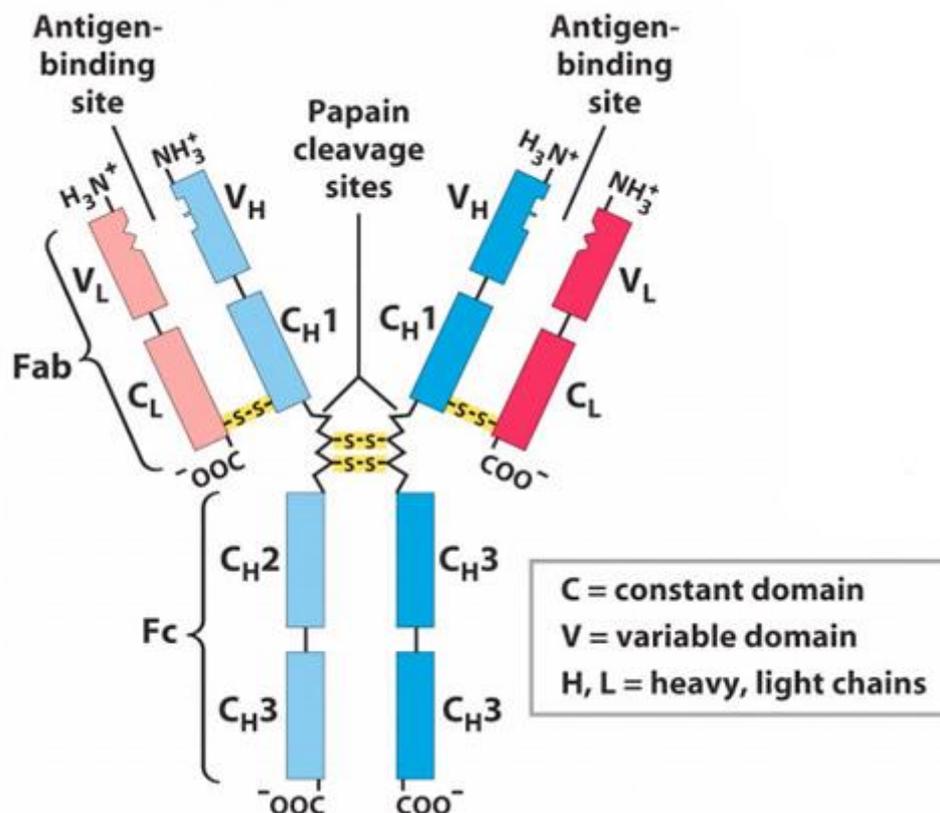


Figure 4: structure de gamma immunoglobuline G (IgG)

Source : <https://www.news-medical.net/>

2.4 Immunité bloquant la transmission du paludisme

L'immunité dirigée contre les stades sexués peut être divisée en deux types. Le premier type correspond à l'immunité dirigée contre les gamétocytes chez l'hôte humain et le second l'immunité contre les stades sexués chez le moustique. Par ailleurs chez le moustique, des études ont montré que des protéines antigéniques de surface communes au gamétocyte et au gamète telles que Pfs48/45 et Pfs230 ainsi que certaines du zygote et de l'ookinète (Pfs25) sont *in vitro* des cibles potentielles d'anticorps monoclonaux bloquant la transmission.

Des sérums bloquant la transmission ont été trouvés chez des individus vivant en région endémique lors d'études réalisées en Afrique et en Asie. L'activité bloquante de sérums d'individus vivant en Nouvelle Guinée était associée à la présence d'anticorps dirigés contre l'antigène Pfs230 alors que celle observée au Cameroun était associée aux taux d'anticorps dirigés contre Pfs48/45.

Le complément reste actif pendant plus de 8 heures dans l'abdomen du moustique. Des études *in vitro* ont montré que les anticorps anti-Pfs230 et anti-Pfs48/45 en coopération avec ou sans

le complément provoquent la lyse rapide des gamètes et du zygote chez le moustique. Les anticorps agissant sans la coopération du complément provoqueraient un encombrement stérique afin de prévenir la fécondation comme dans le cas du fragment Fab de l'anticorps monoclonal dirigé contre Pfs48/45. Les immunoglobulines G seraient capables d'empêcher le développement de l'oocyste et le fragment Fab à lui seul était capable de prévenir l'enkystement de l'ookinète dans l'épithélium de la paroi stomacale.

L'immunité naturelle bloquant la transmission du paludisme peut aussi être à médiation cellulaire. Les mécanismes impliqués sont encore mal connus.

En 1994, l'équipe de Ranawaka démontrait que la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps intervenait dans le mécanisme bloquant la transmission en empêchant la fécondation des gamètes. Des cellules phagocytaires ainsi que certaines cytokines comme l'INF- γ , le TNF- α , les IL-2-4 y participent [68].

2.5 Evasion immunitaire

Dans le paludisme le parasite peut éviter la plupart des mécanismes de défense et assurer sa survie chez cet hôte immunologiquement hostile, en changeant la composition antigénique de sa membrane, en se réfugiant dans certaines cellules ou en dérégulant le système immunitaire de l'hôte. Ces mécanismes d'évasion n'apparaissent que progressivement, en partie sous l'effet de la pression des moyens de défense. En effet, le sujet infecté réduit sa charge parasitaire en s'attaquant essentiellement aux formes jeunes ou libres du parasite tandis que les formes évoluées, bien adaptées à leur environnement, poursuivent leur développement. Il en résulte un stimulus antigénique permanent qui maintient les défenses immunologiques de l'hôte [69].

On sait que la virulence est liée à l'adhérence de globules rouges parasités à l'endothélium et entre eux, pour former des rosettes. Cette adhérence est le fait de la protéine de surface PfEMP1 (*Plasmodium falciparum* érythrocyte membrane protein-1), codée par les gènes de la famille var, qui est aussi un facteur de virulence. Environ 60 gènes var répartis sur les 14 chromosomes du *Plasmodium* n'expriment jamais qu'une seule protéine par un système de commutation mutuellement exclusive. Cette commutation peut atteindre une fréquence de 2% par génération. Elle a lieu *in situ* au stade précoce d'anneaux, elle est apparemment contrôlée au niveau de l'initiation de la transcription et un mécanisme épigénétique a été évoqué dans cette régulation. Ce phénomène permet une « évasion immunitaire » permanente qui est le problème majeur de toute stratégie vaccinale [70].

3. Vaccination anti-palustre

3.1 Les différents types de candidats vaccin

La mise au point d'un vaccin anti-palustre a connu des progrès importants. Plusieurs équipes de chercheurs, mènent actuellement des travaux orientés sur l'identification, la synthèse et l'emploi d'antigènes vaccinaux issus des stades de développement parasitaire, permettant ainsi le blocage du cycle.

3.1.1 Les vaccins pré-érythrocytaires ou hépatiques

Pendant le stade hépatique, le parasite mûrit dans les hépatocytes. Une immunité à médiation cellulaire (la réponse Th1) est donc pensée comme critique. Cela implique des lymphocytes qui peuvent alors cibler et détruire les cellules du foie infectées, détruisant ainsi les parasites se développant. L'immunité spécifique envers les stades hépatiques ne peut être réalisée que par une action coordonnée des cellules T CD8 et des anticorps spécifiques, qui collaborent avec les cellules Natural killer (NK) et les macrophages (MA). L'interféron-gamma (IFN- γ) y joue un rôle important [71].

Puisque les antigènes du stade hépatique peuvent être exposés relativement longtemps, augmentant avec l'exposition à l'infection naturelle, ils peuvent renforcer la réponse immune du vaccin [72].

Les vaccins dirigés contre le stade pré-érythrocytaire ont pour objectif de prévenir l'infection des hépatocytes et/ou de détruire les hépatocytes infectés. Les mécanismes immunitaires effecteurs comprennent des anticorps contre la surface du sporozoïtes et l'IFN- γ produit par des cellules CD8+ et T CD4+. Les bénéficiaires principaux sont les enfants dans les zones endémiques, les voyageurs et les résidents non immuns de zones à faible transmission. Des candidats vaccins de ce type tels que RTS, S/AS02 et PfSPZ sont en cours de développement.

Le RTS, S/AS02 est constitué de particules chimériques contenant l'antigène HBs (antigène S de l'hépatite B) et une portion de la protéine circumsporozoïtaire (CSP) fusionnée à cet antigène.

D'autres antigènes comme la LSA1, LSA3, PfEXP1, STARP, SALSA et TRAP/SSP2 sont aussi inclus dans des vaccins contre les stades pré-érythrocytaires en cours de développement [73].

3.1.2 Les vaccins érythrocytaires

Pendant le stade érythrocytaire, le parasite est caché dans les globules rouges. Puisque les globules rouges n'expriment pas les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité I ou

II, la réaction immunitaire est à la charge des anticorps et les processus associés. Par exemple, la médiation cellulaire cytotoxique dépendante des anticorps et le complément lytique pourraient jouer un rôle dans l'élimination des globules rouges infectés [72].

Les vaccins dirigés contre le stade sanguin asexué ont pour objectif de réduire le niveau de la parasitémie et la maladie. Ils agissent en permettant le blocage de l'infection des hématies avec des anticorps et/ou la destruction des hématies infectées. Leurs bénéficiaires seraient les enfants des zones endémiques. Un exemple de ce type de vaccin est celui basé sur la protéine de surface MSP-1 développé à l'Institut Pasteur de Paris. Il s'agit d'une protéine MSP-1₁₉ produite par baculovirus. D'autres vaccins contre les stades asexués érythrocytaires comprennent les antigènes AMA1, GLURP, HRP- 1, MSP1, MSP2, MSP3, RAP- 2, RESA, SERA ou PfEMP1 [73].

Des mécanismes multiples qui pourraient induire une immunité protectrice ont été identifiés, comme les anticorps qui agissent réciproquement avec les récepteurs superficiels des érythrocytes et interdisent leur invasion par les mérozoïtes, les anticorps qui aident à détruire les parasites intra-érythrocytaires par les monocytes, anticorps directement dirigés contre les antigènes de surface des mérozoïtes qui obtiennent une agglutination des mérozoïtes libres et facilitent leur phagocytose, ou les anticorps qui empêchent l'attache d'érythrocytes infectés à l'endothélium vasculaire, pour ne pas mentionner des cytokines comme l'IFN- α , Le TNF- α ou IL-12, qui peuvent obtenir par médiation la mise à mort du parasite. Le défi majeur rencontré par les vaccins qui ont pour but de répondre à ce type de questions est le haut polymorphisme et la variabilité des antigènes du mérozoïte [74].

Des chercheurs s'intéressent de plus près au stade érythrocytaire asexué du parasite de la malaria, qui cause la maladie clinique. L'immunité des stades érythrocytaires est pensée pour être obtenue par médiation par des anticorps qui bloquent l'invasion, opsonisent les érythrocytes infectés ou les réponses à médiation cellulaire qui éliminent les parasites via une sur-régulation de médiateurs inflammatoires. Ils sont particulièrement intéressés par le rôle que les lymphocytes T CD4 naturels ou induits par le vaccin jouent dans l'immunité à médiation cellulaire. Ils ont utilisé des modèles de rongeurs pour comprendre les réactions immunitaires à l'infection et la pathologie induite par le stade érythrocytaire du parasite. Leurs premières études de souris immunisées avec deux des vaccins candidats principaux, MSP1-19 et AMA-1, ont démontré que les cellules T CD4 + sont certainement critiques pour l'induction d'une immunité agissant comme un effecteur (anticorps indépendant) et/ou comme des cellules helper (anticorps dépendant).

3.1.3 Les vaccins ciblant le stade sexuel du parasite

La réaction immunitaire aux stades sexuels dépend du transfert de l'anticorps de l'hôte chez le moustique pendant le repas sanguin. L'anticorps humain neutralise alors les stades sexuels avant qu'il n'ait l'opportunité de mûrir et de se développer en sporozoïte [72].

Des vaccins contre le stade sexué visent à prévenir la transmission par des anticorps pouvant bloquer le développement du parasite chez le vecteur. Les récipiendaires de ces vaccins seraient des populations vivant dans des zones de faible transmission. Ce type de vaccin serait utile en combinaison avec des vaccins ciblant d'autres stades de développement du parasite. Les antigènes susceptibles de susciter la production d'anticorps bloquant la transmission comprennent Pfs230, Pfs48/45, Pfs27/25, Pfs28, Pfs25 et Pfs16 [73].

3.2 Développement clinique d'un vaccin antipaludique

Le développement clinique d'un vaccin suit une série logique d'évaluations liées les unes aux autres dans un processus itératif qui vise à définir les caractéristiques du produit en termes de tolérance, de réponse immunitaire induite, de schéma de vaccination et d'efficacité. Au terme du développement clinique, le candidat vaccin antipaludique devient un vaccin aux indications précises. Le développement clinique intervient suite aux études sur le modèle animal et représente un parcours de combattant jalonné d'essais cliniques chez l'homme.

Les modèles animaux ne peuvent reproduire de façon satisfaisante l'infection à *P. falciparum*, ni la réponse immune qu'induirait un vaccin chez l'homme [75]. Les conclusions de ces essais ne peuvent être extrapolées à l'homme de façon fiable. Il est impératif que le candidat vaccin antipaludique soit testé sur les sujets à risque de paludisme vivant en zone d'endémie, et qui aussi bénéficieraient le plus du vaccin. Dans le cas des vaccins des stades sanguins asexués, les essais d'efficacité à petite échelle, conduits en zone de forte incidence du paludisme apparaissent comme le chemin le plus court dans le développement clinique pour arriver à un produit fini et commercialisable [76 ; 77]. Ces essais en zone d'endémie exigent qu'ils y existent des sites capables de les conduire. Les candidats vaccins antipaludiques doivent être rigoureusement évalués. Les études sur l'efficacité et les effets secondaires interviennent avant et après la mise sur le marché du vaccin pour usage. Les évaluations avant la mise sur le marché ("prelicensing vaccine trials") comportent classiquement 3 phases:

3.2.1 Les essais de Phase I

Ils correspondent à la première administration du candidat vaccin chez l'homme. Ces essais évaluent la tolérance et l'immunogénicité du candidat vaccin. Le nombre de volontaires est

réduit : environ 10-120 personnes, d'abord chez les adultes puis chez les enfants. En phase I on peut aussi tester différentes doses et différents schémas de vaccination. Les essais en phase I portant sur des participants non exposés au paludisme ont été dénommés essais de phase Ia et ceux chez les participants vivant en zone d'endémie et naturellement exposés au paludisme ont été dénommés essai de phase Ib.

3.2.2 Les essais de Phase II

Le but de ces essais est d'établir la preuve de la protection conférée par le candidat vaccin. Un effectif plus important est inclus (n=200-600) ; cette phase évalue l'efficacité, l'immunogénicité et continue d'évaluer la tolérance du vaccin. On distingue les essais de phase 2a, où la protection est évaluée suite à « un challenge artificiel » ; c'est-à-dire à une épreuve d'infection expérimentale des participants. Les essais de phase 2b portent sur les populations réellement à risque et exposées à l'inoculum parasitaire naturel.

Dans le processus du développement clinique, la décision critique de poursuivre le développement du vaccin, est prise suite aux résultats obtenus en phase II.

3.2.3 Les essais de Phase III

Ils confirment l'efficacité du candidat vaccin qui a donné ses preuves en phase II. Ces essais portent sur un grand échantillon (n=1200-15000) Les critères de jugement peuvent comprendre la mortalité liée au paludisme ou l'incidence des formes graves et compliquées. La phase III permet aussi d'évaluer le niveau et la durée de protection, l'importance des effets secondaires dans une plus large population. Les résultats de phase III sont critiques pour l'obtention de l'autorisation de mise sur le marché.

3.2.4 Les essais de phase IV

Ces essais comportent les évaluations après la mise sur le marché ("post-licensing monitoring") du vaccin. Il s'agit non seulement de l'évaluation continue de l'efficacité du vaccin, mais aussi de l'amélioration des pratiques vaccinales et de la détection des effets secondaires rares. Ils visent à améliorer le mode d'administration, à réduire au maximum les doses, à mettre au point un système de chaîne de froid pratique surtout pour les pays chauds, à rechercher d'autres indications sur le terrain, à mettre au point les grandes lignes opérationnelles pour la conduite des programmes de vaccinations sur le terrain (formation des agents ou des équipes mobiles, instruments utilisés, surveillance et évaluation des programmes de vaccination; améliorer et rationaliser la gestion, extension des zones d'intervention) [78].

3.3 Les adjuvants vaccinaux

Le terme adjuvant dérive du latin “adjuvare” qui veut dire aider, assister. Il désigne toute substance capable d’augmenter l’intensité de la réponse immune dirigée contre un antigène administré simultanément.

Les adjuvants sont utilisés pour améliorer l’immunogénicité et l’efficacité du vaccin en améliorant la présentation de l’antigène aux cellules immunitaires spécifiques de l’antigène dans le but de conférer une protection à long terme contre les agents pathogènes ciblés. Les adjuvants sont utilisés dans les vaccins depuis plus de 90 ans. Des combinaisons de molécules immunostimulantes, telles que celles du système adjuvant AS01, ont ouvert la voie à la mise au point de vaccins nouveaux ou améliorés [79].

Les vaccins sont constitués de molécules antigéniques diluées dans un liquide, mais ces antigènes en solution n’induisent pas souvent de réponse immunitaire satisfaisante, surtout quand il s’agit de vaccins atténués qui ne peuvent pas parfaitement imiter une infection naturelle et des vaccins sous-unitaires qui se réduisent parfois à des simples peptides. Les adjuvants sont utilisés comme constituant des vaccins et la plupart des temps ils sont indispensables pour l’installation d’une réponse immune protectrice. L’utilisation des adjuvants dans la formulation des vaccins permet d’obtenir des taux plus élevés d’anticorps avec moins d’antigène. S’ils sont efficaces, les adjuvants ne sont pas dépourvus d’effets secondaires car ils peuvent être responsables de fièvres, d’une allergie, voire même du déclenchement de maladies auto-immunes. Les chercheurs s’emploient actuellement à utiliser des adjuvants efficaces avec moins d’effets secondaires.

3.3.1 Le QS-21 : Quillaja saponaria 21 (StimulonTM QS-21 Adjuvant)

Le QS-21 est un produit naturel dérivé de l’écorce de Quillaja saponaria, une espèce originaire du Chili et de l’Argentine. L’un des premiers adjuvants utilisés dans la formulation des vaccins pour augmenter l’immunité humorale et à médiation cellulaire. Le QS-21 est une molécule amphiphile avec une bonne hydrosolubilité. Cet adjuvant a été utilisé dans un essai de phase III d’un vaccin thérapeutique contre le mélanome à plus de 100µg par dose. Le QS-21 a été évalué au cours d’un essai de phase I et II de 31 vaccins différents entre 25 et 100µg de QS-21 avec un bon profil de tolérance. L’adjuvant QS-21 a entraîné chez la souris une stimulation de la réponse humorale avec un bon titre d’anticorps spécifiques IgG1, IgG2b, et IgG2a. Généralement administré par voie intramusculaire ou sous-cutanée, QS-21 est également efficace par voie nasale ou orale. Le QS-21 a entraîné une augmentation de la protection de

l'homme par les candidats vaccins recombinants antipaludiques et une stimulation des lymphocytes T cytotoxiques dans un essai de phase I [80].

La récente synthèse de molécules actives de QS-21 a fourni une méthode robuste pour produire cet adjuvant de vaccin de grande pureté ainsi que pour produire de nouveaux congénères synthétiques QS-21 conçus pour induire une réactivité immunitaire accrue et une toxicité réduite [81].

3.3.2 Le MPL : Monophosphoryl lipide A

(3-Q-desacyl-4'-monophosphoryl lipide A ; 3D-MLA)

Le MPL est un dérivé du Lipopolysaccharide (LPS) de *Salmonella minnesota* R595, qui conserve la partie lipidique A immunologiquement active de la molécule mère. Utilisé dans la formulation des vaccins, le MPL est généralement utilisé avec un véhicule (émulsion huile dans eau) qui donne une liaison étroite avec l'antigène, ce qui augmente son activité. Le MPL est soluble dans l'eau et dans l'huile, mais cette solubilité est significativement diminuée en présence des cations métalliques divalents. Des essais cliniques de phase I/II ont montré que le MPL est bien toléré.

3.3.3 Alhydrogel®

L'Alhydrogel est composé de sels d'hydroxyde d'aluminium $Al(OH)_3$.

C'est un adjuvant couramment utilisé dans la recherche immunologique. La procédure consiste à adsorber l'antigène sur le gel d'hydroxyde d'aluminium à fin de permettre une présentation optimale des antigènes aux cellules présentatrice d'antigène et améliorer ainsi la réponse immunitaire aux vaccins.

Les sels d'aluminium induisent de bonnes réponses de l'immunité humorale (lymphocytes B et lymphocytes Th2 CD4+). En revanche, ils induisent peu ou pas de réponses d'immunité cellulaires (lymphocytes Th1 CD8 + cytotoxiques).

3.3.4 AS01

AS01 est un système adjuvant vaccinal à base de liposomes contenant deux immunostimulants: le 3- O -désacyl-4'-monophosphoryl lipide A (MPL) et la saponine QS-21.

Les effets de AS01 sont rapides et transitoires, localisés au muscle injecté et au ganglion lymphatique drainant.

AS01 est efficace pour promouvoir les réponses immunitaires à médiation par les lymphocytes T CD4⁺ et constitue un adjuvant candidat approprié pour l'inclusion dans des vaccins ciblant des virus ou des agents pathogènes intracellulaires [79].

3.3.5 CPG 7909

Le CPG est constitué d'oligodésoxynucléotides riches en séquences (Cytosine phosphorothioate et Guanine), que l'on trouve en quantité dans l'ADN des micro-organismes, et qui sont des agonistes du TLR9.

Ils induisent des réponses Th1 et des réponses lymphocytaires cytotoxiques.

Le CPG 7909 est fabriqué conformément aux normes des bonnes pratiques de fabrication (cGMP). CPG 7909 utilisé dans l'essai était conditionné dans des flacons stériles à dose unique de 0,08 µg à 10 mg / ml, formulés dans un tampon salin pour l'administration intramusculaire (IM).

3.3.6 Les diluants : PBS et HSA

Le diluant du vaccin et du Challenge PfSPZ est composé d'une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) et de l'albumine de sérum humain (HSA).

Le PBS utilisé a été fabriqué dans le respect des BPF (GMP) par Sanaria, Inc.

Le PBS et la HSA sont stockés à la température ambiante selon les spécifications (entre 15°C à 30°C).

3.4 Antigène Pfs230

Pfs230, une protéine de parasite qui est exprimée au cours du développement sexuel chez l'hôte humain comme une grande protéine d'environ 230 kDa, est connu pour contenir diverses substitutions d'acides aminés à travers la protéine; cependant, la fonction de ces changements est inconnue. La protéine recombinante Pfs230 domaine 1 (également identifié comme Pfs230D1M), qui comprend environ 10% de la protéine entière Pfs230 est également connu pour contenir des variants alléliques mineures en comparaison NF54 ou le clone 3D7 de NF54. Pfs230 est aussi à base de cible TBA sur la base des observations faites sur les études chez les animaux que les anticorps polyclonaux et monoclonaux de l'antigène spécifique confèrent des activités de blocage de la transmission en SMFA. Le précurseur Pfs230 entier de 360 kDa est exprimé dans les gamétocytes, dans les érythrocytes, et est appelé à devenir une protéine mature de ~300 kDa après translocation à la surface des gamètes émergeant fraîchement des érythrocytes. La présence de la protéine Pfs230 est logique avec l'immunité anti-Pfs230 observée chez les populations exposées au paludisme, ce qui a fait penser en anticipation qu'un vaccin à base de Pfs230 pourrait être naturellement boosté par l'infection palustre. Dans les études sur les animaux, pour faciliter la production de protéines recombinantes, plusieurs sub-domaines N-terminaux avec cette protéine de 300 kDa ont été testés et ont prouvé qu'ils sont capables d'induire des anticorps fonctionnels pouvant bloquer la transmission. Sur la base de

ces résultats, utilisant une stratégie qualitative de conception, LMIV a développé et fabriqué un Pfs230D1M recombinant correspondant à la séquence de positions #542-#736 d'acides aminés de Pfs230 entier utilisant *P. pastoris* comme système de production. Le Pfs230D1M recombiné de 20-kDa conjugué à EPA permet d'obtenir une forte activité de blocage de la transmission chez les souris, les rats et les singes Aotus.

Pfs230D1M-EPA conjugué à l'Alhydrogel[®] a été testé en phase chez les adultes aux USA (2015) et au Mali (2015-2016) sous le numéro NIAID Protocol #15-I-0044 et a démontré une tolérance et une immunogénicité aussi bien chez les sujets neufs que chez adultes exposés au paludisme.

Bien que l'adjuvant AS01 ne soit pas encore dans les vaccins ayant licence, l'un des composants immunostimulants, monophosphoryl lipide (MPL), est un composant d'un vaccin contre le papillomavirus humain autorisé de GSK, et le système d'adjuvant AS01 a été un élément clé de Mosquirix[™] (RTS, S 25 ug / AS01E) et RTS, S / AS01B (RTS, S 50 pg / AS01B) qui a été largement testé chez les enfants et les adultes à travers l'Afrique. Ainsi, le chemin le plus logique et sûr de notre plan de développement clinique TBV était d'évaluer Pfs25M-EPA et Pfs230D1M-EPA en association avec AS01. Compte tenu de la disponibilité de l'adjuvant de nos partenaires GSK et un solide profil de tolérance, AS01E (MPL + 25 pg QS21 formulation liposomale) plutôt que AS01B ont été utilisés pour la formulation finale (pour cette étude, AS01 est AS01B dilué avec un conjugué / antigène dans la formulation à une dose équivalente à 25pg de MPL et 2pg de QS21 dans une dose de 0,5ml). Cela a induit des réponses immunitaires améliorées avec AS01B et AS01E par rapport à Alhydrogel[®], tout en maintenant un solide profil de sécurité, en collaboration avec les principaux vaccins bloquant la transmission des candidats de LMIV, Pfs25M-EPA et Pfs230D1M-EPA. La présente étude tente d'explorer l'utilisation de Pfs25M-EPA /AS01 et Pfs230D1M-EPA /AS01 au dosage complet et fractionné pour déterminer la dynamique de sécurité, l'immunogénicité, l'activité fonctionnelle, et de blocage de la transmission.

3.5 Antigène Pfs25

Contrairement à Pfs230, Pfs48/45 et Pfs16, Pfs25 est majoritairement synthétisé chez le moustique après la fécondation des gamètes mâles et femelles. C'est le candidat vaccin bloquant la transmission le plus étudié (Barr et al. 1991). L'infime quantité de protéine exprimée au cours de la gamétocytogénèse n'est pas capable de provoquer une réponse humorale naturelle détectable. C'est un polypeptide de 25 kDa constitué de 217 acides aminés avec 22 résidus cystéines et est exprimé à la surface du zygote et de l'ookinète (Vermeulen et al. 1985). La

séquence GPI (glycosyl phosphatidyl inositol) qui ancre la protéine à la membrane est glycosylée par des résidus de mannose et de glucosamine et contient de l'acide palmitique et de l'acide méristique. La protéine disparaît au fur et à mesure de la pénétration de l'ookinète dans la paroi stomacale et au cours de la formation de l'oocyste. Des anticorps monoclonaux anti-Pfs25 ont été reconnus capables d'empêcher la transmission de gamétocytes de sujets naturellement infectés aux moustiques (Mulder et al. 1994). Quoique les mécanismes de blocage de la transmission ne soient pas bien connus, Il est reconnu que l'antigène est très immunogène et que l'action de ces mécanismes se situerait dans les étapes de passage de l'ookinète dans la paroi stomacale du moustique.

Pfs25 a longtemps été un candidat principal pour une TBV du paludisme, toutefois Pfs25 soluble recombinant est faiblement immunogène. Les chercheurs et collaborateurs du LMIV ont conjugué chimiquement Pfs25 à l'exo protéine A (EPA), une protéine mutante et détoxifiée de *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). Ces conjugués ont induit des réponses d'anticorps significativement plus élevées chez les souris, les lapins et les singes rhésus que le non conjugué de Pfs25 [82;83]. La protéine conjuguée, recombinant EPA, ne constitue pas une composante de tous les vaccins homologués, mais a été largement étudié en tant que composant du conjugué des vaccins contre la typhoïde et la shigellose et les études précédentes de phase 1 de TBV du LMIV / MRTC étaient portées sur Pfs25H, Pfs25M et Pfs230D1M formulés avec l'Alhydrogel®.

3.6 ENGERIX-B (vaccin contre l'hépatite B: recombinant)

Est une suspension stérile d'antigène de surface du virus de l'hépatite B non infectieux (HBsAg) pour administration intramusculaire. Il contient de l'HBsAg purifié obtenu par culture de cellules de *Saccharomyces cerevisiae* génétiquement modifiées, qui portent le gène codant pour l'antigène de surface du virus de l'hépatite B. Chaque dose adulte de 1ml contient 20µg d'HBsAg adsorbé sur 0,5mg d'aluminium sous forme d'hydroxyde d'aluminium. Approuvé par la FDA pour les personnes âgées de 20 ans et plus pour une série de 3 doses selon un calendrier de 0, 1, 6 mois.

IV. METHODOLOGIE

1. Le lieu d'étude :

Notre étude s'est déroulée à Sotuba.

Sotuba est un village périurbain, situé à Bamako en commune I du district, en bordure du fleuve Niger, composé de ~ 6.500 habitants. La transmission du paludisme y est principalement saisonnière de juin à Décembre. Cette transmission du paludisme suit la même saisonnalité qu'à Bancoumana et Donéguébougou, bien que les taux d'inoculation entomologique soient historiquement beaucoup plus faibles. Les précipitations annuelles varient entre 800 mm et 1000 mm et se produisent de juin à octobre. L'incidence du paludisme varie de 1,02 à 2,06 épisodes/personne/an dans la tranche d'âge de 0-20 ans (Dicko et al, 2007).

Sotuba a été le site de nombreuses études portant sur l'épidémiologie du paludisme, l'efficacité des médicaments et l'entomologie, menées par le DEAP. L'équipe du DEAP a établi un centre de santé et de recherche électrifié avec une connexion internet.

Il comprend deux salles d'examen médical, une salle de soins, une pharmacie, une salle d'attente et deux salles d'observation; des salles supplémentaires pour l'examen des participants. En 2014 le Malaria Research and Training Center (MRTC) en collaboration avec « European Developing Country Clinical Trial Partenership » (EDCTP)/Malaria Médecine Venture (MMV) a construit un laboratoire annexe muni d'une salle d'attente, d'une pharmacie, d'une salle de prélèvement sanguin, de diagnostic parasitaire, d'analyse biochimique et hématologique, d'une salle de préparation de mélange réactionnel pour la Polymérase Chain Réaction (PCR), d'une salle d'extraction d'ADN, d'une salle d'amplification et de révélation.



Figure 5 : Carte montrant l'emplacement de Bamako, la Capitale du Mali

Source : Institut Géographique du Mali (IGM)

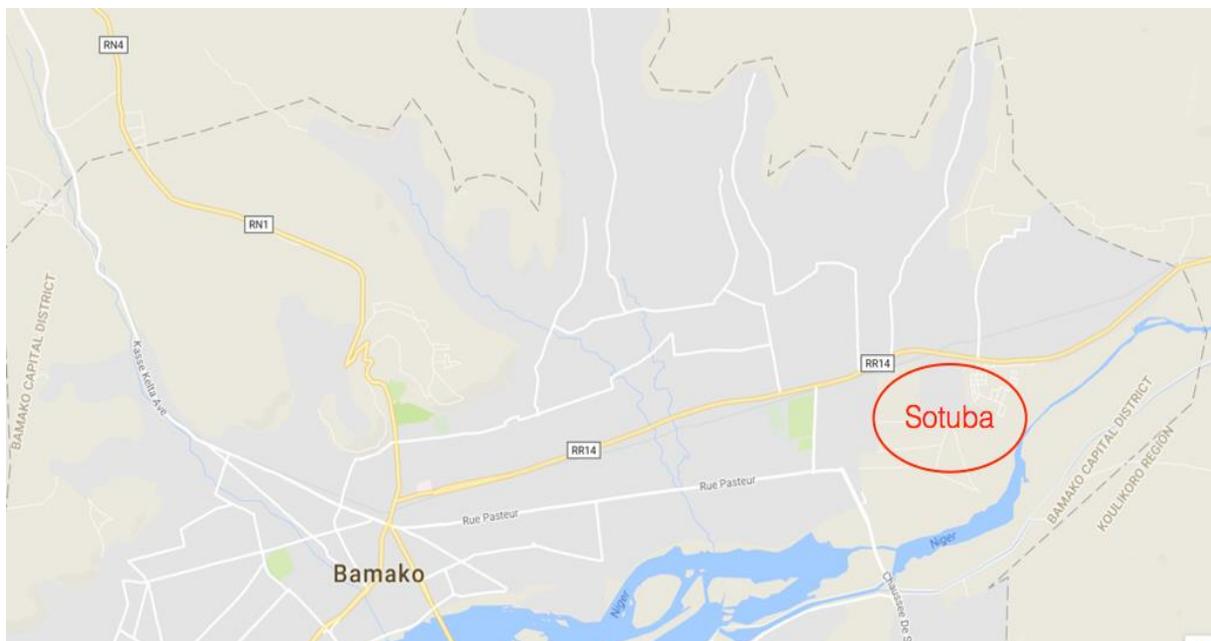


Figure 6 : Carte montrant l'emplacement du site d'étude de Sotuba, vers le côté Est de Bamako

Source : Image Google Map, montrant l'emplacement de Sotuba

2. Période d'étude :

Cette étude s'est déroulée de Janvier 2017 à Décembre 2017

3. Population d'étude

❖ Description

La population d'étude était composée de volontaires d'hommes et de femmes non enceintes en bonne santé, âgés de 18 à 50 ans exposés au risque du paludisme.

Échantillonnage: Une annonce générale a été faite par un griot du village (crieur public avec tam-tam), invitant les chefs de ménages et de familles à venir au centre pour s'informer de l'étude au moment de la permission communautaire. Nous avons procédé au recrutement des volontaires. Par la suite sur 175 personnes dépistées, 65 volontaires répondant à tous les critères d'inclusion, ont été inclus dans l'étude. Par prudence avec d'éventuels problèmes de tolérance des produits à leur première expérimentation chez l'homme, les essais cliniques de phase I utilisent une faible taille d'échantillon.

Les soixante-cinq (65) volontaires étaient répartis en quatre groupes :

Groupe 1: Pfs25M-EPA/AS01 (n=15)

- **Bras 1a** (n=5), pour recevoir 16µg Pfs25M-EPA/AS01 à J0, J28, J168
- **Bras 1b** (n=10), pour recevoir 47µg Pfs25M-EPA/AS01 à J0, J28, J168.

Groupe 2: Pfs230D1M-EPA/AS01 (n=15)

- **Bras 2a** (n=5), pour recevoir 13µg Pfs230D1M-EPA/AS01 à J0, J28, J168
- **Bras 2b** (n=10), pour recevoir 40µg Pfs230D1M-EPA/AS01 à J0, J28, J168

Groupe 3: Pfs25M-EPA/AS01 et Pfs230D1M-EPA/AS01 (n=15)

- **Bras 3a** (n=5), pour recevoir 16µg Pfs25M-EPA/AS01 et 13µg Pfs230D1M-EPA/AS01 à J0, J28, J168
- **Bras 3b** (n=10), pour recevoir 47µg Pfs25M-EPA/AS01 et 40µg Pfs230D1M-EPA/AS01 à J0, J28, J168

Groupe 4: Comparateur (n=20)

- **Bras 4a** (n=10), pour recevoir Engerix B[®] à J0, J28 and J168
- **Bras 4b** (n=10), pour recevoir Engerix B[®] à J0, J28 et J168

4. Type d'étude :

Nous avons effectué une étude expérimentale randomisée, ouverte avec escalade de doses, conçue pour évaluer l'immunogénicité des candidats vaccins chez les adultes de Sotuba en bonne santé vivant dans un contexte de faible transmission du paludisme.

Le processus de cette étude consistait :

- A l'obtention du consentement éclairé individuel
- Un dépistage clinique, paraclinique et de laboratoire
- Administration du vaccin: en injection IM (intramusculaire) dans le muscle deltoïde. Dont le schéma était le suivant : 3 doses administrées aux jours 0, 28 et 168.
- Une observation clinique pendant 30 minutes post-vaccinale dans une pièce séparée pour l'évaluation des signes vitaux: température orale, pouls, tension artérielle.
- Puis les participants ont été revus aux jours 1, 3, 7 et 14 post-vaccinations pour l'évaluation des signes et symptômes cliniques sollicités et/ou non sollicités.
- Une évaluation clinique et biologique les jours 0, 3, 14, 28, 31, 42, 112, 168, 171, 175, 182, 196, 224, 280 et 336.
- Les prélèvements du sang sur les tubes **HEPARINE**, ces échantillons sont collectés pour les analyses cellulaires T et B. Ils ont été initialement traités pour la séparation cellulaire et l'analyse par cytométrie de flux au MRTC. Les PBMCs ont ensuite été conditionnés dans l'azote liquide puis envoyés au LMIV conformément aux procédures standards de l'étude.
- Les analyses transcriptionnelles ont été effectuées sur le sang total prélevé. Le sang a été prélevé par ponction veineuse et placé dans des tubes PAXGène pour préserver l'intégrité de l'ARN jusqu'à ce que l'ARN soit extrait. Des spécimens ont été analysés à la Direction de la recherche des Technologies, NIAID et / ou au NIH Intramural Sequencing Center. Le profil moléculaire comprenait l'identification de transcrits d'ARN présent dans tous les êtres humains qui sont induits ou exprimés après chaque vaccination. Cela ne représente pas un test génétique d'individus ou de leur ADN.
- Les prélèvements du sang ont été effectués sur tubes secs (**SST**) avant chaque immunisation et aux jours 0, 14, 28, 42, 112, 168, 182, 196 et 224 pour le dosage des taux sériques d'anticorps anti-Pfs230 et anti-Pfs25M.

Tableau II : Calendrier de Vaccinal de Pfs230 et Pfs25

CALENDRIER DE VACCINATION

	Day	Date
Vaccination#1	0	18-janv-17
Vaccination#2	28	15-févr-17
Vaccination#3	168	10-juil-17

5. Sélection et recrutement des volontaires

5.1 Recrutement

La permission communautaire a été obtenue auprès des notables de Sotuba et des autres membres de la communauté après explication du protocole et discussion sur l'étude au cours d'une rencontre communautaire. Une annonce générale a été faite à travers la radio locale ou toute autre voie de communication communautaire, invitant les chefs de ménages et de familles à venir à la clinique pour s'informer de l'étude au moment de la permission communautaire.

5.2 Critères d'Inclusion

Les critères d'inclusion étaient basés sur la définition stricte des cas à savoir :

- ✓ Age ≥ 18 et ≤ 50 ans.
- ✓ Disponible pendant la durée de l'étude.
- ✓ Capable de fournir une pièce d'identité à la satisfaction du clinicien de l'étude qui fait le processus d'enrôlement.
- ✓ Bon état général de santé et sans histoire d'antécédent médical significatif.
- ✓ Les femmes en âge de procréer doivent utiliser une méthode de contraception fiable à partir de 21 Jours avant le Jour 0 de l'Etude jusqu'à 3 mois après la dernière vaccination.
- ✓ Volontaire pour que ses échantillons de sang soient gardés pour des futures recherches.
- ✓ Volontaire pour participer aux gorgements directs.
- ✓ Résidant connu de Sotuba.

5.3 Critères de non inclusion

N'ont pas été inclus dans cette étude tous les volontaires qui avaient les critères suivants :

- ✓ Grossesse déterminée par un test positif d'urines ou un test de sérum humain choriogonadotropine (β -hCG).

- ✓ Allaitement en cours.
- ✓ Maladie comportementale, cognitive, ou psychiatrique qui, selon l'avis du chercheur, affecte la capacité de la volontaire à comprendre et à coopérer avec l'exécution du protocole de l'étude.
- ✓ Valeur de l'Hémoglobine, des globules blancs et des plaquettes au-delà de la limite normale définie par le laboratoire.
- ✓ Valeur de l'alanine transaminase (ALT) ou de la créatinine (Créat) au-delà de la limite supérieure définie par le laboratoire.
- ✓ Infection au virus de l'immunodéficience humaine (VIH), au virus de l'hépatite C (VHC), ou au virus de l'hépatite B (VHB).
- ✓ Evidence clinique significative de maladie neurologique, cardiaque, pulmonaire, hépatique, endocrinienne, rhumatologique, auto immune, hématologique, oncologique, ou rénale dans l'histoire médicale, l'examen physique et/ou aux examens de laboratoire y compris l'analyse des urines.
- ✓ Antécédent d'administration de tout produit expérimental dans les 30 jours précédents.
- ✓ Participation ou projet de participation à un essai clinique avec un produit de recherche avant la fin de la visite de suivi du jour 28 après la dernière vaccination, ou la participation prévue à une étude de vaccin expérimental jusqu'à la dernière visite de suivi requise par le protocole.
- ✓ Volontaire ayant eu des problèmes médicaux, professionnels, ou familiaux par suite d'alcoolisme ou d'usage illicite de médicaments dans les 12 derniers mois.
- ✓ Antécédent d'allergie grave ou de choc anaphylactique.
- ✓ Antécédent d'asthme sévère.
- ✓ Préexistence de maladie auto immune ou de maladie avec auto anticorps.
- ✓ Syndrome d'immunodéficience connu.
- ✓ Asplénie connue ou asplénie fonctionnelle.
- ✓ Utilisation chronique (>14 jours) par voie orale ou intraveineuse de corticostéroïdes à dose immunosuppressive ou de médicaments immunosuppresseurs dans les 30 jours précédant le début de cette étude.
- ✓ Administration avant de s'inscrire à l'étude (Jour 0) d'un vaccin vivant lors des quatre dernières semaines ou un vaccin inactivé lors des deux dernières semaines avant de l'étude.
- ✓ Administration d'immunoglobulines ou de produits dérivés du sang lors des 6 derniers mois.

- ✓ Administration antérieure de vaccin antipaludique expérimental dans les cinq dernières années.
- ✓ Toute autre condition, qui de l'avis de l'investigateur pourrait bafouer la sécurité et les droits du participant, interférer avec l'évaluation des objectifs de l'étude, ou rendre le sujet inapte à suivre les procédures de l'étude.
- ✓ Antécédent de réaction sévère aux piqûres de moustiques.
- ✓ Antécédent d'allergie à un des composants du vaccin.

6. Organisation pratique du travail :

Cette étude a été réalisée par trois équipes de recherche. Les laborantins, les cliniciens et les pharmaciens.

6.1 Consentement

Après une rencontre avec les autorités sanitaires, une campagne d'information a été faite auprès de la population quelques semaines avant la première vaccination. Elle a consisté en une rencontre avec le chef du quartier et ses conseillers, les autorités politiques, administratives et locales de la ville de Sotuba. La rencontre avait pour but d'expliquer le protocole et d'obtenir la permission communautaire.

Un consentement éclairé individuel écrit de tous les volontaires a été obtenu après une explication plus détaillée du protocole à chaque volontaire en langue locale avec un témoin. Ce consentement était signé et daté par l'investigateur, le volontaire et le témoin ; avec la permission du mari pour les femmes. Tous les volontaires étaient soumis à un test pour évaluer le niveau de compréhension du consentement. Et il fallait avoir 80% de bonne réponse pour continuer le processus d'éligibilité.

6.2 Dépistage

Après l'obtention du consentement, les volontaires étaient orientés vers la salle de dépistage sur rendez-vous. Le dépistage a consisté à identifier le volontaire puis les examens cliniques. Si éligible, il était orienté vers la salle de prélèvement pour effectuer les prélèvements prévus par le protocole à ce stade ; enfin il passait à la vérification par le coordinateur clinique et recevait un rendez-vous pour la vaccination.

Les prélèvements consistaient à prélever le sang dans les tubes SST pour les tests biochimiques (Créatinine et ALT), HIV, AgHBs, AgHCV, β -hCG pour les femmes et dans le tube EDTA pour le test NFS (Numération Formule Sanguin).

L'analyse des échantillons a immédiatement suivi leur réception. En cas de résultat anormal d'un paramètre, le test était immédiatement répété une fois sur le même échantillon pour confirmer la valeur.

Aucun cas d'erreur technique n'a été noté, ni de panne de machine. Un contrôle de qualité des résultats était effectué après chaque report dans les dossiers individuels des volontaires à partir des documents sources que constituent les imprimés des appareils, pour minimiser les erreurs de transcriptions.

Le laboratoire de biologie clinique a bénéficié des contrôles de qualité interne, effectués sur les appareils deux fois par semaines. Le contrôle de qualité externe a été régulièrement fait tous les trois mois.

6.3 Vaccination

Poste d'identification : Ce poste était composé d'un investigateur et d'un guide. Le travail consistait à identifier chaque volontaire par le guide au départ et aussi à travers le numéro de dépistage puis à vérifier l'obtention du consentement éclairé. Après cette vérification de l'identité, le volontaire était dirigé, vers les postes cliniques au cours de l'étude.

Poste clinique : Composé de médecins tenant chacun une salle de consultation médicale. L'examen clinique et l'examen physique complet ont été effectués. Les participants étaient ensuite orientés vers la salle de prélèvement du laboratoire certifié CAP (College of American Pathologists).

Poste de prélèvement : Tenu par les biologistes et les internes, dont l'un s'occupait de l'étiquetage des tubes SST, HEPARINE et EDTA sur les quels étaient inscrits: la date et l'heure du prélèvement, le numéro d'identification du participant, le jour de visite et les initiales du technicien. Certains étaient chargés du prélèvement du sang veineux, la confection de lames et de confettis. Les spécimens étaient chargés sur un portoir approprié ensuite transportés dans la salle d'analyse clinique dans un panier réservé à cet effet, les lames de goutte épaisse étaient transportées dans le portoir lame pour la coloration et les confettis étaient arrangés le soir dans des enveloppes A4. Un échantillon d'urine était collecté pour chaque volontaire pour l'appréciation de l'hématurie et de la protéinurie, le test de grossesse pour les volontaires de sexe féminin.

La réception : Tous les échantillons étaient enregistrés à leur réception sur la fiche de réception d'échantillons. Les données à enregistrer étaient : le numéro d'étude du volontaire, la date et l'heure du prélèvement, la date et l'heure de la réception ainsi que les initiales du technicien. Chaque échantillon devait répondre à certaines normes :

- Respect du délai entre le prélèvement et la réception pour les tubes SST et HEPARINE.
- Respect du délai entre le prélèvement et le transport : 2 heures pour les tubes SST et HEPARINE.
- Volume du prélèvement suffisant : tubes remplis au 2/3.

La centrifugation, les tests hématologiques sur ABX 60 et biochimiques sur Pentra C 200 ont été effectués dans le laboratoire sur le site. Le participant était ensuite orienté vers la salle d'identification pour vérifier l'éligibilité pour la vaccination puis vers la salle de vaccination.

Les volontaires se présentaient avec leur badge qui porte le numéro d'étude, la photo d'identité, le nom et prénom du volontaire au poste de pré-vaccination et leurs dossiers étaient vérifiés par l'investigateur principale.

Postes de vaccination: Constitué de deux médecins repartis dans deux salles réservées à cet effet et de deux pharmaciens chargés de la préparation des vaccins dans une autre salle séparée, communiquant avec les premières par deux petites fenêtres coulissantes.

La randomisation était effectuée par les statisticiens de NIH par l'attribution du code de randomisation qui correspond à chaque numéro de screening.

Le pharmacien de l'étude disposait de la liste de randomisation pour attribuer le bras de vaccin séquentiellement en fonction de l'ordre d'enrôlement du participant.

Après une vérification supplémentaire de l'identité du participant, il reçoit une dose de vaccin par injection IM dans le muscle deltoïde.

-Préparation des vaccins : les deux pharmaciens étaient chargés de vérifier le numéro de screening du participant en vérifiant la liste de randomisation correspondant à ce numéro puis préparer le vaccin alloué au participant avec toutes les conditions requises, remplir le dossier des participants et passer la seringue étiquetée et le cahier d'observation aux vaccinateurs.

-Salle d'observation clinique poste-vaccinale : Après chaque vaccination le participant a été observé pendant 30 minutes dans une pièce séparée pour l'évaluation des réactions locales et générales notamment la température orale, le pouls, la tension artérielle et la fréquence respiratoire.

Les volontaires retournaient aux postes cliniques pour une évaluation générale.

6.4 Suivi

Composé d'un suivi actif qui consistait à faire des visites programmées pour les évaluations cliniques et biologiques et d'un suivi passif qui consistait à rendre disponible un service de soins à tout moment pour s'occuper des sujets en cas de problèmes de santé.

6.5 Salle de réanimation

Tenue par un médecin anesthésiste réanimateur, équipée de deux lits d'hospitalisation, deux bonbonnes d'oxygène, un lot de matériels et produits de réanimation.

Une ambulance était réservée pour le transport immédiat en cas de réaction allergique grave vers un centre spécialisé.

Un coordinateur clinique était chargé de suivre le déroulement de toutes les activités.

7. Méthodes d'étude

7.1 Etude immunologique

Le but de l'unité d'immunologie est de décrire l'immunité cellulaire et humorale dans la population d'étude dans les conditions naturelles; et de suivre la réponse immunitaire de cette population après administration de vaccin candidat contre le paludisme.

7.1.1 Technique d'ELISA

La technique ELISA a été utilisée pour le dosage des anticorps.

❖ Principe

C'est une technique immuno-enzymatique qui permet le dosage des anticorps. La technique consiste à doser les anticorps contenu dans le sérum du participant.

Il consiste à fixer sur un support solide les antigènes de *P. falciparum* sur lequel les anticorps contenus dans le sérum ou plasma se fixent. Ces anticorps sont ensuite détectés à l'aide d'un second anticorps marqué par une enzyme. Le complexe antigène-anticorps-anticorps conjugué à l'enzyme sera révélé par addition d'un substrat spécifique.

Mode opératoire (voir annexes)

7.2 Étude parasitologique

Le paludisme simple a été défini par la présence de formes asexuées de *Plasmodium* dans le sang, associées à un ou plusieurs symptômes suivants: fièvre, les frissons, céphalées, vomissements, courbature, douleur abdominale, diarrhée.

7.2.1. Diagnostique biologique du paludisme

A. La goutte épaisse (GE)

❖ Principe

C'est une technique de micro concentration de sang sur lame. La goutte épaisse consiste à réaliser un étalement épais de sang circonscrit dans un cercle d'environ un centimètre de diamètre sur une lame porte-objet dégraissée. L'examen au microscope optique à l'objectif 100

à immersion de l'étalement coloré au Giemsa permet de mettre en évidence la présence des plasmodies.

B. Le Frottis mince (FM)

❖ Principe

Il consiste à prélever une goutte de sang que l'on étale en couche fine sur une lame porte-objet et que l'on examine après fixation au méthanol puis coloration au Giemsa à 3% ou 10%.

7.2.2 Test de Diagnostic rapide du paludisme

Pour des visites prévues, des tests diagnostiques rapides ont été utilisés chez les participants présentant les symptômes du paludisme.

Pour des visites imprévues, des tests diagnostiques rapides ont été utilisés pour le diagnostic du paludisme clinique.

7.2.3 Polymérase chaîne réaction et l'amplification du parasite

Ces tests moléculaires de recherche ont augmenté de façon significative la sensibilité pour la détection de l'infection par *P. falciparum* approchant 20 parasites / μ l.

8. Considérations éthiques

Le formulaire de consentement éclairé, la prise en charge des produits administrés et leurs compensations, ainsi que le protocole ont été soumis et approuvés par les comités d'éthique du NIAID (17-I-N006), de la FMPOS (N°2016/133/CE/FMPOS). Au tout début de l'étude nous avons entrepris des visites de courtoisie aux différentes autorités (sanitaire, municipale, chefs de quartier, notables). Au cours de ces visites nous avons donné des explications détaillées sur l'étude et nous avons répondu aux questions. Nous avons obtenu la permission communautaire et le consentement éclairé individuel de tous les participants, toutes les dispositions ont été prises pour garantir la confidentialité. Ces mécanismes avaient pour but de surveiller de la façon la plus objective l'avènement d'effets indésirables, d'augmenter la protection des participants et de minimiser les risques. Les participants ont bénéficié d'un suivi médical gratuit durant la durée de l'étude au centre.

Toute affection diagnostiquée était traitée aux frais du programme vaccin et conformément aux normes et procédures de prise en charge des maladies en vigueur au Mali.

Pour les cas de paludisme, la prise en charge a été assurée conformément aux directives du programme National de Lutte contre le Paludisme. Pour le temps consacré à l'étude, les participants après approbation des comités d'éthique, auront chacun une compensation à chaque visite régulière. Les volontaires étaient libres de se retirer de l'étude à tout moment.

9. Saisie et analyse des données

Les données ont été recueillies dans les cahiers d'observation individuels des participants, saisies et vérifiées dans une base de données Data fax et analysées par les logiciels R i386 version 3.4.1 et Excel 2013.

V. RESULTATS

1. Caractéristiques sociodémographiques de la population d'étude

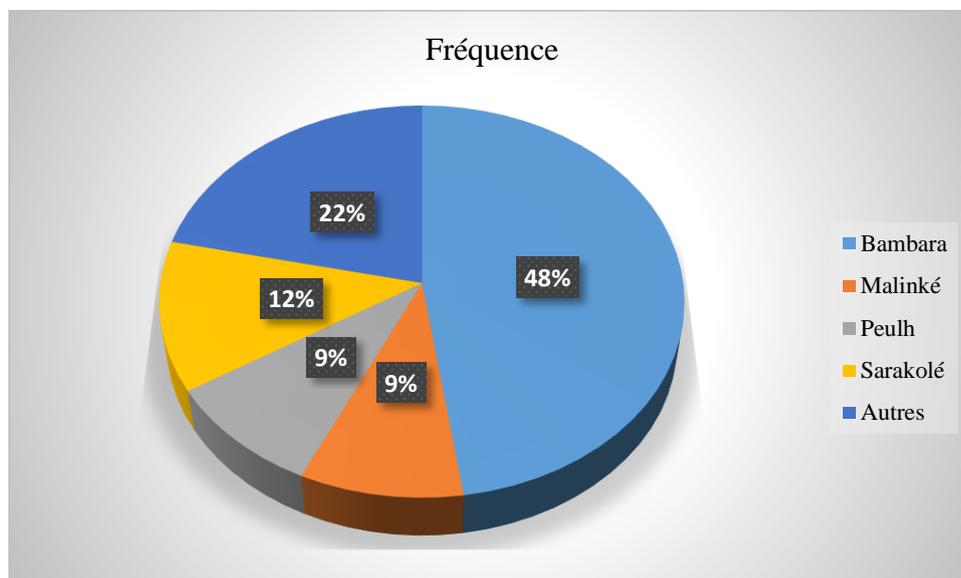


Figure 7: Répartition de la population d'étude en fonction de l'ethnie

L'ethnie Bambara était la plus représentée dans notre étude soit 48%

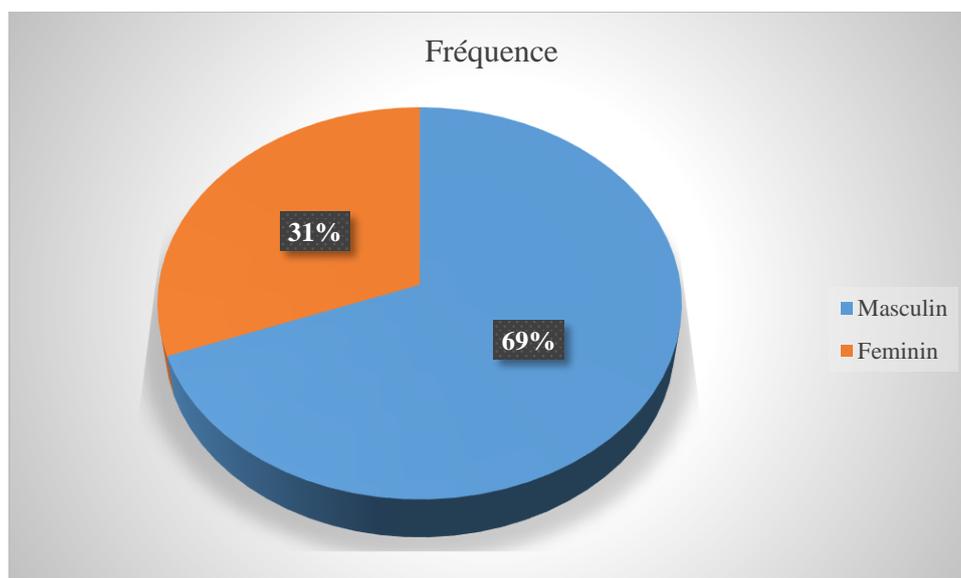


Figure 8: Répartition de la population d'étude en fonction du sexe.

Le sexe masculin était le plus représenté dans notre étude soit 69% (sexe ratio=2,22)

2. Evaluation de l'immunogénicité

Tableau III: Le taux moyen d'IgG anti-Pfs25 et anti-Pfs230 en UI, en fonction du visite

Jour	0	14	28	42	112	168	182	196	224
Pfs25_16ug	20	163	161	2129	316	149	2749	1820	1028
Pfs25_47ug	15	171	145	1279	213	121	808	635	373
Pfs230_13ug	25	695	499	3245	505	230	1873	1059	686
Pfs230_40ug	76	559	385	1752	439	355	2102	1464	854

Après chaque vaccination, nous constatons une production importante d'anticorps au J42, J182 et cela pour tous les antigènes.

Cette production d'anticorps est plus remarquable au J42 pour **Pfs230_13ug** avec une moyenne soit 3245 UI suivi de 2129 UI pour **Pfs25_16ug** et au J182 pour **Pfs25_16ug** avec moyenne soit 2749 UI suivi de 2102 pour **Pfs230_40ug**.

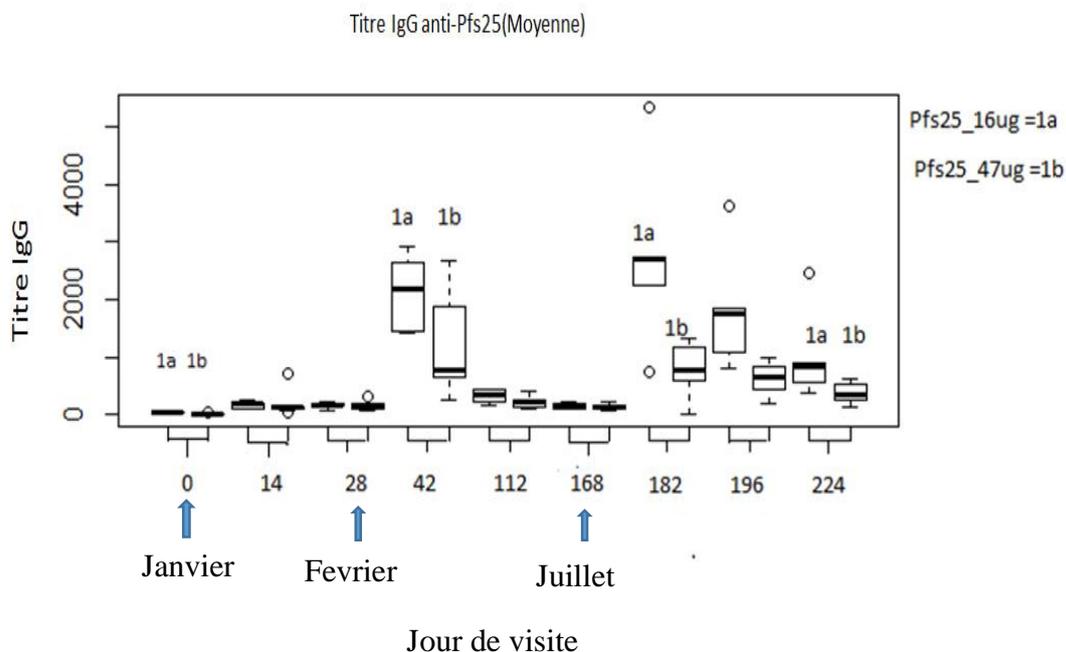


Figure 9: Comparaison de titre d'anticorps IgG anti-Pfs25M-EPA/AS01 faible dose et forte dose

Après les vaccinations, nous avons constaté une production importante d'anticorps IgG au J42, J182 et cela pour tous les antigènes même si cette production était plus marquée pour le bras 1a (Pfs25_16ug) avec $p=0,075$ et $p=0,028$.

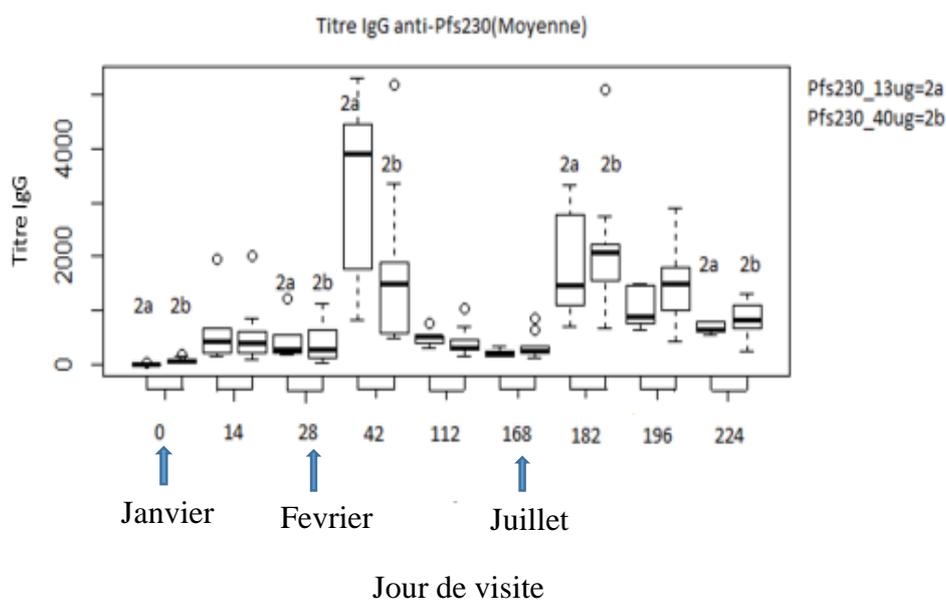


Figure 10: Comparaison de titre d'anticorps IgG anti-Pfs230 D1M-EPA/AS01 faible dose et forte dose

Après les vaccinations, nous avons constaté une production importante d'anticorps IgG au J14, J42, J182 et cela pour tous les antigènes et cette production était plus marquée au jour 42 pour le bras 2a (**Pfs230_13ug**) par contre elle était plus marquée au J182 pour le bras 2b (**Pfs230_40ug**) et persiste avec le temps $p=0,11$ et $p=0,73$.

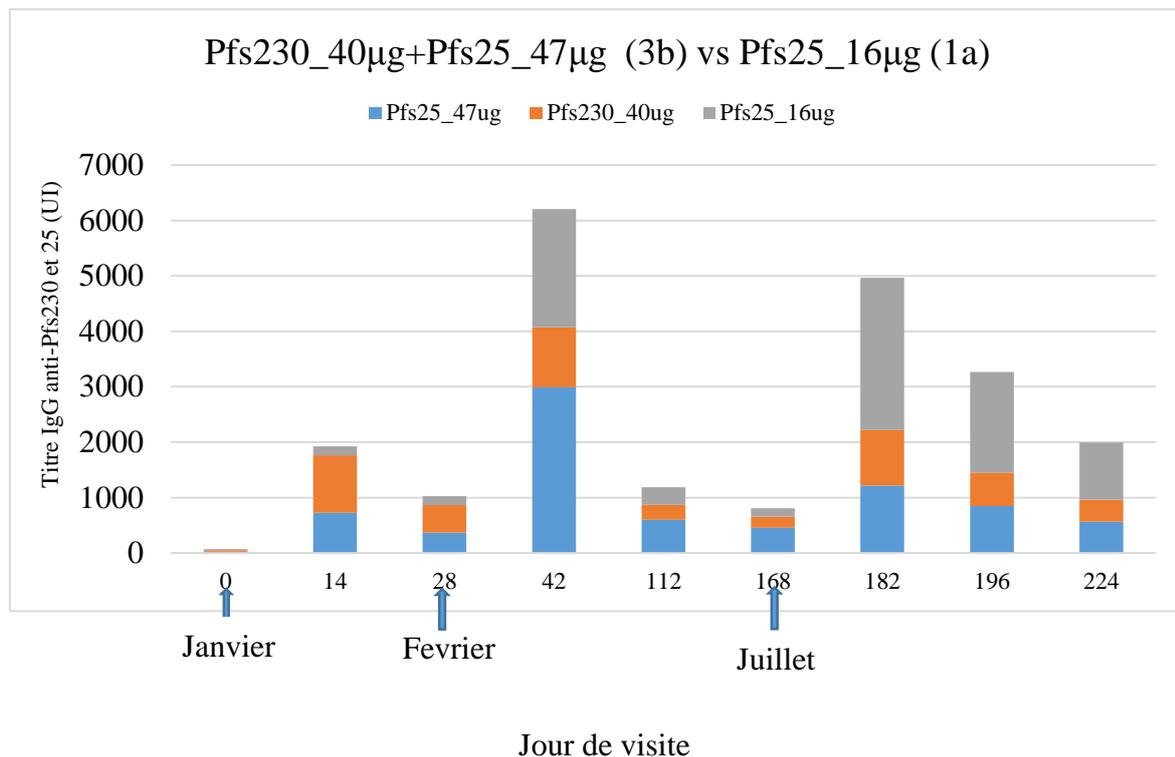


Figure 11: Comparaison des titres d'anticorps IgG anti-Pfs230D1M-EPA/AS01+ Pfs25M-EPA/AS01 forte dose à anti-Pfs25M-EPA/AS01 faible dose

Nous avons observé une production importante d'anticorps au J42 de **Pfs25_47ug** par contre nous avons observé une nette augmentation et une persistance du titre anticorps IgG anti-**Pfs25_16ug** aux jours 182, 196, 224.

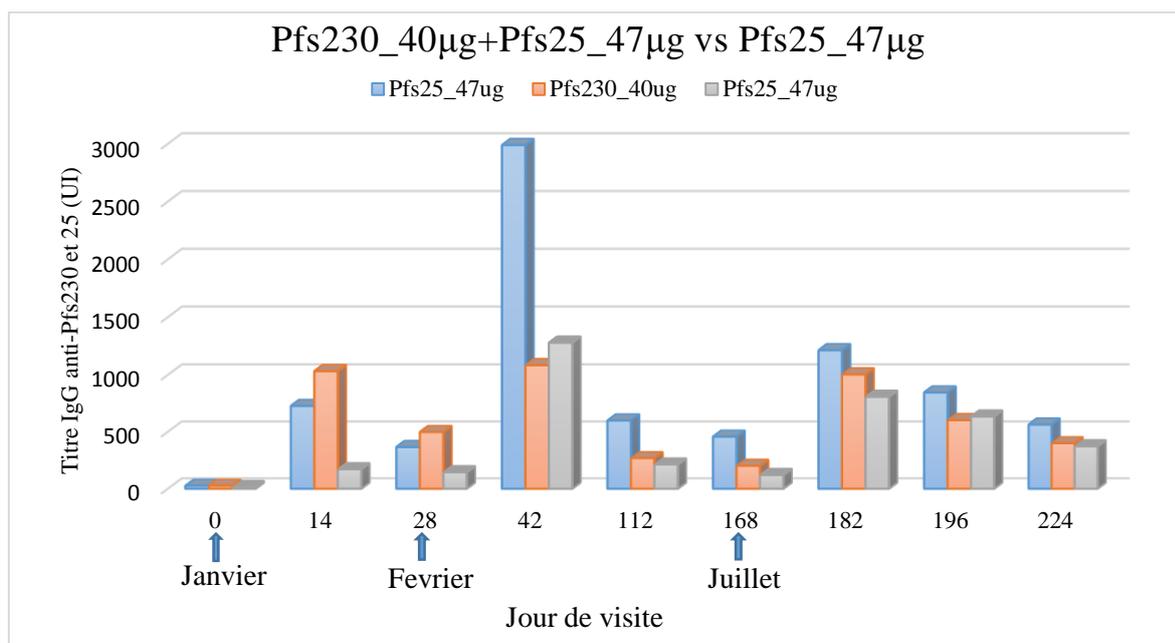


Figure 12: Comparaison de titre d'anticorps IgG anti-Pfs230D1M-EPA/AS01+ Pfs25M-EPA/AS01 forte dose à anti-Pfs25M-EPA/AS01 forte dose

Après les vaccinations, nous avons observé une production importante d'anticorps IgG au J42 et cela pour tous les antigènes et cette production était plus marquée pour la combinaison Pfs25 et Pfs230 forte dose.

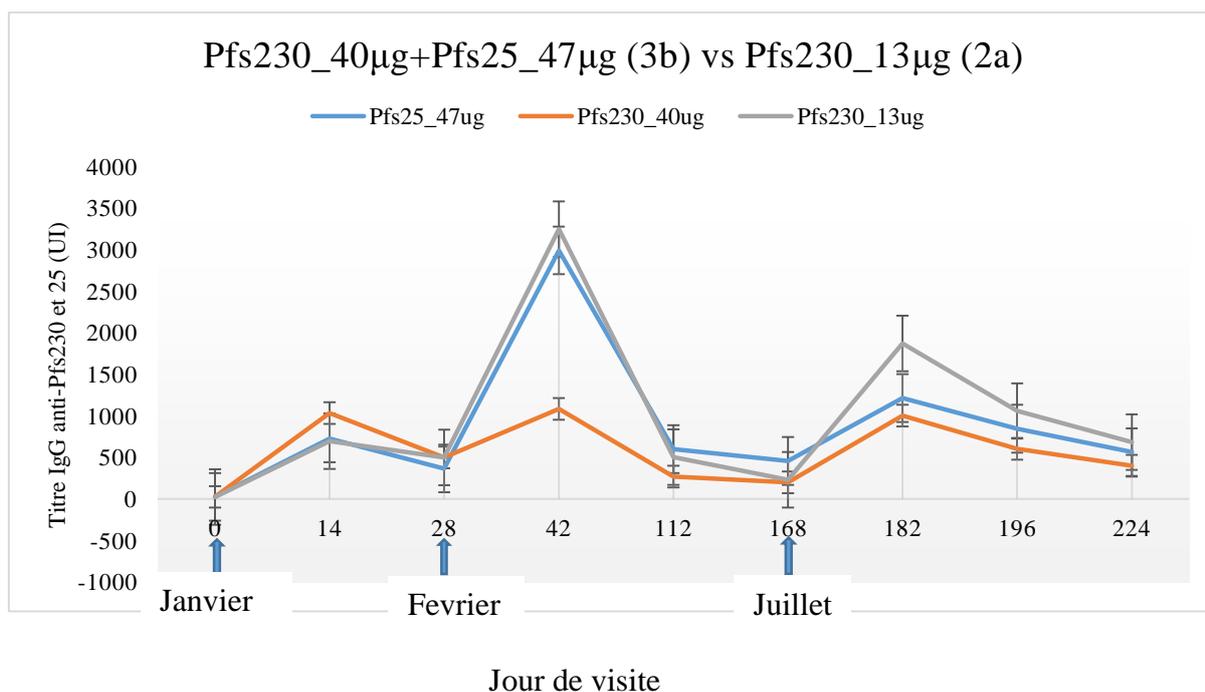


Figure 13: Comparaison de titre d'anticorps IgG anti-Pfs230D1M-EPA/AS01+ Pfs25M-EPA/AS01 forte dose à anti-Pfs230D1M-EPA/AS01 faible dose

Nous avons observé une augmentation des titres d'anticorps IgG entre le bras 3b et 2a aux jours 42 et 182.

La production d'anticorps **anti-Pfs230_13ug** seul était supérieure à celle de la combinaison Pfs230+Pfs25 forte dose.

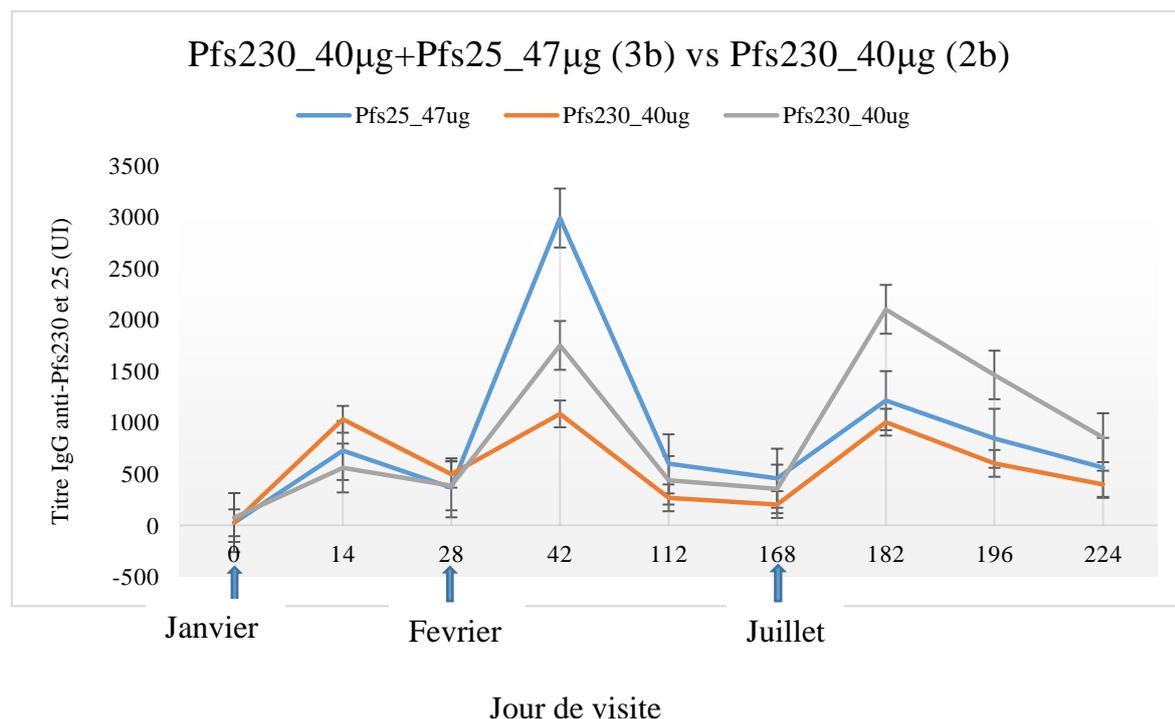


Figure 14: Comparaison du titre d'anticorps IgG anti-Pfs230D1M-EPA/AS01+ Pfs25M-EPA/AS01 forte dose à anti-Pfs230D1M-EPA/AS01 forte dose

Nous avons observé une différence dans les réponses d'anticorps IgG entre le bras 3b et 2b après la deuxième (#2) et troisième (#3) immunisation. Les pics sont observés 14 jours après chacune des vaccinations avec des titres d'anticorps plus importants.

Cette réponse d'anticorps était plus marquée au J42 pour la combinaison (Pfs25+Pfs230 forte dose) et au J182 pour **Pfs230_40ug**.

La production d'anticorps anti-Pfs230_40ug seul est supérieure à celle de Pfs230 et Pfs25 forte dose en combinaison après la troisième (#3) immunisation.

VI. DISCUSSION

Dans ce travail nous avons comparé l'immunogénicité de deux candidats vaccins bloquant la transmission du paludisme en administration seule et en co-administration, en faible ou forte dose chez des adultes exposés au paludisme dans une zone de transmission faible.

Nous avons choisi d'effectuer cette étude à Sotuba car il est situé dans une zone hypo-endémique avec une faible transmission saisonnière d'environ 7 mois, allant de Juin à Décembre. Ce site a fait l'objet de nombreuses études portant sur l'épidémiologie du paludisme, l'efficacité des médicaments et l'entomologie, menées par le MRTC/DEAP. L'équipe du MRTC/DEAP a établi un centre de santé et de recherche électrifié avec une connexion internet. Il existe de très bons rapports de confiance mutuelle entre la population de ce village et l'équipe en place.

Les essais cliniques de phase pilote concernent en général quelques dizaines de participants. Notre étude de phase pilote a enrôlé 65 participants. Dans la population d'étude le sexe ratio était de 2,22 ; cette prédominance masculine s'explique par le fait que certains critères de non inclusion étaient spécifiques aux femmes tels que décrits dans la méthodologie. Le seul critère relatif au besoin d'être sous contraception fiable 21 jours avant la première vaccination et 3 mois après la dernière dose de vaccin limitait suffisamment le recrutement des jeunes filles et femmes en âge de procréer.

Au cours de cette phase pilote nous étions intéressé de savoir lequel des candidats vaccins (Pfs25, Pfs230 et leurs combinaisons) étaient plus immunogènes et donc d'induire une production suffisante d'anticorps IgG durable dans l'organisme.

Aucune immunité préexistante contre Pfs25 n'a été observée avant la vaccination chez les adultes sains de l'étude. La plupart des sujets dans tous les bras recevant Pfs25M (Bras 1a: faible dose de Pfs25M_16µg et Bras 1b: forte dose de Pfs25M_47µg et Bras 3a: faible dose de Pfs25M_16µg + faible dose de Pfs230D1M, 13µg et Bras 3b: forte dose de Pfs25M_47µg + une forte dose de Pfs230D1M, 40µg) ont répondu au vaccin après la vaccination # 1, ce qui n'a pas été observé avec la même dose de Pfs25M associé à l'adjuvant Alhydrogel® aux USA (protocole de NIAID # 15-I-0044). Les réponses anticorps IgG ont continué à augmenter avec la deuxième et la troisième vaccination.

Il y avait une différence statistiquement significative dans les réponses anticorps dirigées contre Pfs25 entre bras 1a (Pfs25_16ug) versus bras 1b (Pfs25_47ug) au J42, J182, J224 ; ce qui a été observé avec la même dose de Pfs25M associé à l'adjuvant Alhydrogel® au Mali en 2015 (Numéro du protocole USTTB, FMPOS: 2015/16/CE/FMPOS).

Nous avons constaté qu'il existait déjà une certaine réponse en anticorps IgG anti Pfs230 chez ces adultes exposés au paludisme à Sotuba. Bousema JT et al font la même observation chez les adultes exposés au paludisme en Tanzanie en 2007 [84]. La présence de la protéine Pfs230 est logique avec l'immunité anti-Pfs230 observée chez les populations exposées au paludisme, cela a d'ailleurs fait penser en anticipation qu'un vaccin à base de Pfs230 pourrait être naturellement boosté par l'infection palustre [85].

La plupart des sujets dans tous les bras recevant Pfs230D1M (bras 2a: faible dose de Pfs230D1M_13µg et bras 2b: forte dose de Pfs230D1M_40µg et bras 3a: faible dose de Pfs25M_16µg + faible dose de Pfs230D1M_13µg et bras 3b: une forte dose de Pfs25M_47µg + une forte dose de Pfs230D1M_40µg) ont bien répondu après les vaccinations.

La production d'anticorps était plus importante 14 jours après chacune des vaccinations et en réponse à tous les antigènes. Ce résultat est conforme à celui de Talat et al 2013 qui ont trouvé des résultats similaires chez les adultes naïfs aux USA [86].

Les réponses anticorps ont été similaires entre ceux qui ont reçu la faible dose (bras 2a) et la dose élevée (bras 2b) de Pfs230D1M jusqu'à la troisième vaccination à partir de laquelle la réponse anticorps IgG est plus forte chez les sujets ayant reçu la forte dose (40ug). Même résultat a été observé avec Pfs230 associé à l'adjuvant Alhydrogel® au Mali en 2015 (Numéro du protocole USTTB, FMPOS: 2015/16/CE/FMPOS).

Pour les combinaisons, des réponses anticorps anti-Pfs25_16ug étaient globalement supérieures à ceux observés chez les sujets ayant reçu la dose combinée (Pfs25_47ug+Pfs230_40ug) à partir du J182 jusqu'au J224.

Un résultat similaire a été obtenu en comparant la combinaison Pfs230_40ug+Pfs25_47ug versus Pfs230_40ug mais aussi la combinaison Pfs230_40ug+Pfs25_47ug versus Pfs230_13ug. Par contre pas de différences considérables entre les réponses IgG anti-Pfs25_47ug versus Pfs230_40ug+Pfs25_47ug.

Les taux moyens d'anticorps IgG anti-Pfs230 étaient plus élevés que ceux obtenus contre Pfs25 et à leur combinaison (Pfs25 + Pfs230). De même, les anticorps anti-Pfs230 persistaient plus que ceux contre Pfs25. Cette disparition rapide des anticorps anti-Pfs25 a été aussi observée par Sagara et al en 2013 à Bancoumana lors d'un essai de Pfs25 utilisant l'Alhydrogel comme adjuvant [87].

Tous ces observations pourraient en partie être dues au fait que Pfs230 est naturellement présent chez les personnes exposées à l'infection palustre et donc, est plus compétant pour intervenir dans l'immunité naturellement acquise et, la vaccination ici constituant simplement de booster

pour un phénomène naturel déjà présent chez l'hôte exposé. Ce constat est important et sera déterminant dans le plan de développement de ce type de vaccins.

VII. CONCLUSION

Les candidats vaccins bloquant la transmission du paludisme Pfs25M-EPA/AS01 et Pfs230D1M-EPA/AS01 et leur combinaison sont tous productrices d'anticorps mais **Pfs230_40ug est celui** qui génère la concentration la plus élevée d'anticorps persistante après la dernière vaccination. Et il a aussi le potentiel d'être exprimé au stade gametocytaire mais aussi au niveau des gamètes et le zygote chez l'anophèle.

VIII. RECOMMANDATION

Au terme de cette étude, nous formulons les recommandations suivantes:

- Faire plus d'essais clinique sur le candidat vaccin Pfs230D1M-EPA/AS01_40 µg et à une large échelle ;
- Renforcer les capacités des laboratoires clinique et d'immunologie du MRTC/DEAP pour le dosage des sous types d'immunoglobulines G ;

IX. RÉFÉRENCE

1. **World Health Organisation.** Comité d'expert du paludisme. Genève; 2000. Report No.: vingtième rapport.
2. **World Health Organization.** World malaria report 2014. Genève; 2014.
3. **World Health Organisation.** World malaria report 2018. Genève; 2018.
4. **DNS** (direction nationale de la santé). Annuaire statistique du système local d'information (SLIS) 2013. Mali; 2013.
5. **Ministère de la santé et de l'Hygiène Publique du Mali.** Système Local information Sanitaire 2017. 2017.
6. **Greenwood B.** Anti-malarial drugs and the prevention of malaria in the population of malaria endemic areas. *Malar J.* 13 Dec 2010; 9 (Suppl 3):S2.
7. **Murray CJL, Rosenfeld LC, Lim SS, Andrews KG, Foreman KJ, Haring D, et al.** Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet.* 4 Feb 2012; 379 (9814):413-31.
8. **Ouattara A, Mu J, Takala-Harrison S, Saye R, Sagara I, Dicko A, et al.** Lack of allele-specific efficacy of a bivalent AMA1 malaria vaccine. *Malar J.* 21 Jun 2010;9:175.
9. **Thera MA, Doumbo OK, Coulibaly D, Laurens MB, Kone AK, Guindo AB, et al.** Safety and immunogenicity of an AMA1 malaria vaccine in Malian children: results of a phase 1 randomized controlled trial. *PLoS ONE.* 4 Feb 2010; 5 (2):e9041.
10. **YS. CORDOLIANI, JL. SARRAZIN, A. FISCH, MR.** of cerebral malaria *AJNR* American journal of neuroradiology. *American journal of neuroradiology.* 1998;19(5):871-4.
11. **Spring MD, Cummings JF, Ockenhouse CF, Dutta S, Reidler R, Angov E, et al.** Phase 1/2a study of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen-1 (AMA-1) administered in adjuvant system AS01B or AS02A. *PLoS ONE.* 2009; 4 (4):e5254.
12. **Murphy SC, Breman JG.** Gaps in the Childhood Malaria Burden in Africa: Cerebral Malaria, Neurological Sequelae, Anemia, Respiratory Distress, Hypoglycemia, and Complications of Pregnancy [Internet]. American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 2001 [cité 23 Jul 2018]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2621/>
13. **World Health Organisation.** World malaria report 2015. Genève; 2015.
14. **Basco LK, Ruggeri C, Le Bras J.** Molécules antipaludiques : mécanismes d'action, mécanismes de résistance et relations structure-activité des schizontocides sanguins. 1994;

15. **Sicuri E, Vieta A, Lindner L, Constenla D, Sauboin C.** The economic costs of malaria in children in three sub-Saharan countries: Ghana, Tanzania and Kenya. *Malar J.* 3 Sep 2013; 12:307.
16. **White, N.J.** Plasmodium knowlesi : the fifth human malaria parasite. *ClinInfectDis.* 2008; 46:172-3.
17. **Kenmorgne D CB, Mbitsi A CN.** Plasmodic Indices and Loads parasites in blood donors in Brazaville CONGO. *Belge Med Trop.* 1993;73:179-87.
18. **Cent. hosp. Régional, spécialiste Hôpitaux, CIV, H D, M H.** Paludisme congenital. *Médecine tropicale.* 1992; 52 (2):175-8.
19. **Ta TH, Hisam S, Lanza M, Jiram AI, Ismail N, Rubio JM.** First case of a naturally acquired human infection with Plasmodium cynomolgi. *Malaria Journal.* 24 Feb 2014;13 (1):68.
20. **Fontenille,D.,et al.** Four years entomological study of the transmission of seasonal malaria in Senegal and the Bionomics of Anopheles gambiae and A.arabiensis. *Trans R Soc MedHyg.* 1997;91(6):647-52.
21. **Aida Sadikh Badiane.** Etude du polymorphisme genetique et l'immunité humorale induite par le candidat vaccin erythrocyte binding antigen-175(EBA-175) [These de Doctorat en Parasitologie]. [Senegal]: UCAD; 2013.
22. **Introduction to Medical Protozoology** [Internet]. [cité 25 Jul 2018]. Disponible sur: <http://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/INTRO.html>
23. **Liu W, Li Y, Shaw KS, Learn GH, Plenderleith LJ, Malenke JA, et al.** African origin of the malaria parasite Plasmodium vivax. *Nat Commun.* 2014; 5:3346.
24. **Sutherland CJ, Tanomsing N, Nolder D, Oguike M, Jennison C, Pukrittayakamee S, et al.** Two Nonrecombining Sympatric Forms of the Human Malaria Parasite Plasmodium ovale Occur Globally. *J Infect Dis.* 15 May 2010; 201(10):1544-50.
25. **Oguike MC, Betson M, Burke M, Nolder D, Stothard JR, Kleinschmidt I, et al.** Plasmodium ovale curtisi and Plasmodium ovale wallikeri circulate simultaneously in African communities. *Int J Parasitol.* May 2011; 41(6-10):677-83.
26. **Yamauchi LM, Coppi A, Snounou G, Sinnis P.** Plasmodium sporozoites trickle out of the injection site. *Cell Microbiol.* May 2007;9(5):1215-22.
27. **Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JC, Frevert U, Nussenzweig RS, et al.** Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. *Science.* 5 Jan 2001; 291(5501):141-4.

28. **Tavares J, Formaglio P, Thiberge S, Mordelet E, Van Rooijen N, Medvinsky A, et al.** Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. *J Exp Med.* 6 May 2013; 210(5):905-15.
29. **Berry, A., et al.** Imported Plasmodium Knowlesi malaria in a French tourist from Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 84(4):535-8.
30. **Gentilini M.** Le paludisme : une situation critique. *Médecine-science.* 1993;91-122.
31. **Barr, M M IA.** Antibody response to tetanus toxoid inoculation in malarious and nonmalarious Gambian children. *Trans R Soc MeHyg.* 1962; 56:364.
32. **Struik SS, Riley EM.** Does malaria suffer from lack of memory? *Immunol Rev.* Oct 2004; 201:268-90.
33. **Friedman MJ and al.** P.falciparum physiological interactions between malaria parasite and the sickle cell. *Exp.parasit.* 1979; 42:73.
34. **Pasvol G, Weatherall D, J. M. Wilson R.** Effects of fetal hemoglobin on susceptibility of red cells to Plasmodium falciparum. *Nature.* 1 Dec 1977; 270:171-3.
35. **Miller LH, Carter R.** A review. Innate resistance in malaria. *Exp Parasitol.* août 1976;40(1):132-46.
36. **Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH.** The resistance factor to Plasmodium vivax in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med.* 5 Aug 1976; 295(6):302-4.
37. **Pasvol, G. and R.J. Wilson.** The interaction of malaria parasites with red blood cells. *Br Med Bul.* 1982; 38(2):133-40.
38. **Niangaly A, Gunalan K, Ouattara A, Coulibaly D, Sá JM, Adams M, et al.** Plasmodium vivax Infections over 3 Years in Duffy Blood Group Negative Malians in Bandiagara, Mali. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 7 Sep 2017; 97 (3):744-52.
39. **Kumaratilake LM, Ferrante A, Jaeger T, Rzepczyk CM.** Effects of cytokines, complement, and antibody on the neutrophil respiratory burst and phagocytic response to Plasmodium falciparum merozoites. *Infect Immun.* Sep 1992; 60 (9):3731-8.
40. **Kumaratilake LM, Ferrante A.** Opsonization and Phagocytosis of Plasmodium falciparum Merozoites Measured by Flow Cytometry. *Clin Diagn Lab Immunol.* Jan 2000;7(1):9-13.
41. **Chapel H, Haeney M, Misbah S, Snowden N, Masson P.** Immunologie clinique : De la théorie à la pratique, avec cas cliniques. Bruxelles: De Boeck; 2004. 358 p.

42. **Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F.** Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27:669-92.
43. **Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of Plasmodium falciparum asexual blood stages.** *J Exp Med.* 1 Aug 1995; 182(2):409-18.
44. **Wu L, Liu Y-J.** Development of dendritic-cell lineages. *Immunity.* Jun 2007;26(6):741-50.
45. **Charles Arama.** Novel Immunization strategies and interethnic differences in response to malaria infection. . [Stocholm]: Stocholm University; 2012.
46. **Artavanis-Tsakonas K, Riley EM.** Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J Immunol.* 15 Sep 2002; 169(6):2956-63.
47. **Vasan S, Tsuji M. A double-edged sword:** the role of NKT cells in malaria and HIV infection and immunity. *Semin Immunol.* Apr 2010; 22(2):87-96.
48. **Bonneville M, O'Brien RL, Born WK.** Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol.* Jul 2010; 10(7):467-78.
49. **Costa G, Loizon S, Guenot M, Mocan I, Halary F, de Saint-Basile G, et al.** Control of Plasmodium falciparum erythrocytic cycle: $\gamma\delta$ T cells target the red blood cell-invasive merozoites. *Blood.* 22 Dec 2011;118(26):6952-62.
50. **Espinosa E, Chillet P.** Immunologie. Paris: Ellipses Marketing; 2010. 510 p.
51. **Adam C, Géniteau M, Gougerot-Pocidallo M, Verroust P, Lebras J, Gibert C, et al.** Cryoglobulins, circulating immune complexes, and complement activation in cerebral malaria. *Infect Immun.* Feb 1981; 31(2):530-5.
52. **Wenisch C, Spitzauer S, Florris-Linau K, Rumpold H, Vannaphan S, Parschalk B, et al.** Complement activation in severe Plasmodium falciparum malaria. *Clin Immunol Immunopathol.* Nov 1997; 85(2):166-71.
53. **Kaca W, Roth R.** Activation of complement by human hemoglobin and by mixtures of hemoglobin and bacterial endotoxin. *Biochim Biophys Acta.* 17 Aug 1995; 1245(1):49-56.
54. **Pawluczko AW, Lindorfer MA, Waitumbi JN, Taylor RP.** Hematin promotes complement alternative pathway-mediated deposition of C3 activation fragments on human erythrocytes: potential implications for the pathogenesis of anemia in malaria. *J Immunol.* 15 Oct 2007; 179(8):5543-52.
55. **Boldt ABW, Luty A, Grobusch MP, Dietz K, Dzeing A, Kombila M, et al.** Association of a new mannose-binding lectin variant with severe malaria in Gabonese children. *Genes Immun.* Jul 2006; 7 (5):393-400.

56. **Luty AJ, Kun JF, Kremsner PG.** Mannose-binding lectin plasma levels and gene polymorphisms in *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis.* Oct 1998; 178(4):1221-4.
57. **Chen N-J, Mirtsos C, Suh D, Lu Y-C, Lin W-J, McKerlie C, et al.** C5L2 is critical for the biological activities of the anaphylatoxins C5a and C3a. *Nature.* 8 Mar 2007; 446(7132):203-7.
58. **Celada A, Cruchaud A, Perrin LH.** Phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes by human polymorphonuclear leukocytes. *J Parasitol.* Feb 1983; 69(1):49-53.
59. **Sher A, Gazzinelli RT, Oswald IP, Clerici M, Kullberg M, Pearce EJ, et al.** Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. *Immunol Rev.* Jun 1992; 127:183-204.
60. **Troye-Blomberg M, Berzins K, Perlmann P.** T-cell control of immunity to the asexual blood stages of the malaria parasite. *Crit Rev Immunol.* 1994; 14(2):131-55.
61. **Kumaratilake LM, Ferrante A, Rzepczyk C.** The role of T lymphocytes in immunity to *Plasmodium falciparum*. Enhancement of neutrophil-mediated parasite killing by lymphotoxin and IFN-gamma: comparisons with tumor necrosis factor effects. *J Immunol.* 15 Jan 1991; 146(2):762-7.
62. **Troye-Blomberg M, Riley EM, Kabilan L, Holmberg M, Perlmann H, Andersson U, et al.** Production by activated human T cells of interleukin 4 but not interferon-gamma is associated with elevated levels of serum antibodies to activating malaria antigens. *Proc Natl Acad Sci USA.* Jul 1990; 87(14):5484-8.
63. **Perlmann P, Troye-Blomberg M.** Malaria and the immune system in humans. *Chem Immunol.* 2002; 80:229-42.
64. **Cohen S, McGREGOR IA, Carrington S.** Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature.* 25 Nov 1961; 192:733-7.
65. **Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI.** The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature.* 10 Mar 2005; 434(7030):214-7.
66. **Riley EM, Allen SJ, Wheeler JG, Blackman MJ, Bennett S, Takacs B, et al.** Naturally acquired cellular and humoral immune responses to the major merozoite surface antigen (PfMSP1) of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced malaria morbidity. *Parasite Immunol.* May 1992; 14(3):321-37.
67. **Groux H, Gysin J.** Opsonization as an effector mechanism in human protection against asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*: functional role of IgG subclasses. *Res Immunol.* Aug 1990;141(6):529-42.

68. **André Lin OUEDRAOGO.** Evaluation des facteurs influençant l'immunité bloquant la transmission du paludisme à *Plasmodium falciparum* en zone rurale du Burkina Faso [Doctorat]. [Burkina Faso]: Université de Ouagadougou; 2008.
69. **C. Boudin, D. Baudon, R. Devoucoux.** IMMUNOLOGIE DU PALUDISME: Les relations hôte-parasite dans l'infection paludéenne. 104 p.
70. **Labie D.** Les stratagèmes du *Plasmodium* pour se protéger dans l'organisme qu'il envahit. *ms.* 2005;21(8-9):700-2.
71. **Vanham G, Bisalinkumi E.** [Immunology of human *Plasmodium falciparum* malaria]. *Ann Soc Belg Med Trop.* Sep 1995;75(3):159-78.
72. **Initiative de lutte contre le paludisme,** publications de MVI, [En ligne], MVI, 2008, disponible sur <http://www.malariavaccine.org> - Recherche Google [Internet]. [Cité 2 Nov 2018].
73. **Kieny MP.** Vaccins contre le paludisme : état d'avancement. In *Médecine tropicale.* 2003; 63:245-6.
74. **Girard MP, Reed ZH, Friede M, Kieny MP.** A review of human vaccine research and development: malaria. *Vaccine.* 19 Feb 2007; 25(9):1567-80.
75. **Kwiatkowski D, Marsh K.** Development of a malaria vaccine. *Lancet.* 1997; 350:1696-701.
76. **Heppner DG, Cummings JF, Ockenhouse C, Kester KE, Lyon JA, Gordon DM.** New World monkey efficacy trials for malaria vaccine development: critical path or detour? *Trends Parasitol.* Sep 2001; 17(9):419-25.
77. **Stowers AW, Miller LH.** Are trials in New World monkeys on the critical path for blood-stage malaria vaccine development? *Trends Parasitol.* Sep 2001; 17(9):415-9.
78. **Goldenthal KL, Falk LA, Ball L, Geber A.** Prelicensure Evaluation of Combination Vaccines. *Clin Infect Dis.* 15 Dec 2001; 33(Supplement_4):S267-73.
79. **Didierlaurent AM, Laupèze B, Pasquale AD, Hergli N, Collignon C, Garçon N.** Adjuvant system AS01: helping to overcome the challenges of modern vaccines. *Expert Review of Vaccines.* 2 Jan 2017; 16(1):55-63.
80. **Vogel FR, Powell MF.** A compendium of vaccine adjuvants and excipients. *Pharm Biotechnol.* 1995; 6:141-228.
81. **Ragupathi G, Gardner JR, Livingston PO, Gin DY.** Natural and synthetic saponin adjuvant QS-21 for vaccines against cancer. *Expert Review of Vaccines.* 1 Apr 2011; 10(4):463-70.

82. **Kubler-Kielb J, Majadly F, Wu Y, Narum DL, Guo C, Miller LH, et al.** Long-lasting and transmission-blocking activity of antibodies to Plasmodium falciparum elicited in mice by protein conjugates of Pfs25. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2 Jan 2007; 104(1):293-8.
83. **Wu Y, Przysiecki C, Flanagan E, Bello-Irizarry SN, Ionescu R, Muratova O, et al.** Sustained high-titer antibody responses induced by conjugating a malarial vaccine candidate to outer-membrane protein complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 28 Nov 2006; 103(48):18243-8.
84. **Bousema JT, Drakeley CJ, Kihonda J, Hendriks JCM, Akim NIJ, Roeffen W, et al.** A longitudinal study of immune responses to Plasmodium falciparum sexual stage antigens in Tanzanian adults. *Parasite Immunol*. Jun 2007; 29(6):309-17.
85. **Farrance CE, Rhee A, Jones RM, Musiychuk K, Shamloul M, Sharma S, et al.** A Plant-Produced Pfs230 Vaccine Candidate Blocks Transmission of Plasmodium falciparum ∇ . *Clin Vaccine Immunol*. Aug 2011;18(8):1351-7.
86. **Talaat KR, Ellis RD, Hurd J, Hentrich A, Gabriel E, Hynes NA, et al.** Safety and Immunogenicity of Pfs25-EPA/Alhydrogel[®], a Transmission Blocking Vaccine against Plasmodium falciparum: An Open Label Study in Malaria Naïve Adults. *PLoS ONE*. 2016; 11(10):e0163144.
87. **Sagara I, Healy SA, Assadou MH, Gabriel EE, Kone M, Sissoko K, et al.** Safety and immunogenicity of Pfs25H-EPA/Alhydrogel, a transmission-blocking vaccine against Plasmodium falciparum: a randomised, double-blind, comparator-controlled, dose-escalation study in healthy Malian adults. *Lancet Infect Dis*. Sep 2018;18(9):969-82.
88. **OMS Genève 1994.** Techniques de base pour le diagnostic biologique du paludisme. Partie I. Guide du stagiaire. ISBN 92 4254430 2 (Classification NLM. WC).

X. FICHE SIGNALÉTIQUE

Nom: OUATTARA

Prénom : ADAMA

Nationalité: Malienne

Date de soutenance: 03 Juillet 2019

Ville de soutenance: Bamako

Email : a.ouattarapharma@gmail.com

Titre: Étude comparative des réponses anticorps IgG des différentes visites de l'essai vaccinal Pfs230D1M-EPA/AS01 et Pfs25M-EPA/AS01 chez les volontaires adultes à Sotuba au Mali.

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la Faculté de Pharmacie (FAPH).

Secteur d'intérêt: Parasitologie, Vaccinologie et Santé publique.

Mots clés: Immunogénicité, Pfs25M, Pfs230D1M, EPA, IgG

Innocuité : Qualité, caractère d'une chose qui n'est pas nuisible.

Immunogénicité : Capacité d'un antigène à induire une réponse immunitaire bien spécifique.

Pfs25M : Antigène de stade sexué de *Plasmodium falciparum*, se trouvant à la surface du zygote et de l'ookinète et pesant 25 kilo dalton (kDA).

Pfs230D1M : Protéine de *P. falciparum*, exprimé au stade sexué du parasite au niveau du gamécyte et du gamète pesant environ 230kDA.

EPA : Exo-protéine A, est une protéine mutante et détoxifiée de *Pseudomonas aeruginosa*.

IgG : Immunoglobuline G, réponse spécifique à un antigène.

RESUME

Un vaccin pouvant interrompre la transmission du paludisme est un outil valable attendu dans la lutte et le contrôle du paludisme. Des candidats vaccins antipaludiques sont en cours d'essai et les résultats sont fort encourageants, cependant, aucun vaccin efficace n'est encore disponible contre le paludisme.

Nous avons évalué deux candidats vaccins antipaludiques en administration seul et en combinaison, Pfs25M et Pfs230D1M associé à l'adjuvant AS01 dans un essai clinique randomisé ouvert avec groupe témoin, chez 65 volontaires, adultes de 18 à 50 ans à Sotuba, entre Janvier 2017 et Décembre 2017. ENGERIXB® vaccin contre l'hépatite B a été utilisé comme vaccin comparateur. Les volontaires éligibles devaient être négatifs au HIV, HCV, à l'AgHBs et au test beta HCG (test de grossesse pour les femmes). Trois séries de vaccination ont été effectuées de façon échelonnée suivant le calendrier J0, J28 et J168. Les participants

étaient suivis cliniquement et/ou biologiquement à J1, J3, J7, J14 et J28 après chaque vaccination puis une fois par mois et cela jusqu'à 6 mois après la dernière vaccination.

Pfs25_16ug était plus immunogène que Pfs25_47ug à partir de la troisième vaccination jusqu'au J224. Par contre Pfs230_40ug était plus immunogène que Pfs230_13ug et aussi plus que la combinaison Pfs230_40ug+Pfs25_47ug à partir de la troisième vaccination jusqu'au J224.

Il ressort dans cette étude que le candidat vaccin antipaludique Pfs230D1M-EPA/AS01 à 40ug possède une meilleure immunogénicité. La poursuite du développement clinique de ce candidat vaccin réserve un grand espoir dans la recherche de vaccin antipaludique.

Identity Sheet

Name: OUATTARA

First name: ADAMA

Nationality: Malian

Defense date: 03 July 2019

City of defense: Bamako

Email: a.ouattarapharma@gmail.com

Title: Comparative Study of IgG Antibody Responses of Various Visits of the Pfs230D1M-EPA / AS01 and Pfs25M-EPA / AS01 Vaccine Trials in Adult Volunteers in Sotuba, Mali.

Place of deposit: Library of the Faculty of Pharmacy (FAPH).

Focus Area: Parasitology, Vaccinology and Public Health.

Key words: Immunogenicity, Pfs25M, Pfs230D1M, EPA, IgG

Safety: Quality, character of a thing that is not harmful.

Immunogenicity: Ability of an antigen to elicit a specific immune response.

Pfs25M: Sexual antigen of Plasmodium Falciparum, found on the surface of zygote and ookinete and weighing 25 kilo dalton (kDA).

Pfs230D1M: Parasite protein, which is expressed during sexual development in human host weighing about 230kDA.

EPA: Exo-protein A, is a mutant and detoxified protein of Pseudomonas aeruginosa.

IgG: Immunoglobulin G, specific antigen response.

Abstract

A vaccine that can interrupt the transmission of malaria is a valuable tool expected in the fight against and control of malaria. Malaria vaccine candidates are being tested and the results are very encouraging, however no effective vaccine is yet available against malaria.

We evaluated two malaria vaccine candidates alone and in combination, Pfs25M and AS01 adjuvanted Pfs230D1M in a randomized open-label clinical trial, in 65 volunteers, adults aged 18-50 in Sotuba, between January 2017 and December 2017. ENGERIXB® vaccine against hepatitis B vaccine has been used as comparator vaccine. Eligible volunteers should be HIV, HCV, HBsAg and HCG beta (pregnancy test for women) negative. Three series of vaccination were carried out in a staggered manner according to the calendar D0, D28 and D168. The participants were followed clinically and / or biologically on D1, D3, D7, D14 and D28 after each vaccination and then once a month until 6 months after the last vaccination.

There was not enough difference in antibody responses against Pfs25 between arm 1a (low dose) versus arm 1b (high dose), or between those who received the combination arm 3b versus arm 1b. Most subjects in all arms receiving Pfs230D1M (arm 2a: low dose of Pfs230D1M_13µg

and arm 2b: high dose of Pfs230D1M, 40µg and arm 3a: low dose of Pfs25M, 16µg and low dose of Pfs230D1M_13µg and arm 3b: a high dose Pfs25M, 47µg and a high dose of Pfs230D1M_40µg) responded after vaccination. Antibody responses were similar between those who received the low dose (arm 2a) and the high dose (arm 2b) of Pfs230D1M alone but more marked at high dose.

Even during the peak of transmission the high dose Pgs230_40ug IgG antibody titers were better than those of Pfs25 at different doses and in combination.

This study shows that the 40ug malaria vaccine candidate Pfs230D1M-EPA / AS01 has good immunogenicity. The continued clinical development of this vaccine candidate holds great hope in the search for malaria vaccine.

XI. ANNEXES

Protocole mode opératoire du test ELISA

❖ Principe

C'est une technique immuno-enzymatique qui permet le dosage des anticorps. La technique consiste à doser l'anticorps contenu dans le sérum du patient.

Il consiste à fixer sur un support solide les antigènes de *P. falciparum* sur lequel les anticorps contenus dans le sérum ou plasma se fixent. Ces anticorps sont ensuite détectés à l'aide d'un second anticorps marqué par une enzyme. Le complexe antigène-anticorps-anticorps conjugué à l'enzyme sera révélé par addition d'un substrat spécifique.

❖ Matériels

Incubateurs ;

Réfrigérateurs ;

Plaque de microtitration (Immulon ® 2HB et 4 HBX);

Pipettes multicanaux (Université Pipette Service), 5-50µl et 50-300µl ;

Pipettes électrique ;

Pipettes sérologique ;

Embouts pour pipette ;

Tubes eppendorf ;

Tube Falcon de 15 et 50 ml

Papier hygiénique ;

Gants ;

Paraffine film ;

Plate scellé ;

Papier aluminium ;

Bassine ;

Un laveur de microplaques (Biotek) ;

Lecteur de microplaques (Spectra Max M3) ;

Le logiciel Soft Max pro7Software ;

Balance ;

Poubelles.

❖ Réactifs

Carbonate de Sodium-Anhydrous, Lot. No: SLBS5287;

Bicarbonate de Sodium- Anhydrous, Lot. No: SLBR3244V;

Eau désionisée fabriquée au laboratoire du DEAP ;

Eau distiller: Ultra-pure Water-Advanced Biotechnologies, Inc.; Cat# 118- 162-131;
Lot#721978

Le lait: Difco TM Skim Milk, Lot. No: 7114758;

TRIS Buffered saline (TBS) 10X, Biofluids, Cat# 351-086-131.; Lot#721985

Comprimés de Phosphatase substrate: Sigma 104 Phosphatases substrate 5mg
tablets.Lot.No :SLBBS3281V,

Tween-20 (Polyoxyethylene sorbitan Monolaurate), Sigma, Lot. No : SLBK8990V,

Antigènes de sensibilisation : (Coating Antigens.)

Anticorps standard pour les deux antigènes :

Anti-Pfs230, Anticorps de chèvre anti-IgG humaine couplé à une phosphatase alcaline,
Cat#No : 5220-0303

Anti-Pfs25, Anticorps de chèvre anti-IgG humaine couplé à une phosphatase alcaline, Cat#No :
Bovine Serum Albumin, Lot#SLBQ3713V

Préparation des solutions tampons

- Tampon carbonate (coating buffer 10X)

Purified water-----100ml

(Na) 2 CO3----- 15, 47 g

NaHCO3 -----29, 4 g

Q.S.P -----100 ml

NB : Pour préparer une solution de 1X à partir de la solution de 10X, mélanger 100 ml de la solution 10x avec 900 ml d'eau distillée.

Cette solution peut être utilisée jusqu'à une année.

- Solution de lavage (Wash Buffer.): 10X Tween-TBS.

TBS, 10X -----1000ml

Tween-20 -----10g

QSP -----1000 ml

L'ensemble est soumis à une agitation magnétique au moins 20 minutes à la température du laboratoire avant utilisation. Cette solution peut être utilisée jusqu'à un mois.

- Solution de blocage (Blocking Buffer: 5% Milk in TBS.)

Skim Milk Powder -----50g

TBS, 10X----- 1000 ml

QSP-----1000 ml

NB: L'ensemble est soumis à une agitation magnétique au moins 20 minutes à la température du laboratoire et gardé à 4 degré avant utilisation.

Cette solution peut être utilisée jusqu'à une semaine.

- Substrat (Révélateur.)

Pour préparer une solution de 10 ml de substrat :

Dissoudre 2 comprimés de Phosphatase alcaline 5mg dans 10 ml de tampon carbonate (Coating buffer) et garder à l'obscurité.

- Dilution du Standart

BSA-----10ml

Standard solution 1/100-----100 µl

Distribuer 1 ml du standart 1/100 dans les puits A, B, C.

Distribuer 500 µl de BSA dans les puits de 2 à 10 et prendre 500 µl dans les puits A, B, C et le mettre dans les second puit et ainsi de suite.

Mode opératoire

I. Sensibiliser (Coating) les plaques avec l'antigène.

1) Etiqueter (Labeler) le nombre de plaque dont vous avez besoin : Mettre le nom du type d'antigène et la date sur chaque plaque.

2) Chaque plaque requiert 10ml de solution coating ; déterminer le volume total de la solution de coating dont on a besoin pour pouvoir sensibiliser le nombre de plaques utilisées. 3) Diluer l'antigène 2µl dans la solution 10ml de 1X coating buffer, mélanger cette solution.

4) A partir de la pipette multichannel mettre 100µl de la solution dans chaque puits de chaque plaque. Couvrir les plaques avec une fine membrane plastique.

Incuber les plaques à 4 degrés pendant au moins une nuit.

NB: Ces plaques peuvent être conservées à un maximum de 7 jours.

II. Blocage des plaques

Laver les plaques à la machine Biotek et tapoter sur un chiffon propre.

Avec une pipette multichannel répartir dans chaque puits de chaque plaque 300-340 µl de la solution de blocage pour bloquer les espaces vides et placer les plaques à l'incubation à la température ambiante dans une chambre humide pendant 2 h ± 15min.

III. Premier anticorps (sérum)

1) Diluer le sérum à la concentration désirée dans la solution de blocage ainsi que le standard

- **Sample dilution**

- 1/50 → 8 µl sérum (Echantillon) + 392 µl Milk

- 1/500 → 40 µl de dilution 1/50 + 360 µl Milk

➤ **Standart dilution**

-1/100 → 10 ml BSA + 100 µl standart

2) Laver les plaques à la machine Biotek avec du 0.1% Tween –TBS 300-340 µl à 4 fois, laisser la solution de lavage agir pendant 30 second et tapoter sur un chiffon propre.

3) Repartir 100µl par puits du premier anticorps (sérum dilué à tester) en « triplicate » à l'aide d'une pipette multichannel.

Dans les deux dernières rangées H et G, mettre la solution du standard, incuber les plaques pendant 2 heures dans une chambre humide.

IV. Second anticorps

Dilution: 10 ml Milk +5 µl anticorps (1mg/ml) pour une plaque

1) Laver les plaques à la machine Biotek avec du 0.1% Tween –TBS 300-340 µl à 4 fois, laisser la solution de lavage agir pendant 30 second pour enlever les anticorps non liés et tapoter sur un chiffon propre.

2) Mettre dans chaque puits 100 µl du second anticorps (anticorps conjugué) dilué à 1 mg/ml dans la solution de blocage. Incuber pendant 2 heures dans la chambre humide à la température ambiante.

V. Substrat

Dilution : 2 comprimés + 10 ml Coating Buffer (1x) pour une plaque

1) Laver les plaques à la machine (programmée à 4 lavages) pour éliminer les excès.

Vérifier que la plaque est propre (surface de la plaque en bas et en haut)

2) A partir d'une pipette multichannel, mettre 100 µl de substrat dans chaque puits de chaque plaque.

Incuber pendant 20 min à la température ambiante en couvrant la plaque avec de l'aluminium.

VII. Lecture

Faire la lecture immédiatement après 20 min à l'aide d'un spectrophotomètre (SPETRAMAX M3) relié à un ordinateur à la longueur d'onde $\lambda_1 = 450$ et $\lambda_2 = 650$, et utiliser le programme SoftMax RAW data.

Les valeurs de densité optique sont utilisées pour déterminer les taux d'anticorps par comparaison à une courbe standard générée à partir d'un plasma positif témoin connu inclus sur chaque plaque ELISA.

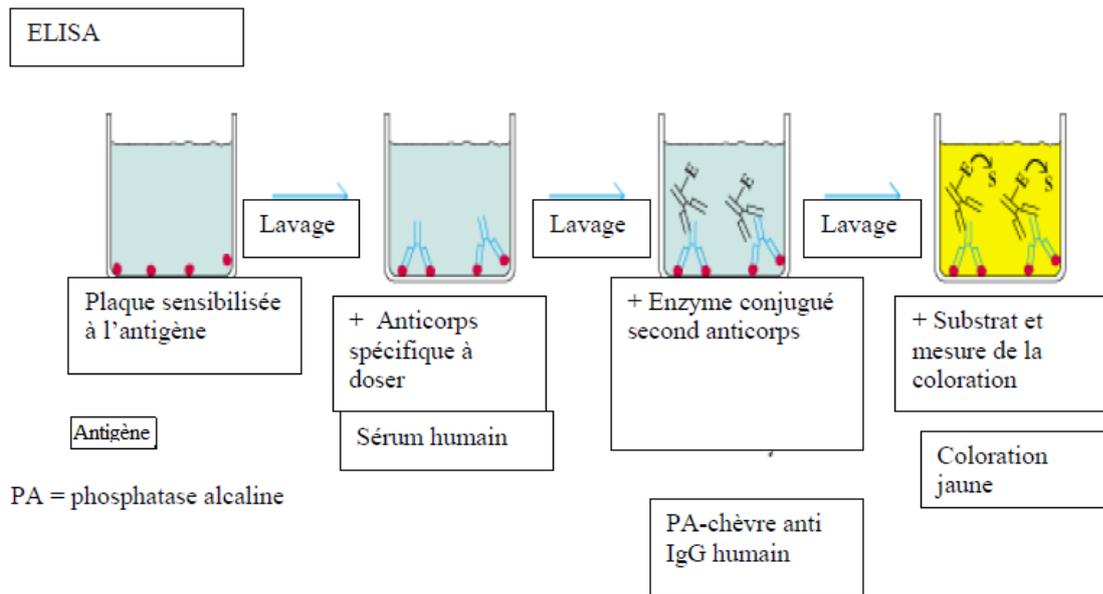


Figure 15: les différentes étapes d'ELISA

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maitres 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 consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels,

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

Que je sois couvert d'opprobres et méprisé de mes confrères si j'y manque !

Je le jure !