

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique

République du Mali
Un Peuple- Un But- Une Foi



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



U.S.T.T-B

Année universitaire 2023-2024



N° :

Titre de la Thèse

**Influence des facteurs sériques humains sur l'activité
inhibitrice de la multiplication de *Plasmodium
falciparum* de la DHA *In Vitro***

Présentée et soutenue publiquement le 21/11/2024 devant la Faculté de Pharmacie

Par M. Issa TRAORE

Pour l'obtention du titre de Docteur en Pharmacie

(Diplôme d'Etat)

Jury

Président :	M. Laurent DEMBELE	Maître de conférences
Membres :	M. Souleymane DAMA	Maître de conférences
	M. Ousmane DEMBELE	Maître de conférences
Directeur :	M. Seidina AS DIAKITE	Maître de conférences



FACULTE DE PHARMACIE



U.S.T.T-B

LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE UNIVERSITE 2023-2024

ADMINISTRATION

Doyen : Sékou BAH, Professeur

Vice-doyen : Souleymane DAMA, Maître de Conférences

Secrétaire principal : Seydou COULIBALY, Administrateur Civil

Agent comptable : Ismaël CISSE Contrôleur des Finances.

PROFESSEURS HONORAIRES

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Flabou	BOUGOUDOGO	Bactériologie-Virologie
2	Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
3	Bakary Mamadou	CISSE	Biochimie
4	Abdoulaye	DABO	Malacologie-Biologie animale
5	Yaya	COULIBALY	Législation
6	Daouda	DIALLO	Chimie Générale et Minérale
7	Mouctar	DIALLO	Parasitologie-Mycologie
8	Souleymane	DIALLO	Bactériologie- Virologie
9	Kaourou	DOUCOURE	Physiologie Humaine
10	Ousmane	DOUMBIA	Chimie thérapeutique
11	Boukassoum	HAÏADARA	Législation
12	Gaoussou	KANOUTE	Chimie analytique
13	Alou A.	KEÏTA	Galénique
14	Ousmane	KOÏTA	Biologie moléculaire
15	Mamadou	KONE	Physiologie
16	Brehima	KOUMARE	Bactériologie- Virologie
17	Abdourahamane S.	MAÏGA	Parasitologie
18	Saïbou	MAÏGA	Législation
19	Mahamadou	TRAORE	Génétique
20	Sékou Fantamady	TRAORE	Zoologie

PROFESSEURS DECEDES

N°	PRENOMS	NOMS	SPECIALITE
1	Mahamadou	CISSE	Biologie
2	Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
3	Moussa	HARAMA	Chimie analytique
4	Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
5	Elimane	MARIKO	Pharmacologie
6	Moussa	SANOGO	Gestion pharmaceutique

DER : SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES

1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	GRADE	SPECIALITE
1	Mounirou	BABY	Professeur	Hématologie
2	Mahamadou	DIAKITE	Professeur	Immunologie-Génétique
3	Alassane	DICKO	Professeur	Santé Publique
4	Abdoulaye	DJIMDE	Professeur	Parasitologie-Mycologie
5	Amagana	DOLO	Professeur	Parasitologie-Mycologie
6	Aldjouma	GUINDO	Professeur	Hématologie. Chef de DER
7	Akory Ag	IKNANE	Professeur	Santé Publique/Nutrition
8	Kassoum	KAYENTAO	Directeur de recherche	Santé publ./ Bio-statistique
9	Ousmane	KOITA	Professeur	Biologie-Moléculaire
10	Issaka	SAGARA	Directeur de recherche	Bio-statistique
11	Boubacar	TRAORE	Professeur	Parasitologie-Mycologie

2. MAITRE DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	GRADE	SPECIALITE
1	Djibril Mamadou	COULIBALY	Maître de conférences	Biochimie clinique
2	Djénéba Coumba	DABITAO	Maître de conférences	Biologie-moléculaire
3	Souleymane	DAMA	Maître de conférences	Parasitologie - Mycologie
4	Antoine	DARA	Maître de conférences	Biologie-moléculaire
5	Laurent	DEMBELE	Maître de conférences	Biotechnologie- Microbienne
6	Seydina S. A.	DIAKITE	Maître de conférences	Immunologie
7	Fatou	DIAWARA	Maître de conférences	Epidémiologie
8	Ibrahima	GUINDO	Maître de conférences	Bactériologie Virologie
9	Bourèma	KOURIBA	Maître de conférences	Immunologie
10	Almoustapha Issiaka	MAÏGA	Maître de recherche	Bactériologie-Virologie
11	Amadou Birama	NIANGALY	Maître de conférences	Parasitologie – Mycologie
12	Fanta	SANGO	Maître de conférences	Santé publ/Santé commun.
13	Yéya dit Sadio	SARRO	Maître de conférences	Epidémiologie
14	Mahamadou S.	SISSOKO	Maître de recherche	Bio-statistique

3. MAITRE ASSISTANT/CHARGE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	GRADE	SPECIALITE
1	Mohamed	AG BARAIKA	Maître-Assistant	Bactériologie-Virologie
2	Charles	ARAMA	Maître-Assistant	Immunologie
3	Boubacar Tiétiè	BISSAN	Maître-Assistant	Biologie clinique
4	Seydou Sassou	COULIBALY	Maître-Assistant	Biochimie Clinique
5	Klétigui Casimir	DEMBELE	Maître-Assistant	Biochimie Clinique
6	Yaya	GOITA	Maître-Assistant	Biochimie Clinique
7	Aminatou	KONE	Maître-Assistant	Biologie moléculaire
8	Birama Apho	LY	Maître-Assistant	Santé publique
9	Dinkorma	OUOLOGUE M	Maître-Assistant	Biologie Cellulaire

4. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	GRADE	SPECIALITE
1	Cheick Amadou	COULIBALY	Attaché de Recherche	Entomologie/parasitologie
2	Michel Emmanuel	COULIBALY	Attaché de Recherche	Entomologie/parasitologie

3	Abdallah Amadou	DIALLO	Attaché de Recherche	Entomologie/parasitologie
4	Bakary	FOFANA	Attaché de Recherche	Recherche clinique
5	Merepen dit Agnès	GUINDO	Assistant	Immunologie
6	Falaye	KEÏTA	Attaché de Recherche	Santé publ./Santé Environn.
7	N'Deyelallah Nina	KOITA	Assistant	Nutrition
8	Oumou	NIARE	Attaché de Recherche	Biologie appliquée
9	Lamine	SOUMAORO	Attaché de Recherche	Entomologie/parasitologie
10	Aliou	TRAORE	Attaché de Recherche	Sciences biologiques appliqué.
11	Djakaridia	TRAORE	Assistant	Hématologie

DER : SCIENCES PHARMACEUTIQUE

1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Rokia	SANOGO	Professeur	Pharmacognosie Chef de DER

2. MAITRE DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Loséni	BENGALY	Maitre de Conférences	Pharmacie hospitalière
2	Mahamane	HAIDARA	Maitre de Conférences	Pharmacognosie

3. MAITRE ASSISTANT/CHARGE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Bakary Moussa	CISSE	Maitre-Assistant	Galénique
2	Issa	COULIBALY	Maitre-Assistant	Gestion
3	Balla Fatogoma	COULIBALY	Maitre-Assistant	Pharmacie hospitalière
4	Adama	DENOU	Maitre-Assistant	Pharmacognosie
5	Hamma Boubacar	MAÏGA	Maitre-Assistant	Galénique
6	Adiaratou	TOGOLA	Maitre-Assistant	Pharmacognosie
7	Aminata Tiéba	TRAORE	Assistant	Pharmacie hospitalière

4. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Seydou Lahaye	COULIBALY	Assistant	Gestion pharmaceutique
2	Daouda Lassine	DEMBELE	Assistant	Pharmacognosie
3	Sékou	DOUMBIA	Assistant	Pharmacognosie
4	Assitan	KALOGA	Assistant	Législation
5	Ahmed	MAÏGA	Assistant	Législation
6	Aichata Ben Adam	MARIKO	Assistant	Galénique
7	Aboubacar	SANGHO	Assistant	Législation
8	Bourama	TRAORE	Assistant	Législation
9	Sylvestre	TRAORÉ	Assistant	Gestion pharmaceutique
10	Mohamed dit Sarmoye	TRAORE	Assistant	Pharmacie hospitalière

DER : SCIENCES DU MEDICAMENT

1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Sékou	BAH	Professeur	Pharmacologie
2	Benoit Yaranga	KOUMARE	Professeur	Chimie Analytique
3	Ababacar I.	MAÏGA	Professeur	Toxicologie

2. MAITRE DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Tidiane	DIALLO	Maitre de Conférences	Toxicologie
2	Hamadoun Abba	TOURE	Maitre de Conférences	Bromatologie Chef de DER

3. MAITRE ASSISTANT/CHARGE DE RECHERCHE

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

1	Dominique Patomo	ARAMA	Maitre-Assistant	Pharmacie chimique
2	Mody	CISSE	Maitre-Assistant	Chimie thérapeutique
3	Ousmane	DEMBELE	Maitre-Assistant	Chimie thérapeutique
4	Madani	MARIKO	Maitre-Assistant	Chimie Analytique
5	Karim	TRAORE	Maître-Assistant	Pharmacologie

4. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Mahamadou	BALLO	Assistant	Pharmacologie
2	Dalaye Bernadette	COULIBALY	Assistant	Chimie analytique
3	Blaise	DACKOUO	Assistant	Chimie Analytique
4	Fatoumata	DAOU	Assistant	Pharmacologie
5	Abdourahamane	DIARA	Assistant	Toxicologie
6	Aiguerou dit Abdoulaye	GUINDO	Assistant	Pharmacologie
7	Mohamed El Béchir	NACO	Assistant	Chimie analytique
8	Mahamadou	TANDIA	Assistant	Chimie Analytique

DER : SCIENCES FONDAMENTALES

1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
-	-	-	-	-

2. MAITRE DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIAUTE
1	Lassana	DOUMBIA	Maitre de Conférences	Chimie appliquée
2	Abdoulaye	KANTE	Maitre de Conférences	Anatomie
3	Boubacar	YALCOUYE	Maitre de Conférences	Chimie organique

3. MAITRE ASSISTANT/CHARGE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Mamadou Lamine	DIARRA	Maitre-Assistant	Botanique-Biol. Végét Chef de DER
2	Joseph Sékou B.	DEMBELE	Maitre-Assistant	Biologie végétale
3	Boureima	KELLY	Maître-Assistant	Physiologie médicale

4. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE

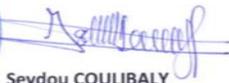
N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Seydou Simbo	DIAKITE	Assistant	Chimie organique
2	Modibo	DIALLO	Assistant	Génétique
3	Moussa	KONE	Assistant	Chimie Organique
4	Massiriba	KONE	Assistant	Biologie Entomologie

CHARGES DE COURS (VACATAIRES)

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Cheick Oumar	BAGAYOKO	Informatique
2	Babou	BAH	Anatomie
3	Souleymane	COULIBALY	Psychologie
4	Yacouba M	COULIBALY	Droit commercial
5	Moussa I	DIARRA	Biophysique
6	Mahamoudou	KONE	Droit et éthique
7	Modibo	SANGARE	Anglais
8	Satigui	SIDIBÉ	Pharmacie vétérinaire
9	Sidi Boula	SISSOKO	Histologie-embryologie
10	Fana	TANGARA	Mathématiques
10	Djénébou	TRAORE	Sémiologie et Pathologie médicale
12	Oumar	SAMASSEKOU	Génétique

11	Boubacar	ZIBEÏROU	Physique
----	----------	----------	----------

Bamako, le 27 mai 2024


P/Le Doyen PO
Le Secrétaire Principal

Seydou COULIBALY
Administrateur Civil

Dédicaces

Ce travail est humblement dédié à mes parents

À mon père Adama TRAORE

Cher père, tu as fait de notre éducation et de notre instruction ta priorité absolue. Tu restes un modèle pour ta rigueur, ta droiture et ton sens élevé de responsabilité. Ce travail est l'un des moyens pour nous de t'exprimer notre fierté de t'avoir comme père mais aussi de te remercier pour l'accompagnement ainsi que les innombrables sacrifices consentis pour moi. Ce travail est le fruit de tes encouragements et tes prières.

Puisse le tout puissant, le miséricordieux dans sa bonté infinie t'accorder une longévité et une santé à tout épreuve, Amine !

A ma mère, Alima THIAMA

Si une mère est censée protéger ses enfants, alors nous ne pouvons que nous réjouir de t'avoir comme mère, nous te sommes redevables pour tous les sacrifices dans le but de protéger tes enfants que nous sommes. Ta présence constante, ta bravoure, tes soutiens et bénédictions indéfectibles font de toi une mère exceptionnelle. Merci.

Qu'Allah te donne une longue vie et te récompense de la plus belle des manières, Amine !

Remerciements

Alhamdoulilah ! je remercie Allah pour tous ses bien faits sur moi et notre famille, et je formule le salut sur notre prophète Mohamed que la paix d'Allah soit sur lui et sa famille, Amine !

À mes mamans, Alima THIAMA, Sitan COULIBALY, Bintou DIARRA, Fatoumata DEMBELE.

Merci pour les bénédictions et les soutiens, qu'Allah vous récompense.

À mes frères et sœurs, Bakary TRAORE, Bèmè TRAORE, Mahamadou TRAORE, Sékou TRAORE, Souleymane TRAORE, Lassinè TRAORE, Bakoroba TRAORE, Seydou TRAORE, Adam TRAORE, Kadidia TRAORE, Fatoumata TRAORE, Mamou TRAORE, Djeneba TRAORE.

Pour la fraternité et l'accompagnement que vous avez témoigné, qu'Allah perdure ce lien.

À mes Tantes, Mamou TRAORE, Djénéba TRAORE, Aoua TRAORE, Assan THIAMA, Fana THIAMA, Sali THIAMA, Aoua THIAMA

Merci pour les bénédictions et les soutiens, qu'Allah vous récompense.

À mes tontons et oncles, Sidi TRAORE, Mahamadou TRAORE, Mohamed TRAORE, Adama THIAMA, Amidou THIAMA

Merci pour vos conseils, vos enseignements et l'éducation reçue, qu'Allah vous récompense.

À la famille SACKO, DEMBELE, SISSOUMA,

Vous m'avez accepté à bras ouverts et pris comme un fils, avec vous je me suis senti comme faisant un membre à part entière de votre famille. Merci pour tout le soutien.

Au professeur Mahamadou DIAKITE

Cher maître, je saisis cette opportunité pour vous témoigner ma profonde gratitude pour l'accueil que m'avez fait, merci cher maître pour votre humilité, votre disponibilité, votre simplicité et vos encouragements. Qu'Allah vous bénisse et vous accorde longévité et santé, Amine !

Au professeur Abdoulaye DJIMDE

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

Aux Docteurs Saidou BALAM, Karim TRAORE, Drissa KONATE, Abdouramane TRAORE, Salimata KANTE, Fanta SOGORE, Fatoumata Ousmane MAIGA,

Pour votre soutien, disponibilité et accompagnement durant ce travail. Que Dieu vous accompagne dans tout ce que vous faites et vous donne une longue vie.

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

À mes cousins et Amis

Souleymane BOIRE, Bourama DEMBELE, Issouf COULIBALY, Karim TRAORE, Abou COULIBALY, Fah COULIBALY, Dr Souleymane CISSOUMA, Mahamadou COULIBALY, Diakaridia TRAORE, Adama TIMBINE, Dr Oumar T CAMARA, Dr Aboubacar DEMBELE, Cherif DIALLO, Dr Hamidou DIEPKILE, Nouhoum BA, Dr Issouf DOUMBIA, Dr Mohamed KAMAFORO, Dr Seydou Zié SANOGO, Rokiatou Te DIAKITE, Mme Konaté Wassa F DIARRA, Dagati TOGO et tous ceux dont les noms ne figurent pas ici.

A tout le personnel de la pharmacie LOTHIOZAN

Principalement au Promoteur Dr Bakary SISSOUMA, cher tonton, merci de m'avoir accepté au sein de votre entreprise, soutenu et facilité l'apprentissage tout au long de mon parcours

À l'équipe de l'Unité d'Immunogénétique et d'Hémoglobinopathie de l'ICER-Mali et Molecular Epidemiologie and Drug Resistance (MEDRU)

Pr Seidina A.S. DIAKITE, Pr Sory I DIAWARA, Dr Agnès M. GUINDO, Dr Karim TRAORE, Dr Bourama KEITA, Dr Bourama TRAORE, Dr Fatoumata KASSE, Dr Job KONE, Dr.Fanta SOGORE, Dr Mohamedou KATHRY, Dr Abdourahmane CISSE, Dr Larissa DENOUE, Dr Fatoumata Ousmane MAIGA, Dr Karamoko TANGARA, Dr Dramane SOGODOGO, Dr Mathias KAMATE, Dr Rouhoulahi BAH, Dr Rahmatoullah YENA, Dr Korotoumou MALLE, Dr Sohoye TOURE, Dr Abdoul SAMAKE, Dr Djeneba DIALLO, vos conseils et vos encouragements nous ont été d'une grande utilité. Merci pour vos apports et votre disponibilité. Je vous en suis très reconnaissant.

À mes Collègues de l'Unité d'Immunogénétique et Hémoglobinopathie de l'ICER-Mali, et Molecular Epidemiologie and Drug Resistance (MEDRU)

M. Mohamed Maiga, M. Ousmane BERTHE, M. Ousmaila DIAKITE, M. Allaye SAGARA, M. Joel DOUGNON, M. Abdrahamane KAMATE, Mlle. Fatoumata DIALLO, Ce travail n'aurait pu aboutir sans votre contribution. Merci pour tout.

A tous mes camarades de la 14ème promotion du numéris clausus, section

Pharmacie « Promotion Feu Pr Drissa DIALLO ».

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

Je remercie particulièrement tous enseignant du primaire, secondaire et de l'université qui ont participé de près ou de loin à ma formation. Je leur témoigne ici ma reconnaissance et prie le bon Dieu de leur accorder une récompense à la hauteur de leur effort et sacrifice.

HOMMAGES AUX HONORABLES MEMBRES DU JURY

A notre Maître et président du jury

Pr Laurent DEMBELE

- ❖ Maître de Conférences CAMES
- ❖ Docteur en biotechnologie, génie microbiologie
- ❖ Chercheur au MRTC Parasitologie

Cher maître,

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury. Votre désir de vouloir toujours l'excellence et votre rigueur dans le travail font de vous un modèle admiré de tous.

Cher maître, veuillez recevoir, le témoignage de notre sincère reconnaissance et notre profonde estime.

A notre maitre et juge,

Pr Souleymane DAMA

- ❖ Maître de Conférences de Parasitologie-Mycologie à la FAPH ;
- ❖ Spécialiste en Pharmacologie préclinique et clinique ;
- ❖ Enseignant-chercheur à la FAPH ;
- ❖ Vice Doyen de le FAPH.

Cher maitre,

Tout au long de ce travail, nous avons apprécié vos qualités humaines et scientifiques.

Votre disponibilité constante et votre amour pour le travail bien fait nous ont beaucoup impressionnés.

Permettez-nous cher Maître de vous adresser l'expression de notre gratitude et de notre reconnaissance.

A notre maitre et juge,

Pr Ousmane DEMBELE

- ❖ Maître de Conférences de Chimie Thérapeutique à la Faculté de Pharmacie de l'USTTB ;
- ❖ Sous-Directeur Technique au Laboratoire National de la Santé ;
- ❖ Chef de service contrôle qualité des médicaments au LNS ;
- ❖ Membre du Comité d'Experts de L'OOAS pour le contrôle qualité ;
- ❖ Membre du Comité Technique de l'AMQF ;
- ❖ Président du Sous-comité Surveillance et Contrôle du Marché de l'AMQF.

Cher Maître,

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

Trouvez ici l'expression de nos sincères remerciements.

A NOTRE MAITRE ET DIRECTEUR DE THESE,

Pr Seidina A.S. DIAKITE

- ❖ Maître de conférences en immunologie à la FAPH/USTTB
- ❖ Docteur en Pharmacie, PhD en Immunologie
- ❖ Enseignant-chercheur à la FAPH

Cher Maitre,

Vous nous avez honorés en acceptant de nous confier ce travail. Votre large ouverture d'esprit, votre gentillesse et votre clairvoyance font de vous un homme et un chercheur exceptionnel. La rigueur scientifique, la perspicacité et le gout de formation que font de vous un grand scientifique. Nous sommes fiers d'être cités parmi vos élèves. Nous n'oublierons jamais vos conseils et ne cesserons de vous en remercier.

Cher Maitre, soyez rassuré de notre profonde reconnaissance.

Table des matières

1. Introduction.....	1
2. Objectifs.....	3
2.1. Objectif général	3
2.2. Objectifs spécifiques.....	3
3. Généralité.....	4
3.1. Epidémiologie	4
3.2. Agents pathogènes.....	5
3.3. Vecteurs.....	6
3.4. Cycle biologique du <i>Plasmodium</i>	7
3.5. Immunité anti palustre.....	9
3.5.1. Immunité innée ou naturelle anti palustre :	10
3.5.2. Immunité acquise ou adaptative.....	11
3.6. Diagnostic biologique	13
3.7. Les stratégies de lutte contre le paludisme	13
3.7.1. Traitement curatif :	13
3.7.2. Les mesures préventives :	13
3.7.3. Les antipaludiques :	14
4. Méthodologie	15
4.1. Cadre et sites de l'étude.....	15
4.2. Types et période de l'étude.....	17
4.3. Echantillonnage	17
4.4. Techniques de laboratoire utilisées	17
4.5. Les antigènes étudiés	18
4.5.1. Antigène P27 (Tableau 1)	18
4.5.2. LR253, LR186 et M4 (Tableau 1).....	19
4.6. Gestion et analyse des données.....	20
5. Résultats	21
5.1. Résultats Globaux.....	21
5.2. Caractéristiques socio-démographiques des donneurs de sérum	21
5.3. Caractéristiques immunologiques des sérums.....	22
5.4. Activité inhibitrice de multiplication de <i>P. falciparum</i> des sérums <i>in vitro</i> :	23
5.5. Influence des sérums sur l'activité de la DHA <i>in vitro</i>	29
7. Conclusion et Perspectives.....	33
7.1 Conclusion	33
7.2 Perspectives.....	33

8. Références bibliographiques	34
9. Annexes	37

Liste des tableaux

Tableau I. Les Séquences Des Peptides Représentant Les Domaines De Msp2, Et De P27	19
Tableau II : Repartition Des Echantillons Selon La Residence, L'age Et Le Sexe Des Donneurs.....	21
Tableau III : Densité Optique Moyenne Des Serums En Anticorps Anti Lr186. Anti-Lr253, Anti-Pf27 Et Anti-M4.....	22

Liste des figures

Figure 1.Cycle de vie du <i>Plasmodium</i> [27].....	9
Figure 2.Inhibition de la multiplication <i>in vitro</i> de <i>P. Falciparum</i> par le sérum K01 à 48 heures et 96 heures ...	23
Figure 3.Inhibition de la multiplication <i>in vitro</i> de <i>P. Falciparum</i> par le K02 à 48 heures et 96 heures	23
Figure 4.Inhibition de la multiplication <i>in vitro</i> de <i>P. Falciparum</i> par le K03 à 48 heures et 96 heures	24
Figure 5.Inhibition de la multiplication <i>in vitro</i> de <i>P Falciparum</i> par le K04 à 48 heures et 96 heures	24
Figure 6. Inhibition de la multiplication <i>in vitro</i> de <i>P. Falciparum</i> par le K05 à 48 heures et 96 heures	25
Figure 7.Inhibition de la multiplication <i>in vitro</i> de <i>P. Falciparum</i> par le D01 à 48 heures et 96 heures	25
Figure 8.Inhibition de la multiplication <i>in vitro</i> de <i>P. Falciparum</i> par le D02 à 48 heures et 96 heures	26
Figure 9. Inhibition de la multiplication <i>in vitro</i> de <i>P. Falciparum</i> par le D03 à 48 heures et 96 heures	26
Figure 10.Inhibition de la multiplication <i>in vitro</i> de <i>P. Falciparum</i> par le D04 à 48 heures et à 96 heures	27
Figure 11. Inhibition de la multiplication <i>in vitro</i> de <i>P. Falciparum</i> par le D05 à 48 heures et 96 heures	27
Figure 12.Corrélation entre l'inhibition et les titres des sérums (exprimés en do) en anticorps anti-LR253, anti-LR186, anti-M4 et anti-pf27.....	28
Figure 13. Influence des sérums de koïla sur l'activité du DHA.	29
Figure 14. Influence des sérums de dangassa sur l'activité du DHA.	29
Figure 15.Maps pour l'expérience des sérums sur des parasites infectés.....	40
Figure 16. Maps pour l'expérience du médicament en association avec les sérums	41

Liste des sigles et abréviations

ADCI	: Antibody-Dependent Cellular Inhibition
AMA-1	: Antigène-1 Membranaire Apicale du Mérozoïte
AQ	: Amodiaquine
CI₅₀	: Concentration Inhibitrice de 50% de la population parasitaire
CPS	: Chimio-prévention du Paludisme Saisonnier
DHA	: Dihydroartémisinine
DO	: Densité Optique
ELISA	: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
FAPH	: Faculté de Pharmacie
FMOS	: Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie
HP	: Hématies Parasitées
HPLC	: Chromatographie Liquide à Haute Performance
Ig	: Immunoglobuline
IL	: Interleukine
INF	: Interferon
IP	: Indice Plasmodique
MEDRU	: Molecular Epidemiology of Drug Resistance Unity
MRTC	: Malaria Research and Training Center
MSP 2	: Protéine-2 à la Surface du Mérozoïte
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
PBS-T	: Phosphate Buffered Saline with Tween
PfEMP-1	: P. falciparum Erythrocyte Membrane Protéine-1
PNLP	: Programme National de Lutte contre le Paludisme
SLIS	: Système Local d'Information Sanitaire
SP	: Sulfadoxine-Pyriméthamine
TDR	: Test de Diagnostic Rapide
TLR	: Récepteurs Toll-Killer
TPI	: Traitement Préventif Intermittent
USTTB	: Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako

1. Introduction

Le paludisme est une érythrocytopathie fébrile et hémolysante, causée par le développement et la multiplication d'abord dans le foie puis dans les globules rouges d'un hématozoaire du genre *Plasmodium*, transmis à l'homme par la piqûre infectante du moustique femelle du genre *Anopheles*[1].

Selon le rapport 2023 de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), on comptait 249 millions de cas de paludisme en 2022 contre 244 millions en 2021. Le nombre estimé de décès imputables au paludisme s'est élevé à 608 000 en 2022 contre 610 000 en 2021. La Région africaine de l'OMS continue de supporter une part importante et disproportionnée de la charge mondiale du paludisme. En 2022, environ 94 % des cas de paludisme et 95 % des décès dus à la maladie ont été enregistrés dans cette Région. Les enfants de moins de cinq ans représentaient environ 78 % des décès dus au paludisme dans la Région. Un peu plus de la moitié des décès dus au paludisme dans le monde étaient enregistrés dans quatre pays africains : le Nigéria (26,8 %), la République démocratique du Congo (12,3 %), l'Ouganda (5,1 %) et le Mozambique (4,2 %)[2].

Au Mali, le paludisme constitue un réel problème de santé publique et représente le premier motif de consultation dans les formations sanitaires publiques (34%) et la première cause de mortalité avec (27%) et de morbidité (43%) selon l'annuaire statistique du Système Local d'Information Sanitaire (SLIS 2022). Les données du SLIS montrent une tendance à l'augmentation de l'incidence du paludisme entre 2017 et 2022. De 111‰ en 2017, l'incidence du paludisme dans la population générale est passée à 133‰ en 2018 ; 143‰ en 2019 ; 129‰ en 2020 et 172‰ en 2022 [3].

Le niveau de transmission varie considérablement d'une région à une autre et dans la même région, d'une localité à une autre, suivant les conditions écologiques et climatiques.

Dans ce contexte, le programme national de lutte contre le paludisme au Mali (PNLP) s'est fixé comme objectif de réduire d'au moins 75% de la mortalité et la morbidité imputables au paludisme [4]. Cependant, l'émergence et la propagation des phénomènes de résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques usuels constituent des défis importants pour l'élimination et l'éradication du paludisme d'où la nécessité de recherche continue dans le développement des nouvelles molécules antipaludiques [5]. Les méthodes ou outils actuels d'évaluation préclinique des molécules sont basés presque exclusivement sur leur capacité intrinsèque des molécules à inhiber la croissance et la multiplication *in vitro* des parasites. Cependant des facteurs humains innés et acquis sont souvent déterminant pour l'issue d'un traitement médicamenteux des infections palustres *in vivo*.

Ces facteurs ne sont pas suffisamment pris en compte au cours du développement des molécules antipaludiques pendant les phases précliniques *in vitro*. Une prise en compte de cet aspect pendant les phases précoces pourrait permettre d'optimiser le screening des potentiels médicaments antipaludiques en anticipant les effets des facteurs humains. Il s'avère donc important de développer un modèle *in vitro* d'évaluation de l'effet d'inhibition de la croissance ou de multiplication de *P. falciparum* des molécules antipaludiques qui prenne en compte l'impact des facteurs liés à l'hôte humain. Parmi les facteurs humains pouvant influencer l'activité des molécules *in vivo* on peut citer les facteurs affectant surtout le métabolisme de la molécule et son transport, les facteurs cellulaires immunitaires et les facteurs sériques notamment les anticorps et d'autres protéines plasmatiques.

Le but de cette étude est de mettre en place une méthode d'évaluation de l'activité *in vitro* des molécules anti paludiques qui tienne compte de l'impact des facteurs immunitaires humoraux contenu dans les sérums humains.

Hypothèse de recherche :

Les sérums de sujets vivants en zones d'endémie palustre influencent l'inhibition de la multiplication *in vitro* de *P. falciparum* par des molécules antipaludiques.

2. Objectifs

2.1. Objectif général

Etudier l'influence des sérums de sujets vivants en zones d'endémie palustre sur l'activité inhibitrice *in vitro* de la dihydroartémisinine sur la multiplication de *P. falciparum*.

2.2. Objectifs spécifiques

- Déterminer l'influence des sérums de sujets vivants en zones d'endémie palustre sur la multiplication *in vitro* de *P. falciparum*.
- Mesurer les titres en anticorps anti-Pf27, anti-LR186, anti-LR253 et anti-M4 des sérums des sujets vivant en zone d'endemie palustre.
- Rechercher une corrélation entre les concentrations des sérums en anticorps anti-Pf27, anti-LR186, anti-LR253 et anti-M4 et l'inhibition de la multiplication *in vitro* de *P. falciparum*.
- Evaluer l'impact des sérums de sujets vivants en zones d'endémie palustre sur l'inhibition de la multiplication de *P. falciparum in vitro* par la dihydroartémisinine.

3. Généralité

Le paludisme est une maladie parasitaire causée par un protozoaire du genre Plasmodium, transmis à l'homme par la piqûre infectante des moustiques femelles du genre *Anopheles* lors de son repas sanguin[6].

3.1. Epidémiologie

L'Afrique subsaharienne est la région la plus touchée par le paludisme. La région afrotropicale, qui ne compte que 8% de la population mondiale, supporte le plus lourd fardeau du paludisme avec 85 à 90% des cas (200 à 280 millions des cas dont 90% sont dus à *P. falciparum*). On y comptabilise environ 800 000 décès annuels. Deux complexes de vecteurs sont les responsables majeurs de la transmission du paludisme en Afrique : *Anopheles gambiae* (*arabiensis*, *bwambae*, *gambiae*, *melas*, *merus* et *quadriannulatu*) et *Anopheles funestus*[7].

La distribution du paludisme est extrêmement variable d'une zone géographique à une autre. Cette variabilité est sous la dépendance de facteurs liés au vecteur, à l'hôte, au parasite et à l'environnement[8]. L'indice de stabilité déterminé par Macdonald permet de classer l'enracinement du paludisme en deux zones :

- **Les zones de paludisme stable ou endémique** : la transmission du paludisme est longue et intense entraînant une prémunition permettant de limiter les manifestations cliniques graves chez les jeunes enfants ;
- **Les zones de paludisme instable ou épidémique** : la transmission du paludisme est très courte et il sévit sous forme épidémique. Ce caractère épisodique de la transmission ne permet pas le développement de la prémunition. Tous les individus sont à risque de développer la maladie[9]. Au Mali, il y a une extrême variabilité de la situation épidémiologique du paludisme en fonction des faciès géo-climatiques. Il existe cinq modalités épidémiologiques de transmission du paludisme :
 - Une zone soudano-guinéenne à transmission saisonnière longue ≥ 6 mois. Dans cette zone, l'indice plasmodique (IP) chez les enfants est $\geq 80\%$. L'état de la prémunition est acquis vers l'âge de 5-6 ans au prix d'une forte mortalité infantile ;
 - Une zone sahélienne à transmission saisonnière courte ≤ 3 mois. Dans cette zone, l'IP se situe entre 50-70%. L'état de prémunition est rarement atteint avant l'âge de 9-10 ans ;

- Une zone de transmission sporadique voire épidémique correspondant aux régions du Nord et à certaines localités des régions de Koulikoro et de Kayes. L'IP est en dessous de 5%. Tous les groupes d'âge sont à risque de paludisme grave ;
- Des zones de transmission bi ou plurimodales comprenant le delta intérieur du fleuve Niger et les zones de barrage et de riziculture (Manantali, Markala, Sélingué). L'IP se situe entre 40-50%. L'anémie reste un phénotype clinique important de la maladie ;
- Des zones peu propices à l'impaludation particulièrement dans les milieux urbains comme Bamako et Mopti où le paludisme est hypo endémique. L'IP est $\leq 10\%$ et les adultes peuvent faire des formes graves et compliquées de la maladie.

3.2. Agents pathogènes

Plasmodium appartient au Phylum des Apicomplexa, à la Classe des Aconoidasida, à l'Ordre des Haemosporida, à la Famille des Plasmodiidae et au Genre *Plasmodium*[10]. Il existe de très nombreuses espèces de *Plasmodium* touchant diverses espèces animales, mais les plus retrouvées en pathologie humaine sont[11] :

➤ *Plasmodium falciparum*

P. falciparum est l'espèce la plus largement répandue à travers le monde, elle est responsable de plus de 99% des cas de paludisme en Afrique et provoque des formes cliniques graves potentiellement mortelles. Des résistances aux antipaludiques fréquemment développées par *P. falciparum*[12]. Il est responsable de la fièvre tierce maligne [12]. Des recrudescences saisonnières observées suite à une transmission pendant toute l'année. On n'observe pas de rechutes tardives comme avec les autres espèces[13, 14].

➤ *Plasmodium vivax*

P. vivax est très largement répandu en Amérique du Sud et en Asie, et dans certaines régions de l'Afrique. Sa transmission s'arrête en dessous de 15°C. Sa période d'incubation est de 11 à 13 jours, mais on peut observer des rechutes (accès de reviviscence lié à la présence des hypnozoïtes) pendant 3 à 4 ans[15]. Le paludisme provoqué par *P. vivax* est classiquement considéré comme bénin (fièvre tierce bénigne, c'est-à-dire due à un cycle érythrocytaire de 48 heures) mais en zone d'endémie il peut entraîner des répercussions graves sur l'état de santé des populations, notamment par l'intermédiaire des anémies chez l'enfant. De plus en plus, quelques cas de *P. vivax* résistants à la chloroquine s'observe[16].

➤ ***Plasmodium ovale***

Plasmodium ovale est biologiquement et morphologiquement très semblable à *P. vivax*, il est essentiellement présent en Afrique intertropicale du centre et de l'ouest, et dans certaines régions du Pacifique occidental. Son incubation peut aller de 15 jours à 4 ans. Il provoque une fièvre tierce comme *P. vivax*, et ses manifestations cliniques sont généralement modérées. Les méthodes de la biologie moléculaire ont démontré que *P. ovale* se compose de deux sous-espèces bien distinctes : *P. ovale curtisi* et *P. ovale wallikeri*[17]. Schématiquement, on dit que *P. ovale* remplace *P. vivax* en Afrique là où cette dernière espèce n'existe pas. Les deux sous espèces ont une morphologie similaire[18].

➤ ***Plasmodium malariae***

P. malariae sévit dans les trois continents, mais de manière beaucoup plus sporadique. Il se différencie des autres espèces par une incubation plus longue 15 à 21 jours, par une périodicité différente de la fièvre (cycle érythrocytaire de 72 heures responsable d'une fièvre quarte) et surtout par sa capacité à entraîner des reviviscences très tardives (jusqu'à 20 ans après le retour de la zone d'endémie). L'infection est bénigne mais *P. malariae* peut parfois entraîner des complications rénales[16].

➤ ***Plasmodium knowlesi***

P. knowlesi sévit en Asie du Sud-Est particulièrement en Malaisie, à Bornéo, en zone forestière car il est étroitement lié à la répartition des singes macaques, son hôte habituel, et de son vecteur piquant l'homme et la singe. Il est morphologiquement proche de *P. malariae*. Il se différencie des autres espèces par un cycle érythrocytaire de 24 heures responsable d'une fièvre quotidienne. Il existe de rares formes graves, voire mortelles, avec forte parasitémie. A ce jour aucune chimiorésistance n'a été observée pour cette espèce[16].

➤ ***Plasmodium cynomolgi***

P. cynomolgi fait partie des espèces plasmodiales infectant les singes macaques comme *P. knowlesi* et, est principalement rencontré en Asie du Sud-est. Il possède des caractéristiques biologiques et génétiques proches de *P. vivax*[19].

Récemment un cas de paludisme causé par *P. cynomolgi* a été signalé dans l'est de la Malaisie[20].

3.3. Vecteurs

L'agent vecteur responsable de la transmission du paludisme à l'homme appartient à l'ordre des diptères, à la famille des *Culicidae*, à la sous famille des Anophelinae et au genre *Anopheles*[16]. Les moustiques *Culicidea* du genre *Anopheles* assurent la transmission du paludisme dont il existe plus de

400 espèces, seule une cinquantaine est capable de transmettre le paludisme à l'homme. Dans la pratique, 20 espèces assurent l'essentiel de la transmission dans le monde[21]. Le développement et la longévité des Anopheles dépendent de la température avec un optimum entre 20 et 30°C pour une durée de vie de l'ordre de 30 jours. Les vecteurs responsables de la transmission en Afrique sont : *An. gambiae* et *An. funestus*. La distribution de ces vecteurs dépend fortement des variations spatiales et temporelles, *An. funestus* étant abondant pendant la saison froide et sèche, *An. gambiae* pendant la saison des pluies[22, 23].

3.4. Cycle biologique du *Plasmodium*[24]

Le cycle biologique du *Plasmodium* est un cycle complexe qui comprend un hôte intermédiaire (l'homme) où il se trouve sous une forme haploïde et se multiplie de manière asexuée et un hôte définitif, l'anophèle femelle (chez le moustique) dans lequel se déroule la reproduction sexuée (Sporogonie)

➤ Cycle chez le moustique (Sporogonie)[25]

Lors d'un repas sanguin sur un individu infecté, l'anophèle femelle ingère des formes sexuées du *Plasmodium* ainsi que les gamétocytes mâles (micro-gamétocytes) et femelles (macro-gamétocytes). Ces derniers parviennent dans l'estomac du moustique et se transforment en gamètes.

Le gamète mâle subit un processus d'ex-flagellation à la suite duquel les gamètes femelles sont fécondés. Il en résulte un zygote appelé ookinète ; celui-ci s'implante sous la paroi stomacale en formant l'oocyste. Cette brève phase diploïde s'achève par une division méiotique suivie par plusieurs milliers de méiose qui conduit à la production de sporozoïtes. L'éclatement de l'oocyste libère des éléments mobiles et haploïde dans l'hémolymphe. Les sporozoïtes gagnent préférentiellement les glandes salivaires du moustique d'où ils pourront être injectés par la salive lors d'une pique infectante. Chez le moustique, l'ensemble de ce cycle se déroule entre 10 à 40 jours, suivant la température extérieure et l'espèce en cause.

➤ Cycle chez l'homme (schizogonie)

- Cycle exo érythrocytaire

Au cours de la piqûre, l'anophèle femelle infecté injecte dans un capillaire des sporozoïtes. Les sporozoïtes transitent dans la circulation générale et, en quelques minutes, ils envahissent les hépatocytes grâce à une interaction spécifique entre la protéine majeure de surface du sporozoïte (CSP) et un récepteur spécifique situé sur la membrane plasmique de l'hépatocyte du côté de l'espace dissepimentaire, espace directement en contact avec le sang circulant. Le sporozoïte entre alors dans une phase de

réplication au sein de la vacuole parasitophore et de prolifération intracellulaire qui repousse en périphérie le noyau de la cellule. Il finit par constituer une masse multinucléée appelée schizonte (schizonte hépatocytaire) qui conduit à la libération de plusieurs dizaines de milliers de mérozoïte dans la circulation sanguine.

Cette phase de multiplication est asymptomatique et dure 8 à 15 jours selon les espèces.

- **Cycle intra érythrocytaire[10]**

C'est la seule phase symptomatique du cycle et est d'intensité variable selon le statut immunitaire de la personne infectée. Les mérozoïtes libérés lors de la rupture de l'hépatocyte vont débiter le cycle sanguin asexué de prolifération de *P. falciparum* en infectant les érythrocytes.

Le mérozoïte pénètre l'érythrocyte grâce à un processus parasitaire actif et se différencie en anneau (trophozoïte jeune), puis en trophozoïte mature, stade à partir duquel une intense phase replicative commence. Il donne alors naissance au schizonte (schizonte hépatocytaire), celui-ci après segmentation, montre une forme caractéristique de rosace, puis libère 8 à 32 mérozoïtes lesquels rapidement réinfectent des érythrocytes sains.

L'ensemble de ce cycle dure 48 heures chez *P. falciparum*. L'apparition des gamétocytes se déroule en général à la deuxième semaine qui suit l'infection et ces formes peuvent persister plusieurs semaines après la guérison[1, 26].

À la suite d'une nouvelle pique par l'anophèle femelle, les gamétocytes mâles et femelles sont ingérés lors d'un repas sanguin de moustiques femelles pour un nouveau cycle. Il est à noter que la proportion de moustiques femelles infectés dépend de la gamétocytemie à *P. falciparum* en zone endémique[25].

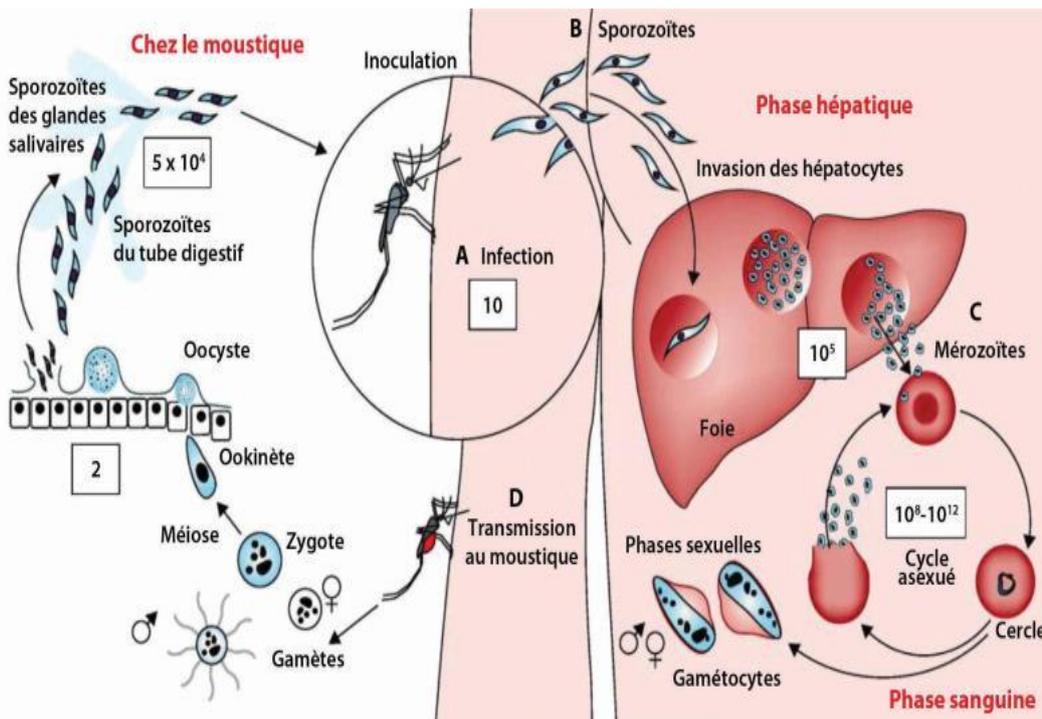


Figure 1. Cycle de vie du Plasmodium[27]

3.5. Immunité anti palustre

L'infection due à *Plasmodium*, induit des réponses immunitaires de l'hôte, lesquelles sont régularisées à la fois par le système immunitaire inné autrement nommé système immunitaire non spécifique, par le système immunitaire spécifique ou acquis, que par des facteurs environnementaux. Les systèmes immunitaires précédemment nommés sont complémentaires. L'immunité innée se met en place dès les premières heures de l'infection. Elle est indépendante de toute infection en attendant la mise en place de l'immunité dite « acquise » qui lui serait fonctionnelle une dizaine de jours plus tard. L'immunité acquise est tout autant spécifique des stades de développement du parasite que des espèces parasitaires. Cette immunité s'est révélée rarement complètement protectrice, et le cas du paludisme sait qu'elle est partielle et non stérilisante[28].

L'acquisition, par les populations humaines exposées d'une immunité anti-palustre progressive, éphémère et incomplète, dite « de prémunition » caractéristique de la relation « homme /parasite /vecteur ».

Il s'agit en réalité d'un état d'immunité, un équilibre entre hôte-parasite après plusieurs années d'exposition si la transmission est constante et relativement élevée. Elle protège d'abord contre la mortalité et les formes graves palustres, puis contre les accès palustres simples en diminuant leur incidence plutôt que leur gravité et enfin en réduisant la durée ou le niveau des infections par les stades sanguins. Cet équilibre est labile et disparaît en 12-24 mois chez le sujet immun qui quitte la zone

d'endémie[29]. Le développement de cette immunité de prémunition est dépendant du contexte épidémiologique, de la saisonnalité et de l'intensité de la transmission au niveau de la zone géographique. Elle apparaît d'autant plus rapidement que la transmission est importante et permanente. Cependant le développement de la prémunition n'empêche pas le portage de parasites faisant des sujets semi-immuns d'excellents « réservoirs » de parasites. Dans certaines régions sèches, de paludisme instable, la transmission fluctue considérablement d'une saison et d'une année à l'autre, cela retardant l'acquisition de l'immunité[30].

3.5.1. Immunité innée ou naturelle anti palustre :

Le système immunitaire inné constitue la première ligne de défense contre les microorganismes. Il se mobilise dès les premières heures de l'infection. Les neutrophiles, les monocytes et les cellules NK (Natural Killer) semblent jouer un rôle prépondérant dans l'immunité innée observée au cours de la phase précoce du paludisme[31]. Parmi les cellules en première ligne lors de l'infection par *Plasmodium*, on distingue les cellules dendritiques (DC), les lymphocytes $T\gamma\delta$, les macrophages et les cellules NK (natural killer ou cellule tueuse naturelle). Ces cellules sont impliquées soit dans l'élimination des cellules infectées ou non (érythrocytes ou hépatocytes) soit dans l'initiation et la régulation de la réponse innée et adaptative[32].

Le taux de cellules NK croît aussi longtemps que celles-ci sont en mesure de détruire des globules rouges infectés par *P. falciparum in vitro*. Les cellules NK sont aussi de puissantes productrices de cytokines et de chimiokines en réponse à différents stimulus, notamment l'IFN- γ , le TNF- α , l'IL-10, l'IL-13 ou le GM-CSF (granulocyte/macrophage colony stimulating factor)[33]. La production rapide d'IFN- γ (interféron γ) est importante pour le pronostic évolutif de la pathologie. Des études récentes suggèrent que les cellules NK pourraient être l'une des sources de cette production précoce d'IFN- γ [34]. Plus connues pour leur rôle dans l'immunité anti tumorale et antivirale, les cellules NK seraient également capables de reconnaître directement des hématies infectées par *P. falciparum*[32]. Les preuves actuelles montrent que la reconnaissance précoce de *Plasmodium* et la libération ultérieure de cytokines et de médiateurs inflammatoires sont importantes pour l'élimination du parasite, mais peuvent également contribuer à la gravité de la maladie. Au cours des dernières années, la famille des récepteurs toll-like (TLR) a été identifiée comme des molécules hôtes clés dans l'induction de réponses immunitaires innées aux ligands microbiens[35].

3.5.2. Immunité acquise ou adaptative

Elle repose sur l'intervention des lymphocytes T et B qui sont spécifiquement dirigés contre le parasite. Cette réponse immunitaire adaptative se divise en deux composantes essentielles : l'immunité à médiation humorale et l'immunité cellulaire.

3.5.2.1. Les antigènes du *Plasmodium*

Plusieurs composants du *Plasmodium* exprimés à différentes étapes de son cycle de vie sont reconnus par les récepteurs des cellules du système immunitaire spécifique (LT et LB) de l'homme. Ces composants, essentiellement des protéines induisent des réponses immunitaires et engendrent la production des anticorps détectables chez les individus vivant dans des zones d'endémie palustre. Ces protéines parasitaires sont caractérisées par leur très grande variabilité conditionnée par leur polymorphisme et leur polygenie. Cette grande variabilité constitue l'un des grands défis pour le développement de vaccin efficace contre le paludisme. Ainsi on peut citer :

-Les antigènes du stade pré-érythrocytaire : Le Merozoite Surface Protein (MSP) 1 et 2, Apical Membrane Antigen 1 (AMA1), circumsporozoite protein (CSP), le Glutamate Rich Protein, (GLURP)

-Les antigènes du stade érythrocytaire : Ils sont connus sous le nom de Variant surface Antigens (VSA) à cause de leur très grande variabilité. Les plus étudiées sont : le *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Proteins 1 (PfEMP1), Le Repetitive Interspersed Family (RIFIN), Subtelomeric Variable Open Reading Frame (STEVOR), Surface-associated Interspersed gene family (SURFIN), Knob-Associated Histidine-Rich Protein (KAHRP).

-Les antigènes du stade gamétocytaire : Plusieurs antigènes du stade sexuelle du *Plasmodium* ont été décrits. Ces antigènes sont particulièrement intéressants pour le développement de médicaments et de vaccins bloquant la transmission. On peut citer les Pfs48, Les Pfs27, Les Pfs45.

3.5.2.2. Réponse à médiation cellulaire

L'immunité à médiation cellulaire a été mise en évidence à la suite d'un transfert adoptif de ses cellules en absence de réponse humorale détectable. Elle est surtout l'œuvre des cellules TCD4+ et TCD8+ spécifiques au parasite et protègerait l'hôte contre les stades hépatocytaires et érythrocytaires car les parasites y sont intracellulaires et difficilement accessibles par les anticorps. Les lymphocytes TCD4 sont classés en plusieurs sous-groupes qui agissent différemment selon le type de cytokines produites. Les cellules Th1 produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'INF- γ et l'IL-2 intervenant dans la réponse cytotoxique alors que les Th2 produisent des cytokines anti-inflammatoires comme IL-4 et IL-13 qui régulent la réponse humorale[36]. Une forte prolifération cellulaire TCD4+ et TCD8+

liée à une réponse cytokinique Th1 (IFN- γ et IL-2) a été associée à la protection contre le paludisme, indépendamment de la production d'anticorps[37].

3.5.2.3. Réponse médiation humorale

L'immunité humorale acquise est principalement dirigée contre le stade érythrocytaire asexué, les cibles principales étant les mérozoïtes extracellulaires en circulation, mais le stade pré-érythrocytaire est également visé par les réponses immunitaires protectrices[38]. Cette réponse humorale repose surtout sur l'intervention des cellules B qui après stimulation antigénique puis différenciation en plasmocytes, produisent les anticorps. Le rôle des anticorps spécifiques dans le contrôle de l'infection palustre est illustré par de nombreuses observations épidémiologiques, cliniques et expérimentales. En effet des titres élevés d'anticorps dirigés contre des antigènes plasmodiques ont été observés chez des sujets âgés vivant en zones d'endémie palustre et associés à une réduction du risque de la maladie notamment les formes graves[39, 40]. Ces anticorps dans l'immunité anti palustre est démontré par les anticorps capables de bloquer l'invasion des hépatocytes par le parasite. Les anticorps produits au cours de l'infection palustre sont constitués essentiellement par des immunoglobulines G (IgG), les IgM mais aussi d'autres isotypes d'immunoglobulines. Bien que des anticorps d'isotypes différents puissent avoir des fonctions protectrices, les IgG sont en effet les plus performantes dans la protection antipaludique[41]. Ces anticorps protecteurs sont principalement de type IgG1 et IgG3. Ils peuvent activer le complément et induire une lyse des sporozoïtes par le mécanisme d'inhibition cellulaire dépendante de l'anticorps ou ADCI (antibody-dependent cellular inhibition) ou par la phagocytose[42]. Les IgG2 et IgG4 seraient non protecteurs ; et des études ont montré qu'il existe une relation entre les taux d'IgG non cytophiles et la gravité de la maladie[43].

Les études séro-épidémiologiques contribue à fournir des informations sur l'immunité au niveau de la population et indirectement sur le niveau de l'exposition[44].

Lorsque la transmission diminue ainsi que l'immunité décroît, les communautés ou sous-groupes devenus vulnérables aux risques accrus de maladies pourraient être identifiés afin d'adapter des interventions de protection supplémentaires. À ce jour, les mécanismes expliquant le rôle de l'immunité anti-palustre dans la transmission du paludisme ne sont pas bien élucidés[45]. Probablement parce que la recherche sur l'immunité anti palustre est focalisée à un certain nombre d'antigènes du paludisme, nombre de ces études ne mesurant que les niveaux d'anticorps, mais pas la réponse fonctionnelle[46, 47]. Récemment, des nouveaux antigènes ont été identifiés dont les anticorps spécifiques étaient associés à la protection[48, 49]. Les données ont montré que les anticorps contre les antigènes recombinants du merozoïte sont des biomarqueurs de l'immunité[44, 50]. De nombreux

travaux ont également été réalisés ces dernières années pour identifier les mécanismes de fonctionnement de l'immunité et son association à la protection[48, 51]. Les anticorps avec la fonction de reconnaissance de l'antigène du parasite n'ont pas toujours été prédictive de l'immunité protectrice, tandis que les données récentes suggèrent que la phagocytose opsonique des mérozoïtes peut être un solide corrélat de l'immunité[52]. Cependant, des études prospectives supplémentaires reliant les réponses d'anticorps fonctionnels a des résultats cliniques sont nécessaires.

3.6. Diagnostic biologique

Il existe plusieurs méthodes de diagnostic du paludisme, mais les plus utilisées sont :

➤ Tests de diagnostic rapide (TDR)

Les tests de diagnostic rapide (TDR) sont basés sur la détection d'histidine riche protéine 2 (HRP-2), du parasite lactate déshydrogénase et de l'aldolase. Ces tests ont une sensibilité entre 88 et 99% pour *P. falciparum* mais ont une mauvaise sensibilité pour les autres espèces du Plasmodium particulièrement *P. ovale* et *P. malariae*[15]. Ils doivent toujours faire l'objet d'une confirmation par un frottis sanguin.

➤ Goutte épaisse et le frottis mince

Ils détectent la présence ou non du parasite et le frottis mince permet de voir la morphologie et faire le diagnostic différentiel d'espèce. Les deux méthodes sont utilisées pour estimer la parasitémie.

3.7. Les stratégies de lutte contre le paludisme

3.7.1. Traitement curatif :

Le Mali a adopté depuis 2005 les recommandations de l'OMS pour la prise en charge des cas du paludisme, notamment les Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTAs) contre le paludisme non compliqué (Artéméther+Luméfántrine et Dihydroartémisinine + Pipéraqúine) chaque fois que la voie orale reste possible. L'artésunate, l'arthéméter et la quinine tous utilisés par voie parentérale sont les molécules de choix pour le traitement des cas de paludisme grave. Également, les formes suppositoires de l'artésunate se sont avérées utiles pour le traitement prétransfert des cas de paludisme grave et compliqué. Le gouvernement du Mali s'est engagé à assurer gratuitement le traitement de l'accès palustre chez les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes.

3.7.2. Les mesures préventives :

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

- La lutte antivectorielle (utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action, utilisation de biolarvicides pour la destruction des gîtes larvaires et des répulsifs ;

- La pulvérisation intradomiciliaire ;
- Le Traitement Préventif Intermittent (TPI) utilisant la sulfadoxine-pyriméthamine chez les femmes enceintes. Ce traitement est administré gratuitement à raison d'une cure supervisée par mois entre le 4ème et le 8ème mois de la grossesse. Chaque cure est composée d'une prise unique de 3 comprimés de Sulfadoxine(500mg) et Pyriméthamine (25mg) chacun.
- La Chimio-prévention du Paludisme Saisonnier (CPS) chez les enfants de 3 à 59 mois à base de Sulfadoxine-pyriméthamine (AQ+SP) à intervalles réguliers d'un mois. La posologie recommandée en fonction de l'âge est pour les Nourrissons <12 mois : AQ moitié d'un comprimé à 153 mg une fois par jour pendant trois jours plus une dose unique de SP- moitié d'un comprimé à 500/25 mg et pour les enfants de 12-59 mois : AQ-un comprimé entier à 153 mg une fois par jour pendant trois jours plus une dose unique de SP-un comprimé entier à 500/25 mg.

3.7.3. Les antipaludiques :

La classification des antipaludiques est pharmacologique et chimique. C'est ainsi qu'on distingue :

- ❖ Les schizonticides : ils sont actifs sur les schizontes mais inactifs sur les gamétocytes. Ils sont curatifs des accès palustres, mais n'empêchent pas la transmission de la maladie. Ils comprennent : la quinine, les amino-4 quinoléines, les biguanides et dérivés, les diaminopyrimidines et les sulfamides. En plus de l'activité schizontocide, l'artémisinine et dérivés est actif préférentiellement sur les formes anneaux jeunes 'Ring stages'.
- ❖ Les gamétocytocides : ils n'ont pas d'action forte sur les schizontes mais ont un intérêt sur le plan collectif car ils peuvent empêcher la transmission.

D'autre part, certains antibiotiques appartenant à la famille des tétracyclines (Doxycycline) ou des macrolides (érythromycine) utilisés en association avec les schizonticides (en général la quinine) permettent de renforcer l'activité antipaludique.

La classification chimique des antipaludiques comporte :

- Les Amino-4-quinoléines : l'amodiaquine
- Les Amino-alcools : quinine, méfloquine, lumefantrine
- Les anti métabolites : proguanil, diaminopyrimidine
- Les Pipéraquline
- Les Pyronaridine
- L'Artémisinine et dérivés : Artéméter, artésunate, dihydroartémisinine qui est le principal métabolite actif des dérivés de l'artémisinine
- Les amino-8 quinoléines : Primaquine, tafenoquine

4. Méthodologie

4.1. Cadre et sites de l'étude

Il s'agit d'une étude de recherche initiée et menée dans le cadre d'une collaboration entre « Unité d'Immunogénétique » et le « MEDRU » (Molecular epidemiology of Drug resistance Unity = Unité d'épidémiologie moléculaire de la Résistance aux médicaments). Toutes les deux unités sont basées à l'ICER-Mali /FAPH-FMOS /USTTB.

L'étude expérimentale d'évaluation de l'activité des sérums et des molécules sur la multiplication de *P. falciparum* ainsi que la détermination des concentrations des sérums en anticorps a été menée dans les locaux des laboratoires d'immunogénétique et du MEDRU.

Les échantillons de sérum ont été collectés chez les sujets résidant à Dangassa et Koïla deux zones éco-climatiques différents au Mali.

➤ Dangassa

- Situation géographique

Le village de Dangassa est une zone de longue et d'intense transmission du paludisme situé à 82 km au sud-ouest de Bamako sur la route nationale 7 (RN7), dans la commune rurale de Niagadina, dans le district sanitaire de Ouélessébougou, région de Koulikoro.

- Climat et végétation

Le climat est de type soudano-guinéen avec deux grandes saisons : une saison pluvieuse de juin à octobre et une saison sèche de décembre à mai. Les vents dominants sont la mousson (en saison de pluie) et l'harmattan (en saison sèche). La végétation est faite de savane arborée qui est menacée de disparition à cause des coupes abusives du bois et des feux de brousse. Parmi les plantes rencontrées, on y trouve le karité, le tamarinier, le néré, le Cai cédrat, le kundie etc...L'habitat est de type traditionnel, fait de cases rondes et rectangulaires en terre battue et aux toitures en chaumes conique constituent un lieu propice de repos des moustiques favorisant ainsi l'agressivité anophélienne. L'environnement physique du village est propice à la prolifération des moustiques tels que l'anophèle gambiae qui assure la transmission du paludisme. Pendant la saison des pluies, il existe des cultures intra domiciliaires qui favorisent la prolifération d'herbes sauvages et contribuent aussi à l'augmentation de la densité et l'agressivité des moustiques. La température la plus élevée se situe à environ 40°C au mois de mai et la température la plus basse avoisine les 18°C aux mois de décembre-janvier. La température moyenne annuelle est autour de 29°C. D'une manière générale, le climat et la

végétation sont propices à la faune entomologique constituée invertébrée et d'arthropodes. *Anopheles gambiae* abondent dans le village où ils assurent la transmission du paludisme constitue le vecteur majeur du paludisme dans la zone.

➤ **Koïla :**

- **Situation géographique**

Situé dans la commune rurale de Dioro, Koïla Bambaran fait partie de l'aire de santé de Koïla du district sanitaire de Markala dans la région de Ségou. Il est à 45 Km du centre de santé de référence de Markala et à 14 km de Dioro.

Le village de Koïla Bambaran à une population estimée à 2944 habitants dont 312 enfants de moins de 5 ans (source : recensement GIS/UCRC, 2017)

- **Climat et végétation**

Le relief de Koïla est composé essentiellement de plaines argilo-sablonneuses et de basfonds, les canaux d'irrigations du village proviennent du barrage de Markala. Ils sont utilisés pour la riziculture et la pêche. La faune sauvage est pauvre à cause des aménagements de casiers rizicoles. Néanmoins. On retrouve quelques animaux comme les lièvres (*Pedetes capensis*) et les écureuils (*Sciurus vulgaris*). La végétation est composée de d'herbes et d'arbustes.

On rencontre aussi des arbres de type soudanien comme le néré (*Parkia biglobosa*), le Karité (*Vitellaria paradoxa*), l'acacia (*Acacia tortilis*) et le Balanzan (*Faidherbia albida*, syn. *Acacia albida*)

Le village dispose d'un CSCoM depuis 2008 mise en œuvre par le projet village du millénaire, projet ayant pris fin en 2014. Il est composé de deux blocs à savoir un dispensaire et une maternité. Les Organisations Non Gouvernementales (ONG) fonctionnant dans le village, en plus de l'ICEMR, sont l'UNICEF qui intervient dans la communauté et la Terre des Hommes dans l'alimentation des enfants et la prise en charge des cas de malnutrition dans la localité. Le programme de l'ICEMR intervient dans le village en suivant une cohorte d'étude de 1400 participants de tout âge.

➤ **Laboratoire immunogénétique et parasitologie du MRTC/FMOS-FAPH/USTTB**

Le laboratoire d'immunogénétique et Parasitologie du Centre International d'Excellence dans la Recherche (ICER-Mali) de la FMOS/FAPH/USTTB a été créé en 2008 au sein du Département d'Entomologie et des Maladies à Transmission Vectorielles du MRTC. C'est le fruit d'une collaboration entre les chercheurs de l'USTTB et le Laboratoire de Recherche sur le Paludisme et les Vecteurs des Instituts Nationaux de la Santé des Etats Unis d'Amérique (LMVR/NIH/USA).

Le Laboratoire d'Immunogénétique a conduit de nombreuses études sur les différents aspects du paludisme notamment l'immunité innée et acquise contre le paludisme chez les enfants, la résistance aux antipaludiques et l'évaluation des stratégies de lutte et de prévention. Le laboratoire collabore avec les autres unités de recherche de l'ICER-Mali dans la lutte contre le paludisme et les autres maladies infectieuses au Mali. L'unité apporte également son soutien aux différents programmes nationaux notamment le PNLP dans la mise en œuvre des interventions de lutte chez les enfants et les femmes enceintes ; aide aussi les deux facultés dans le cadre de la formation continue des étudiants et les jeunes chercheurs. Le site principal pour mener les activités est le village de Kéniéroba, mais les activités se font aussi dans d'autres villages comme Dangassa, Koïla, Nioro du Sahel.

Le laboratoire d'immunogénétique dispose d'équipements variés adaptés à ses activités comme les équipements de biologie moléculaire, d'immunogénétique et parasitologie, le tout soutenu par un réseau informatique et une chaîne de froid adaptée au stockage des données et à conservation de différents types d'échantillons. Le laboratoire dispose d'un personnel qualifié et diversifié comprenant des immunologistes, un pharmacologue, des épidémiologistes, des médecins, des pharmaciens et des techniciens de laboratoire. Le laboratoire a également participé à plusieurs publications dans des revues scientifiques en collaboration avec des chercheurs de renommée internationale. Les analyses de biologie clinique et de recherche ont été effectuées dans ce laboratoire.

4.2. Types et période de l'étude

Nous avons effectué une étude expérimentale *in vitro* pour mesurer l'effet d'inhibition des molécules antipaludiques et des sérums des sujets vivant en zones d'endémie sur la multiplication de *P. falciparum*.

4.3. Echantillonnage

Les échantillons étaient constitués de sérums collectés chez des enfants enrôlés dans le programme de l'ICEMR au cours d'un passage transversal en décembre 2021. L'échantillonnage était aléatoire à partir de la base cohorte de l'ICEMR et a permis de sélectionner 10 participants chez qui les données ont été collectées.

4.4. Techniques de laboratoire utilisées

➤ Détermination de la concentration des sérums en anticorps :

Les concentrations en anticorps anti-Pf27, anti-LR86, anti-LR253 et anti-M4 des sérums ont été déterminées par le test ELISA indirecte (« Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay »). Elle a été exprimée en DO.

➤ **La culture de *P. falciparum* :**

Les souches de laboratoire de *P. falciparum* (NF54 et FUP) ont été cultivées *in vitro*. Le milieu complet de culture standard (composition) a été utilisée. La culture a été faite dans un incubateur à 37°C sous une atmosphère de 5% CO₂

➤ **Test d'inhibition *in vitro* de la multiplication de *P. falciparum* par les sérums :**

Le test d'inhibition de la multiplication de *P. falciparum in vitro* par les sérums a consisté à cultiver *P. falciparum* en présence de concentration croissante de sérums de sujets vivant en zone d'endémie palustre, suivi de l'évaluation par le flow cytométrie de la parasitémie après 48 heures puis 96 heures de culture. Ce test a permis de déterminer les concentrations de sérum inhibant de 50% la multiplication de *P. falciparum* en culture.

➤ **Détermination de la CI₅₀ par flow cytométrie :**

Le cymomètre en flux BD ACCURI C6 flow cytometer (numéro de série : 2901) a été utilisé pour déterminer le taux de survie des parasites à une série de dilution des sérums ou médicament. Le logiciel GraphPad Prism version 8 a été utilisé pour : 1) l'analyse des données, 2) la prédiction des concentrations inhibitrices à 50 % (CI₅₀), ainsi que 3) le t test statistique pour la comparaison des résultats. La valeur $p \leq 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

Nous avons également utilisé la cytométrie en flux pour mesurer la parasitémie dans les échantillons de sang et dans les cultures. FL1-H (SG) mesure la quantité d'ADN parasitaire permettant de voir que les globules rouges parasités. La granulosité de tous les globules rouges parasités et non parasité est visualisé par FSC-H. La viabilité du parasite est mesurée à la FL4-H (MT) en utilisant un marquage des mitochondries avec un mitotracker rouge vif.

➤ **Evaluation de l'influence des sérums sur l'inhibition *in vitro* de la multiplication de *P. falciparum* par la DHA :**

Il s'agissait de déterminer l'effet d'inhibition de la multiplication de *P. falciparum* par la DHA (CI₅₀) en utilisant différent sérum de sujet vivant en zone d'endémie palustre (10%) en remplacement de l'albumax dans le milieu de culture.

4.5. Les antigènes étudiés

4.5.1. Antigène P27 (Tableau 1)

L'antigène P27 est une séquence de 27 acides aminés contenus dans la protéine d'exportation de trophozoïte 1103 acides aminés (la protéine PFF0165c). En effet, l'exploration des domaines structurels présents dans la protéine a permis d'identifier le P27 comme une boucle hélicoïdale avec

plusieurs segments à faible teneur en acides aminés hydrophobes. Ces segments se sont avérés fonctionnels et se replient lorsqu'ils se lient à leurs cibles[53]. Le P27 est la cible des anticorps humains inhibant la croissance des parasites[54]. Deux régions de Tex1 ont été synthétisées chimiquement. L'un des peptides synthétiques est le P27 et couvre la région alpha hélicoïdale (K845 à T871), l'autre est le P27A correspondant à la région N-terminale intrinsèquement non structurée (H223 à S326). Les deux fragments de Tex1(P27 et P27A) sont considérés comme de nouveaux candidats vaccins prometteurs pour le paludisme au stade sanguin. Les propriétés immunogènes du P27A, associées à son faible polymorphisme et son association avec une protection clinique contre le paludisme chez l'homme justifient son développement ultérieur en tant que vaccin candidat contre le paludisme. Le P27 est la cible des anticorps humains inhibant la croissance des parasites[54]. En outre, l'analyse bio-informatique du génome du parasite (via Salvador 1 (PlasmoDB)) a permis la découverte de plusieurs protéines orthologues pour *P. falciparum* et *P. vivax*, dont le couple orthologues Pf27/Pv27[55, 56].

4.5.2. LR253, LR186 et M4 (Tableau 1)

Le MSP2 ("Merozoite surface protein 2") comporte des domaines faiblement polymorphes (le domaine dimorphique D et la partie C-terminale C) qui peuvent induire des anticorps spécifiques associés à la clairance du *P. falciparum* et à la protection contre le paludisme. Les régions dimorphiques définissant les deux formes alléliques de *P. falciparum* (Pf3D7 et PfFC27) et leur partie constante, C (commune à 3D7 et FC27)[57] peuvent donc être imitées par des peptides synthétiques ("LR235", "LR186" et "M4") couvrant différents fragments du D et du C de la MSP2.

Tableau I. Les séquences des peptides représentant les domaines de MSP2, et de P27

Nom des peptides (Nombre d'acides aminés, aa)	Nom de la protéine, P. falciparum	Séquence des peptides
LR253 =MR140 (40 aa)	MSP-2 (3D7 et FC27)	APENKGTGQHGHMHGSRNNHPQNT SDSQKECTDGNKENC
LR186 (96 aa)	MSP-2 3D7	AEASTSTSSNPNHKNAETNPKGKG EVQEPNQANKETQNNNSNVQDSQT KSNVPPTQDADTKSPTAQPEQAENS APTAEQTESPELQSAPENKGTG
M4 (73 aa)	MSP-2 3D7	NAETNPKGKGGEVQEPNQANKETQN NSNVQDSQTKSNVPPTQDADTKSP

		TAQPEQAENSAPTAEQTESPELQS
Pf27 (27 aa)	PF3D7_0603 400,1 (TEX1)	KKRNVEEELHSLRKNYNIINEEIEEIT

Le peptide LR253 (MR140, en rouge) est une séquence de 40 aa couvrant la partie constante et commune aux deux formes alléliques de MSP2, 3D7 et FC27 de *P. falciparum*. La séquence LR186 (soulignée) couvre le domaine D dimorphique (y compris la séquence M4 en vert) de MSP2 (3D7) et les 8 premiers acides aminés de la portion C. La séquence M4 est une séquence plus courte (en vert) dans le domaine D.

4.6. Gestion et analyse des données

Toutes les données ELISA ont été obtenues sous la forme d'une valeur de densité optique (DO) moyenne provenant de triple puits. Les données d'inhibition ont été extraits dans le logiciel CFlow Sampler et ensuite exportés dans Microsoft Excel 2016. La corrélation Linéaire a été utilisé pour évaluer la relation entre l'inhibition des sérums et leurs titres en anticorps. Les résultats ont été présentés sous forme de tableaux et figures. Les figures ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism® version 8.

5. Résultats

5.1. Résultats Globaux

Au total, dix (10) échantillons de sérums provenant de Dangassa et Koïla ont été testés *in vitro* sur la multiplication de *P. falciparum* à 48 heures et à 96 heures. De façon générale, nous n'avons pas observé de corrélation entre l'inhibition et les titres des sérums en anticorps à 48h ($r < 0$). L'activité inhibitrice de la multiplication de *P. falciparum* était différemment impactée par les différents sérums utilisés.

5.2. Caractéristiques socio-démographiques des donneurs de sérum

Tableau II : Répartition des échantillons selon la résidence, l'âge et le sexe des donneurs

RESIDENCES	ID	AGES	SEXES
Koïla	K01	10	Masculin
	K02	10	Féminin
	K03	10	Féminin
	K04	7	Masculin
	K05	8	Féminin
Dangassa	D01	13	Masculin
	D02	8	Masculin
	D03	19	Masculin
	D04	14	Masculin
	D05	14	Masculin

Nos sérums ont été collectés chez 5 sujets résidents de Koïla dont 3 de sexe féminin et 2 sexe masculin, et 5 sujets résidents de Dangassa tous de sexe masculin. L'âge des sujets variaient de 7 à 19 ans

5.3. Caractéristiques immunologiques des sérums

Tableau III : Densité optique moyenne des sérums en anticorps anti LR186, Anti-LR253, Anti-PF27 et Anti-M4

Résidence	ID	DO moyenne			
		Anti-LR186	Anti-LR253	Anti-PF27	Anti-M4
Koïla	K01	0,4348	0,1990	0,1773	0,3516
	K02	0,7225	0,6130	0,6349	0,7147
	K03	0,6521	0,5648	0,1540	0,1677
	K04	0,1254	0,1408	0,5299	0,6549
	K05	0,2108	0,3925	0,1210	0,1270
Dangassa	D01	1,1973	1,4437	0,9826	1,4366
	D02	1,3641	1,4777	0,8833	1,5684
	D03	1,2958	1,3920	1,1816	1,4891
	D04	1,0521	1,5930	1,2385	1,4875
	D05	1,4705	1,4142	1,2001	1,4037

Les concentrations en anticorps anti LR186, anti-LR2253, anti-PF27 et anti-M4 exprimés en densité optique (DO) étaient beaucoup plus élevés dans les sérums collectés à Dangassa que ceux de Koïla.

5.4. Activité inhibitrice de multiplication de *P. falciparum* des sérums *in vitro* :

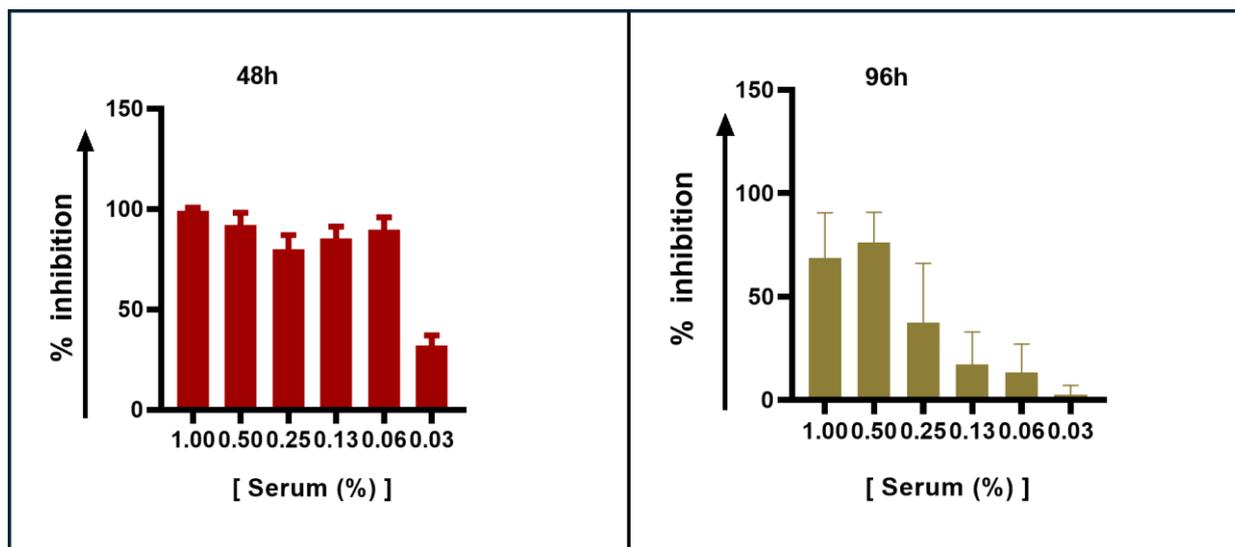


Figure 2. Inhibition de la multiplication *in vitro* de *P. falciparum* par le sérum K01 à 48 heures et 96 heures

Nous avons observé une plus forte inhibition de la multiplication *in vitro* de *P. falciparum* par le sérum K01 à 48 heures comparé à 96 heures avec des taux d'inhibition respectif de 92,12% et 68,71%. Cette inhibition était à dose dépendante.

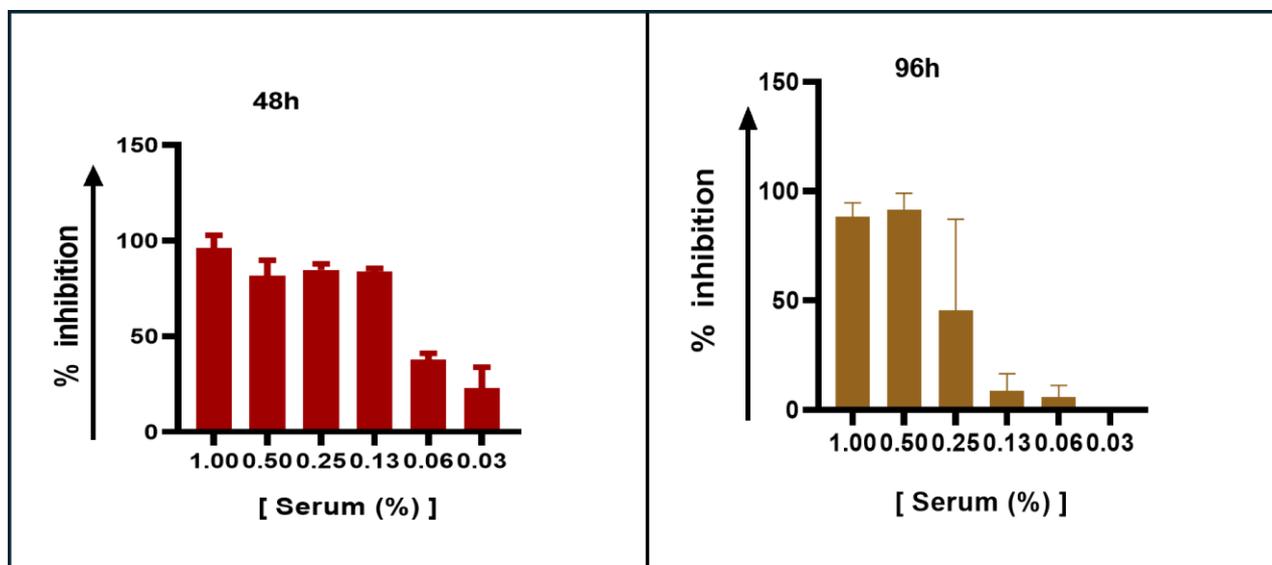


Figure 3. Inhibition de la multiplication *in vitro* de *P. falciparum* par le K02 à 48 heures et 96 heures

Le sérum K02 a plus fortement inhibé la multiplication *in vitro* de *P. falciparum* à 48 heures comparé à 96 heures avec des taux d'inhibition respectif de 96,2% et 88,29%. Cette inhibition était à dose dépendante.

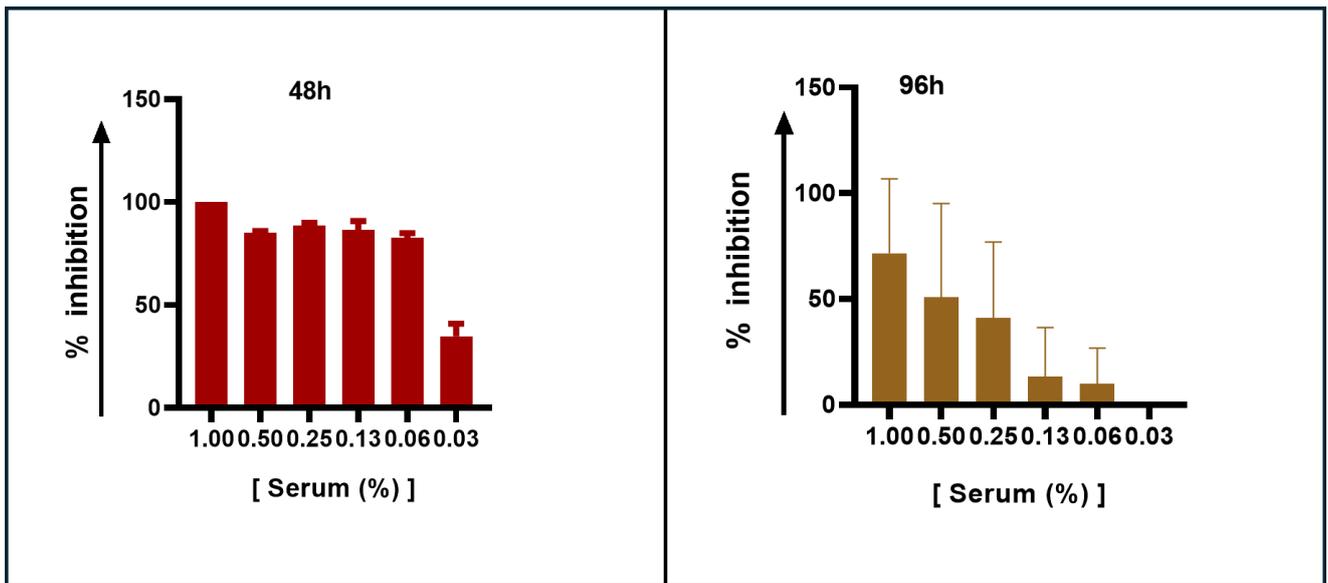


Figure 4. Inhibition de la multiplication *in vitro* de *P. falciparum* par le K03 à 48 heures et 96 heures. A dose dépendante du sérum, le K03 a plus fortement inhibé la multiplication *in vitro* de *P. falciparum* à 48 heures comparé à 96 heures avec des taux d'inhibition respectif de 100% et 71,78%.

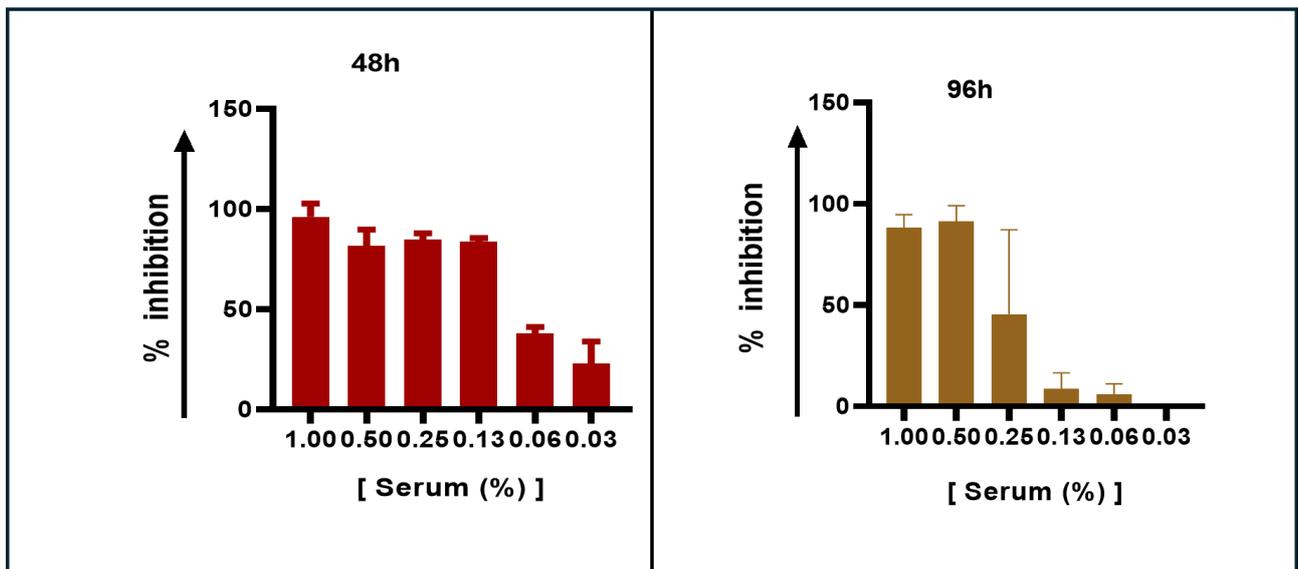


Figure 5. Inhibition de la multiplication *in vitro* de *P. falciparum* par le K04 à 48 heures et 96 heures. Le sérum K04 a aussi fortement inhibé la multiplication *in vitro* de *P. falciparum* à 48 heures comparé à 96 heures avec des taux d'inhibition respectif de 100% et 93,06%. Cette inhibition était à dose dépendante.

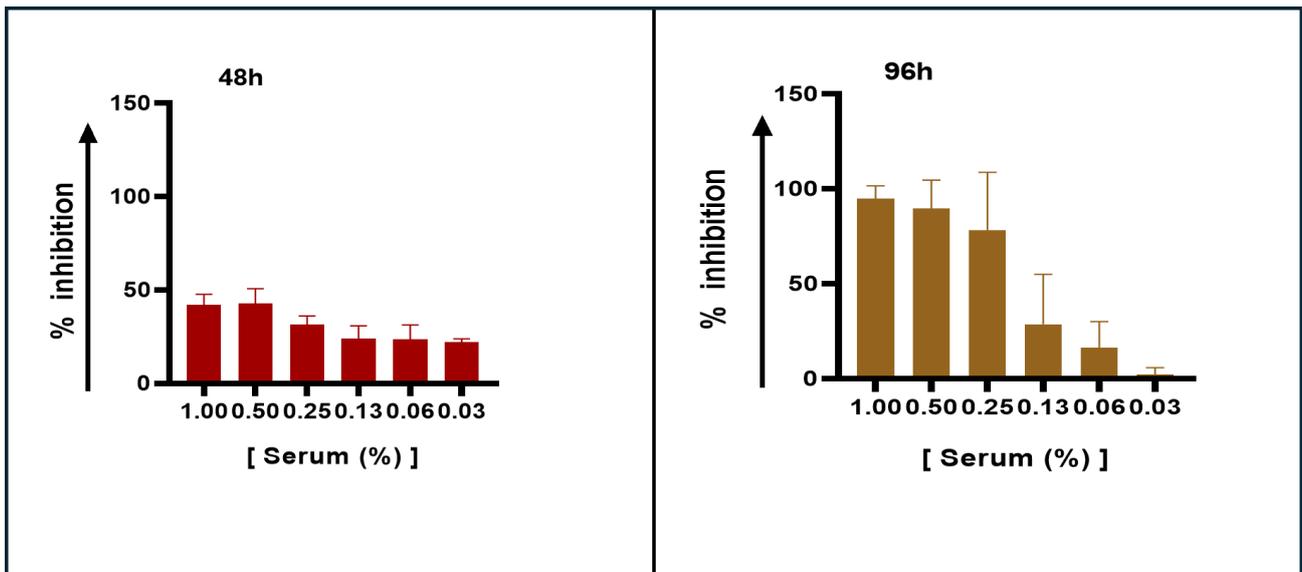


Figure 6. Inhibition de la multiplication *in vitro* de *P. falciparum* par le K05 à 48 heures et 96 heures
 L'inhibition de la multiplication de *P. falciparum in vitro* était dose dépendante aussi avec le sérum K05. Elle était à plus forte était à 96 heures avec **94,83%** qu'à 48 heures **42,02%**.

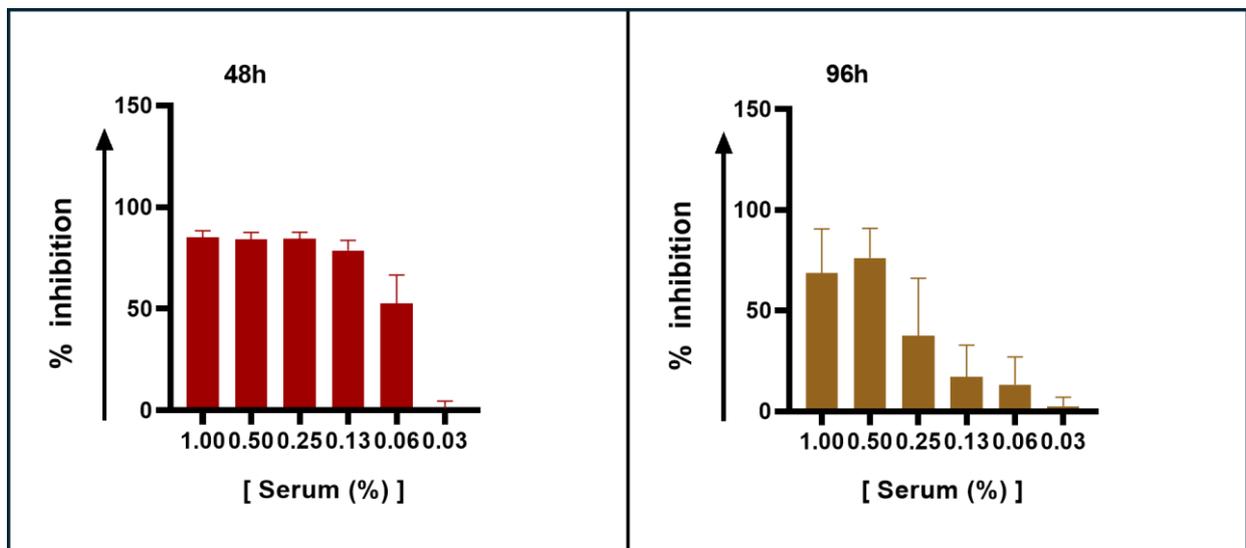


Figure 7. Inhibition de la multiplication *in vitro* de *P. falciparum* par le D01 à 48 heures et 96 heures
 Le sérum D01 était très actif sur la multiplication de *P. falciparum* à 48 heures avec **85,12%** et contre **68,71%** à 96 heures.

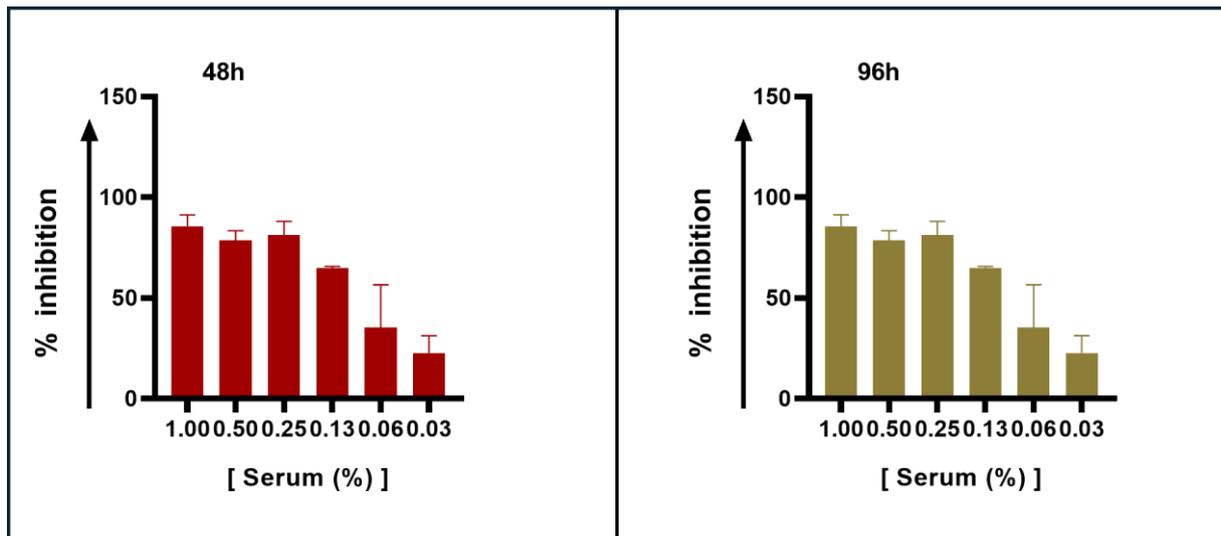


Figure 8. Inhibition de la multiplication *in vitro* de *P. falciparum* par le D02 à 48 heures et 96 heures
 Le sérum D02 avait similairement inhibé la multiplication de *P. falciparum* à 48 heures et à 96 heures avec **85,74%**.

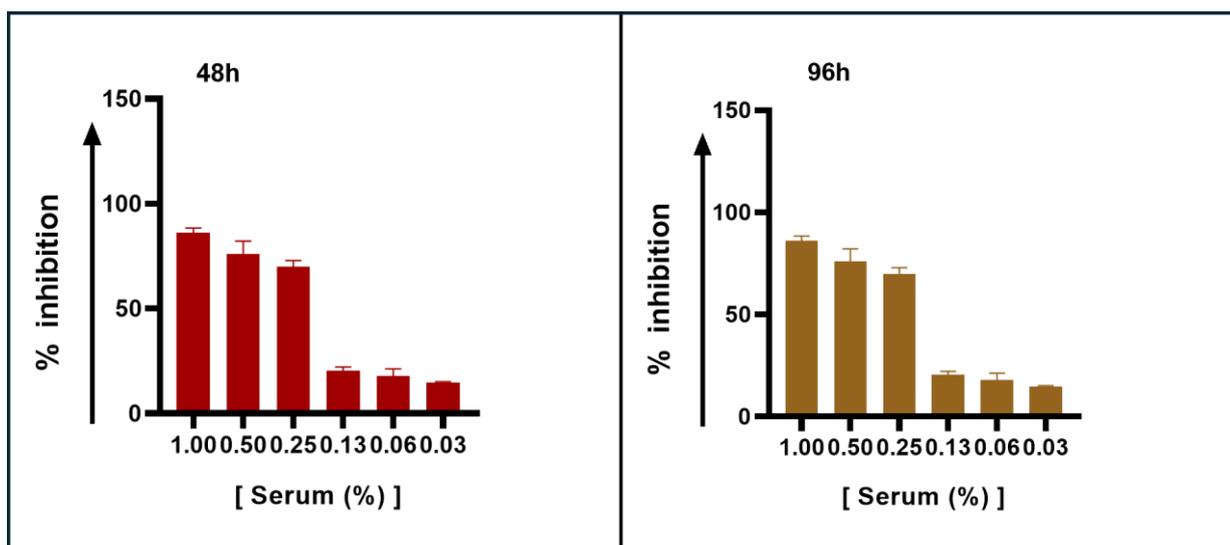


Figure 9. Inhibition de la multiplication *in vitro* de *P. falciparum* par le D03 à 48 heures et 96 heures
 Le sérum D03 avait similairement inhibé la multiplication de *P. falciparum* à 48 heures et à 96 heures avec **86,22%**.

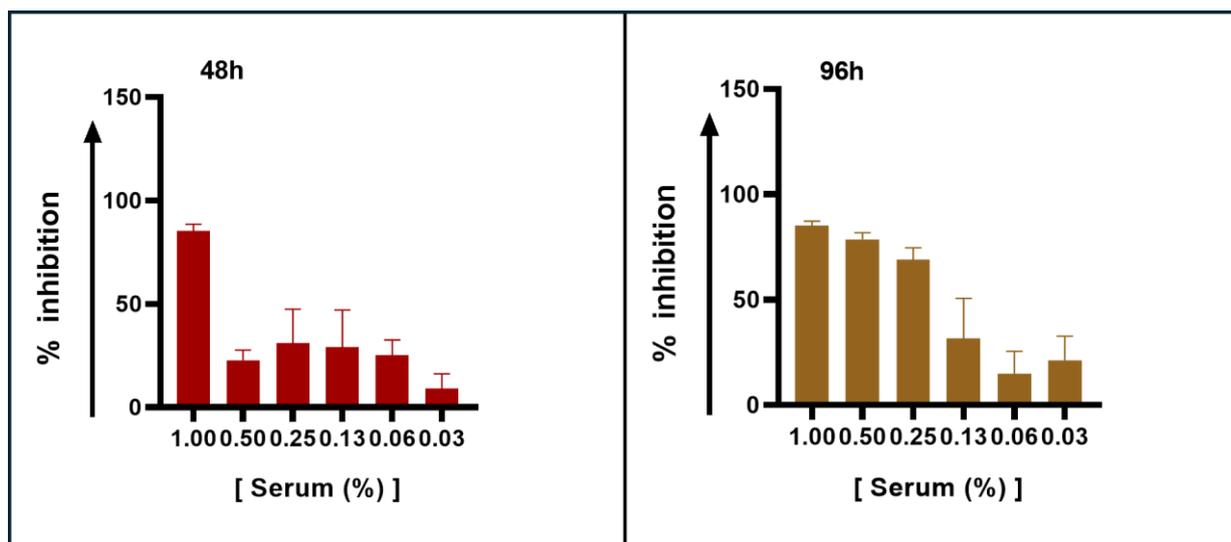


Figure 10. Inhibition de la multiplication *in vitro* de *P. falciparum* par le D04 à 48 heures et à 96 heures

Le sérum D04 a entraîné une plus forte inhibition de la multiplication de *P. falciparum* à 96 heures avec **85,13% contre 83,15%** à 48 heures.

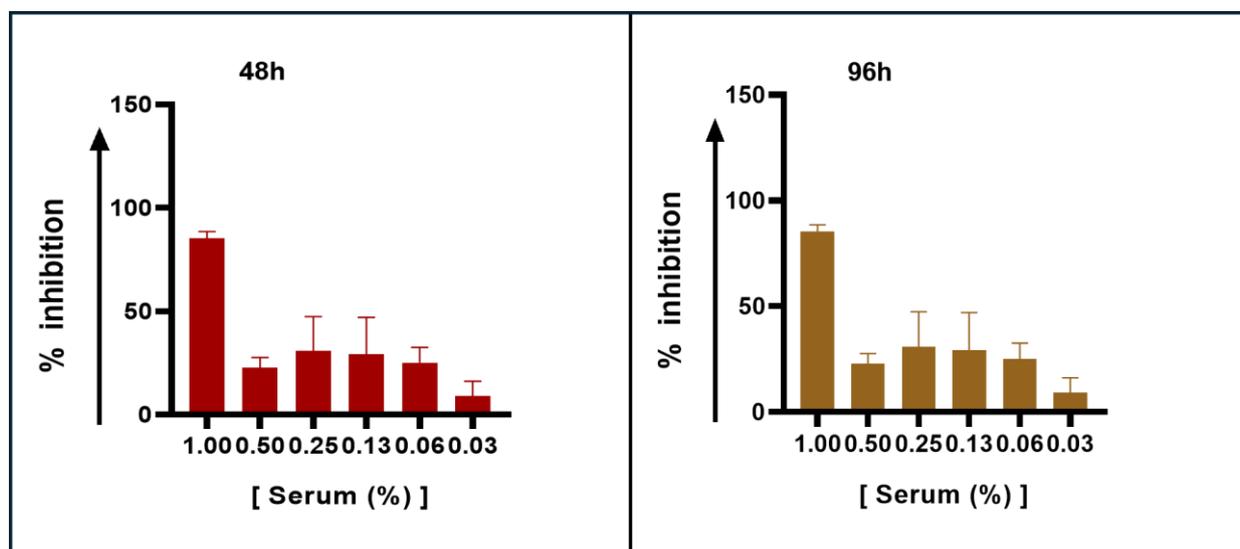


Figure 11. Inhibition de la multiplication *in vitro* de *P. falciparum* par le D05 à 48 heures et 96 heures

L'effet d'inhibition du sérum D05 était similaire à 48 heures ainsi qu'à 96 heures avec **85,33%**. Nous avons aussi observé un effet dose dépendant du sérum sur l'inhibition.

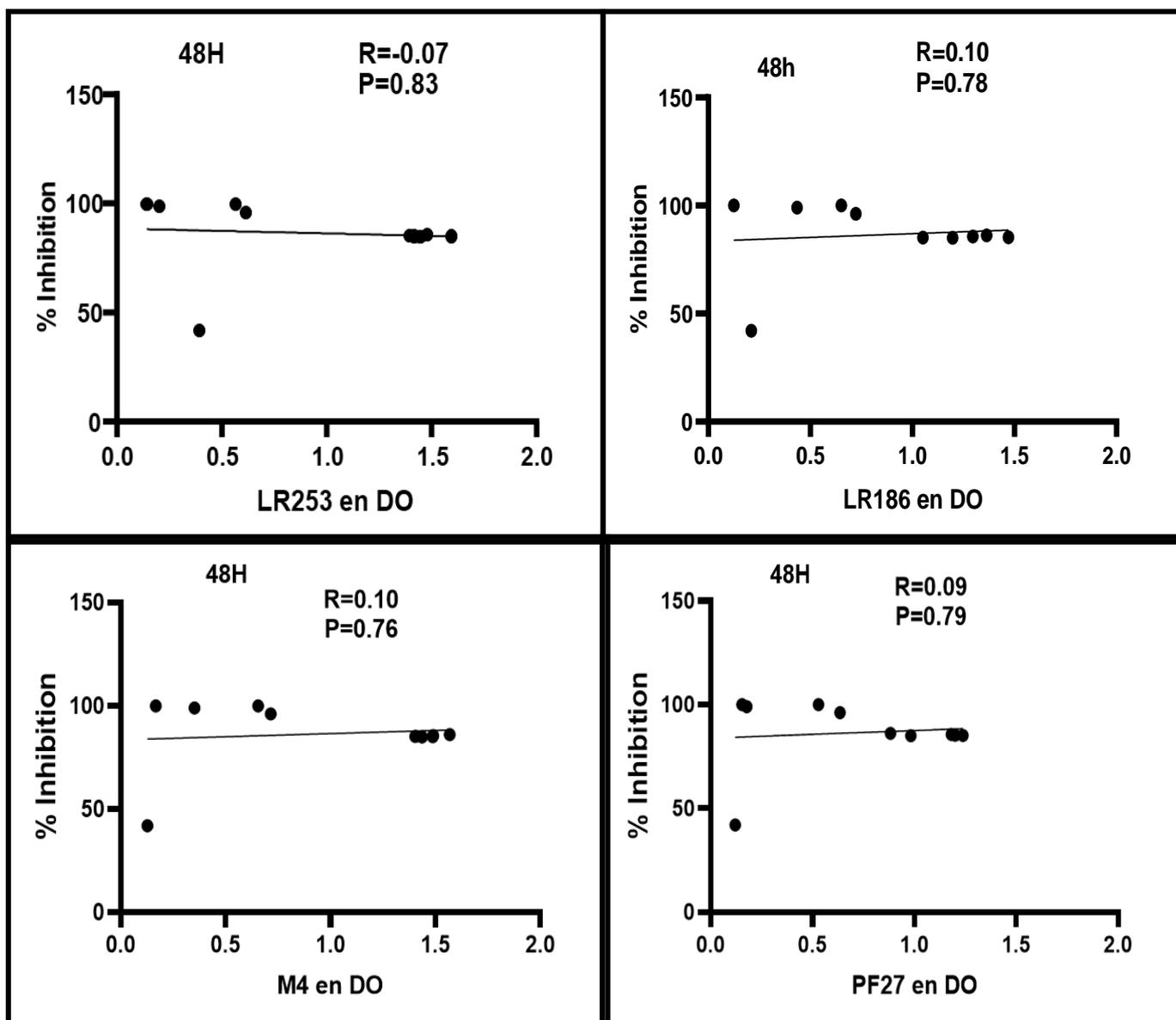


Figure 12. Corrélation entre l'inhibition et les titres des sérums (exprimés en DO) en anticorps Anti-LR253, Anti-LR186, Anti-M4 et Anti-Pf27

De façon générale, nous n'avons pas observé de corrélation entre les concentrations des sérums en anticorps et les inhibitions occasionnées par les sérums sur la multiplication de *P. falciparum in vitro*.

5.5. Influence des sérums sur l'activité de la DHA *in vitro*

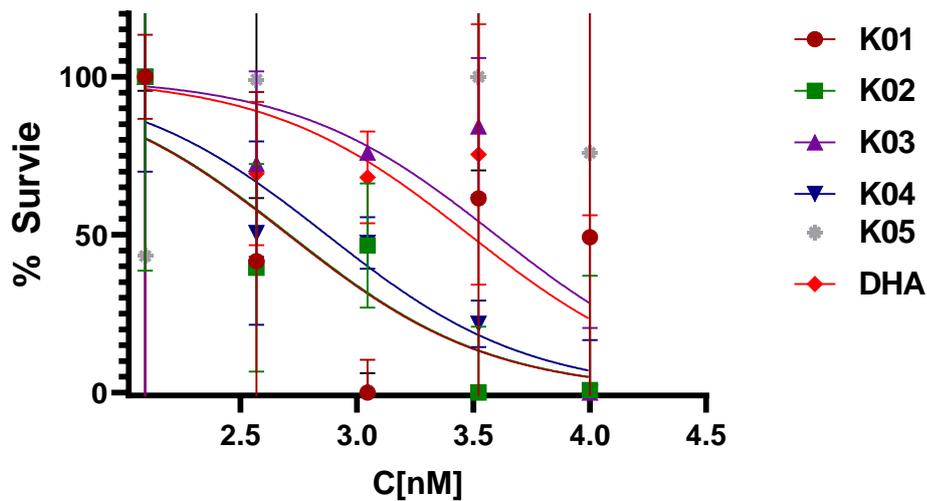


Figure 13. Influence des sérums de Koïla sur l'activité du DHA.

Certains sérums semblent améliorer l'efficacité du DHA comme le K01, K02, K04, par contre d'autres comme K03 et K05 ont tendance à diminuer son effet.

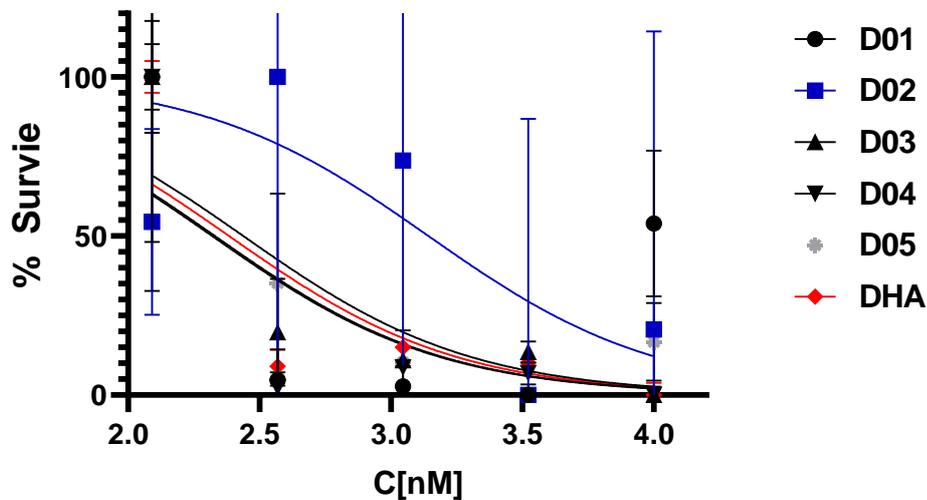


Figure 14. Influence des sérums de Dangassa sur l'activité du DHA.

Les sérums D01, D03, D04, D05 n'ont pratiquement pas d'effet sur l'efficacité du DHA, par contre D02 a tendance à diminuer l'efficacité du DHA.

6. Commentaires et discussion

Malgré les énormes progrès réalisés au cours des 15 dernières années, le paludisme reste une maladie dévastatrice, causant environ 608 000 décès pour la seule année 2022[2]. Il est de plus en plus évident que l'élimination locale et l'éradication mondiale du paludisme nécessiteront l'effort concerté de multiples interventions pour être efficaces à savoir la recherche vaccinale, médicamenteuse, le développement de certains modèles de recherche *in vitro*[58, 59].

La bio-informatique est considérée comme un outil vital pour éradication du paludisme. Cependant, la découverte et le développement de médicaments et/ou de vaccins antipaludiques sont actuellement entravés par le coût et la durée de recherche. Les méthodes ou outils actuels d'évaluation préclinique des molécules sont basés presque exclusivement sur leur capacité intrinsèque des molécules à inhiber la croissance et la multiplication *in vitro* des parasites. Cependant des facteurs humains innés et acquis sont souvent déterminant pour l'issue d'un traitement médicamenteux des infections palustres *in vivo*[60].

Dans la présente étude, nous avons étudié *in vitro* la variabilité allotypique de l'effet des sérums de sujets vivants au Mali sur l'inhibition de la multiplication de *P. falciparum* par la dihydroartémisinine. Subsidièrement nous avons évalué l'effet inhibiteur isolé des sérums sur la multiplication *in vitro* de *P. falciparum* ainsi que son lien avec certains anticorps dirigés contre des antigènes de Plasmodium.

Au total, 10 participants ont été inclus dans cette étude dont cinq de Koïla et cinq de Dangassa. Dangassa et Koïla sont des localités situées dans des zones éco-climatiques différentes donc présentant des caractéristiques de transmission de paludisme différentes. L'immunité anti palustre est dépendant de l'âge mais aussi et surtout de l'endémicité de la zone de résidence. L'enrôlement des sujets dans différentes zones d'endémicité avait pour but de s'assurer de la variation des niveaux d'immunité des sujets ainsi donc du niveau des anticorps anti-plasmodium des sérums utilisés. Les sexes masculins étaient majoritaires aux sexes féminins et la tranche d'âge 10-14 était la plus représentée.

Les effets d'inhibition des sérums sur la multiplication de *P. falciparum* ont été mesurés en déterminant le taux d'inhibition de la multiplication des parasites sur 48 heures et 96 heures de culture en présence d'une concentration de sérum de 10%. De façon générale les sérums ont plus inhibé la multiplication des parasites aussi bien à 48 heures que à 96 heures. Les inhibitions étaient plus importantes à 48 heures avec les sérums de Koïla alors qu'elles étaient similaires à 48 heures et à 96 heures avec ceux de Dangassa. La différence d'inhibition observée à 48h et 96 heures pourrait être due à des difficultés techniques. En effet, dans nos conditions de culture, la viabilité des parasites est affectée par la durée de la culture. Cela pourrait masquer l'effet du sérum.

Nous avons évalué l'inhibition de la multiplication en présence des doses croissantes de sérum. Nous avons observé une inhibition dose dépendante apportant l'évidence que l'inhibition n'est pas due au hasard. Cette inhibition pourrait être due aux anticorps anti plasmodiques contenus dans les sérums.

Les anticorps anti-LR253, anti-LR186, anti-M4 et anti-Pf27 ont été mesurés dans les sérums utilisés par Elisa et les titres en anticorps ont été exprimés en DO. Bien qu'étant des antigènes putatifs conçus par des méthodes bio-informatiques, les antigènes LR253, LR186, M4 et Pf27 se sont montrés assez réactifs avec des sérums de sujets naturellement exposés à *P. falciparum*. La réactivité de ces antigènes avait été rapportées par Maiga et al en 2023 chez les sujets de la même localité[61]. La réactivité d'autres antigènes putatifs de *P. falciparum* aux sérums de sujets immuns a été aussi rapportée par d'autres auteurs[62]. Cependant aucune étude n'avait été menée sur la fonctionnalité de ces anticorps.

En vue d'explorer la fonctionnalité des anticorps étudiés, nous avons recherché des corrélations entre les titres des sérums en anticorps et l'inhibition de la multiplication des parasites *in vitro*. Nos résultats n'ont montré aucune corrélation entre les titres d'anticorps et l'inhibition. Les inhibitions observées pourraient être dues à d'autres anticorps que ceux étudiés. En effet nos sérums ont été collectés chez des sujets vivant dans des zones à forte endémicité du paludisme. Ces sérums pourraient donc contenir d'autres anticorps anti palustre pouvant inhiber la multiplication de *P. falciparum*.

Dans le but de développer une technique d'évaluation *in vitro* de l'action antipaludique des molécules prenant en compte les potentielles interactions que pourraient causer certains facteurs sériques *in vivo*, nous avons évalué l'inhibition de la multiplication des parasites par la DHA individuellement en présence des 10 sérums étudiés. Nous avons observé que l'effet inhibitrice de la DHA sur la multiplication *in vitro* de *P. falciparum* variait avec les différents sérums utilisés. Cependant cette variation n'était pas fonction du niveau d'anticorps des sérums. Ainsi, Certains sérums de Koïla (K01, K02, K04) ont boosté l'inhibition de la multiplication de *P. falciparum* par la DHA, tandis que d'autres (K03, K05) l'ont réduit . En revanche, les sérums de Dangassa ont montré une interaction plus uniforme avec la DHA, seul le D02 réduisait légèrement son efficacité. Cette variabilité de l'influence des sérums sur l'action de la DHA peut être due à des profils immunologiques distincts des donneurs, influencés par des facteurs génétiques ou des expositions antérieures au paludisme. En effet l'immunité a été associée à une clairance plus rapide des parasites chez les patients sous traitement à l'artésunate au Mali selon Tatiana Lopera et al en 2015 [63].

Limites de l'étude

Malgré la grande diversité de sérums utilisés en terme zone de collecte et de l'âge des donneurs, le nombre de sérums était relativement faible. Aussi les anticorps investigués ne concernent que quatre antigènes de *P. falciparum* ce qui ne sauraient être représentatif du statut immunitaire des sujets.

En plus de l'immunité, d'autres facteurs sériques comme les enzymes de métabolisation pourraient influencer l'activité des molécules.

7. Conclusion et Perspectives

7.1 Conclusion

Les résultats ont révélé une bonne réactivité des sérums aux antigènes LR253, LR186, M4 et Pf27 de *P. falciparum*. Il n'y avait pas de corrélation entre les titres des sérums en anticorps anti- LR253, anti-LR186, anti-M4 et anti-Pf27 et l'inhibition de la multiplication des parasites *in vitro*. Notre étude a révélé aussi une grande variabilité de l'effet des sérums sur l'inhibition de la multiplication *in vitro* de *P. falciparum* par la DHA. L'influence des sérums sur l'activité de la DHA n'avait pas de lien avec le titre des sérums en anticorps.

7.2 Perspectives

A terme nous envisageons de Développer une technique d'évaluation *in vitro* de l'activité des molécules antipaludiques qui prenne en compte l'interaction des facteurs de l'hôte qu'ils soient sériques ou cellulaires.

- Déterminer le rôle de l'immunité humorale sur l'activité des molécules antipaludiques *in vitro*
- Déterminer le rôle de l'immunité cellulaire sur l'activité des molécules antipaludiques *in vitro* en développant une technique de Co-culture de *P. falciparum* et des cellules phagocytaires et lymphocytaires.
- Développer une technique d'évaluation *in vitro* des Drugs-Discovery prenant en compte des facteurs sériques et humoraux.

8. Références bibliographiques

1. Ligne, A.e. *clicours, Généralités sur le paludisme 2024* <https://www.clicours.com/generalites-sur-le-paludisme/> consulté le 01/06/2024.
2. OMS. Geneva: World Health Organization; . Available from: World%20malaria%20report%202023%20(1).pdf, consulté le 01/06/2024 Licence:CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
3. PNLP. *Plan strategique de lutte contre le paludisme 2013-2017..* Available from: https://www.severemalaria.org/sites/mmv-smo/files/content/attachments/2017-07-25/Mali%20malaria%20PStrag%202013-17PNLP_0.pdf. consulté le 23/05/2024.
4. PNLP. *Programme nationale de lutte contre le paludisme(PNLP).* consulté le 23/05/2024.; Available from: <https://PNLP/conseil-dadministration/#directeur>.
5. Mairet, M. *Résistance de Plasmodium falciparum aux combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine au Cambodge et au Cameroun : épidémiologie, mécanismes et nouvelles options thérapeutiques.* Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2020. Français. consulté le 01/06/2024.; Available from: <https://theses.hal.science/tel-03279353v1/file/2020TOU30283b.pdf>.
6. Liviu, M., et al. . *Paludisme.* 2016 Available from: https://zoeproject.eu/documents/study/IO3_Malaria_FR.pdf consulté le 01/06/2024.
7. ligne, A.e. *Généralités sur le paludisme.* Available from: <https://www.clicours.com/generalites-sur-le-paludisme/> consulté le 01/06/2024.
8. Noguer, A., *Les facteurs influençant la distribution géographique du paludisme dans le monde.* Le Globe. Revue genevoise de géographie, 1979: p. 15-25.
9. Macdonald, G., *Epidemiological basis of malaria control.* Bull World Health Organ, 1956. **15**(3-5): p. 613-26.
10. Maier, A.G., et al., *Plasmodium falciparum.* Trends Parasitol, 2019. **35**(6): p. 481-482.
11. Sato, *Plasmodium—a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology.* J Physiol Anthropol, 2021. **40**.
12. Pierre Aubry, B.-A.G. *Généralités sur la Médecine Tropicale Actualités 2022.* consulté le 03/05/2024]; Available from: <http://medecinetropicale.free.fr/cours/medecinetropicale.pdf>.
13. ANOFEL. *Paludisme (ANOFEL) Association Française des Enseignants de Parasitologist ET Mycologist 2014 Consulate Le 04/06/2024.* Available from: <https://fr.readkong.com/page/paludisme-association-francaise-des-enseignants-de-6695706>.
14. Ouldabdallahi, M., et al., *[Study of morbidity and Plasmodium species in the several geographic-climatic areas of Mauritania].* Bull Soc Pathol Exot, 2015. **108**(2): p. 112-6.
15. J.C. Yombi (1), U.N.O. *LA MALARIA :ASPECT CLINIQUE ET THÉRAPEUTIQUE.* . Available from: https://www.louvainmedical.be/sites/default/files/content/article/pdf/yombijc_0.pdf Consulté le 04/06/2024.
16. PALUDISME, A. *Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie (ANOFEL) 2014 Consulté le 04/06/2024.* Available from: <https://archives.uness.fr/sites/campus-unf3s-2015/UNF3Smiroir/campus-numeriques/parasitologie/enseignement/paludisme/site/html/cours.pdf>.
17. Diallo, M.A., et al., *[Plasmodium ovale wallikeri and Plasmodium ovale curtisi Malaria in Senegal in 2016].* Bull Soc Pathol Exot, 2017. **110**(5): p. 286-290.
18. Oguike, M.C., et al., *Plasmodium ovale curtisi and Plasmodium ovale wallikeri circulate simultaneously in African communities.* Int J Parasitol, 2011. **41**(6): p. 677-83.
19. Faust, C. and A.P. Dobson, *Primate malarias: Diversity, distribution and insights for zoonotic Plasmodium.* One Health, 2015. **1**: p. 66-75.
20. Ta, T.H., et al., *First case of a naturally acquired human infection with Plasmodium cynomolgi.* Malaria Journal, 2014. **13**(1): p. 68.
21. Harbach, R.E., *The classification of genus Anopheles (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships.* Bull Entomol Res, 2004. **94**(6): p. 537-53.

22. Coetzee, M. and L.L. Koekemoer, *Molecular systematics and insecticide resistance in the major African malaria vector Anopheles funestus*. *Annu Rev Entomol*, 2013. **58**: p. 393-412.
23. Touré, Y.T., et al., *Ecological genetic studies in the chromosomal form Mopti of Anopheles gambiae s.str. in Mali, west Africa*. *Genetica*, 1994. **94**(2-3): p. 213-23.
24. Venugopal, K., et al., *Plasmodium asexual growth and sexual development in the haematopoietic niche of the host*. *Nature Reviews Microbiology*, 2020. **18**(3): p. 177-189.
25. Ahmad, A., et al., *Infectivity of patent Plasmodium falciparum gametocyte carriers to mosquitoes: establishing capacity to investigate the infectious reservoir of malaria in a low-transmission setting in The Gambia*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2021. **115**(12): p. 1462-1467.
26. Soulard, V., et al., *Plasmodium falciparum full life cycle and Plasmodium ovale liver stages in humanized mice*. *Nature Communications*, 2015. **6**(1): p. 7690.
27. Argy, N. and S. Houzé, *Épidémiologie et cycle parasitaire d'un fléau mondial, le paludisme*. *Actualités Pharmaceutiques*, 2018. **57**(574): p. 18-20.
28. NIH. *Malaria vaccines provide strong and lasting immunity*. 2021 Consulté le 05/06/2024. Available from: <https://www.nih.gov/news-events/nih-research-matters/malaria-vaccines>
29. Deloron, P. and C. Chougnet, *Is immunity to malaria really short-lived?* *Parasitol Today*, 1992. **8**(11): p. 375-8.
30. Trape, J.F., et al., *The Dielmo project: a longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal*. *Am J Trop Med Hyg*, 1994. **51**(2): p. 123-37.
31. Laurent, V., et al., *Physiopathologie du paludisme à Plasmodium falciparum: principaux mécanismes et avancées récentes: Paludisme*. 2012. **27**(6): p. 222-226.
32. Roetyncck, S., et al., *[NK cells and innate immunity to malaria]*. *Med Sci (Paris)*, 2006. **22**(8-9): p. 739-44.
33. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets*. *Trends Immunol*, 2001. **22**(11): p. 633-40.
34. Artavanis-Tsakonas, K. and E.M. Riley, *Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live Plasmodium falciparum-infected erythrocytes*. *J Immunol*, 2002. **169**(6): p. 2956-63.
35. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. *Annu Rev Immunol*, 2002. **20**: p. 197-216.
36. Taylor-Robinson, A.W., et al., *Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells*. *Eur J Immunol*, 1994. **24**(4): p. 980-4.
37. Pombo, D.J., et al., *Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with Plasmodium falciparum*. *Lancet*, 2002. **360**(9333): p. 610-7.
38. Dent, A.E., et al., *Temporal stability of naturally acquired immunity to Merozoite Surface Protein-1 in Kenyan adults*. *Malar J*, 2009. **8**: p. 162.
39. Boudin, C., et al., *Possible role of specific immunoglobulin M antibodies to Plasmodium falciparum antigens in immunoprotection of humans living in a hyperendemic area, Burkina Faso*. *J Clin Microbiol*, 1993. **31**(3): p. 636-41.
40. Bouharoun-Tayoun, H. and P. Druilhe, *Antibodies in falciparum malaria: what matters most, quantity or quality?* *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1992. **87 Suppl 3**: p. 229-34.
41. Nebie, I., et al., *Humoral responses to Plasmodium falciparum blood-stage antigens and association with incidence of clinical malaria in children living in an area of seasonal malaria transmission in Burkina Faso, West Africa*. *Infect Immun*, 2008. **76**(2): p. 759-66.
42. Perlmann, P. and M. Troye-Blomberg, *Malaria blood-stage infection and its control by the immune system*. *Folia Biol (Praha)*, 2000. **46**(6): p. 210-8.
43. Schreiber, V., et al., *Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. **7**(7): p. 517-28.

44. Richards, J.S., et al., *Identification and prioritization of merozoite antigens as targets of protective human immunity to Plasmodium falciparum malaria for vaccine and biomarker development*. J Immunol, 2013. **191**(2): p. 795-809.
45. Cutts, J.C., et al., *Immunological markers of Plasmodium vivax exposure and immunity: a systematic review and meta-analysis*. BMC Med, 2014. **12**: p. 150.
46. Beeson, J.G., F.H. Osier, and C.R. Engwerda, *Recent insights into humoral and cellular immune responses against malaria*. Trends Parasitol, 2008. **24**(12): p. 578-84.
47. Chan, J.A., et al., *Targets of antibodies against Plasmodium falciparum-infected erythrocytes in malaria immunity*. J Clin Invest, 2012. **122**(9): p. 3227-38.
48. Crompton, P.D., et al., *Sickle cell trait is associated with a delayed onset of malaria: implications for time-to-event analysis in clinical studies of malaria*. J Infect Dis, 2008. **198**(9): p. 1265-75.
49. Chan, J.A., F.J. Fowkes, and J.G. Beeson, *Surface antigens of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes as immune targets and malaria vaccine candidates*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(19): p. 3633-57.
50. Fowkes, F.J., et al., *The relationship between anti-merozoite antibodies and incidence of Plasmodium falciparum malaria: A systematic review and meta-analysis*. PLoS Med, 2010. **7**(1): p. e1000218.
51. Tran, E., et al., *Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer*. Science, 2014. **344**(6184): p. 641-5.
52. Joos, C., et al., *Clinical protection from falciparum malaria correlates with neutrophil respiratory bursts induced by merozoites opsonized with human serum antibodies*. PLoS One, 2010. **5**(3): p. e9871.
53. Villard, V., et al., *Rapid identification of malaria vaccine candidates based on alpha-helical coiled coil protein motif*. PLoS One, 2007. **2**(7): p. e645.
54. Olugbile, S., et al., *Vaccine potentials of an intrinsically unstructured fragment derived from the blood stage-associated Plasmodium falciparum protein PFF0165c*. Infect Immun, 2009. **77**(12): p. 5701-9.
55. Céspedes, N., et al., *Plasmodium vivax Antigen Discovery Based on Alpha-Helical Coiled Coil Protein Motif*. PLOS ONE, 2014. **9**(6): p. e100440.
56. Lupas, A., M. Van Dyke, and J. Stock, *Predicting coiled coils from protein sequences*. Science, 1991. **252**(5009): p. 1162-4.
57. Balam, S., et al., *Plasmodium falciparum merozoite surface protein 2: epitope mapping and fine specificity of human antibody response against non-polymorphic domains*. Malar J, 2014. **13**: p. 510.
58. Alonso, P.L., et al., *A research agenda to underpin malaria eradication*. PLoS Med, 2011. **8**(1): p. e1000406.
59. Alonso, P.L. and M. Tanner, *Public health challenges and prospects for malaria control and elimination*. Nat Med, 2013. **19**(2): p. 150-5.
60. Delves, M.J., et al., *Routine in vitro culture of P. falciparum gametocytes to evaluate novel transmission-blocking interventions*. Nat Protoc, 2016. **11**(9): p. 1668-80.
61. MAIGA, I., *Réactivité des antigènes LR253, LR186, M4 et Pf27 du Plasmodium falciparum avec les sérums de Dangassa et de Koïla, deux zones rurales d'endémie palustre au Mali*, in *Faculte de medecine et odonto-stomalogie du Mali*. 2023, USTTB.
62. Sharma, S. and M.K. Bhattacharyya, *Novel putative protective antigens of Plasmodium falciparum*. Indian J Med Res, 1997. **106**: p. 63-9.
63. Ndour, P.A., et al., *Plasmodium falciparum clearance is rapid and pitting independent in immune Malian children treated with artesunate for malaria*. J Infect Dis, 2015. **211**(2): p. 290-7.
64. Boistelle, A., *Piercing dangers*. Br Dent J, 2000. **189**(3): p. 126.
65. Trager, W. and J.B. Jensen, *Human malaria parasites in continuous culture*. Science, 1976. **193**(4254): p. 673-5.

9. Annexes

Mode opératoire standardisé de la technique d'ELISA :

Le principe : Cette technique est basée sur la détection et la qualification de la réaction antigène-anticorps dans un échantillon biologique.

Matériels et réactifs :

Procédure : Les étapes de l'ELISA indirect pour la détermination du taux d'anticorps dans les échantillons de sérum lors de cette étude sont :

- sensibiliser la plaque d'ELISA (plaque 96 puits) avec les antigènes (LR253, LR186, M4 et Pf27) à une concentration de 5µg/ml et incuber à +4°C pendant la nuit ;
- laver la plaque à 4 reprises avec la solution de lavage PBS-T (Phosphate Buffered Saline with tween®20) ;
- bloquer la plaque avec la solution PBS-T+5% de lait (200µl/puit) puis incuber pendant 2 heures à température ambiante ;
- vider les puits et ajouter 50µl des échantillons de sérum dilués à 1/50 dans une solution de PBS-T + 2,5% de lait puis incuber la plaque pendant 1 heure à température ambiante ;
- laver la plaque à 4 reprises et ajouter dans les puits 50µl d'anticorps secondaire dilué à 1/1000 dans la solution de PBS-T+ 2,5% de lait puis incuber la plaque pendant 1 heure à température ambiante ;
- laver à quatre reprises les plaques et ajouter 50µl du substrat (peroxydase) dans chaque puit pendant 15 minutes à l'abri de la lumière. Ajouter ensuite 50µl de solution stop de peroxydase pour stopper la réaction (Dodecyl sulfate de sodium(seracare™)) ;
- la lecture de la réaction était ensuite effectuée avec ELISA SoftMax®Pro software à une Densité Optique (DO) 405nm.

Matériels de culture *in vitro* de *P. falciparum*

Le matériel utilisé dans la culture étaient des consommables à usage unique, des équipements durables et des organismes vivants (parasite et globule rouge).

Equipements de base du laboratoire

La chaîne de froid (+4°C, -20°C et -80°C) était nécessaire pour la conservation des milieux de culture, des globules rouges et des souches de parasite et des sérums.

Le bain marie était constamment à 37°C pour la décongélation du parasite et aussi le maintien de la température du milieu de culture.

L'incubateur était réglé à 37°C, pour donner une atmosphère composée de 5% de CO₂ et le taux d'humidité maintenu à 80%.

La hotte à flux laminaire était utilisée pour la préparation des différents milieux de culture et la culture parasitaire dans des conditions stériles. La surface de travail était débarrassée du matériel utilisé et nettoyée avec alcool de 70° avant et après usage.

Souches de parasite utilisées

Nous avons utilisé la souche de parasite 3D7 stocké dans le congélateur de -80°C de notre laboratoire.

Collecte des globules rouges de culture

Les globules rouges étaient prélevés chez des volontaires après obtention de leur consentement libre et éclairé. Le génotypage des globules rouges a été réalisé en utilisant la technique de chromatographie liquide de haute performance (HPLC) avec la machine D-10® de Bio-Rad.

Préparation du milieu de culture

Les milieux de culture classiques à base d'AlbuMax II™ (Catalogue # [64], Thermo Fisher Scientific) ont été employés. Le milieu de culture « incomplet » (MCI) composé de RPMI 1640 (Gibco BRL), de 5,4 g/l de HEPES (Calbiochem, CA), 0,5 g/l d'hypoxanthine (Sigma, MO) était préparé et conservé à 4°C. Un milieu de culture « complet » (MCC) était préparé en ajoutant au MCI 2,5% d'AlbuMaxII™, 25 mM de bicarbonate de sodium (Biofluids, MD) et 0,01 % de gentamicine (Sigma, MO). Un milieu de culture qui ne contenait pas d'AlbuMaxII™ qui sera remplacé par le sérum humain à 10%. Tous les milieux de culture étaient rendus stériles par filtration (Nalgene Filterware, Fisher Scientific, Pittsburgh) et conservés en aligots à 4°C maximum une semaine avant usage.

Décongélation et congélation du parasite

La congélation se réalisait avec le glycérol, les Cryo-tubes étaient identifiés et stockés dans le frigo à -80°C. Elle permettait de constituer une réserve de souches toujours disponibles et de stocker les excédents de culture. A la congélation, il est important d'utiliser de faibles d'hématies parasitées 5% et de volumes entre 0,5-1 ml pour éviter l'hémolyse. Comme les formes en anneau survivent au mieux lors de la congélation. Il est donc préférable mais non indispensable de congeler une culture riche en stades en anneau, De même une décongélation rapide est nécessaire pour réduire le phénomène d'hémolyse. Elle avait lieu suivant la technique décrite dans l'annexe dans le bain marie et de lavage successif avec le RPMI 1640 incomplet (Gibco BRL) pour éviter les résidus de glycérol dans la culture.

Préparation des hématies non parasité

Le sang était prélevé chez les volontaires au laboratoire d'Immunogénétique et parasitologie, et il était lavé 3 fois successive avec le RPMI incomplet pour éliminer le sérum. Les hématies étaient diluées avec le RPMI incomplet à 50% et conservées à une température de 4°C avant l'utilisation.

Culture de *plasmodium falciparum*

Le principe repose sur la technique de base décrite en premier par Trager et Jensen (1977)[65], Ce principe a marqué l'histoire de la recherche en paludologie. Par la suite, de nouvelles techniques de culture ont été développées pour améliorer le maintien en culture des isolats de *P. falciparum* afin de produire plus de matériels parasitaires. La culture était effectuée dans les Flaks de 150ml à 37°C, dans un incubateur réglé pour donner une atmosphère composée de 5% de CO₂, avec un taux d'humidité maintenu à 80%. Un suivi quotidien était effectué pour changer le milieu de culture et noté l'aspect qualitatif et quantitatif des hématies parasitées.

En pratique, le changement de milieu s'effectue après réchauffement à 37°C, en inclinant légèrement le Flaks et en aspirant le milieu surnageant. La lecture quotidienne d'un frottis mince coloré effectué sur chaque Flaks de culture permettait d'évaluer la croissance parasitaire. Les paramètres d'appréciation étaient l'intégrité morphologique, la densité parasitaire et l'index de multiplication.

Comptage de parasites

Pour apprécier la vitalité de la culture, la parasitémie était déterminée au microscope à l'immersion au grossissement x100. Après avoir changé le milieu nutritif, une goutte du mélange était prélevée du fond de Flaks de culture et déposée sur une lame pour effectuer un frottis dans l'annexe. On comptait le nombre d'hématies parasitées, non parasitées et les différents stades du parasite par champs et on dénombre par champs.

Puis le résultat est exprimé en pourcentage. Il s'agit ici d'établir une parasitémie différentielle : sur les hématies parasitées, on dénombre les trophozoïtes, les schizontes.

Test d'inhibition de la multiplication de *P. falciparum* par les sérums *in vitro*

Après synchronisation de l'état de développement des parasites en culture (3D7wt) avec du sorbitol 5% enfin d'avoir la morphologie souhaitée aux stades rings lors de la culture et du suivie quotidien et en suite on a effectué les expériences à une parasitémie de 1% et le taux d'hématocrite à 2%. Les expériences ont été faites dans les plaques de 96 puits, deux plaques ont été utilisés pour chaque série de sérums qui faisait cinq sérums et pour chaque Times pointe à savoir 48h et 96h incubation. On a

utilisé des sérums à 10% la forte concentration dans les cinq premiers puits de la plaque en position vertical dont RPMI utilisé était sans Albumax pour chaque sérum utilisé après une série de dilution d'un 1/2 jusqu'à 1/32 dans les puits suivants les cinq premières ou ils contenaient de RPMI avec de l'Albumax, ensuite on a mis des contrôles positifs avec du sang infectés (RBCi) et contrôles négatifs avec du sang normal (RBCs) normales. Ainsi le volume final de 120ul de préparation dans chaque puit est incubé à 37°C dans un incubateur avec 5% CO2. A chaque time pointe on centrifuge les plaques et enlever le surnageant pour ensuite les colorés avec du mitotracker et du Syber-green et les incubés pendant 1heure de temps, après on procède au lavage trois fois successifs avec la solution de lavage (voir annexe) et qui seront acheminer par une lecture au flow.

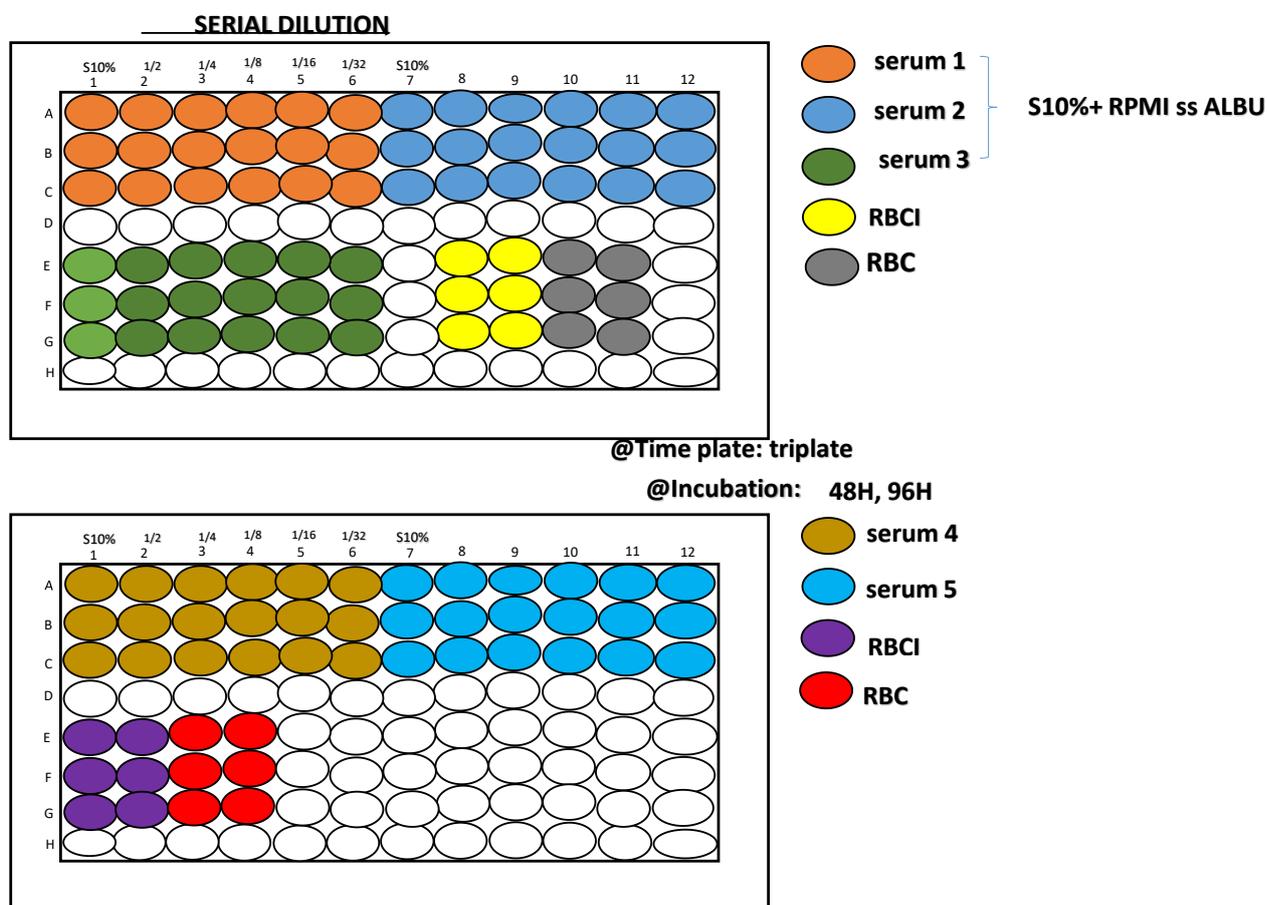


Figure 15. Maps pour l'expérience des sérums sur des parasites infectés

Détermination de la CI₅₀ des sérums

Le cymomètre en flux BD ACCURI C6 flow cytometer (numéro de série : 2901) a été utilisé pour déterminer le taux de survie des parasites à une série de dilution des différents sérums comme indiqué dans le Maps. Le logiciel GraphPad Prism version 8 a été utilisé pour : 1) l'analyse des données, 2) la prédiction des concentrations inhibitrices à 50 % (CI₅₀).

Test *in vitro* des sérums en association avec du Dihydroartémisinine sur la multiplication des parasites :

L'impact du taux d'anticorps sur CI_{50} du Dihydroartémisinine (DHA) a été mesurer suite de la suspension globulaire à une parasitémie de 1% et un taux d'hématocrite de 2% contenant CI_{50} du DHA avec un volume total de 180ul dans les premiers puits de la plaque en duplicate et ensuite diluer à 1/3 de la position verticale contenant une concentration équimolaire de la première plus une concentration fixe des sérums à 10% qui a remplacé l'albumax, des contrôles ont été faites, un contrôle de CI_{50} du DHA avec de RPMI complet , un contrôle positif avec du sang infecté et un contrôle négatif avec de sang normal qui étaient en duplicate.

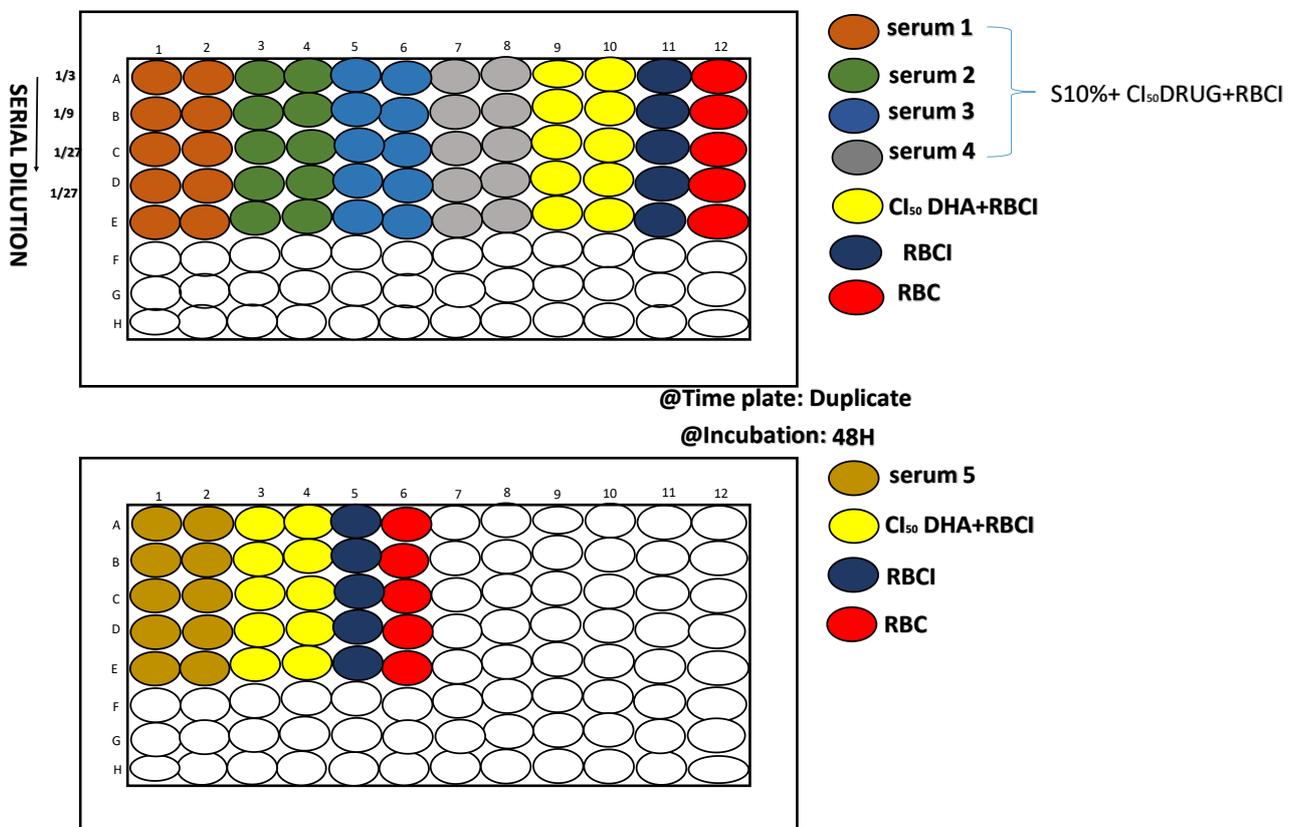


Figure 16. Maps pour l'expérience du médicament en association avec les sérums

Fiche signalétique :**Auteur :** TRAORE Issa**Téléphone :** +223 76124903**Adresse email :** itraore82595@gmail.com/issa-a.traore@icermali.org**TITRE :** Influence des facteurs sériques humains sur l'activité inhibitrice de multiplication de *Plasmodium falciparum* des molécules antipaludiques *In Vitro***Année universitaire :** 2023-2024**Ville de soutenance :** Bamako**Pays d'origine :** Mali**Lieu de dépôt :** Bibliothèque de la faculté de Médecine et d'Odontostomatologie (FMOS) et La Faculté de pharmacie (FAPH).**Secteur d'intérêt :** Immunologie, Parasitologie**Résumé**

La culture et le test *in vitro* et *ex-vivo* de *P. falciparum* a facilité la recherche active sur le parasite du paludisme en vue de la recherche de connaissances fondamentales et de la découverte de traitements médicamenteux efficaces. Une telle méthode de culture et d'essais de médicament ne prenant en compte des aspects immunologiques s'avère donc une approche bénéfique durant le développement des médicaments. Ici, nous avons évalué *in vitro* l'influence des facteurs sériques humains sur l'activité inhibitrice de multiplication de *Plasmodium falciparum* en présence d'une molécule antipaludique. Nous avons effectué une étude expérimentale *in vitro* pour mesurer l'effet d'inhibition de la multiplication de *P. falciparum* d'une molécule anti paludique et des sérums collectés chez les sujets vivants dans des zones endémiques de paludisme. Les inhibitions étaient plus importantes à 48 heures avec les sérums de Koïla alors qu'elles étaient similaires à 48 heures et à 96 heures avec ceux de Dangassa. De façon générale, Nos résultats n'ont montré aucune corrélation entre les titres d'anticorps et l'inhibition. Certains sérums de Koïla ont boosté l'inhibition de la multiplication de *P. falciparum* par la DHA, tandis que d'autres l'ont réduit . En revanche, les sérums de Dangassa ont montré une interaction plus uniforme avec la DHA, seul un sérum réduisant légèrement son efficacité.

Mots clés : *P. falciparum*, Antigènes, Anticorps, Enfants, Mali

Summary

The in vitro and ex-vivo culture and testing of *P. falciparum* has facilitated active research into the malaria parasite with a view to gaining fundamental knowledge and discovering effective drug treatments. Such a method of drug cultivation and testing that does not take immunological aspects into account is therefore proving to be a beneficial approach during drug development. Here, we evaluated in vitro the influence of human serum factors on the multiplication inhibitory activity of *Plasmodium falciparum* in the presence of an antimalarial molecule. We carried out an experimental in vitro study to measure the inhibitory effect on *P. falciparum* multiplication of an anti-malarial molecule and sera collected from subjects living in malaria-endemic areas. Inhibition was greatest at 48 hours with Koïla sera, whereas it was similar at 48 hours and 96 hours with Dangassa sera. Some Koïla sera boosted the inhibition of *P. falciparum* multiplication by DHA, while others reduced it. In contrast, Dangassa sera showed a more uniform interaction with DHA, with only one serum slightly reducing its efficacy.

Key words: *P. falciparum*, Antigens, Antibodies, Children, Mali

SERMENT DE GALIEN

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

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

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

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

En aucun cas, je ne 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 couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.

Je le jure !