



## Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako



### Faculté de Médecine et d'odontostomatologie

Année universitaire : 2017- 2018

Thèse N

## THESE

# EFFET DE L'ARTESUNATE-AMODIAQUINE SUR DES CELLULES T GAMMA DELTA AU COURS D'UN ESSAI VACCINAL ANTIPALUDIQUE, MALI.

Présentée et soutenue publiquement le 10/12/ 2018 devant le jury de la Faculté de  
Médecine et d'odontostomatologie

**Par: Mr Boubacar DEMBELE**

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

### JURY :

---

**Président: Pr Sékou Fantamady TRAORE**

**Membre : Dr Charles ARAMA**

**Co-directeur: Dr Mahamadou S. SISSOKO**

**Directeur: Pr Amagana DOLO**

---

## **DEDICACES**

**Au nom d'ALLAH,  
Je dédie ce travail,**

**A ma mère**

Aucun mot de ce monde ne saurait exprimer l'immense amour et la fierté que je te porte, ni la profonde gratitude que je te dois à vie pour les efforts et sacrifices consentis pour mon épanouissement et mon bien être.

Merci pour tes conseils, tes prières

Merci maman, merci encore...

Reçois l'expression de mon amour pour toi à travers ce travail.

**A la mémoire de mon père feu Dounanké DEMBELE**

Sans relâche avec corps et âme, tu as fait de l'éducation de tes enfants, ton cheval de bataille. Homme d'exception, source d'admiration et exemple parmi les exemples.

Mon souhait était de partager avec toi cet instant de joie et de bonheur symbole du couronnement d'un de tes rêves.

Tu as été et resteras pour nous un modèle.

Merci pour l'éducation que tu nous as donnée. Je suis fier de t'avoir eu comme père.

Puisse ton exemple nous inspirer tout au long de notre existence.

**A la mémoire de mon frère Ousmane DEMBELE**

**A la mémoire du Professeur Ogobara K. DOUMBO**

Puissent vos âmes reposent en paix dans la grâce d'ALLAH

## **A mes frères et sœurs Mahamadou, Oumar et Fatoumata**

Dans la joie et la peine nous avons serré les coudes, dans la facilité et la difficulté comme un seul homme nous avons surmonté toutes les barrières ; tout l'or et tout l'argent du monde ne sauraient récompenser votre amour et soutien à mon égard, je vous exhorte davantage à l'union sacrée et à la solidarité comme l'a toujours prônée papa

Puissent l'amour et la fraternité nous unir à jamais et le Miséricordieux nous protéger du mal et nous procurer santé et longévité dans une vie couronnée de bonheur, Amine !

## **A ma femme**

### **Korotoumou Cissé**

### **A mes enfants : Awa et Nènè**

Pour la joie que vous m'apportez quotidiennement. Qu'ALLAH nous donne longévité dans la santé et le bonheur !

## REMERCIEMENTS

Nous adressons nos sincères remerciements à :

### **Mon cher pays le MALI :**

Tu fus quand d'autres n'étaient pas! Pays de paix et d'hospitalité! Merci pour l'éducation reçue ! Merci pour la formation reçue ; je te promets d'être le digne fils qui portera haut le flambeau qui illuminera le chemin de ton bonheur éternel !

Puisse **Dieu** faire en sorte que tu retrouves ton rayonnement et ta grandeur d'antan !

A Mr Bougou DEMBELE et toute sa famille à Niamakoro pour l'hospitalité.

A tous mes frères et sœurs cousins et cousines !

Les familles DEMBELE à Kalaban, Sénou, Bolibana, Moribabougou, Badialan, San et Niono.

La famille FOFANA à Sébénikoro

Les familles COULIBALY et TOURE à Niono.

La famille SACKO à San.

Dr Adama SACKO, Merci grand frère pour l'accueil et l'assistance à la faculté.

Dr Seyba Mohamed KANE et sa famille à Bamako.

Dr Mahamadou SOKONA, Merci pour tout !

Dr Moctar COULIBALY, Dr Lassina TRAORE.

### **Mes amis de San :**

Assey M T HAIDARA, Mamadou Tidiane SANOGO, Mamadou Kampaga SANOGO, Abdoulaye KANE.

### **Les camarades du Lycée de San :**

Abdoulaye KANE, Abdourahmane THIERO, Dr Aimé Paul Dackouo, Dr Amadou Boro, Dr Dramane Métaga COULIBALY, Henriette DIARRA, Dr Daouda SANKHARE, Dr Moustaph DAOU

### **Mes amis à la Faculté :**

Dr Dramane Métaga COULIBALY, Soumaila CAMARA « Commandant », Dr Binamara DIAKITE, Dr Daouda SANKHARE, Dr Amadou BORO, Dr Joseph KONE, DIALLO Aïcha Abebi DIAWARA, Amadou BAMBBA, Dr Nampa DANSOGO, Dr Sékou LANDOURE, Dr Sidiki KAMISSOKO, Dr Issa TRAORE, Dr Amadou KONE « Neveu », Dr Aboubacar SIA, Dr Hamidou CISSE, Salif THIAM, Dr Marie Laure Keita, Dr Attaher MAIGA

A la cour Massa SIDIBE de Point G spécialement à Mr Mohamed KONE, sa femme Aïssata TOURE, les enfants Hindou, Souleymane

### **Mes Amis à Niamakoro:**

Mohamed KEITA, Ali DAOU, Sidi DIARA, Dramane TRAORE, Boua KONATE, Karim FANE, Mamoutou MARIKO

Ma belle-famille : les familles CISSE à Niamakoro, Kanadjiguila

### **Au personnel du laboratoire d'Immunologie/LMIV**

Dr Karamoko I NIARE et Dr Fanta KOITA, pour l'accueil et l'initiation au labo merci pour tout !

Dr Agnès GUINDO

Kadidia Baba CISSE, Dr Kalifa DIARRA, Barasse COULIBALY, Aly TOGORA Amara CISSE, Mamoutou YATTOURA

### **Au personnel du laboratoire d'Immuno-Epi/LMIV**

Dr Oumar Attaher, Merci pour tout !

Dr Almahamoudou MAHAMAR, Adama DEMBELE, Youssoufa DICKO, Sidi Mohamed NIAMBELE, Ahmadou YOUSSEUF

**Au personnel du laboratoire Cap-Lab**

**Aux thésards de MRTC :**

Balla DIARRA, Sidiki PEROU, Sidi Mohamed NIAMBELE, Barasse  
COULIBALY, Ahmadou Youssouf, Alkaly DOUMBIA, Modibo TRAORE,  
Adama OUATTARA, Abdoulaye DJIGUIBA, Seydou SANKARE, Sadio Koni  
DIARRA

**A l'association en santé des étudiants du cercle de San et  
sympathisants « ASECSS »**

A la promotion **Ogobara DOUMBO** de la Faculté de Médecine et  
d'Odontostomatologie, **FMOS**.

## ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AQ	Amodiaquine
AS	Artesunate
AT	Artemether
ATP	Antipaludique
BD	Becton Dickinson
BPC	Bonnes pratiques cliniques
BPL	Bonnes pratiques de laboratoire
CD	Cluster de Différenciation
CDC	Centre pour le contrôle de la maladie et Prévention
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CGP	Comité de gestion du projet
CPS	Chimioprévention du paludisme saisonnier
CCMH	Concentration corpusculaire moyen en hémoglobine
cm	centimètre
Cr	Créatinine
CRF	Cahier d'observation (Case Report Form)
CRP	Protéine C-réactive
CTA	Combinaison thérapeutique à base d'artémisinine
DEAP	Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires
dl	décilitre
Dhfr	Dihydrofolate réductase
DO	Densité optique
ECG	Electrocardiogramme
EDSM	Enquête démographique et de la santé du Mali
EDTA	Ethylène diamine tétra acétique

ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FBH	Fièvre bilieuse hémoglobinurique
Fe <sup>++</sup>	Fer ferreux
Fe <sup>+++</sup>	Fer ferrique
fl	flacon litre
FOXP 3	Fork head box P3
FM	Frottis mince
g	gramme
gd	gamma delta
GE	Goutte épaisse
GR	Globule rouge
GPI	Glycosilphosphatidylinositol
G6PD	Glucose-6-phosphate deshydrogenase
H	Heure
Hb	Hémoglobine
H <sub>2</sub> O	Eau
H/F	Homme/Femme
HPRII	Histidine Rich Protein II
Ht	Hématocrite
IMEP	Immuno-épidémiologie
ID	Numéro d'identification
IgG	Immunoglobuline G
IM	Intramusculaire
IR	Intra rectale
J	Jour
Kg	Kilogramme
Km	Kilomètre
l	litre
LDH	Lactate Deshydrogenase

LU	Luméfantine
LMIV	Laboratory of malaria immunology and vaccinology
LT	Lymphocyte T
Ltd	Limited company
MAIT	Lymphocytes invariants associés aux muqueuses
MII	Moustiquaires imprégnées d'insecticides
MRTC	Malaria Research and Training Center
MSP1	Merozoite de surface protéine 1
mol	mole
MF	Méfloquine
mg	Milligramme
mm	Millimètre
mn	Minute
Na Cl	Chlorure de sodium
nm	Nanomètre
NIH	Instituts Nationaux de Santé des Etats Unis d'Amérique
NK	Natural killer
O K T	Nom générique d'une classe d'anticorps monoclonaux
OMD	Objectifs du millénaire pour le développement
OMS	Organisation mondiale de la Santé
OptiMAL-IT	OptiMAL Individual Test
PBS	Phosphatase bovine serum
PCR	Polymerase chain reaction
Pfcr1	Plasmodium falciparum chloroquine résistance transporté
pfmdr1	Plasmodium falciparum résistant à de multiples médicaments
PID	Pulvérisation intra domiciliaire
PMI	Initiative du président américain pour la lutte contre le paludisme
PNLP	Programme national de lutte contre le paludisme

Pf HPR2	Plasmodium falciparum Histidine rich proteine 2
pLDH	Lactate Deshydrogenase plasmodiale
PfAMA1	Antigène de la membrane apicale du Plasmodium falciparum
P. falciparum	Plasmodium falciparum
P. malariae	Plasmodium malariae
P. ovale	Plasmodium ovale
P. vivax	Plasmodium vivax
pg	Pictogramme
POS	Procédures opératoires standardisées
QBC	Quantitative Buffy Coat
RGPH	Recensement Général de la Population et de l'Habitat
SOTELMA	Société des télécommunications du Mali
SP	Sulfadoxine – pyrimethamine
TCR	Récepteur de cellules T
TDR	Test de diagnostic rapide
TLR	Toll like receptor
TCMH	Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine
Tf	Trophozoïte de Plasmodium falciparum
TNF	Tumor necrosis factor
TCD4+	Lymphocytes T auxiliaire
TCD8+	Lymphocyte T cytotoxique
TRAIL	Tumor-necrosis-factor related inducing ligand
T reg	Lymphocytes T régulateur
TBS	Tris buffered saline
UNICEF	Fonds des nations unies pour l'enfance
USAID	Agence internationale des Etats Unis pour le développement
VGM	Volume globulaire moyen
VH B	virus de l'hépatite B
VH C	virus de l'hépatite C

VIH	virus de l'immunodéficience humaine
°C	Degré celsius
%	Pourcent
µg	Microgramme
µl	Microlitre
µmol	Micromole

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I :</b> Comparaison entre les cellules gamma delta et les cellules alpha beta....	28
<b>Tableau II :</b> Distribution normale des cellules T $\gamma$ $\delta$ .....	32
<b>Tableau III :</b> Pourcentage des cellules T $\gamma$ $\delta$ parmi les lymphocytes T au cours de l'infection à <i>Plasmodium falciparum</i> .....	33
<b>Tableau IV:</b> Répartition des participants par sexe et par groupe de traitement.....	54
<b>Tableau V:</b> Répartition des participants par tranche d'âge et par groupe de traitement.....	55
<b>Tableau VI:</b> Moyenne d'âge des participants par groupe de traitement.....	55
<b>Tableau VII:</b> Répartition des infections palustres par groupe de traitement après administration de la première dose de vaccin.....	56
<b>Tableau VIII:</b> Répartition des infections palustres par groupe de traitement après administration de la troisième dose de vaccin.....	56
<b>Tableau IX:</b> Moyenne de $\gamma$ $\delta$ T des participants par groupe de traitement après administration de la première dose de vaccin.....	57
<b>Tableau X:</b> Moyenne des cellules $\gamma$ $\delta$ T des participants par groupe de traitement après administration de la troisième dose de vaccin. ....	57

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Cycle de développement du Plasmodium... ..	11
<b>Figure2:</b> Test de dépistage optimal pour falciparum.....	17
<b>Figure3 :</b> Structure du lymphocyte T.....	25
<b>Figure 4:</b> Réponse immunitaire innée et adaptative.....	29
<b>Figure 5:</b> Représentation du TCR de la cellule T gamma delta .....	30
<b>Figure 6:</b> Fonctions des cellules T gamma-delta.....	35
<b>Figure 7 :</b> Localisation du site d'étude.....	40
<b>Figure 8 :</b> Plan du village de Donéguébougou.....	41
<b>Figure 9 :</b> Technique du frottis mince.....	47
<b>Figure 10 :</b> Technique de la goutte épaisse.....	50
<b>Figure 11:</b> BD LSR II flow cytometer .....	52
<b>Figure 12 :</b> Stratégie d'analyse d'expression des cellules $\gamma \delta$ sur les cellules T.....	52

# HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

## A NOTRE MAITRE ET PRÉSIDENT DU JURY

### **Pr SÉKOU FANTAMADY TRAORE**

- **Professeur Titulaire en Entomologie Médicale**
- **Responsable du Cours de Biologie à la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie, (FMOS) et à la Faculté de Pharmacie (FAPH)**
- **Co-Directeur du Malaria Research and Training Center (MRTC)**

*Cher Maître, permettez-nous de vous remercier de la confiance que vous nous avez faite en acceptant de présider ce jury. Nous avons beaucoup admiré vos immenses qualités humaines, sociales et scientifiques tout au long de ce travail.*

*Votre simplicité, votre disponibilité, votre rigueur font de vous un maître apprécié de tous. Trouvez ici, cher maître l'expression de notre profonde gratitude et de notre indéfectible disponibilité.*

## **A NOTRE MAITRE ET JUGE**

### **Dr CHARLES ARAMA**

- **Pharmacien et Chargé de recherche au MRTC/DEAP**
- **Ph D en Immunologie**
- **Maitre-assistant à la Faculté de Pharmacie**

*Cher maître, nous ressentons une vive émotion et une grande satisfaction en vous comptant parmi les membres de ce jury. Votre abord facile, votre esprit critique, votre objectivité ont largement contribué à renforcer la qualité de ce travail. Ce qui nous honore et nous permet d'apprécier la grandeur de votre personnalité. Permettez-nous cher maître de vous exprimer nos sincères remerciements et nos sentiments respectueux.*

## **A NOTRE MAITRE ET CO DIRECTEUR DE THÈSE**

### **Dr MAHAMADOU SOUMANA SISSOKO**

- **Médecin Chercheur à la la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie (FMOS) et à la Faculté de pharmacie (FAPH).**
- **Directeur adjoint du MRTC Parasito/DEAP/FMOS/FAPH**
- **Coordinateur pédagogique du cours supérieur d'épidémiologie pour cadres supérieurs de la santé en Afrique.**

*Cher maître, vous nous avez fait un grand honneur en acceptant d'être le co-directeur de cette thèse. Nous avons été fascinés par votre accueil chaleureux, votre modestie et votre gentillesse. Votre rigueur dans la démarche scientifique, associée à vos valeurs humaines nous ont profondément marqué. Votre précieux encadrement a contribué à l'élaboration de cette thèse et nous vous présentons nos sincères remerciements. Soyez rassuré cher maître de notre profonde reconnaissance.*

## **A NOTRE MAITRE ET DIRECTEUR DE THESE**

### **Pr AMAGANA DOLO**

- **Professeur titulaire de Parasitologie-Mycologie à la Faculté de Pharmacie (FAPH).**
- **Directeur De l'Ecole Doctorale Des Sciences Et Des Technologies Du MALI (EDSTM)**
- **Enseignant-chercheur à la Faculté de Pharmacie (FAPH).**

*Cher maitre, la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de diriger cette thèse malgré vos multiples occupations nous a marqué. Nous avons eu le plaisir de vous connaître et, ainsi, nous avons pu apprécier l'homme que vous êtes : modeste, rigoureux, simple, aimable. Votre humanisme, votre sens de l'écoute et votre amour pour le travail bien fait font de vous un exemple pour nous.*

# TABLE DES MATIERES

<b>I. INTRODUCTION</b> .....	20
<b>II. OBJECTIFS</b> .....	6
1. Objectif général .....	23
2. Objectifs spécifiques .....	23
<b>III. GENERALITES</b> .....	7
1. Rappel sur le paludisme.....	24
1.1. Définition.....	24
1.2. Epidémiologie .....	24
1.3. Cycle des plasmodies .....	26
1.3. Physiopathologie du paludisme .....	29
1.5. Diagnostic parasitologique .....	31
1.6. Traitement .....	35
2. Vaccins antipaludiques.....	40
Types de vaccins antipaludiques .....	40
3. Lymphocytes T.....	42
3.1. Morphologie .....	42
3.2. Types de lymphocytes T.....	43
<b>4. METHODOLOGIE</b> .....	55
1. Lieu d'étude.....	55
1.1. Historique .....	55
1.2. Relief .....	55
1.3. Climat, flore et faune.....	55
1.4. Hydrographie.....	56
1.5. Population.....	56
1.6 Infrastructures socio-sanitaires .....	57
2. Type d'étude.....	60
3. Période d'étude.....	60
4. Population d'étude.....	60
5. Critères d'inclusion et de non inclusion .....	60
5.1. Critères d'inclusion .....	60

6. Organisation générale du travail.....	61
7. Critères de jugement de l'étude.....	63
8. Taille de l'échantillon.....	63
9. Enrôlement et recrutement des participants .....	63
10. Techniques de mesure des variables.....	64
10.1. Variables démographiques .....	64
10.2. Variables biologiques .....	64
11. Collecte, saisie et analyse des données.....	71
12. Considération éthique.....	71
<b>V. RESULTATS .....</b>	<b>72</b>
1. Résultats globaux .....	72
2. Caractéristiques démographiques des participants de l'étude. ....	72
3. Impact de la prise de l'ASAQ sur l'incidence du paludisme chez les participants. ....	74
4. Expression de gamma delta TCR sur les cellules T. ....	75
1. Sur le plan de la méthodologie .....	76
2. Sur le plan des résultats .....	76
2.1. Caractéristiques sociodémographiques.....	76
2.2. Infection palustre.....	77
2.3. Proportion des cellules T gamma delta ( $\gamma \delta$ ) du sang périphérique des volontaires.....	77
3. Les limites de l'étude .....	79
<b>VII. CONCLUSION.....</b>	<b>80</b>
<b>IX. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>82</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>96</b>

# I. INTRODUCTION

Le paludisme, transmis à l'homme par la piqûre infestante du moustique femelle du genre *Anopheles* [1] reste une problématique de nos jours.

En 2015, 3,2 milliards de personnes soit environ près de la moitié de la population mondiale étaient exposées au risque de contracter le paludisme [2]. La plupart des cas de paludisme et des décès dus à cette maladie surviennent en Afrique subsaharienne. Toutefois, l'Asie, l'Amérique latine et, dans une moindre mesure, le Moyen-Orient sont également affectés. Au cours de cette même année, 96 pays et territoires étaient confrontés à une transmission continue du paludisme [2].

Certains groupes de la population courent un risque beaucoup plus élevé que d'autres de contracter le paludisme et d'être gravement atteints : les enfants de moins de cinq ans, les femmes enceintes, les personnes porteuses du virus de l'immunodéficience humaine ou atteintes du syndrome de l'immunodéficience acquis.

Selon les estimations de l'OMS, il a été enregistré en 2015, 214 millions de cas de paludisme et 438000 cas de décès [2]. Entre 2000 et 2015 l'incidence du paludisme a reculé de 37% à l'échelle mondiale tandis que le taux de mortalité a baissé de 60%.

L'Afrique subsaharienne reste la région la plus frappée par le paludisme. En 2015, 88% des cas de paludisme et 90% des décès dus à cette maladie sont survenus dans cette région. Dans les régions où la transmission du paludisme est intense, les enfants de moins de cinq ans risquent particulièrement de contracter l'infection, de tomber malades et de mourir. Plus des deux tiers (70%) des décès dus au paludisme surviennent dans cette tranche d'âge. Entre 2000 et 2015 le taux de mortalité chez les enfants de moins de cinq ans a baissé de 65% à l'échelle mondiale, ce qui signifie que 5,9 millions d'enfants environ ont été sauvés [2].

Au Mali le paludisme est responsable de 42% des motifs de consultation dans les services de santé [3]. Le nombre de cas de paludisme recensé dans les formations sanitaires a été estimé à 2111434 en 2012 dont 1465046 cas de paludisme simple et 646.388 cas de paludisme grave avec 1.833 cas de décès [3]. Le paludisme est la première cause de morbidité dans la population générale et de mortalité chez les enfants de moins de 5 ans [3]. La transmission du paludisme au Mali est fortement

saisonnaire et survient essentiellement pendant la saison des pluies qui varie de 3 à 6 mois en fonction des différents faciès épidémiologiques [4].

Au cours des dernières années, la lutte contre le paludisme a reçu un coup de pouce considérable, avec l'aide des grandes organisations de financement proposant son éradication. L'utilisation accrue de plusieurs mesures rentables validées disponibles pour réduire le paludisme telles que les moustiquaires imprégnées d'insecticide (MII), la pulvérisation intra domiciliaire à effet rémanent (PID), la combinaison thérapeutique à base d'artémisinine (CTA) et le traitement préventif intermittent pendant la grossesse (TPI) lors de la dernière décennie a contribué à la baisse récente observée du paludisme clinique dans de nombreuses parties de l'Afrique subsaharienne [5–8].

Cependant, malgré les efforts concertés de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), du Fonds des Nations Unies pour l'Enfance, et de l'initiative Faire Reculer le Paludisme de la Banque Mondiale pour intensifier ces mesures, les estimations du rapport de l'OMS sur le paludisme de 2010 déclarent que seulement 35% des enfants de moins de 5 ans dorment sous des moustiquaires imprégnées d'insecticide, seulement 12% des femmes enceintes reçoivent une deuxième dose du traitement préventif intermittent, la couverture PID reste aussi basse que 10%, et que 25 pays africains offrent encore l'artémisinine en monothérapie, compromettant la durée de vie utile de ce médicament.

En outre, l'OMS estime que 6 milliards de dollars américains par an seraient nécessaires pour maintenir et accroître les efforts de lutte actuelle; toutefois, en 2009, seulement 1,6 milliard de dollars américains étaient disponible [9].

Il est également intéressant de noter que la mortalité imputable au paludisme est restée stable en Afrique de l'Ouest, et a même augmenté en Afrique de l'Est et du Sud tout au long des 2 dernières décennies [10,11].

Prises ensemble, ces données soulèvent des inquiétudes en ce qui concerne l'espoir d'éradiquer le paludisme avec les moyens actuellement disponibles et montrent aussi que celui-ci reste un problème majeur de santé publique. D'où la nécessité évidente voire urgente de développer un vaccin efficace pour éliminer le paludisme.

La conception d'un vaccin contre le paludisme n'est pas simple [12].

Au cours de la dernière décennie, Sanaria, Inc. a développé un nouveau procédé de fabrication pour obtenir des sporozoïtes cryoconservés, aseptiques, purifiés à partir de l'isolat NF54 du *P. falciparum*. Les vaccins Pf SPZ sont produits en élevant des moustiques adultes *A. stephensi* à l'aide des cultures de sang contenant des gamétocytes aseptiques de *P. falciparum*. Au sein de ces moustiques infectés par *P. falciparum*, ces gamétocytes de *P. falciparum* se développent en sporozoïtes. Pour préparer un candidat vaccin à base de Pf SPZ, atténué par irradiation les moustiques sont irradiés à ce stade. Ce produit est appelé le « vaccin Pf SPZ » [13,14]. Les glandes salivaires sont ensuite éliminées par dissection et triturées pour libérer les sporozoïtes. Les sporozoïtes subissent plusieurs étapes de purification, sont comptés, et cryoconservés à une concentration spécifiée. Plusieurs essais cliniques aux États-Unis et à l'étranger ont utilisé le candidat vaccin Pf SPZ livré par inoculation veineuse directe par Sanaria, Inc.

La compréhension des mécanismes immunitaires tant « innés » que « acquis » est très importante pour le développement des candidats vaccins. Les lymphocytes T gamma delta, une sous population des lymphocytes T, joueraient également un rôle important dans l'immunité antipalustre car leur taux augmente au cours de l'infection palustre. Une ample connaissance de ces cellules a sans doute son lot de contribution dans la lutte contre le paludisme.

C'est dans le cadre de l'essai clinique du candidat vaccin Pf SPZ mené à Donéguébougou en 2016 au Mali que nous avons profité pour initier cette étude afin de voir l'effet de deux schémas différents d'administration d'ASAQ sur la fréquence des cellules T gamma delta du sang périphérique.

## **II. OBJECTIFS**

### **1. Objectif général**

Evaluer l'effet du traitement antipaludique (ASAQ) sur l'infection palustre et la fréquence des cellules T gamma delta chez des adultes en bonne santé à Donéguébougou, Mali.

### **2. Objectifs spécifiques**

- Comparer la prévalence du paludisme chez le groupe ayant reçu les 3 doses de traitement antipaludique (3 doses d'ASAQ) et le groupe n'ayant reçu qu'une seule dose de traitement (1 dose d'ASAQ).
- Comparer la fréquence des cellules T gamma delta chez le groupe ayant reçu les 3 doses de traitement antipaludique (3 doses ASAQ) et le groupe n'ayant reçu qu'une seule dose de traitement (1 dose d'ASAQ).

### III. GENERALITES

#### 1. Rappel sur le paludisme

##### 1.1. Définition

Endémie parasitaire majeure, le paludisme (palus = marais) ou malaria (mauvais air) est une érythrocytopathie hémolysante souvent fébrile due à un hématozoaire du genre *Plasmodium*, transmis à l'homme par la femelle d'un moustique du genre *Anopheles*.

Il existe six espèces plasmodiales (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale curtisi*, *Plasmodium ovale wallikeri*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowlesi* et *Plasmodium cynomolgi*) responsables du paludisme chez l'homme, dont *P. falciparum* et *P. vivax* sont les plus dangereux. *P. falciparum* est le plus répandu sur le continent africain. Il est responsable de la plupart des cas mortels dans le monde. *P. vivax* est présent à plus d'endroits que *P. falciparum* et est prédominant en dehors du continent africain.

##### 1.2. Epidémiologie

Le paludisme est présent dans la majeure partie du monde intertropical; mais son impact varie considérablement d'une région à une autre. Cette variation repose sur trois paramètres:

- les modalités de transmission liées à la présence de biotopes favorables aux anophèles et la qualité vectrice des espèces présentes,
- les espèces plasmodiales impliquées,
- les réactions de défense des êtres humains face à la maladie.

L'indice de stabilité du paludisme déterminé par Mc Donald en 1957 caractérise l'enracinement du paludisme dans une zone déterminée. Ainsi il permet de distinguer :

- les zones de paludisme stables où la forte transmission entraîne une prémunition. Celle-ci n'empêche pas les habitants d'être parasités mais limite les manifestations pathologiques aux classes d'âge les plus jeunes tandis que les adultes sont moins touchés.
- les zones de paludisme instable où le caractère épisodique de la transmission ne permet pas le développement de la prémunition; la maladie sévit sous forme d'épidémie meurtrière touchant toutes les classes d'âge.

- entre ces deux extrêmes existe toute une diversité de situations intermédiaires.

### ✓ **Le vecteur**

Plus de 50 espèces d'anophèles assurent la transmission des parasites de manière plus ou moins efficace suivant leur anthropophilie et leur longévité.

Chaque espèce a une aire de distribution bien délimitée dans l'ensemble biogéographique mondial. A l'intérieur de chaque aire de distribution les facteurs climatiques, édaphiques et humains conditionnent la présence des gîtes larvaires, donc de la densité et de la dynamique des populations d'anophèles vecteurs. Les vecteurs du paludisme humain appartiennent tous au genre *Anophèle*. Les espèces rencontrées au Mali sont : le complexe *Anopheles gambiae* sl (*A. gambiae* ss et *A. arabiensis*) et *Anopheles funestus*

### ✓ **Les parasites**

Les parasites (plasmodies) sont des protozoaires appartenant à l'embranchement des sporozoaires, à l'ordre des *Haemosporidae*, à la classe des *Haemosporida*, à la famille des *Plasmodidae*, au genre *Plasmodium*. On distingue cinq espèces plasmodiales inféodées à l'homme: *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax*, *P. knowlesi* et *P. falciparum*. Ce dernier contribue de 85 à 90% de la formule parasitaire, et est responsable des formes létales, graves et compliquées du paludisme au Mali [3].

### ✓ **Indices épidémiologiques**

Ils apprécient la fréquence et la distribution du paludisme au sein d'une population donnée. Ils permettent de définir différents niveaux de transmission et d'endémicité permettant ainsi d'adapter les stratégies de lutte contre le paludisme par rapport au biotope considéré.

### ✓ **Indices chez l'homme**

- Indice plasmodique (IP) : c'est le pourcentage de sujets d'un groupe d'âge donné (2 à 9 ans) porteurs de formes asexuées dans le sang périphérique. Il permet de déterminer le niveau d'endémie. Lorsque la maladie est connue dans la région et que le nombre de cas est attendu compte tenu du lieu, du temps et de la population considérée, on distingue 4 niveaux (pourcentage de la population) [selon la classification de Yaoundé \(Juillet 1962\)](#) : ≤ 25% : hypo-endémie ; de 26 à 50% : méso-endémie ; de 51 à 75% : hyper-endémie ; > 75% : holo-endémie chez les nourrissons de 0 à 11 mois.

- Indice splénique : c'est le pourcentage d'enfants entre 2 et 9 ans présentant une splénomégalie. Cet indice permet le classement en zones d'hypo-endémie (indice splénique  $\leq 10\%$ ), en zones de méso-endémie (indice splénique de 11 à 50 %), en zones d'hyper endémie (indice splénique de 51 à 75 %) et en zones d'holo-endémie (indice splénique  $> 75\%$ ). Il n'est plus utilisé de nos jours.

- Indice gamétocytaire : il représente le pourcentage de sujets porteurs de gamétocytes sanguins. Il indique la capacité d'une population humaine à infester les vecteurs et donc le risque d'infectivité d'une population donnée.

#### ✓ **Indices chez le vecteur**

L'importance du rôle des anophèles dans la transmission est évaluée par trois indices :

- Indice sporozoïtique (IS): c'est le pourcentage d'anophèles porteurs de sporozoïtes dans les glandes salivaires.

- Indice oocystique (IO) : c'est le pourcentage d'anophèles porteurs d'oocystes dans la paroi de leur estomac. Cet indice n'est pas très fiable car l'évolution sporogonique peut avorter après la formation d'oocystes.

- Taux d'inoculation entomologique : le taux d'inoculation entomologique ou TIE représente le nombre de piqûres infestantes pour l'homme et par unité de temps. Cette unité peut être exprimée en nuit, en mois ou en année selon les études entomologiques réalisées.

### **1.3. Cycle des plasmodies**

On distingue deux parties dans ce cycle : une multiplication asexuée qui se déroule chez l'homme et une multiplication sexuée qui se déroule chez l'anophèle femelle.

#### ✓ **Cycle asexué**

Il comprend deux phases :

- **La phase hépatique** : l'homme est contaminé par la piqûre infectante de l'anophèle femelle qui injecte avec sa salive dans le tissu sous-cutané des milliers de parasites sous forme de sporozoïtes. Ces sporozoïtes gagnent le foie en moins de 45 minutes. Au niveau du foie s'effectue une schizogonie hépatocytaire. Des sporozoïtes de *P. vivax* et *P. ovale* peuvent rester quiescents dans les hépatocytes sans se transformer en schizontes (hypnozoïtes). Les schizontes hépatiques grossissent leurs noyaux, se divisent et en une semaine environ, évoluent en schizontes matures contenant quelques

milliers de noyaux (corps bleus). L'éclatement du schizonte hépatique libère de nombreux mérozoïtes qui pour la plupart s'embolisent dans les capillaires sinusoides et passent dans la circulation sanguine amorçant les premières schizogonies sanguines. Cette phase dure en moyenne 6 jours pour *P. falciparum*, 8 jours pour *P. vivax*, 9 jours pour *P. ovale*, et 13 jours pour *P. malariae*.

- **La phase sanguine** : dans le sang s'effectue le cycle érythrocytaire. Les mérozoïtes libérés après l'éclatement des schizontes hépatiques pénètrent dans les hématies hôtes et s'y transforment en trophozoïtes. La multiplication des noyaux dont chacun s'entoure d'une plage cytoplasmique forme un schizonte mûr ou corps en rosace qui en s'éclatant libère de nouveaux mérozoïtes qui vont infecter de nouvelles hématies et le cycle recommence. Après une semaine environ, certains mérozoïtes vont évoluer au stade sexué : les gamétocytes.

✓ **Cycle sexué** : il se passe chez l'anophèle

En prenant son repas sanguin sur une personne infectée, l'anophèle femelle absorbe des gamétocytes qui assurent la poursuite du cycle. Dans l'estomac du moustique les gamétocytes se transforment en gamètes femelle et mâle. La fécondation du gamète femelle par le gamète mâle donne un œuf mobile (ookinete) qui traverse la paroi de l'estomac de l'anophèle et se fixe au niveau de sa face externe formant l'oocyste dans lequel s'individualisent les sporozoïtes. Libérés par l'éclatement de l'oocyste, ces derniers gagnent avec prédilection les glandes salivaires de l'anophèle qui les réinjecte à l'homme.

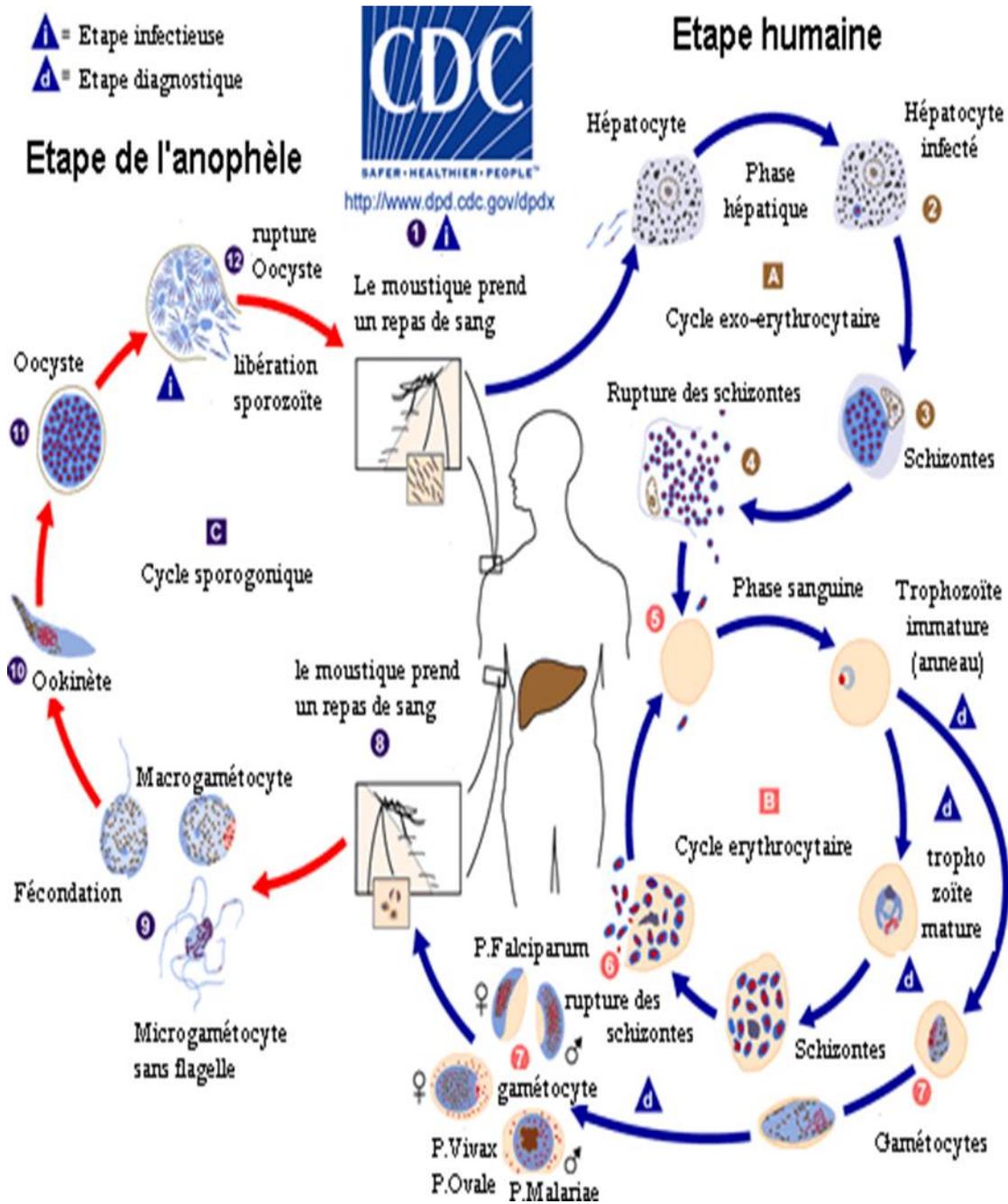


Figure 1: Cycle de développement du Plasmodium

Source: <http://www.cdc.gov/dpdx/>

### **1.3. Physiopathologie du paludisme**

#### ✓ **Accès palustre simple**

#### ✓ **Définition**

L'accès simple se définit par la présence dans le sang de plasmodium, associé aux signes suivants : fièvre, céphalée, vomissement, diarrhée, triade frisson, chaleur, sueur. Cette description classique est en réalité rarement retrouvée, la symptomatologie étant le plus souvent atypique [15].

#### ✓ **Physiopathologie**

La symptomatologie dépend de plusieurs facteurs qui sont liés soit au malade (niveau d'immunité) soit surtout au parasite (espèce plasmodiale, intensité de l'infestation, mode d'inoculation, phase de développement parasitaire). Pour toutes les espèces plasmodiales le cycle hépatique est asymptomatique, et les manifestations cliniques s'observent au cours de la phase sanguine.

**La fièvre :** le facteur déclenchant est la libération, au moment de l'éclatement des hématies parasitées, de pigment malarique (hémozoïne) qui se comporte comme une véritable substance pyrogène agissant sur les centres bulbaires de la thermorégulation. Au niveau de chaque hématie parasitée, la quantité d'hémozoïne est évidemment négligeable ; mais lorsque la parasitémie atteint un certain seuil, le nombre d'hématies parasitées qui éclatent en libérant du pigment pyrogène est suffisant pour entraîner les crises fébriles.

**L'anémie :** est en relation avec la destruction des globules rouges parasités et avec l'opsonisation d'hématies normales et la présence d'auto anticorps anti-érythrocytaires. De plus, les globules rouges parasités présentent, à leur surface, des antigènes du mérozoïte induisant l'action des anticorps et l'hémolyse.

L'hépatomégalie et surtout la splénomégalie sont la conséquence de l'hyperactivité du système monocyte macrophage chargé de débarrasser l'organisme aussi bien du pigment malarique que des débris érythrocytaires.

#### ✓ **Paludisme viscéral évolutif**

Il survient généralement chez les enfants de 2 à 5 ans non encore prémunis vivant en zones d'endémie soumis à des infections palustres répétées. La symptomatologie est subaiguë ou chronique. Elle associe une anémie, avec pâleur, asthénie et anorexie. La

splénomégalie est constante, modérée. On peut noter aussi une fièvre modérée. La recherche d'hématozoaires est positive par intermittence avec parasitémie faible, la sérologie anti-palustre montre un taux élevé des anticorps (IgG). La réponse au traitement est assez rapide.

✓ **Fièvre bilieuse hémoglobinurique**

Elle est due à une hémolyse intravasculaire aiguë en rapport avec des prises de quinine dans une zone d'endémie à *P. falciparum*, mais aussi la méfloquine et l'halofantrine. Elle se manifeste par : une fièvre élevée, hémoglobinurie macroscopique (urines couleur porto), un choc, une anémie aiguë, une insuffisance rénale aiguë. Le pronostic est sévère avec 30% de décès.

✓ **Paludisme grave et compliqué**

Le paludisme grave se définit comme une goutte épaisse positive à *P. falciparum*, associé à un ou plusieurs des signes cités : prostration, trouble de la conscience, détresse respiratoire, convulsions répétées, état de choc, saignement anormal, ictère avec un taux de bilirubine  $> 50 \mu\text{mol/l}$ , hémoglobinurie, anémie profonde ( $\text{ht} \leq 15\%$  ou  $\text{Hb} < 5\text{g/dl}$ ), insuffisance rénale avec excrétion urinaire inférieure à 12 ml/24h, œdème pulmonaire aigu, hypoglycémie ( $< 2,2 \text{ mmol/L}$ ), Hyperlactémie avec un taux de lactates plasmatiques  $>5 \text{ mmol/l}$ , hyperparasitémie ( $\geq 200.000$  trophozoïdes/ $\mu\text{l}$ ), hémoglobinurie macroscopique, acidose métabolique avec un taux de bicarbonates plasmatiques  $< 15 \text{ mmol/L}$  [16].

Seul *P. falciparum* est responsable de paludisme grave et compliqué par sa schizogonie dans les viscères profonds (cerveau). Sa multiplication dans les capillaires des organes (cerveau, rein, foie) entraîne une anoxie tissulaire par anémie hémolytique, des troubles de la microcirculation et des phénomènes cytotoxiques. Il existe à la surface des hématies parasitées des protubérances particulières appelées "knobs" qui provoquerait une adhérence des cellules parasitées à l'endothélium vasculaire et le ralentissement du flux capillaire. La physiopathologie du paludisme grave peut être expliquée par quatre mécanismes :

- une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-méningée entraînant une fuite du liquide céphalorachidien et un œdème cérébrale ;
- un phénomène immuno-pathologique avec dépôt de complexe immun ;

- des mécanismes toxiques dans lesquels des cytokines telles que le TNF (tumor necrosis factor) et IL1 sont impliquées. Des cytokines telles que le TNF alpha augmentent l'expression des molécules d'adhésion et favorisent la cytoadhérence et l'obstruction de la microcirculation.

- la cytoadhérence des hématies parasitées et leur séquestration dans les vaisseaux.

✓ **Autres formes cliniques particulières**

✓ **Paludisme congénital**

La réalité de l'infection trans placentaire du nouveau-né est admise, liée au passage de globules rouges parasités du placenta. Le paludisme congénital maladie est rare. Il apparaît après un délai variable de 5 à 60 jours après l'accouchement et le signe clinique constant est la fièvre [17].

✓ **Paludisme transfusionnel**

Il survient 2 à 3 semaines après une transfusion. Le dépistage des anticorps antipaludiques se fait par la technique d'immunofluorescence indirecte.

## 1.5. Diagnostic parasitologique

Il s'agit d'un diagnostic d'urgence chez les groupes à risque. Il consiste à la mise en évidence des formes sanguines du parasite. Le prélèvement sanguin doit être effectué le plus près possible du pic thermique.

➤ **Méthodes de mise en évidence directe du parasite**

✓ **Le Frottis mince (FM)**

Le frottis mince est utilisé dans le diagnostic d'urgence du paludisme. Une goutte de sang prélevée au bout du 3<sup>ème</sup> ou 4<sup>ème</sup> doigt est déposée à l'extrémité d'une lame porte-objet, une deuxième lame qu'on incline d'environ 45° est amenée au contact de cette goutte de sang, puis dans un mouvement régulier et ininterrompu, la lame inclinée entraîne derrière elle ce sang qui s'étale en couche unistratifiée. La préparation est d'abord fixée au méthanol absolu pendant quelques secondes avant d'être colorée au Giemsa. Ce frottis montre des parasites dont le cytoplasme est bleu et le noyau rouge. La lecture est faite au microscope optique à l'immersion à l'objectif 100. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'hématies parasitées. Les avantages de cette technique sont sa rapidité et la mise en évidence de l'espèce plasmodiale en cause. Cependant, le

frottis mince ne permet pas de détecter les faibles parasitémies (moins de 200 parasites par  $\mu\text{l}$  de sang).

✓ **La Goutte épaisse (GE)**

C'est une technique de micro concentration sur lame. Une petite goutte de sang prélevée au troisième ou au quatrième doigt est déposée au milieu d'une lame porte-objet. Avec le bout d'une seconde lame, la goutte est uniformément étalée sur une surface de 1 à 1,5 cm de diamètre. Elle est colorée après séchage à la température ambiante au Giemsa dilué à 10% pendant 15 à 20 mn et lue au microscope à l'objectif 100. Elle doit être effectuée par un technicien spécialisé. Son principal avantage est le diagnostic de la maladie dans les cas de faibles parasitémies (10 à 20 parasites par  $\mu\text{l}$  de sang) ; Colorée au Giemsa, elle montre les parasites sans le repère de l'hématie. Les résultats sont exprimés en nombre de parasites par  $\mu\text{l}$  de sang. Elle permet également de déterminer la charge parasitaire et d'établir des indices épidémiologiques (l'indice plasmodique et l'indice gamétocytaire). Il est à signaler que ces deux techniques (GE et FM) demandent un microscopiste bien expérimenté et une source de lumière sans oublier un temps d'exécution plus long (au moins 90 mn pour le résultat d'une Goutte épaisse et 15 à 20 mn pour celui d'un frottis mince

✓ **Quantitative Buffy Coat (QBC)**

C'est une méthode d'immunofluorescence directe. Le principe consiste à concentrer une petite quantité de sang par centrifugation dans un micro tube à hématocrite. Les globules rouges parasités se trouvent aussi à l'interface des leucocytes des hématies saines. L'acridine orange, agent intercalant spécifique des acides nucléiques, contenu dans les noyaux fait apparaître le parasite avec une fluorescence verte ou jaune-orangée à l'intérieur de l'hématie. La QBC a une sensibilité supérieure à celle de la goutte épaisse. Elle est intéressante dans les formes pauci-parasitaires, dans la surveillance de l'évolution de l'infection. Son principal inconvénient est la difficulté d'établir un diagnostic d'espèce. En outre la nécessité d'avoir un microscope à fluorescence peut limiter les petites structures dans l'acquisition de cet appareil.

➤ **Méthodes de mise en évidence indirecte des constituants parasitaires.**

✓ **Tests rapides :** (Parasight F et l'OptiMAL-IT)

Des bandelettes de nitrocellulose sont utilisées pour réaliser la détection de protéines (pfHRP2) pour le test de Parasight F ou d'enzymes parasitaires (pLDH) pour le test d'OptiMAL-IT. Ces tests ne nécessitent qu'un minimum de matériel et une formation minimale. Leur interprétation est simple.

• **Parasight F** (de Becton Dickinson)

Il consiste en la recherche dans le sang total de l'antigène protéique de type II riche en histidine (HRPII) de *Plasmodium falciparum*. La protéine pf HRP2 (*P. falciparum* Histidine rich proteine 2) est relativement spécifique de ce parasite. L'utilisation de bandelettes sur lesquelles ont été fixées des anticorps anti-pf HRP2 donne une idée assez exacte de la présence ou non de parasite dans l'échantillon. Ce test a l'avantage d'être manuel et rapide pour le diagnostic du paludisme à *P. falciparum*. Le kit est transportable partout, manipulable par un non spécialiste. Cependant, il n'apporte pas de données quantitatives. D'autre part, ce test reste positif de nombreux jours après la disparition des parasites.

• **L'OptiMAL-IT**

C'est un test dont le principe est basé sur la détection d'une enzyme métabolique intracellulaire abondante produite par les plasmodies dans le sang. Cette enzyme, la lactate déshydrogénase plasmodiale (pLDH), est produite par les formes asexuées (trophozoïtes) et sexuées (gamétocytes) du parasite et elle est rapidement détectée par une série d'anticorps monoclonaux dirigés contre des isoformes de l'enzyme permettant de faire une différenciation entre les espèces plasmodiales. Il n'y a aucune réaction croisée avec la LDH humaine. Des bandelettes de nitrocellulose sont utilisées pour réaliser la détection de la pLDH. Ce test est plus performant que le précédent et mieux adapté au diagnostic de l'infection aiguë. Malgré le confort et les qualités de ces tests, ils ne peuvent remplacer à 100% l'observation microscopique d'un frottis sanguin et d'une goutte épaisse.



**Figure 2:** Test de dépistage optimal pour *P. falciparum*

[http://www.standardia.com/fr/home/product/rapid/infectious-disease/Malaria\\_Ag\\_Pf- HRP2.html](http://www.standardia.com/fr/home/product/rapid/infectious-disease/Malaria_Ag_Pf- HRP2.html)

- **SD bioline**

Le test SD bioline Malaria Antigène *P.falciparum* contient une bandelette enduite d'un anticorps monoclonal de sous spécifique à la protéine II riche en histidine (HRP-II). Les lettres T et C pour ligne de test et ligne de contrôle sont sur la surface de la plaque du test. La ligne de test ainsi que la ligne de contrôle ne sont pas visibles dans la fenêtre des résultats avant l'application des échantillons. La ligne de contrôle apparait si le test est réalisé correctement et si ses réactifs fonctionnent. Le test SD bioline malaria Ag p.f est un test rapide qualitatif et différentiel pour détecter l'antigène HRP-II spécifique dans les échantillons de sang humain. Ce kit destiné à usage professionnel est seulement recommandé pour un dépistage initial. Pour les échantillons positifs, il est recommandé de pratiquer une analyse supplémentaire telle que l'examen au microscope.

- **La Polymérase Chain Réaction (PCR)**

Elle consiste à synthétiser in vitro en plusieurs copies un fragment de gène codant pour une protéine du plasmodium en utilisant deux amorces spécifiques. Cette technique est très spécifique et très sensible. Elle peut en plus du diagnostic permettre d'identifier les parasites résistant à certains médicaments par la recherche de mutations spécifiques. Les inconvénients de cette technique sont: sa lourdeur, son coût et le fait qu'elle nécessite un personnel qualifié et un équipement approprié.

- **Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)**

La méthode immuno-enzymatique ELISA (littéralement « dosage d'immuno-absorption par enzyme liée », c'est-à-dire dosage immuno-enzymatique sur support solide) est un examen de laboratoire. Cette méthode est principalement utilisée en immunologie pour détecter la présence d'un anticorps ou d'un antigène dans un échantillon. Ce test entre dans le cadre plus général des dosages immuno-enzymatiques, dans lequel le dosage est couplé à une réaction catalysée par une enzyme qui libère un composant coloré dont l'absorbance est mesurée par un spectrophotomètre.

L'ELISA est une technique immuno-enzymatique utilisant un ou deux anticorps. L'un de ceux-ci est spécifique de l'antigène, tandis que l'autre réagit aux complexes immuns (antigène-anticorps) et est couplé à une enzyme. Cet anticorps secondaire, responsable du nom de la technique, peut aussi causer l'émission d'un signal par un substrat chromogène ou fluorescence.

L'ELISA pouvant être utilisé tant pour évaluer la présence d'un antigène que celle d'un anticorps dans un échantillon, c'est un outil efficace à la fois pour déterminer des concentrations sériques d'anticorps (comme pour le test du VIH ou le virus du Nil), que pour détecter la présence d'un antigène. Il a également trouvé des applications dans l'industrie alimentaire, pour détecter des allergènes alimentaires, comme le lait, les cacahuètes, les noix et les œufs. C'est un test simple, facile d'emploi et peu coûteux. Il est limité par la disponibilité en anticorps spécifique.

## **1.6. Traitement**

- ✓ **Définition des antipaludiques**

Les antipaludiques (ATP) sont des substances actives utilisées dans le traitement ou la prévention du paludisme.

- ✓ **Principaux médicaments antipaludiques en usage en Afrique au sud du Sahara**

Les antipaludiques les plus fréquemment utilisés en Afrique au sud du Sahara sont : les sels de quinine, la sulfadoxine- pyriméthamine, et les combinaisons thérapeutiques à base des dérivés d'artémisinine avec l'amodiaquine, la luméfántrine et la méfloquine.

- ✓ **Les sels de quinine**

Les sels de quinine sont les antipaludiques de référence dans la prise en charge des formes graves de paludisme. Elles exercent une action schizonticide sanguine rapide sur toutes les espèces plasmodiales. Elles n'ont aucune activité sur les formes intrahépatiques et elles sont recommandées à la dose de 30 mg de quinine base/kg/jour, répartie en 3 administrations espacées de 8h. Une dose de charge de 20 mg/kg administrée en 4 heures est recommandée. La durée du traitement est d'au moins 7 jours(18). La voie d'administration préférentielle est IV, avec relais per os à partir de J3, quand les symptômes s'améliorent. La voie IM est possible mais présente des risques de paralysie du nerf sciatique. Il existe enfin des formulations adaptées à la voie IR.

- **La sulfadoxine- pyriméthamine**

La sulfadoxine bloque la dihydroptéroate synthétase qui transforme le para-amino-benzoate en dihydrofolate alors que la pyriméthamine bloque la dihydrofolate réductase qui transforme le dihydrofolate en tétrahydrofolate actif comme donneur de radicaux monocarbonés pour la synthèse des bases des purines de l'ADN des parasites. Cette action synergique schizonticide détruit les formes intra-érythrocytaires des 4 espèces (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*).

- **Les dérivés de l'artémisinine**

L'Artémisinine ou Quingaoshu, est une lactone (Sesquiterpène lactone) extraite des feuilles de plante *Artemesia annua*, issue de la pharmacopée traditionnelle chinoise. Son activité schizontocide puissante s'exerce sur toutes les formes asexuées des plasmodies : l'artémisinine agit en inhibant la PfATPase 6, une adénosine triphosphatase calcium dépendante essentielle au parasite, une action dont résulte la libération de radicaux libres toxiques pour le parasite (pont endoperoxide).

Les dérivés semi-synthétiques de l'artémisinine ont une activité schizontocide supérieure à celle de l'artémisinine : la dihydroartémisinine, l'artemether et l'artesunate sont les plus utilisées.

Leur action est très rapide, extrêmement efficace mais de courte durée. Pour cette raison, ces médicaments doivent être exclusivement utilisés en combinaison thérapeutique avec d'autres antipaludiques. L'artémisinine et ses dérivés présentent plusieurs avantages. Ils réalisent une diminution de la biomasse parasitaire par un

facteur de 104 à chaque cycle asexué de 36 à 48 h, soit une réduction de 106 à 108 de 3 jours de traitement. La résolution des symptômes est rapide 48h ou moins et leur tolérance est bonne. Ils ont une activité gametocytocide réduisant ainsi le risque de transmission du paludisme. Leur courte durée de vie dans l'organisme constitue leur limitation majeure. Ces avantages et inconvénients expliquent la recommandation de les utiliser toujours en combinaisons thérapeutiques, en associant avec des antipaludiques.

### ✓ **Les combinaisons thérapeutiques**

#### • **Définition**

Selon l'OMS une combinaison thérapeutique d'antipaludique est l'usage simultané de deux ou plusieurs schizonticides sanguin ayant des mécanismes d'action et des cibles biochimiques différentes au niveau du parasite. L'action synergique des molécules permet d'augmenter l'efficacité des médicaments et d'obtenir une protection mutuelle des produits contre l'acquisition de résistance du parasite. Il y'a deux sortes de combinaisons :

- les combinaisons libres : la co-administration de deux médicaments distincts ;
- les combinaisons fixes : co-formulation de deux principes actifs sous une même forme galénique [19].

#### • **Combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA)**

La combinaison Artesunate (AS) + Amodiaquine (AQ) et la combinaison Artemether (AT) + Lumefantrine (LU) sont retenues pour le traitement du paludisme simple par le PNLP au Mali.

#### - **Amodiaquine (AQ)**

Elle a une structure et une action antipaludique semblable à celle de la chloroquine et possède des propriétés antipyrétiques et anti-inflammatoires.

Elle est absorbée dans le tractus gastro-intestinal, transformée en un métabolite actif : la deséthylamodiaquine. Des effets secondaires hépatiques et une grande incidence d'agranulocytose ont été rapportés [20,21].

Dans l'évaluation de la stratégie CPS, l'amodiaquine en combinaison avec la SP a été administrée à plus de 10380 enfants au Mali, au Burkina Faso, en Gambie, au Ghana

et au Sénégal avec une très bonne tolérance [22–26]. Toutefois une surveillance clinique accrue de la survenue de potentiels effets secondaires a été instituée.

L'amodiaquine est rapidement absorbée et métabolisée au niveau hépatique par le cytochrome P450 2C8 en un métabolite actif, la déséthylamodiaquine. L'amodiaquine et la déséthylamodiaquine sont toutes deux fortement fixées aux protéines plasmatiques (> 90%). Sa demi-vie d'élimination beaucoup plus courte que celle de son métabolite (3 à 8 heures versus 8 jours) [27].

L'efficacité de son activité schizonticide a été démontrée sur les souches chloroquinorésistantes de *P. falciparum in vitro* [28].

Une analyse systématique des études menées au cours des 10 dernières années en Afrique sur le traitement du PNC, montre que l'amodiaquine se révèle sensiblement plus efficace que la chloroquine en ce qui concerne l'élimination de la parasitémie, avec une tendance à favoriser une récupération clinique plus rapide [29].

#### - **Artesunate (AS)**

L'artésunate comme l'artéméther sont des dérivés de l'artémisinine. Ce sont deux molécules différentes, mais dont le métabolisme aboutit à la formation du même composé actif, la dihydroartémisinine. Toutes les deux sont rapidement absorbées par voie orale, une concentration maximale survenant moins d'une heure après l'administration pour l'artésunate, et environ deux heures après l'administration pour l'artéméther. La demi-vie d'élimination de l'artésunate après administration en I.V est inférieure à 15 minutes, mais elle est en général comprise entre 20 et 72 minutes après administration orale.

La demi-vie d'élimination de l'artéméther est de 2 à 3 heures, celle de la dihydroartémisinine est généralement comprise entre 30 et 60 minutes.

Sur le plan pharmacodynamique, ces composés permettent une diminution rapide et très importante du nombre de parasites présents dans l'organisme. Cependant, du fait de leur élimination très rapide, il est obligatoire, dans le cas du paludisme non compliqué (courte durée de traitement), de leur associer un autre antipaludique à longue demi-vie d'élimination qui permettra d'éradiquer les parasites restants et de prévenir la sélection de parasites résistants. Les molécules généralement combinées à l'artésunate, à l'artéméther, voire directement à la dihydroartémisinine, sont

l'amodiaquine, la méfloquine, la luméfántrine, la sulfadoxinepyriméthamine et la pipéraqúine [27].

Par ailleurs Il n'y a aucune réaction indésirable grave qui soit attribuable à la prise du médicament [30].

- **Combinaisons thérapeutiques sans artémisinine**

Chloroquine+sulfadoxine-pyriméthamine

Sulfadoxine-pyriméthamine + méfloquine: FANSIMEF® de F Hoffman La Roche (utilisé en Asie du sud-est).

Atovaquone + proguanil: (MALARONE®) de GlaxoSmithKline

Quinine + doxycycline

Chloroquine+proguanil: SAVARINE® de Alliance pharma ltd (utilisé en chimioprophylaxie seulement)

Amodiaquine + sulfadoxine-pyriméthamine.

La sulfadoxine-pyriméthamine est utilisée dans le traitement intermittent chez la femme enceinte.

Au Mali l'amodiaquine + sulfadoxine-pyriméthamine est utilisée dans la chimioprévention du paludisme saisonnier (CPS) chez les enfants de 3 à 59 mois [3].

- ✓ **Antipaludiques issus de la médecine traditionnelle au Mali**

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la médecine traditionnelle est définie comme un ensemble comprenant diverses pratiques, approches, connaissances et croyances sanitaires intégrant des médicaments à base de plantes, d'animaux et/ou de minéraux, des traitements spirituels, des techniques manuelles et exercices, appliqués seuls ou en association afin de maintenir le bien-être traiter, diagnostiquer ou prévenir une maladie [31].

- ***Argemone mexicana***

La décoction d'*Argemone mexicana* pourra représenter un complément aux médicaments standards pour le traitement à domicile du paludisme présomptif dans les zones de haute transmission. La mise en œuvre de cette nouvelle stratégie, progressivement à plus large échelle, a été intégrée dans le Plan stratégique de lutte contre le paludisme au Mali [23].

- ***Malarial 5***

Des études beaucoup plus approfondies ont été réalisées par le département de la Médecine Traditionnelle pour améliorer l'efficacité de ce produit. Elles ont permis de montrer des effets bénéfiques dans le traitement du paludisme et de prouver que l'activité antiparasitaire est essentiellement due au spilanthol extrait de *Spilanthes oleracea* [23,32].

## **2. Vaccins antipaludiques**

### **Types de vaccins antipaludiques**

#### **✓ Vaccins du stade hépatique**

Ces vaccins préviennent l'infection de l'homme par la forme infectante du *Plasmodium* qui est le sporozoïte.

Ils sont constitués de sporozoïtes entiers vivants (PfSPZ-CVAC) ou tués par irradiation tel que le Pf SPZ NF54 ou d'une partie antigénique du sporozoïte comme la protéine circumsporozoïte (CSP) [33].

Les anticorps produits contre ce type de vaccin préviendraient l'invasion des cellules hépatiques et par conséquent assureront une protection contre l'accès palustre.

Le RTS, S, constitué de la protéine Circumsporozoïte du *Plasmodium falciparum* (RTS) et de la protéine de surface du virus de l'hépatite B(S) est le plus avancé.

Des résultats d'un essai de phase II en Afrique ont montré que le RTS, S assure une protection de 30-50% mais cette protection est d'une courte durée (12 mois) [34].

#### **✓ Vaccins du stade érythrocytaire (vaccins antimerozoïtes)**

Ces vaccins ont pour but de stopper le cycle érythrocytaire et ainsi éviter la survenue des manifestations cliniques et les complications.

Les molécules les plus étudiées pour le développement de ce type de vaccin sont l'AMA1 et le MSP.

#### **✓ Vaccins bloquant la transmission (vaccins antigametocytes)**

Ils ont pour cibles les gamétocytes, le zygote et l'ookinète ce qui interrompt le développement du *Plasmodium* dans le tube digestif de l'Anophèle.

Ils produisent des immunoglobulines dirigées contre les formes sexuées du parasite afin d'empêcher leur évolution au stade sporozoïte dans la glande salivaire de l'Anophèle [35].

Le Pfs25 et le Pfs28 sont les plus étudiés parmi ce genre de vaccin.

La réponse humorale dirigée contre le Pfs28 bloque la transmission du *Plasmodium falciparum* de l'homme au moustique et agit en synergie avec celle du Pfs25 s'ils sont utilisés en combinaison [36].

Ce genre de vaccin ne protège pas directement la personne vaccinée mais plutôt son entourage.

Il n'existe actuellement aucun vaccin autorisé sur le marché contre le paludisme.

Malgré des résultats récents encourageants, le développement d'un vaccin antipaludique est limité par notre connaissance incomplète des mécanismes de l'immunité anti-parasitaire [37].

[Le Pfs 230 est en cours de développement à Sotuba au Mali avec une équipe du MRTC.](#)

Le vaccin expérimental contre *P. falciparum*, connu sous le nom de RTS, S/AS01 du groupe GSK (GlaxoSmithKline) destiné aux enfants d'Afrique sub-saharienne, est un vaccin cliniquement avancé à ce jour. Pendant la période de suivi de 18 mois, RTS,S/AS01A a réduit le nombre de cas de paludisme clinique de 46% chez les jeunes enfants âgés de 5 -17 mois, et de 27% les cas de paludisme chez les nourrissons de 6-12 semaines [38]. Des données complémentaires ont été publiées en 2015 en particulier sur une période de suivi de 32 mois ainsi que l'impact de la quatrième dose ou dose de rappel dispensé 18 mois après les trois premières doses montrant ainsi une efficacité de 36,3% contre le paludisme, soit une baisse de 50,4% des cas de paludisme et 32,2 % contre le paludisme grave mesuré le 14<sup>ème</sup> mois après la dose de rappel chez les 5- 17 mois. Une efficacité plus faible et non significative pour le groupe plus jeune 6- 12 mois [39].

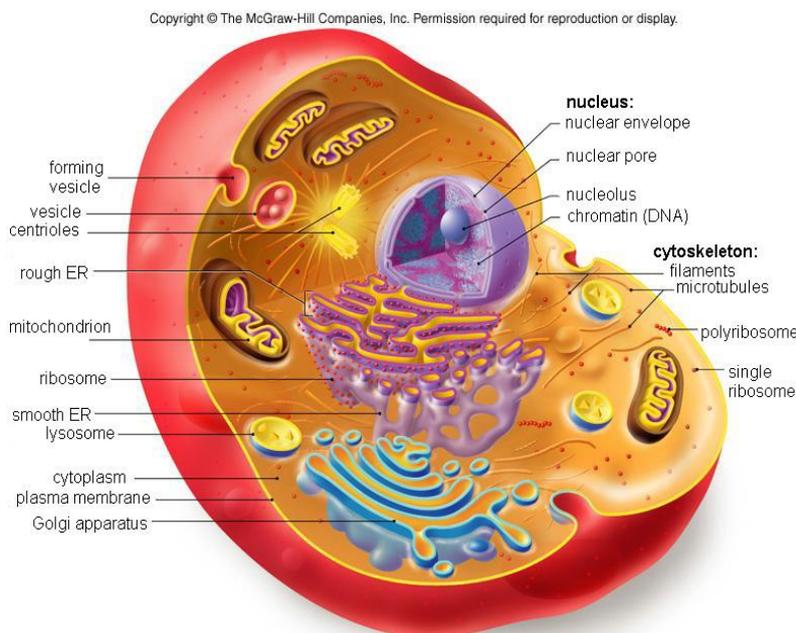
Actuellement le vaccin basé sur les sporozoïtes (mis au point par l'entreprise Sanaria Inc.) est en cours d'évaluation au Mali. Il s'agit d'un candidat vaccin qui est administré par voie intraveineuse et composé de sporozoïtes vivants atténués de l'espèce *Plasmodium falciparum*. Le vaccin vient d'être testé par les chercheurs du NIH / NIAID sur des volontaires adultes en bonne santé. Les doses élevées de vaccins étaient associées à une véritable protection contre le paludisme. Les résultats de cette étude montrent une protection de 90-94% chez les adultes ayant reçu 5 doses intraveineuses avant d'être exposés au parasite [40].

Ce candidat vaccin Pf SPZ est en cours d'évaluation chez les adultes maliens vivant dans les zones hyper endémiques notamment à Donéguébougou et tout récemment à Ouélessébougou par une équipe de MRTC.

### 3. Lymphocytes T

#### 3.1. Morphologie

Au microscope, les lymphocytes apparaissent comme des cellules ovoïdes, nucléées, dont le noyau de grande taille (environ 7  $\mu\text{m}$ , soit le diamètre d'un globule rouge) occupe quasiment tout le cytoplasme. Sa chromatine est disposée en mottes.



*Figure 3 : Structure du lymphocyte T*

[<https://fr.wikipedia.org/wiki/Lymphocyte#Structure>]

Les lymphocytes T, ou cellules T, sont une catégorie de leucocytes qui jouent un grand rôle dans la réponse immunitaire secondaire. « T » est l'abréviation de thymus, l'organe dans lequel leur développement s'achève.

Ils sont responsables de l'immunité cellulaire : les cellules infectées par un virus par exemple, ou les cellules cancéreuses reconnues comme étrangères à l'organisme (c'est-à-dire distinctes des cellules que les lymphocytes T ont appris à tolérer lors de leur maturation) sont détruites par un mécanisme complexe.

Les lymphocytes T expriment tous le marqueur membranaire CD3.

### **3.2. Types de lymphocytes T**

-Les lymphocytes T cytotoxiques (TCD8 ou T killer)

Ils détruisent les cellules infectées. Ces cellules sont dites cytotoxiques car elles sont à elles-mêmes capables de détruire des cellules cibles qui présentent des antigènes spécifiques à travers le CMH de classe I. Elles portent à leur surface un marqueur CD8.

- Les lymphocytes T auxiliaires (TCD4 ou T helper)

Ils sont des intermédiaires de la réponse immunitaire et prolifèrent pour activer en quantité d'autres types de cellules qui agiront de manière plus directe sur la réponse. Les T auxiliaires régulent ou aident à la réalisation d'autres fonctions lymphocytaires. Elles portent à leur surface un marqueur CD4. On sait qu'elles sont la cible de l'infection au VIH, qui entraîne la chute de leur population.

- Les lymphocytes T régulateurs (T reg)

Ils aident à prévenir l'activation des lymphocytes auto-immuns qui détruisent les cellules de leur propre organisme. Auparavant appelés « T suppresseurs », ils sont très importants pour le maintien de l'homéostasie. Le rôle principal est de réprimer l'activité des cellules de l'immunité, soit auto-immune, soit en fin de réaction immunitaire. Ils se distinguent facilement des autres lymphocytes T : ils portent à leur surface les marqueurs CD4 et CD25 à leur état basal, et expriment la molécule FOXP3 dans leur cytosol.

-Les lymphocytes NKT

Ils sont un type de lymphocytes présentant des marqueurs de cellule T (CD3) et des marqueurs de cellules NK. Ils sont donc un lien entre le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif. Contrairement aux lymphocytes T conventionnels, dont le TCR reconnaît un peptide présenté dans une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), les NKT sont capables de reconnaître un glycolipide présenté dans une molécule appelé CD1, structurellement proche du CMH de classe I. Une fois activés, les NKT sont capables de lyser les cibles et de sécréter des cytokines.

-Les lymphocytes MAIT, ou "lymphocytes T invariants associés aux muqueuses", disposant d'un TCR semi-invariant [41].

-Les lymphocytes T gamma delta ( $\gamma \delta$ )

#### **4. Lymphocytes T $\gamma \delta$**

Les lymphocytes T gamma delta ( $\gamma \delta$ ) représentent une catégorie de cellules T ayant un récepteur de cellule T ou T-Cell Receptor (TCR) portant une chaîne  $\gamma$  et une chaîne  $\delta$  [37].

La première description d'une population lymphocytaire exprimant un « T cell receptor » (TCR) différent du TCR  $\alpha \beta$  des lymphocytes T conventionnels date de plus de 30 ans [42]. Initialement référencé sous le nom de TCR T3, le laboratoire du Pr. M. Krangel définit pour la première fois sous le nom de « lymphocytes T  $\gamma \delta$  », une population de lymphocytes humains exprimant le TCR T3 en absence d'expression d'un TCR  $\alpha \beta$  [43].

Les lymphocytes T gamma delta ( $\gamma \delta$ ) sont des cellules de l'immunité [44]. Ils appartiennent à la population des lymphocytes T et plus particulièrement aux lymphocytes T non-conventionnels [37,45]. Leur action est intégrée dans la réponse immunitaire globale de l'organisme. Ils participent à la fois à la réponse immunitaire innée et adaptative [37,46]. Le TCR  $\gamma\delta$  (T-cell receptor ou récepteur des cellules T) définit cette lignée par opposition au TCR alpha-bêta ( $\alpha \beta$ ) des lymphocytes T conventionnels [44].

En effet la plupart des lymphocytes T possèdent un TCR composé de deux glycoprotéines, les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ . Cependant, les cellules  $\gamma \delta$  possèdent un TCR fait d'une chaîne  $\gamma$  et d'une chaîne  $\delta$  [37]. Ces lymphocytes sont moins abondants que les  $\alpha\beta$  (ils représentent 5 % du total des lymphocytes T du sang périphérique), mais se retrouvent en plus grande quantité dans la muqueuse intestinale, parmi la population lymphocytaire nommée lymphocytes intra-épithéliaux. Le déterminant antigénique auquel répondent ces lymphocytes est inconnu à l'heure actuelle. Leur TCR ne semble pas restreint à la reconnaissance d'un peptide, mais serait capable de réagir à la présence d'une protéine entière, sans nécessiter la présentation via les molécules du CMH. Il a été montré que les lymphocytes  $\gamma \delta$  pouvaient être activés via le CD1, molécule apparentée au CMH I mais présentant des lipides glycosylés ou non.

L'immunité cellulaire (la réponse immunitaire vis-à-vis d'organismes pathogènes à l'intérieur des cellules) implique l'activation des cellules T.

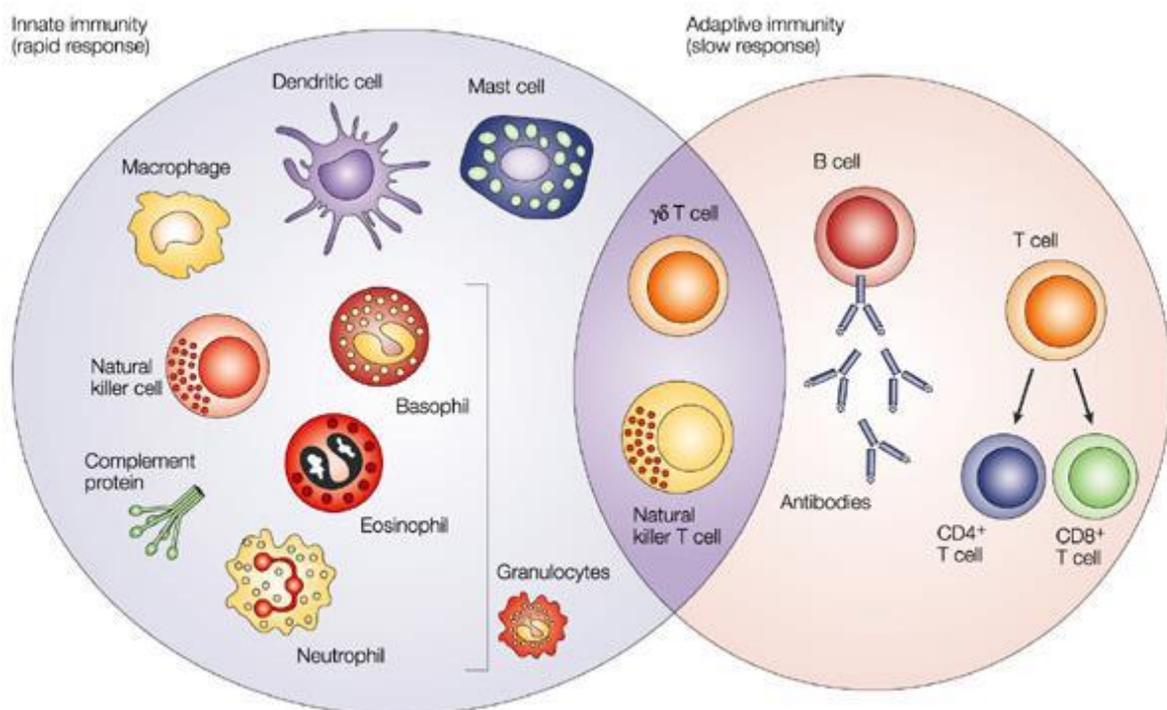
**Tableau I** : Comparaison entre les cellules gamma delta et les cellules alpha beta.

<b>Caractéristiques</b>	<b>Cellules <math>\gamma \delta</math></b>	<b>Cellules <math>\alpha \beta</math></b>
<b>Types d'immunité</b>	Innée et adaptative	Adaptative
<b>Ontogénie</b>	Développement précoce	Développement tardif
<b>Phylogénie</b>	Ancienne cellule	Jeune
<b>TCR</b>	CD3+ $\gamma\delta$	CD3+ $\alpha\beta$
<b>Phénotype</b>	Très souvent CD4-CD8- Rarement CD8+	CD4+ ou CD8+
<b>Restriction par CMH</b>	Non	Oui cellule T spécifique à l'Ag et aussi reconnaître le CMH associé à l'Ag
<b>Reconnaissance d'antigène</b>	Protéique et non protéique	Complexe peptide + CMH
<b>Distribution</b>	Epithélium, tissus lymphoïdes, muqueuses	Sang, tissus lymphoïdes, muqueuses
<b>Fréquence dans le sang</b>	0 -10 %	75 – 90 %

Une multitude d'études ont ainsi étudié, chez l'homme, le rôle des lymphocytes T  $\gamma\delta$  dans de nombreux types de réponses immunes amenant son lot de controverses par rapport aux travaux pionniers et de nouveaux concepts parfois difficiles à intégrer philosophiquement pour une telle population lymphocytaire [47].

Le système immunitaire est souvent présenté comme une entité séparée en un système immunitaire inné et un système immunitaire adaptatif. Sur cette base archaïque, il est difficile de concevoir que la réponse immunitaire puisse être un continuum. En effet, il devient de plus en plus difficile de rester figé sur ce dogme centenaire et rigide. Si les acteurs cellulaires propres à l'immunité innée ou adaptative possèdent des caractéristiques distinctes et non redondantes les unes des autres, il existe une troisième « famille » de leucocytes « hybrides » partageant à la fois des

caractéristiques et phénotypes de cellules innées et adaptatives. Ainsi ces cellules permettent d'établir un lien concret entre l'immunité innée et adaptative. Ces lymphocytes T dits « non conventionnels » forment ainsi un troisième « système » parfois appelé immunité transitionnelle ou intermédiaire [47]. Cela est illustré dans la figure ci-dessous [48].



**Figure 4:** Réponse immunitaire innée et adaptative

Source : Nature Reviews Cancer 2004

La réponse immunitaire innée agit comme première ligne de défense contre l'infection. Elle est représentée par des facteurs solubles, tels que les protéines du complément, et divers composants cellulaires dont les granulocytes (basophiles, éosinophiles et neutrophiles), les mastocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes Natural Killer. La réponse adaptative est plus lente à se mettre en place, mais présente une spécificité et une réponse mémoire plus importantes. Elle est représentée par les anticorps, les cellules B et les lymphocytes T CD4+ et CD8+. Les cellules T Natural killer et gamma-delta sont des lymphocytes présents à l'interface entre l'immunité innée et adaptative [48].

## ✓ **Structure**

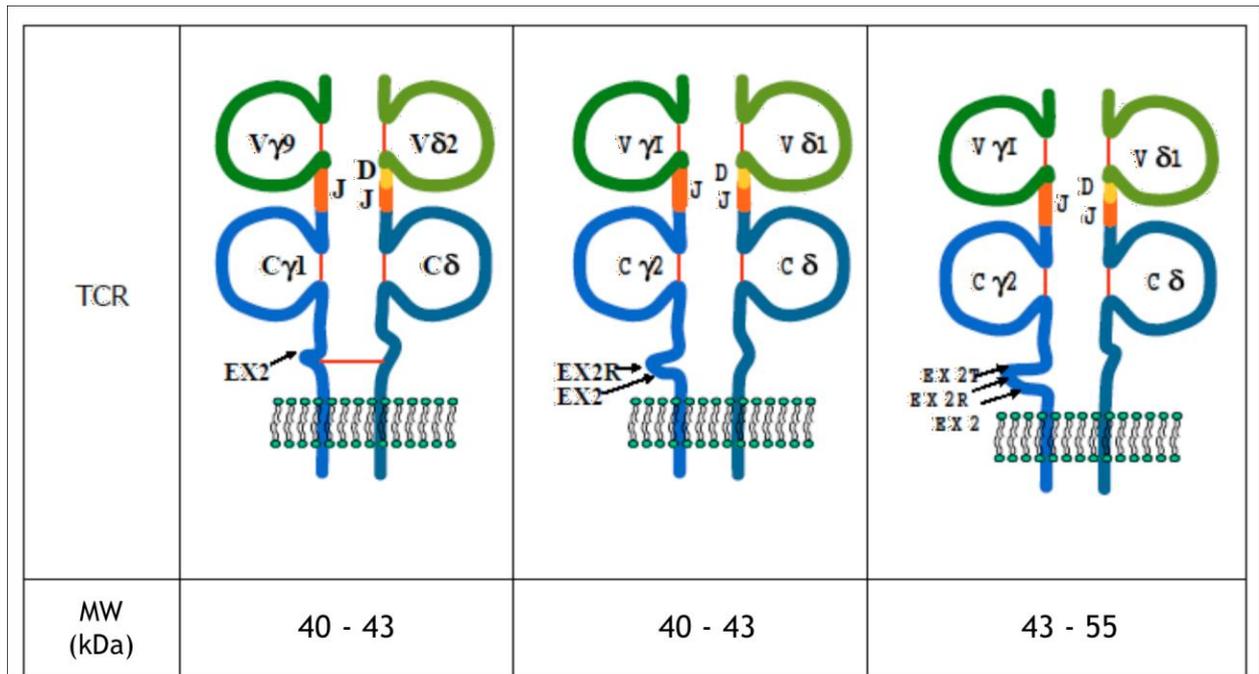
Les lymphocytes T $\gamma\delta$  possèdent un récepteur pour l'antigène appelé TCR, mais n'expriment généralement pas les corécepteurs CD4 et CD8 associés au TCR [46]. Celui-ci est composé de deux chaînes protéiques :  $\gamma$  et  $\delta$ , par opposition au TCR des lymphocytes T conventionnels qui est constitué des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  [44].

Le gène codant le TCR  $\gamma\delta$  est généré par la combinaison de différents segments géniques : V, J, C pour la chaîne  $\gamma$  et V, D, J et C pour la chaîne  $\delta$ . On parle de diversité combinatoire [44]. Il existe aussi la diversité jonctionnelle correspondant à l'ajout ou au retrait de nucléotides aux jonctions inter-segments par des enzymes.

Le locus de la chaîne  $\gamma$  du TCR se trouve sur le chromosome 7 alors que celui de la chaîne  $\delta$  est inclus dans celui de la chaîne  $\alpha$  sur le chromosome 14 [44,49].

Le répertoire du TCR  $\gamma\delta$  est plus restreint que celui du TCR  $\alpha\beta$ . En effet, le nombre de segments géniques est plus faible [44]. Il existe des réarrangements préférentiels c'est-à-dire que l'association de certaines chaînes  $\gamma$  avec certaines chaînes  $\delta$  semble favorisée. Par exemple, la chaîne V $\gamma$ 9 s'associe de préférence avec la chaîne V $\delta$ 2 pour donner la sous-population V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 [46].

Le type de TCR  $\gamma\delta$  exprimé pourrait conférer aux sous-populations ainsi générées des rôles différents, dans la mesure où chaque sous-population semble peupler spécifiquement un ou des organes [44].



*Figure 5: Représentation du TCR de la cellule T gamma delta*

Source: Lefranc and Rabbits, 1989, [50]

### ✓ Développement des lymphocytes T $\gamma\delta$

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont les premiers lymphocytes T à se développer [45]. Ils sont continuellement produits dans le thymus dès la vie fœtale puis migrent vers les tissus où ils résident pendant le développement embryonnaire ainsi qu'après la naissance [44]. Ils apparaissent par vagues successives au cours du temps [37,44].

Le thymus reste un organe majeur impliqué dans le développement des cellules T  $\gamma\delta$ , néanmoins quelques preuves de développement extra thymique existent [51], notamment l'intestin et le foie [37].

### ✓ Localisation

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  représentent 10% des cellules circulant dans le sang. Ils sont localisés en majorité dans les épithélia des muqueuses digestives [52]. On les trouve également au niveau de la peau, des muqueuses vaginale et utérine, du foie et des organes lymphoïdes classiques (ganglions) [37,44]. Ils sont présents dans le sang et les organes périphériques à raison de 1 à 5 % de la population totale de lymphocytes T [44].



**Tableau II** : Distribution normale des cellules T gamma delta  $\gamma \delta$ 

Localisation anatomique	% de la sous-population de cellules T $\gamma \delta$	Auteurs et date
<b>Sang périphérique</b>	9% 0.5-16% 7%	Falini et al, 1989 [53] Groh et al, 1989 [54] Bucy et al, 1989 [55]
<b>Thymus</b>	0.5-16% medulla 0.8-2% medulla 1.4% medulla peu (cortex) 0.5% (cortex)	Falini et al, 1989 [53] Groh et al, 1989 [54] Inghirami et al, 1990 [56] Groh et al, 1989 [54] Falini et al, 1989 [53]
<b>Amygdales</b>	1-15% 0.7% 3%	Groh et al, 1989 [54] Inghirami et al, 1990 [56] Falini et al, 1989 [53]
<b>Ganglions lymphatiques</b>	2% des CD3	Inghirami et al, 1990 [56]
<b>Plaques de Peyer</b>	<5% des CD3	Vroom et al, 1991 [57]
<b>Rate</b>	15% des CD3 22% des CD3 6-22% des CD3  <5% des CD3	Bucy et al, 1989 [55] Falini et al, 1989 [53] Bordessoule et al, 1990 [58]  Vroom et al, 1991 [57]
<b>Intestin</b>	6% des CD3 1-15% 3% Vd1/CD3 LPL 13% gd/CD3 IEL 4% Vd1 CD3 LPL 37% Vd1/CD3 IEL	Falini et al, 1989 [53] Groh et al, 1989 [54] Ullrich et al, 1991 [59] Jarry et al, 1990 [60] Deush et al, 1991 [61] Deush et al, 1991 [61]
<b>Peau</b>	rare	Bucy et al, 1989 [55]
<b>Glandes salivaires</b>	occasionelles	Falini et al, 1989 [53]
<b>Tissu gingival</b>	30% Vd1 GMC	Lundqvist et Hammastrom, 1993 [62]
<b>Foie</b>	6.8-34% gd CD3	Noris et al, 1998 [63]
<b>Rein</b>	0 occasionelles	Vroom et al, 1991 [57] Falini et al, 1989 [53]
<b>Poumon</b>	0	Groh et al, 1989 [54]

Le taux de lymphocytes T  $\gamma \delta$  augmente chez des sujets infectés par des bactéries, par exemple en cas de tuberculose, listériose, légionellose, ou par des parasites comme *Plasmodium falciparum*, *Leishmania* [37,45,64]. Ce taux diminue après guérison [64].

**Tableau III :** Pourcentage des cellules T  $\gamma \delta$  parmi les lymphocytes T au cours de l'infection à *Plasmodium falciparum*.

Infection	% de cellules T $\gamma \delta$ parmi les cellules T	Auteurs et date
<b>Paludisme aigu</b>	16	Ho et al, 1990 [65]
	16	Roussilhon et al, 1990 [66]
	18	Schwartz et al, 1996 [67]
<b>Paludisme avec atteinte cérébrale</b>	14	Nakazawa et al, 1994 [68]
<b>Paludisme grave</b>	11	Perera et al, 1994 [69]

En fonction de l'organe considéré, différentes sous-populations de lymphocytes T $\gamma\delta$  sont représentées, définies par un TCR  $\gamma\delta$  particulier. Par exemple, les lymphocytes T $\gamma\delta$  sanguins expriment un TCR particulier appelé V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 que n'expriment pas ceux présents au niveau de la peau [45].

Chez l'homme, c'est la sous-population T $\gamma$ 9 $\delta$ 2, qui est la plus étudiée, c'est pourquoi beaucoup des caractéristiques fonctionnelles des lymphocytes T $\gamma\delta$  ont été découvertes chez cette population [37].

#### ✓ **Reconnaissance de l'antigène et activation**

Les lymphocytes T  $\gamma \delta$  n'ont pas besoin que l'antigène leur soit présenté par les molécules du CMH (Complexe majeur d'histocompatibilité) afin de le reconnaître. Ils reconnaissent une très grande variété d'antigènes (peptidique, lipidique, glyco-lipidique, étranger ou du soi, ...). Les lymphocytes T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 sont connus pour reconnaître des petites molécules appelés phosphoantigènes [37]. À la suite de ce contact avec l'antigène les lymphocytes T  $\gamma \delta$  s'activent et se multiplient en présence d'interleukine 2 [45]. Des lymphocytes T  $\gamma \delta$  mémoires, capables de se réactiver ultérieurement en cas de nouveau contact avec l'antigène, sont générés [44].

#### ✓ **Rôles effecteurs des lymphocytes T $\gamma \delta$**

##### ***-Participation à la réponse immunitaire innée***

Les lymphocytes T  $\gamma \delta$  jouent le rôle de première barrière de défense dans l'immunité anti-infectieuse, grâce à leur localisation dans les épithélia qui entraîne une activation

rapide lorsqu'un pathogène entre dans l'organisme [37,52]. Ils sont attirés sur les sites inflammatoires où ils produisent des cytokines favorisant l'inflammation [37,45]. Dans ce cas, ils sont peu cytotoxiques [45]. Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  expriment des TLR (Toll like receptor ou récepteur de type Toll) et des récepteurs semblables à ceux des cellules Natural Killer (NK), ce qui les rend proches des cellules de l'immunité innée [44].

#### ***-Cytotoxicité des lymphocytes T $\gamma\delta$ .***

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  ont également une fonction cytotoxique qui leur confère un rôle important dans la lutte anti-tumorale [45]. Celle-ci a lieu grâce à :

- la sécrétion de molécules lytiques : perforine et granzyme qui induisent la mort des cellules cibles [45,47]. Ce processus est similaire à celui mis en œuvre par les cellules NK et les lymphocytes T $\alpha\beta$  cytotoxiques [45].

- l'expression de protéines comme TNF  $\alpha$ , TRAIL, FasL qui déclenche l'apoptose des cellules cible [45].

- la sécrétion de granulysines et de cathélicidines qui jouent un rôle antiviral et antibactérien [45].

#### ***-Reconnaissance et destruction des cellules tumorales***

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  infiltrent le tissu tumoral et sont capables de lyser les cellules cancéreuses humaines [46].

En outre, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont capables de reconnaître si une cellule est saine ou non (infectée, transformée, cancéreuse) grâce à des récepteurs inhibiteurs associés au TCR. Ces récepteurs inhibent l'activation du lymphocyte T  $\gamma\delta$  si la cellule est saine en reconnaissant des molécules du CMH de classe I. Si le TCR  $\gamma\delta$  détecte peu de phosphoantigènes mais beaucoup de molécules de CMH I, la cellule sera épargnée et, à l'inverse, s'il y a beaucoup d'antigènes mais peu de molécules du CMH I, cette cellule sera éliminée [45].

Les lymphocytes T $\gamma\delta$  partagent donc des propriétés des cellules de l'immunité innée et adaptative [44,46].

#### ***-Rôle anti-tumoral des lymphocytes T $\gamma\delta$ : perspectives en immunothérapie***

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont actifs contre les tumeurs. En effet, il existe des lymphocytes T  $\gamma\delta$  infiltrant des tumeurs solides. On peut les stimuler in vitro par

différentes méthodes (ex. stimulation en PHA-feeders, feeders : lignée B immortalisée, cellules mononuclées du sang périphérique, et ceci en présence d'IL-2). De plus, les lignées cellulaires tumorales sont sensibles à la lyse par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  [46].

Pour des thérapies anti-tumorales, il faut exploiter la capacité des lymphocytes T  $\gamma\delta$  à détruire les cellules tumorales. Il faudrait arriver à les activer chez des patients atteints de cancer par des antigènes spécifiques [46].

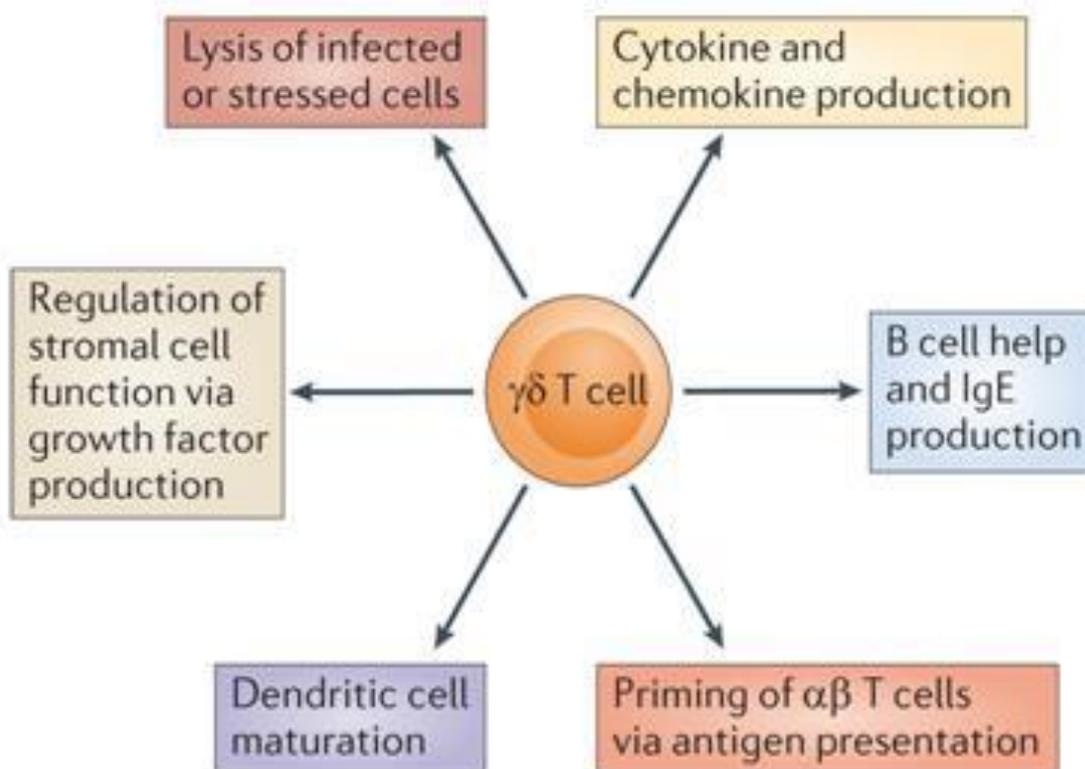
Il existe deux manières d'amplifier ces lymphocytes :

- des injections de molécules visant à activer et/ou amplifier la population T $\gamma\delta$  chez les patients atteints de cancer.

- des injections répétées à des patients de lymphocytes T  $\gamma\delta$  amplifiés *ex vivo* [46].

Ces essais ont été décevants mais de nouvelles pistes sont explorées pour augmenter l'activation des lymphocytes T  $\gamma\delta$  [46].

Les fonctions des cellules T  $\gamma\delta$  sont résumées sur la figure ci-dessous [70].



**Figure 6:** Fonctions des cellules T gamma-delta

Source : Nature Reviews Immunology 2013

Les cellules T gamma-delta peuvent avoir un rôle central important dans la défense de l'hôte contre une large gamme de stress stériles ou infectieux.

Ce rôle est atteint via 6 mécanismes.

- 1- Les lymphocytes T  $\gamma \delta$  peuvent directement lyser et éliminer les cellules stressées ou infectées suite à la production de granzymes.
- 2- Elles peuvent produire des cytokines et des chimiokines leur permettant de réguler d'autres cellules immunitaires et non-immunitaires.
- 3- Elles peuvent aider les cellules B et promouvoir la production d'IgE.
- 4- Elles peuvent présenter des antigènes pour le priming des cellules T  $\alpha\beta$ .
- 5- Elles peuvent jouer un rôle dans la maturation des cellules dendritiques.
- 6- Elles peuvent réguler la fonction des cellules stromales via la production de facteurs de croissance.

## **4. Méthodologie**

### **1. Lieu d'étude**

Notre étude a été menée à Donégébougou, village situé dans la préfecture de Kati, à 30 km au Nord-ouest de Bamako et 17 km au nord-est de Kati. Il est limité au Nord par le village de N'gara et ses hameaux, au Sud par le village de Sikoro, à l'Est par les villages de Sirababougou et de Torodo, à l'Ouest par le village de Banambani. Ses coordonnées géographiques sont 7°59'5'' longitude Ouest et 12°48'38'' latitude Nord.

#### **1.1. Historique**

Le village de Donégébougou a été fondé au XIX<sup>ème</sup> siècle par un chasseur du nom de Donégué Niaré venu de Torodo. De retour d'une chasse, il trouva le site propice à l'agriculture et à la chasse. Il s'y installa et ceci près du grand puits sacré qui demeura l'unique puits du village jusqu'à son tarissement dans les années 1960 ; il est présentement réhabilité.

Donégué, fasciné par la chasse, fit venir de Torodo son village d'origine ses frères, ensemble, ils érigèrent le premier hameau du village qui prit le nom de Donégébougou qui signifie en Bambara le hameau de Donégué.

Plus tard, les Niaré autochtones furent rejoints par les Diarra et les Diallo.

#### **1.2. Relief**

Il est composé par des collines de nature gréseuse, des plaines et des dépressions où coulent des ruisseaux.

Les Kouloudian, Kouloubléni et le Kôkôfè-koulou sont les prolongements du plateau mandingue et culminent respectivement à 543, 415 et 400 mètres.

Les terrains d'exploitation agricole sont constitués d'une part par les graviers et d'autre part des plaines sablo-argileuses.

#### **1.3. Climat, flore et faune**

##### **➤ Climat**

Le climat est du type soudanien. Deux vents soufflent sur le village : la mousson de direction sud-ouest et l'harmattan de direction nord-est et divisent ainsi l'année en deux saisons :

- une saison pluvieuse de Juin à Octobre, avec le pic de précipitation en Août et une forte densité anophélienne en septembre; les précipitations annuelles atteignant environ 1800 mm de pluies par an, sont principalement enregistrées pendant la saison des pluies ;

- une saison sèche comprenant une saison sèche fraîche de Novembre à Février et une saison sèche chaude de Mars à Juin avec des températures moyennes élevées (31-33°C).

#### ➤ **Flore**

La végétation est une savane arborée avec un tapis herbacé plus ou moins dense.

L'arbre le plus fréquent est le karité (*Vitellaria paradoxa*).

#### ➤ **Faune**

La faune est constituée par de nombreux insectes d'importance médicale dont le groupe des Culicidae (les *Anopheles*, *Culex* et *Aedes*). Parmi les vertébrés on rencontre les reptiles et plusieurs espèces d'oiseaux et de petits mammifères.

### **1.4. Hydrographie**

Le village possède un cours d'eau, la rivière Koba alimentée par les eaux de pluies; se trouve au sud du village de Donéguébougou. Ce principal cours d'eau constitue un gîte permanent pour le développement des anophèles pendant une bonne partie de l'année.

A l'est du village, le Farani et à l'ouest le Banifarani sont deux cours d'eau qui ne tarissent qu'au mois de février. Pour ce qui est du Koba, son assèchement n'est total qu'au mois de mars.

### **1.5. Population**

Essentiellement constitué de Bambara, de Malinké et de Peulh.

Le nombre d'habitants en 2016 était de 2074 à Donéguébougou, 1829 habitants à Torodo, 1435 à Zorokoro et 2028 à Banambani.

La principale activité menée est le maraichage. La culture des céréales, l'élevage et la sylviculture y sont des activités secondaires.

Les religions pratiquées sont l'Islam, le Christianisme et l'Animisme.

## **1.6 Infrastructures socio-sanitaires**

Le village de Donéguébougou dispose d'un dispensaire communautaire. Il a été construit en novembre 1994 avec l'appui du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires de l'Ecole Nationale de Médecine et de pharmacie (l'actuelle FMOS-FAPH) à travers le projet SELF-HELP de l'Ambassade des Etats-Unis d'Amérique au Mali.

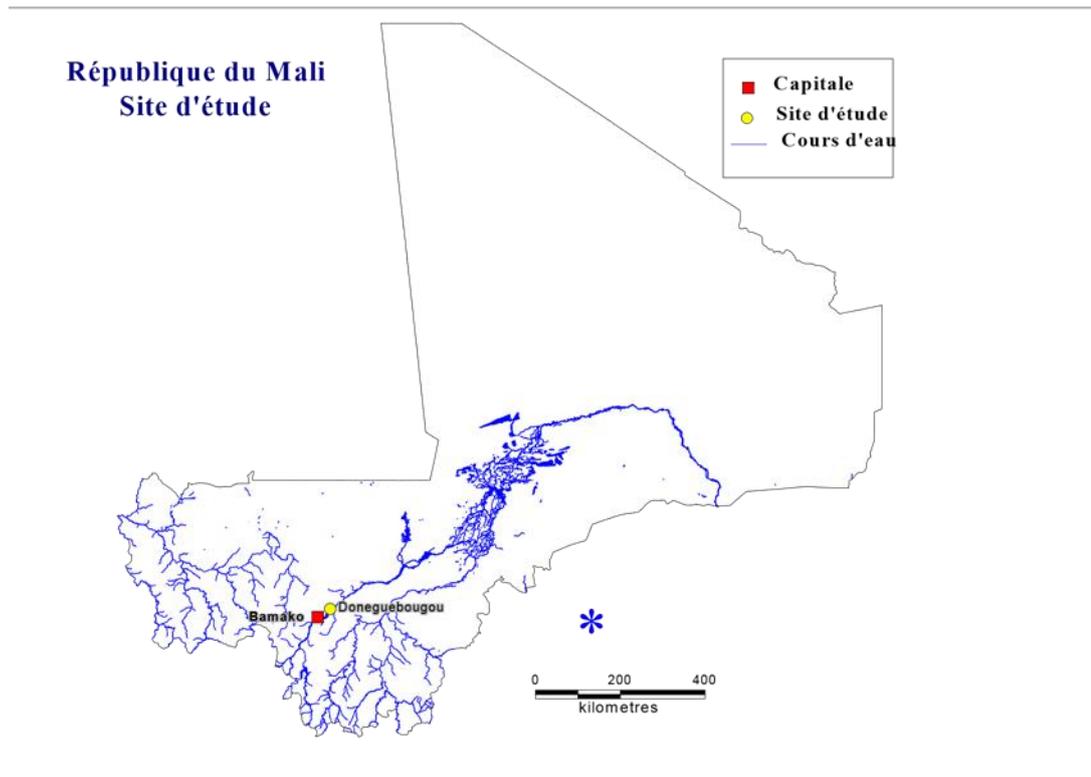
Un centre de recherche du MRTC composé de :

- un bloc de recherche avec une salle d'identification, trois boxes cliniques, une salle de données, une salle de prélèvement, une salle de préparation du vaccin, une salle de vaccination, une salle de réanimation et une salle d'observation.
- un bloc de consultation externe
- un bloc de logement pour le personnel
- un château d'eau et deux groupes électrogènes

Le village a été également doté d'une école fondamentale en décembre 1994 par la coopération canadienne.

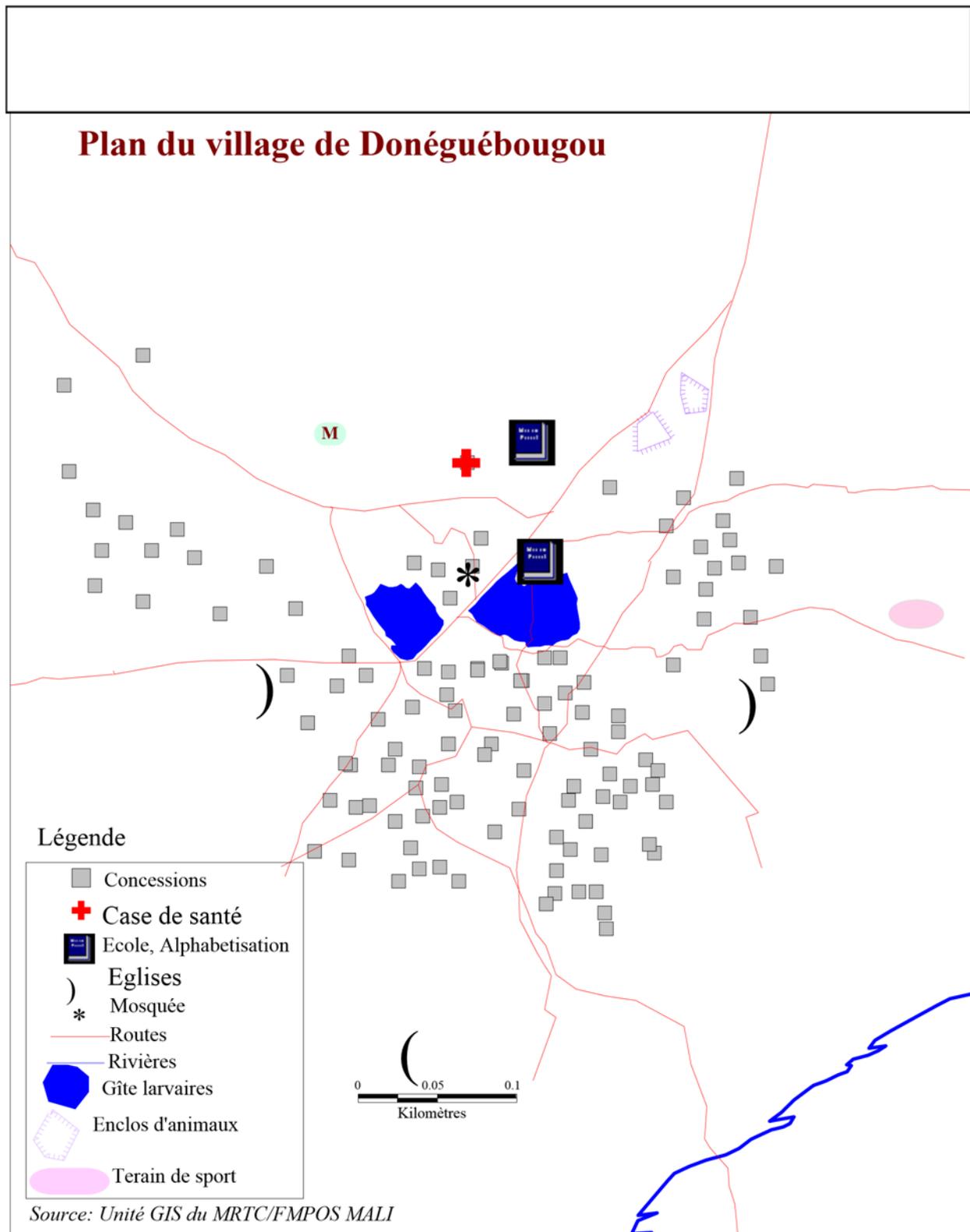
Une mosquée, une église catholique, une église protestante et un centre d'alphabétisation représentent les autres édifices publics du village.

Le village dispose de réseaux de téléphonie mobile ; Orange Mali et la SOTELMA Malitel.



*Figure 7: Localisation du site d'étude.*

**Source : Unité GIS du MRTC/FMPOS MALI.**



**Figure 5 :** Plan du village de Donéguébougou

**Figure 8 :** Plan du village de Donéguébougou

**Source: Unité GIS du MRTC/FMPOS MALI.**

## **2. Type d'étude**

Il s'agissait d'une étude transversale.

## **3. Période d'étude**

Cette étude s'est déroulée de Novembre 2015 à Mars 2016.

## **4. Population d'étude**

La population de l'étude se compose de sujets en bonne santé âgés de 18 à 50 ans, qui résident à Donéguébougou et dans les villages environnants comme Banambani, Toubana, Torodo, Sirababougou au Mali.

## **5. Critères d'inclusion et de non inclusion**

### **5.1. Critères d'inclusion**

Les critères d'inclusion comprenaient :

- âge  $\geq 18$  et  $\leq 50$  ans
- capable de fournir une preuve d'identité à la satisfaction du clinicien d'étude qui achève le processus d'inclusion
- généralement en bonne santé et sans antécédents médicaux cliniquement significatifs
- fournir un consentement éclairé pour la participation à l'étude
- disponible pour toute la durée de l'étude
- contraception fiable pour les femmes ayant le potentiel de

### **5.2. Critères de non inclusion**

Les critères de non inclusion étaient :

- grossesse, telle que déterminée par un échantillon d'urine positif ou un test de choriogonadotropine sérique humaine
- actuellement allaitante (si c'est une femme)
- une maladie comportementale, cognitive ou psychiatrique qui, de l'avis du chercheur affecte la capacité du participant de comprendre et de se conformer au protocole de l'étude.
- les allergies connus ou une contre-indication: ASAQ ou Coartem.

- l'hémoglobine, WBC, les neutrophiles et les plaquettes en dehors des limites normales définies par le laboratoire local.
- le niveau de l'Alanine transaminase (ALT) ou de la créatinine (Cr) au-dessus de la limite normale supérieure.
- infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), l'hépatite C (VHC), ou l'hépatite B (VHB).
- anomalie de l'ECG cliniquement significative
- antécédent de prise d'un produit expérimental au cours des 30 derniers jours
- la participation ou la participation prévue à un essai clinique avec un produit expérimental avant l'achèvement de la visite de suivi 28 jours après la dernière vaccination ou la participation prévue à une étude de vaccin expérimental jusqu'à la dernière visite requise du protocole.
- antécédent d'une réaction allergique grave ou choc anaphylactique.
- le syndrome d'immunodéficience connu.
- la réception d'un vaccin vivant au cours des 4 dernières semaines ou d'un vaccin inactivé au cours des 2 dernières semaines avant la vaccination # 1 et chaque jour de vaccination ultérieure
- la réception précédente d'un vaccin expérimental contre le paludisme au cours des 5 dernières années.

## **6. Organisation générale du travail**

Le travail se faisait à Donéguébougou. Certains échantillons sont traités sur place tandis que d'autres sont transportés et traités au laboratoire d'Immunologie du MRTC au Point G à Bamako.

La permission communautaire étant obtenue avant le début de l'étude, un consentement écrit individuel était obtenu avant le dépistage et l'inclusion dans l'étude. Le travail était organisé autour de plusieurs postes.

### ***Poste d'identification***

Il était composé essentiellement d'un clinicien chargé d'identifier les sujets. Chaque volontaire était identifié par son numéro d'identification composé du numéro d'étude unique.

### ***Poste clinique***

Composés par deux médecins occupant chacun une salle médicale. Leurs tâches consistaient à faire un examen clinique complet des participants, ainsi que la prescription de médicaments s'il y avait lieu. Du poste clinique, les participants étaient orientés au poste de prélèvement.

### ***Poste de prélèvement***

Des biologistes étaient chargés du prélèvement de sang veineux, de la confection de goutte épaisse et de frottis mince, de la réalisation d'un test de diagnostic rapide (TDR) au besoin. Les prélèvements de sang veineux se faisaient sur des tubes EDTA. Sur les étiquettes étaient mentionnés : le numéro d'identification et le sexe du participant, la date et l'heure du prélèvement ainsi que les initiales du biologiste qui a prélevé. Les échantillons étaient chargés sur des portoirs appropriés et transportés ensuite dans la salle d'analyse. Certains étaient envoyés au laboratoire d'Immunologie du MRTC au Point G à Bamako pour le dosage des cellules T par la cytométrie en flux.

### ***Poste d'administration des médicaments***

Le médicament de l'étude était l'artésunate/amodiaquine (ASAQ).

Tous les sujets ont reçu au moins une dose de traitement complet antipaludique avec l'artésunate/amodiaquine (ASAQ) au cours de l'étude.

L'ASAQ est une combinaison thérapeutique à base d'artémisinine à dose fixe qui est indiqué et approuvé pour le traitement du paludisme à *P. falciparum* non compliqué. Il a été démontré être aussi efficace que l'artéméter/luméfantrine lorsqu'il est pris à une dose une fois/jour.

### ***Transfert et réception des échantillons au laboratoire***

Un biologiste était chargé de la réception des échantillons envoyés en vérifiant leur qualité (sang non hémolysé et non coagulé) ainsi que la conformité des données sur les tubes et les fiches d'envoi. Les échantillons étaient ensuite enregistrés sur une fiche de réception comportant les informations suivantes (le numéro d'identification, date et heure de prélèvement, date et heure de réception et les initiales du receveur) avant toutes procédures d'analyse.

### ***Traitement des échantillons***

Le personnel du laboratoire a été formé aux bonnes pratiques de laboratoires.

## **7. Critères de jugement de l'étude**

Le critère de jugement primaire était :

- Les cellules T : la proportion d'expression des cellules T gamma delta.

Le critère de jugement secondaire était :

- L'infection palustre (parasitémie détectée par la goutte épaisse).

## **8. Taille de l'échantillon**

Nous estimons pouvoir détecter différentes proportions d'expression des cellules T gamma delta à deux temps fixes entre les sujets qui avaient reçu en tout 3 doses de traitement antipaludique (ASAQ) et ceux qui n'avaient reçu qu'une seule dose. Nous avons utilisé un groupe de 30 participants appariés selon leur affiliation dans deux groupes que nous avons constitué pour comparer les proportions d'expression des cellules T gamma delta ( groupe 3 ASAQ et groupe 1 ASAQ comprenant chacun 15 participants).

## **9. Enrôlement et recrutement des participants**

Les participants potentiels de l'étude ont été informés sur l'étude à travers des réunions communautaires et pendant les visites aux centres de santé. Les informations concernant les objectifs de l'étude, la population cible, et les procédures de l'étude ont été présentées. Les participants éligibles ont été invités au centre de santé et le consentement éclairé individuel est obtenu avant tout enrôlement dans l'étude.

Si le participant ne peut pas lire et comprendre le français, le consentement éclairé lui est traduit oralement dans la langue locale en présence d'un témoin qui peut lire et comprendre le français. Les participants qui ne peuvent pas lire apposent leur empreinte digitale à la place de la signature; en plus un témoin indépendant signe le formulaire de consentement pour attester que le contenu du document de consentement éclairé a été communiqué et compris pour l'inclusion dans l'étude.

## **10. Techniques de mesure des variables**

### **10.1. Variables démographiques**

Les principales variables démographiques sont le sexe et l'âge. Elles ont été déterminées à l'inclusion sur la base des données du recensement et confirmées par l'interrogatoire et l'examen clinique.

### **10.2. Variables biologiques**

#### **La parasitémie**

Les techniques de la goutte épaisse et du frottis mince ont été utilisées pour la détermination de la charge parasitaire, le stade de développement du parasite et l'espèce plasmodiale.

#### ***Préparation de la goutte épaisse et du frottis mince***

Étiquetage de la goutte épaisse et du frottis.

Chaque lame est étiquetée de façon correcte et lisible avant la collecte de sang sur elle.

L'étiquetage est fait sur la partie rugueuse de la lame.

Les lames ont porté les informations suivantes :

- le numéro d'identification du volontaire
- la date de visite et
- les initiales du préleveur.

#### ***Prélèvement de sang capillaire pour la goutte épaisse/frottis :***

Choisir le 3ème ou le 4ème doigt de la main gauche. Éviter les doigts enflés ou tuméfiés ainsi que les doigts présentant une éruption cutanée ou les doigts très froids.

Réchauffer le doigt si nécessaire en le frottant entre vos mains. Nettoyer le doigt avec un tampon d'alcool (70% c/v).

Laisser sécher ou nettoyer avec du coton sec pour ôter le reste de l'alcool avant la piqûre.

Retirer un vaccinostyle de son emballage en évitant de toucher le bout pointu.

Ne pas piquer près de l'ongle et éviter les côtés du doigt. Piquer fermement d'un coup au centre de la pulpe du doigt. Le bout du vaccinostyle doit bien pénétrer le doigt pour un écoulement adéquat de sang.

Nettoyer la première goutte de sang avec du coton sec. Recueillir assez de gouttes de sang pour la GE, pour la confection du frottis. Presser le doigt vers l'extrémité si nécessaire pour recueillir suffisamment de gouttes de sang. Disposer deux gouttes de sang sur la lame comme ci-dessous.

Placer un tampon sec sur la zone de la piqûre et demander à l'enfant ou à son parent/tuteur de le tenir environ 2-3 minutes jusqu'à l'arrêt de l'écoulement de sang.

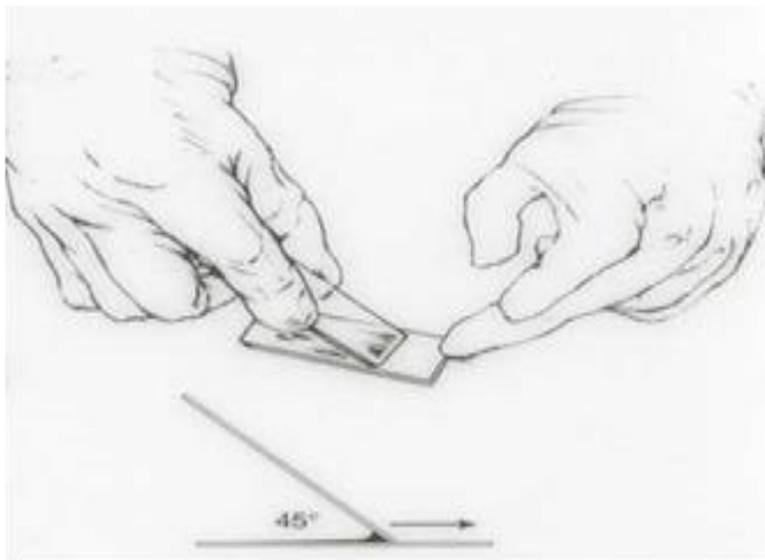
***Préparation de la GE et du frottis :***

Déposer une lame sur une surface ferme et plate. Utiliser une lame d'étalement pour préparer la GE et le frottis mince.

Placer un bout de la lame d'étalement juste après la goutte de sang déposé pour le frottis.

Permettre un léger contact de la lame avec la goutte de sang et laisser le sang se répandre sur les bords de la lame d'étalement.

En tenant la lame d'étalement, former un angle de 45 degré avec la lame de GE/frottis et pousser doucement et régulièrement vers le bout de la lame de GE/frottis jusqu'à ce que le sang soit entièrement reparti sur la surface de la lame pour former le frottis mince.



***Figure 9: Technique du frottis mince***

**Source : Manuel des techniques de base pour le laboratoire, OMS : 1997 [71].**

S'assurer que la lame d'étalement est bien en contact avec la surface de la lame de GE/frottis au moment de la confection du frottis.

En utilisant un coin de la lame d'étalement joindre les gouttes de sang recueilli pour la GE en formant un cercle de 1 à 1.5 cm de diamètre.

Ne pas triturer excessivement le sang.

Toutes ces tâches doivent être exécutées rapidement afin d'éviter la coagulation du sang.

Eviter des GE trop épaisses ou des frottis trop fins.

Déposer la lame de goutte épaisse/frottis mince dans la boîte de collection de type OMS pour séchage.

### ***Coloration des lames***

La coloration de goutte épaisse/frottis était effectuée après fixation du frottis au méthanol et coloration au Giemsa dilué à 10% avec de l'eau distillée. Les lames étaient placées sur le côté dans un portoir et trempées dans un bassin contenant le colorant de Giemsa fraîchement préparé pendant 15 à 20 minutes. Au terme du temps de coloration les lames étaient rincées et séchées sur le râtelier à l'air libre.

### ***Lecture des lames***

La procédure de double lecture systématique par 2 techniciens indépendants était adoptée.

La lecture des lames était faite à l'aide d'un microscope optique binoculaire à immersion (objectif 100). La parasitémie était établie en comptant les formes asexuées et les formes sexuées (gamétocytes) de chaque espèce plasmodiale observée contre 300 leucocytes pour les formes asexuées et 500 pour les gamétocytes. Les résultats sont exprimés en nombre de parasites par mm<sup>3</sup> de sang sur la base du nombre des leucocytes obtenus à partir de la numération formule sanguine. Après la lecture double un programme informatique était utilisé pour comparer les résultats afin de déterminer s'il y a une différence de plus de 30% entre les 2 lectures auquel cas une troisième lecture était réalisée par un autre technicien de laboratoire.

### ***Matériels utilisés pour la préparation, coloration et lecture de la GE/frottis***

Microscope optique avec objectif à immersion (x100)

Lames porte-objets

Vaccinostyles stériles  
Gants  
Coton hydrophile  
Alcool à 70°C  
Colorant Giemsa  
Détergent (Ajax)  
Bac à coloration avec portoir à lames  
Papier absorbant  
Tissu doux et non pelucheux  
Marqueur indélébile  
Crayon  
Stylo  
Séchoir  
Chronomètre  
Eau de javel  
Pot d'étalement  
Bassine  
Eau de robinet  
Eau distillée à PH=7.2  
Huile à immersion  
Poubelles  
Registre + cahiers de pailleasse  
Fiches de report des résultats  
Boîtes de rangement des lames type



**Figure 10 : Technique de la goutte épaisse**

**-Le dosage des cellules T.**

***Mode opératoire***

Le dosage des cellules T gamma delta est fait en utilisant la cytométrie en flux.

Elle consistait à effectuer en *ex vivo*, l'immuno-marquage du sang total par des anticorps fluorescents (**anti- CD3-Alexa700**, anti-CD8- APC H7, anti-CD4-PE-CY5, **anti-gamma delta TCR-PE**, anti-TCR Vd2-FITC, anti-CD45RO –BV421, anti-CD27-PE-Cy7, anti-CD103-APC, anti CD169-BV650) à chaque point de temps selon la procédure ci-dessous.

***Matériels :***

FACS tube,

Pipettes de 2 µl, 20µl et 200 µl

Pipette sérologique: 10 ml

Centrifugeuse

***Réactifs :***

Phosphate buffered saline (PBS),

Fix/Perm

Perm Buffer (1X)

***Procédure :***

Mettre 150 µl de sang total dans le FACS tube

Ajouter 1 µl des anticorps de surface (**anti- CD3-Alexa700**, anti-CD8- APC H7, anti-CD4-PE-CY5, **anti-gd TCR-PE**, anti-TCR Vd2-FITC, anti-CD45RO –BV421, anti-CD27-PE-Cy7, anti-CD103-APC, anti CD169- BV650) et agiter

Incuber à la température ambiante en absence de la lumière pendant 20 mn.

Laver avec 2 ml de PBS, centrifuger à 1700 tours pendant 5 mn puis enlever le surnageant,

Ajouter 1 ml de solution de Fix/perm dans chaque tube, puis vortexer

Incuber pendant 20 mn a 4 C.

Laver avec 2 ml de PBS, centrifuger à 1700 tours pendant 5mn et enlever le surnageant

Laver avec 2 ml de Perm Buffer (1X). Centrifuger à 1700 tours pendant 5mn et enlever le surnageant.

Resuspendre les cellules dans 200 µl de PBS. Stocker dans 4 C jusqu'au moment de l'utilisation au LSRII.

#### ***Préparation des tubes de compensation***

Préparer les tubes

Ajouter une goutte de beads de compensation (One Compbeads) dans chaque FACS tube

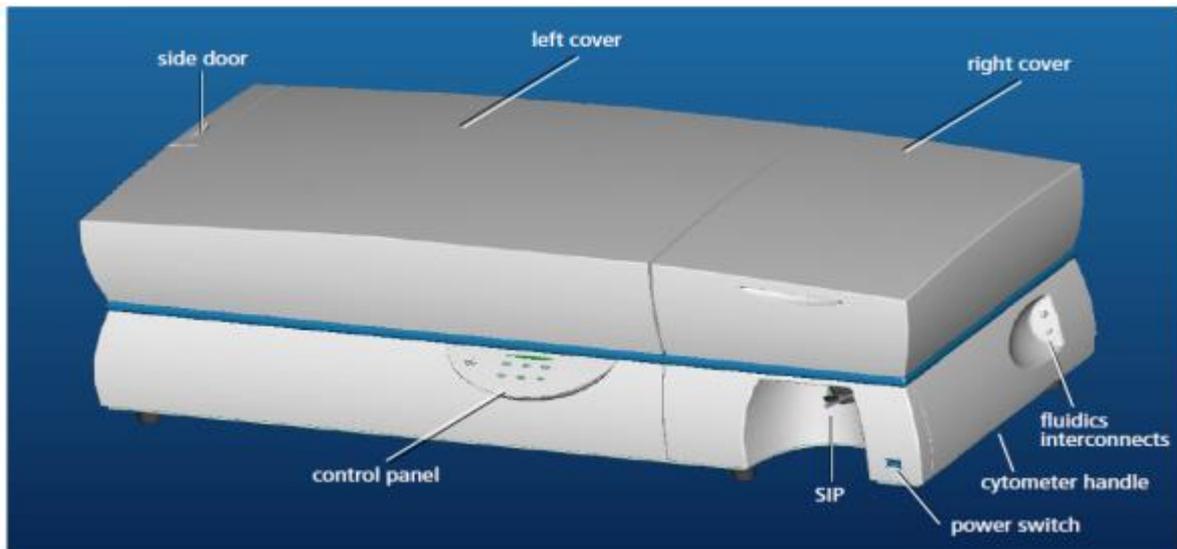
Ajouter la même quantité d'anticorps utilisée dans les échantillons

Incuber pendant 15 mn à la température ambiante en l'absence de la lumière

Laver avec 1 ml de PBS, centrifugé à 1700 tours pendant 5mn. Enlever le surnageant

Ajouter 300ul de PBS dans chaque tube et agiter.

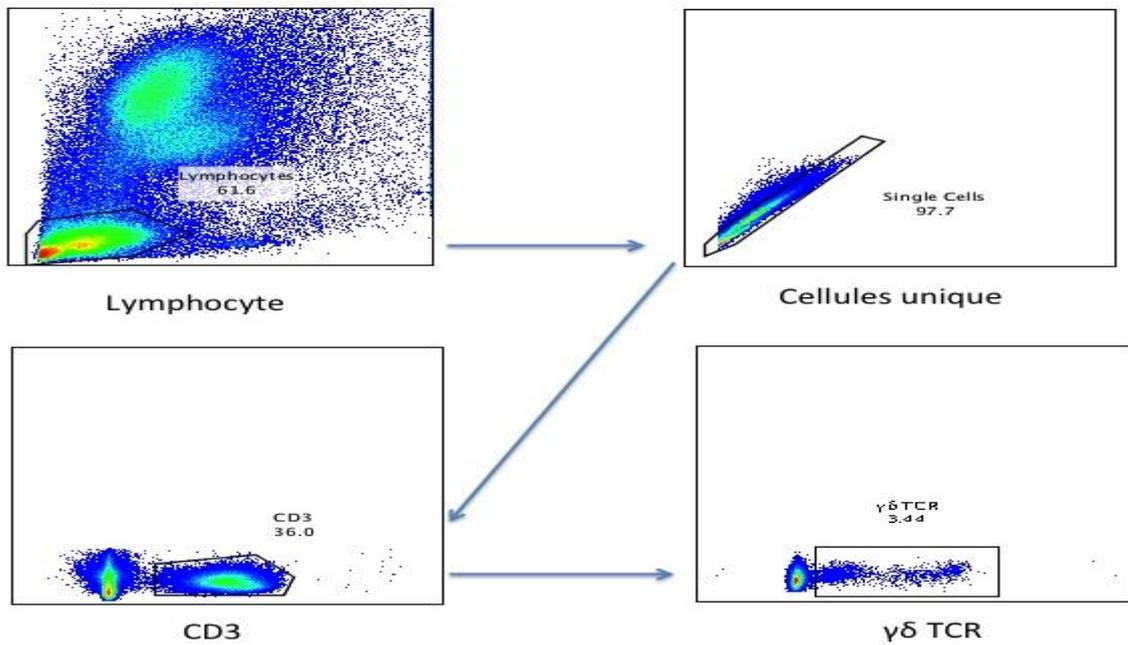
Stocker dans 4° C jusqu'au moment de l'utilisation au cytomètre BD LSRII.



*Figure 11: BD LSR II flow cytometer*

**bdbiosciences.com**

La moyenne d'expression des cellules T  $\gamma\delta$  était obtenue à partir de la proportion de CD3 exprimée sur les lymphocytes T.



*Figure 12 : Stratégie d'analyse d'expression des cellules  $\gamma\delta$  sur les cellules T.*

## **11. Collecte, saisie et analyse des données**

Les données ont été recueillies dans les cahiers d'observation individuels des participants, saisies et vérifiées dans une base de données Data fax version 2.1 et analysées par les logiciel SPSS version 22 et Excel 2010.

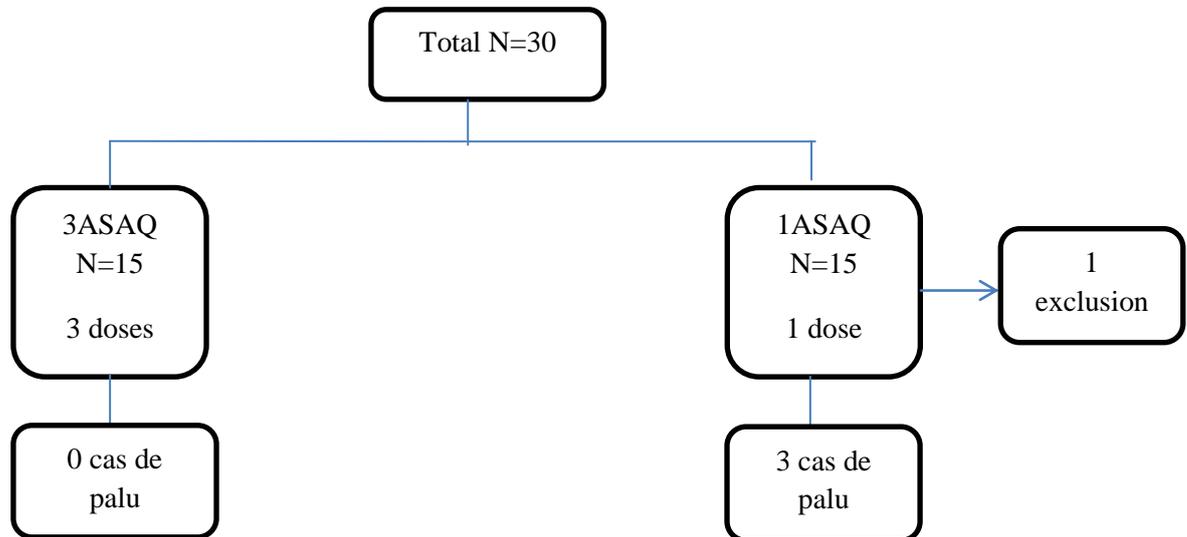
Le dosage des cellules  $\gamma \delta$  était fait sur le cytomètre BD LSR II, les données analysées par le logiciel Flow Jo version 10.0.

## **12. Considération éthique**

Le protocole d'étude finalisé avait été examiné, approuvé par le comité d'éthique de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie de l'Université de Bamako sous le numéro 2015/137/CE/FMPOS. Un consentement éclairé était obtenu avant le dépistage pour l'inclusion dans l'étude. Les sujets étaient identifiés par des numéros d'identification qui sont portés dans les dossiers et sur les tubes de prélèvements afin de préserver l'anonymat des participants. Les participants recevaient des soins médicaux gratuits en cas de maladie et une compensation pour leurs temps et les voyages.

# V. RESULTATS

## 1. Résultats globaux



Une exclusion a été enregistrée dans le groupe 1ASAQ (sexe féminin, 41 ans exclue pour traitement traditionnel de longue durée).

– Age moyen: 37,1 ans [33,7 ; 40,5], l'écart type: 9,0, âge min : 19 ans et âge max : 50 ans.

## 2. Caractéristiques démographiques des participants de l'étude.

**Tableau IV:** Répartition des participants par sexe et par groupe de traitement.

Sexe	3 ASAQ	1 ASAQ	Total
Féminin	3 (20%)	8 (53,3%)	11 (36,7%)
Masculin	12 (80%)	7 (46,7%)	19 (63,3%)
Total	15	15	30

Les participants de sexe masculin représentaient respectivement de 80 % et 46,7% dans le groupe 3 ASAQ et 1 ASAQ et étaient comparables dans les deux groupes;  $\chi^2=3,589, p=0,058$ .

**Tableau V:** Répartition des participants par tranche d'âge et par groupe de traitement.

Age (ans)	3 ASAQ	1 ASAQ	Total
[18-35]	4 (26,7%)	6 (40%)	10 (33,3%)
[36-50]	<b>11 (73,3%)</b>	<b>9 (60%)</b>	20 (66,7%)
<b>Total</b>	15	15	30

La tranche d'âge des 36-50 ans était majoritairement représentée dans notre étude avec respectivement 73,3% et 60% dans les groupes 3 ASAQ et 1 ASAQ et était comparable dans les deux groupes ;  $\chi^2=0,6$  ;  $p=0,439$ .

**Tableau VI:** Moyenne d'âge des participants par groupe de traitement

Age (ans)	3 ASAQ	1 ASAQ	Total
N	15	15	30
<b>Moyenne, IC 95%</b>	<b>37,4</b> [32,1 ; 42,7]	<b>36,8</b> [31,9 ; 41,7]	37,1 [33,7 ; 40,5]
<b>Ecart-type</b>	9,6	8,8	9,0
<b>Min – Max</b>	19 – 50	21 - 50	19 - 50

Les âges moyens étaient de 37,4 ans avec un intervalle de confiance de [32,1 ; 42,7] et de 36,8 ans avec un intervalle de confiance de [31,9 ; 41,7] respectivement dans le groupe 3 ASAQ et 1 ASAQ et étaient comparables dans les deux groupes  $t\text{-test}=0,179$  ;  $p=0,859$ .

### 3. Impact de la prise de l'ASAQ sur l'incidence du paludisme chez les participants.

**Tableau VII:** Répartition des infections palustres par groupe de traitement après administration de la première dose de vaccin.

<b>GE</b>	<b>3 ASAQ</b>	<b>1 ASAQ</b>	<b>Total</b>
<b>GE+</b>	0 (0%)	<b>3 (20%)</b>	3 (10%)
<b>GE-</b>	15 (100%)	12 (80%)	27 (90%)
<b>Total</b>	15	15	30

La prévalence du paludisme était de 20% dans le groupe 1 ASAQ et 0% dans le groupe 3 ASAQ et était comparable dans les deux groupes Fisher Exact test  $p=0,224$ .

**Tableau VIII:** Répartition des infections palustres par groupe de traitement après administration de la troisième dose de vaccin.

<b>GE</b>	<b>3 ASAQ</b>	<b>1 ASAQ</b>	<b>Total</b>
<b>GE+</b>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>GE-</b>	15 (100%)	14 (100%)	29 (100%)
<b>Total</b>	15	14	29

Après administration de la troisième dose de vaccin la prévalence du paludisme était nulle dans les deux groupes.

#### 4. Expression de gamma delta TCR sur les cellules T.

**Tableau IX:** Moyenne de  $\gamma \delta$  T des participants par groupe de traitement après administration de la première dose de vaccin.

gd TCR	3 ASAQ	1 ASAQ	Total
N	15	15	30
Moyenne, IC 95%	10,9 [5,5 ; 16,3]	5,9 [4,0 ; 7,8]	8,4 [5,7 ; 11,1]
Ecart-type	9,4	3,4	7,2
Min – Max	2,2 – 28,0	2,7 – 15,8	2,2 – 28

La moyenne d'expression des cellules  $\gamma \delta$  était de 10,9 dans le groupe 3 ASAQ et de 5,9 dans le groupe 1 ASAQ. Elle était comparable dans les deux groupes T-test=1,991 ;  $p=0,056$ .

**Tableau X:** Moyenne des cellules  $\gamma \delta$  T des participants par groupe de traitement après administration de la troisième dose de vaccin.

gd TCR	3 ASAQ	1 ASAQ	Total
N	14	15	29
Moyenne, IC 95%	6,0 [3,7 ; 8,3]	7,8 [5,4 ; 10,3]	6,9 [5,3 ; 8,6]
Ecart-type	3,9	4,4	4,2
Min – Max	3,1 – 18,5	3,7 – 19,6	3,1 – 19,6

La moyenne d'expression des cellules  $\gamma \delta$  était de 6,0 dans le groupe 3 ASAQ et de 7,8 dans le groupe 1 ASAQ. Elle était comparable dans les deux groupes, T-test= 1,147 ;  $p=0,261$ .

## **VI. COMMENTAIRES ET DISCUSSION**

Le but de notre étude était de déterminer l'effet de différentes doses d'Artésunate-Amodiaquine (ASAQ) à travers deux schémas d'administration sur la parasitémie et la fréquence des cellules T  $\gamma$   $\delta$  chez des participants adultes en bonne santé à Donéguébougou au cours d'un essai vaccinal.

### **1. Sur le plan de la méthodologie**

Notre cadre d'étude a été le village de Donéguébougou, le choix de ce site se justifie par les raisons suivantes :

- depuis 1993 ce village a été le site des études entomologiques et épidémiologiques sur le paludisme, et abrite depuis 1998 des études de préparation de site pour la conduite d'essais cliniques de vaccins antipaludiques ;
- il existe des rapports de confiance mutuelle entre la population de ce village et l'équipe du MRTC /DEAP.

### **2. Sur le plan des résultats**

#### **2.1. Caractéristiques sociodémographiques**

Sur les 30 participants qui ont été inclus dans notre étude 63% étaient de sexe masculin et le ratio (H/F) était de 1,72 en faveur du sexe masculin.

Ce résultat est comparable à celui obtenu par Darar Y à Missira (61,90%) en 2004 qui a trouvé un sexe ratio de 1,62 en faveur du sexe masculin [72], à celui de Ngoma à Libreville (1,4)[29].

La répartition des participants selon le sexe et le groupe a montré que les participants de sexe masculin représentaient respectivement de 80 % et 46,7% dans les groupes 3 ASAQ et 1 ASAQ et étaient comparables dans les deux groupes;  $\chi^2=3,589$ ,  $p=0,058$ .

Sur l'ensemble des participants la moyenne d'âge était de 37,1 ans avec un intervalle de confiance de [33,7 ; 40,5] et l'écart type 9,0. L'âge minimum était de 19 ans et l'âge maximum était de 50 ans.

La tranche d'âge des 36-50 ans était majoritaire dans les deux groupes avec 73,3% et 60% respectivement dans les groupes 3 ASAQ et 1 ASAQ. Elle était comparable dans les deux groupes ;  $p=0,439$ .

La moyenne d'âge des participants était comparable dans les deux groupes avec 37,4 ans et 36,8 ans respectivement dans les groupes 3 ASAQ et 1 ASAQ ;  $p=0,859$ .

## **2.2. Infection palustre**

Sur les 30 participants inclus dans notre étude, après administration de la première dose la prévalence de l'infection palustre était de 20% dans le groupe 1 ASAQ et nulle dans le groupe de 3 ASAQ et était comparable dans les deux groupes  $p=0,224$ . Ce résultat était comparable à ceux de Diarra K à Ouelessebougou en 2014 soit 23,3% [73] et Dicko et al à Kita en 2014 soit 24,1% [74] chez des enfants.

Par contre il était différent de ceux obtenus par Tapily A S en 2009 à Mantéourou qui était de 7,6% chez des adultes [75] et également différent de ceux de Sangaré B en 2011 à Nanguilabougou 46,2% [76], de Traoré M B en 2011 à Nanguilabougou 46,3% [77] et Darrar Y en 2004 à Missira soit 51,50% [72] tous chez des enfants.

Après la troisième vaccination, la prévalence de l'infection palustre était similaire et nulle dans les groupes. Ce résultat pourrait s'expliquer par la surveillance et le suivi dont ont fait l'objet les participants d'une part et d'autre part par l'efficacité du traitement à l'Artésunate-Amodiaquine associé au vaccin.

Ce résultat est similaire à celui de Tjitra *et al* en 1999 en Indonésie avec la combinaison AS+SP [78].

## **2.3. Proportion des cellules T gamma delta ( $\gamma \delta$ ) du sang périphérique des volontaires.**

Il a été rapporté chez l'homme une augmentation remarquable du nombre de cellules  $\gamma \delta$  T dans le sang périphérique au cours de l'infection palustre et qui demeure élevé plus d'un mois après traitement [79]. Troye-Blomberg *et al* ont montré que les cellules  $\gamma \delta$  T inhibent *in vitro* la croissance des formes asexuées de *Plasmodium falciparum* par une voie cytotoxique [80].

Chez l'homme les cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, représentent un sous ensemble de cellules T  $\gamma\delta$ . Elles sont augmentées et activées au cours de l'infection par *Plasmodium falciparum* et inhibent *in vitro* le cycle sanguin du parasite par un mécanisme encore mal compris [37]. Le mérozoïte (forme parasitaire invasive) est le seul stade vulnérable dans ce phénomène. Chez les patients infectés, une proportion élevée de cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 pourvue de granulysine qui présente une réactivité antiparasitaire spécifique a été détectée. Ceci suggère fortement un rôle important des cellules TV $\gamma$ 9V $\delta$ 2 dans le contrôle de la charge parasitaire chez ces individus [37]. L'étude de cette activité antiparasitaire qui se trouve être renforcée chez les individus exposés, suggère que les cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 représentent donc un nouvel effecteur anti-palustre pouvant directement contribuer au contrôle de la parasitémie, chez les individus exposés ou non [37].

Dans notre étude après administration de la première dose, la moyenne d'expression de cellules gamma delta sur les cellules T était de 10,9 dans le groupe 3 ASAQ et de 5,9 dans le groupe 1 ASAQ et était comparable les deux groupes,  $p=0,056$ .

De même après administration de la troisième dose d'ASAQ, la moyenne d'expression cellules gamma delta sur les cellules T était comparable dans les deux groupes avec 6,0 et 7,8 respectivement dans les groupes 3 ASAQ et 1 ASAQ,  $p=0,261$ .

Ces résultats sont comparables à celui de Tapily A S en 2009 à Mantéourou ( $p > 0,05$ ), [75], à celui de Traoré M B à Nanguilabougou ( $p > 0,05$ ) [77], à celui de Tomoyo *et al* en 2017 en République Démocratique et Populaire du Laos ( $p = 0,62$ ) [81].

Toutes fois nos résultats ont montré une petite diminution de la moyenne des cellules T gamma delta dans le groupe 3 ASAQ. Cette diminution dans le temps pourrait s'expliquer par la prévalence du paludisme dans ce groupe pendant toute la durée de l'étude. La tendance à l'élévation de ce même taux observée dans le groupe 1ASAQ peut s'expliquer par les cas d'infection palustres observés dans ce groupe.

Au début de l'étude la moyenne des cellules T gamma delta était certes comparable dans les deux groupes mais à la limite ( $p = 0,056$ ). Donc la possibilité d'une différence significative n'est pas à écarter avec un échantillonnage différent du nôtre (30

volontaires), ou avec des enfants plus affectés par le paludisme que les adultes sur qui notre étude a porté.

### **3. Les limites de l'étude**

Notre étude a porté sur une trentaine de participants adultes à Donéguébougou. D'autres études plus élargies sur les enfants qui restent plus sujets au paludisme que les adultes pourraient donner d'amples renseignements d'une part quant au dosage des antipaludiques lorsqu'ils sont utilisés dans les essais vaccinaux, et d'autre part sur la fréquence des cellules T  $\gamma \delta$ .

Nous avons exploré la parasitémie au moyen de la goutte épaisse. D'autres méthodes de détection du *Plasmodium* plus sensibles que la GE telle que la PCR par exemple nous auraient permis d'avoir une meilleure estimation des valeurs intrinsèques du paludisme.

Le dosage d'autres marqueurs en plus tels que le PD-1 ou marqueur de l'épuisement des cellules T contribuerait à une meilleure compréhension de l'immunité antipalustre.

## **VII. CONCLUSION**

Nous avons constaté qu'il n'y a pas de différence significative entre le schéma à une dose et le schéma à trois doses d'ASAQ (Artésunate-Amodiaquine) quant à leurs effets sur la parasitémie et la moyenne d'expression des cellules T gamma delta.

La prévalence de l'infection palustre qui était de 20% dans le groupe 1 ASAQ au début et était nulle dans les deux groupes à la fin de l'étude.

La moyenne d'expression des cellules gamma delta sur les cellules T était comparable dans les deux groupes.

## **VIII. RECOMMANDATIONS**

### **Aux chercheurs**

- Poursuivre les études d'impact de l'association traitement antipaludique-vaccin antipaludique à long terme sur l'immunité antipalustre.
- Poursuivre les mêmes études chez d'autres catégories de populations telles que les enfants.
- Encourager la population à participer massivement aux études de recherche pour aider à faciliter l'éradication de ce fléau que constitue le paludisme.

## **IX. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- 1. Gentilini M, Duflo B.** Médecine tropicale. Flammarion; 1986. 839 pp. (Médecine Sciences).
- 2. OMS (organisation mondiale de la santé).** Rapport sur le paludisme 2015. 2015.
- 3. Ministère de la santé du Mali.** EDSM Enquête démographique et de santé du Mali. 2013.
- 4. Doumbo O, Ouattara NI, Korta O, Maharaux A, Touré YT, Traoré SF, Quilici M.** Approche eco-géographique au paludisme en milieu urbain: ville de Bamako au Mali. *Ecol.Hum.*, 1989; 8(3):3-15.
- 5. Ceesay, S. J., Casals-Pascual, C., Erskine, J., Anya, S. E., Duah, N. O., Fulford, A. J., . . . Conway, D. J.** Changes in malaria indices between 1999 and 2007 in The Gambia: a retrospective analysis. *Lancet*,372(9649).
- 6. O’Meara, W. P., Bejon, P., Mwangi, T. W., Okiro, E. A., Peshu, N., Snow, R. W., . . . Marsh, K.** Effect of a fall in malaria transmission on morbidity and mortality in Kilifi, Kenya. *Lancet*, 372(9649). 2008;
- 7. O’Meara, W. P., Mwangi, T. W., Williams, T. N., McKenzie, F. E., Snow, R. W., & Marsh, K.** Relationship between exposure, clinical malaria, and age in an area of changing transmission intensity. *PubMed*, 2008.
- 8. Walther, B., & Walther, M.** What does it take to control malaria? *Ann Trop Med Parasitol*. 2007;
- 9. Das, P., & Horton, R.** Malaria elimination: worthy, challenging, and just possible. *Lancet*, 376(9752), 1515-1517. 2010;
- 10. Korenromp, E. L., Williams, B. G., Gouws, E., Dye, C., & Snow, R. W.** Measurement of trends in childhood malaria mortality in Africa: an assessment of progress toward targets based on verbal autopsy. *Lancet Infect Dis*, 3(6). 2003;349-358.

11. **Ndugwa, R. P., Ramroth, H., Muller, O., Jasseh, M., Sie, A., Kouyate, B., . . . Becher, H.** Comparison of all-cause and malaria-specific mortality from two West African countries with different malaria transmission patterns. 2008;
12. **Walther, M.** Advances in vaccine development against the pre-erythrocytic stage of *Plasmodium falciparum* malaria. *Expert Rev Vaccines*, 5(1). 2006;81-93.
13. **Epstein, J. E., Tewari, K., Lyke, K. E., Sim, B. K., Billingsley, P. F., Laurens, M. B., . . . Hoffman, S. L.** Live attenuated malaria vaccine designed to protect through hepatic CD8(+) T cell immunity. *Science*, 334(6055). 2011;475-480.
14. **Hoffman, S. L., Billingsley, P. F., James, E., Richman, A., Loyevsky, M., Li, T., . . . Sim, B. K.** Development of a metabolically active, non-replicating sporozoite vaccine to prevent *Plasmodium falciparum* malaria. *Hum Vaccin* 61. 2010;97-106.
15. **ZOUNAGRABE.** Etude de l'efficacité hématologique, clinique et parasitologique de la chloroquine et la sulfadoxine-pyriméthamine dans le traitement de l'accès palustre simple de l'enfant dans la région de Bobo-Dioulasso de 1997 à 1999. [Thèse de pharmacie]. [Bamako]: Université de Bamako; 2001.
16. **OMS:** World Health Organization. Severe falciparum malaria. 2000.
17. **Pierre A.** Diplôme de Médecine Tropicale des Pays de l'Océan Indien. Paludisme. 21 sept 2004;
18. **Ndiaye, J. L., Randrianarivelojosa, M., Sagara, I., Brasseur, P., Ndiaye, I., Faye, B., . . . Gaye, O.** Randomized, multicentre assessment of the efficacy and safety of ASAQ--a fixed-dose artesunate-amodiaquine combination therapy in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Malar J*, 8, 125. 2009;
19. **OMS.** Guidelines for the treatment of malaria/World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria/World Health Organization. 2006. Report No.: WHO/HTM/MAL/2006.1108.
20. **Hatton C S R, Peto T E A, Bunch C, Pasvol G.** Frequency of severe neutropenia associated with amodiaquine prophylaxis against malaria. *Lancet* 1. 1986;411-3.
21. **Neftel K A, Woodtly W, Schmid M.** Amodiaquine induced agranulocytosis and liver damage. *Brit Med J* 292. 1986;

- 22. Dicko A, Diallo AI, Tembine I, Dicko Y, Dara N, Sidibe Y, Santara G, Diawara H, Conaré T, Djimde A, Chandramohan D, Cousens S, Milligan PJ, Diallo DA, Doumbo OK.** Intermittent preventive treatment of malaria provides substantial protection against malaria in children already protected by an insecticide-treated bednet in Mali: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *PLoS Med.* 1 févr 2011;
- 23. Konaté AT, Yaro JB, Ouédraogo AZ, Diarra A, Gansané A, Soulama I, Kangoyé DT, Kaboré Y, Ouédraogo E, Ouédraogo A, Tiono AB, Ouédraogo IN, Chandramohan D, Cousens S, Milligan PJ, Sirima SB, Greenwood B, Diallo DA.** Intermittent preventive treatment of malaria provides substantial protection against malaria in children already protected by an insecticide-treated bednet in Burkina Faso: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *PLoS Med.* 1 févr 2011;
- 24. Bojang K, Akor F, Bittaye O, Conway D, Bottomley C, Milligan P, Greenwood B.** A randomised trial to compare the safety, tolerability and efficacy of three drug combinations for intermittent preventive treatment in children. *PLoS One.* 21 juin 2010;
- 25. Sesay S, Milligan P, Touray E, Sowe M, Webb EL, Greenwood BM, Bojang KA.** A trial of intermittent preventive treatment and home-based management of malaria in a rural area of The Gambia. *Malar J.* 7 janv 2011;
- 26. Tagbor H, Cairns M, Nakwa E, Browne E, Sarkodie B, Counihan H, Meek S, Chandramohan D.** The clinical impact of combining intermittent preventive treatment with home management of malaria in children aged below 5 years: cluster randomised trial. *Trop Med Int Health.* 2011;
- 27. Tome XXVII-n°6. La lettre de l'infectiologue.** 2012.
- 28. Woodrow C J, Haynes R K and Krishna S.** Artemisinins. *Postgrad Med J.* 2005;
- 29. Ngoma Nellie Ubertaine.** Evaluation de l'efficacité thérapeutique et de la tolérance clinique et biologique de l'Arsucam®, de l'Artequin® et du Coartem® dans le traitement du paludisme non compliqué de l'enfant à Libreville. [Thèse de Pharmacie, FMPOS]. [Bamako]: Université de Bamako; 2006.

- 30. WHO/ CDS/ RBM.** Les combinaisons thérapeutiques antipaludiques. 2001 5 avril.
- 31. Tangara B.** Efficacité de l'Artésunate-Amodiaquine en chimio-prévention du paludisme saisonnier en milieu scolaire périurbain de Bamako, à Sirakoro-Meguetana, Mali. [Thèse de Médecine]. [Bamako]: FMOS; 2015.
- 32. HOFFMAN S. L., ISENBARGER D., LONG G. W., SEDEGAH M., SZARFMAN A., WATERS L., HOLLINGDALE M. R., VAN DER MEIDE P. H., FINBLOOM D. S., BALLOU W. R.** Sporozoite vaccine induces genetically restricted T cell elimination of malaria from hepatocytes. 1989;
- 33. Okies S.** Betting on a malaria vaccine. *NEnglJMed*,2005.
- 34. Guinovart C, Aponte JJ, Sacarla J, Aide P, Leach A, Bassat Q, Macete E, Dobano C, Lievens M, Loucq C, Ballou WR, Cohen J, and Alonso PL.** Insights into longlasting protection induced by RTS,S/AS02A malaria vaccine further results from a phase IIb trial in Mozambique children. *Plosone*. 2009;
- 35. Carter R, Mendis KN, Miller LH, Molineaux L, and Saul A.** Malaria transmission blocking vaccine- how can their development be supported? *Nat.Med*. 2000;241-244 .
- 36. DUFFY P. E., KASLOW D. C.** A novel malaria protein, Pfs28, and Pfs25 are genetically linked and synergistic as falciparum malaria transmission-blocking vaccines. 1997;
- 37. Costa G.** Immune effectors against malaria: deciphering the anti-parasitic activity of  $\gamma\delta$  T lymphocytes. Doctoral thesis« UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (Paris 6) » Speciality« Biology, genetics and immunology of parasitics infections ». 2009.
- 38. RTS, S Clinical Trials Partnership.** Efficacy and safety of the RTS,S/AS01 malaria vaccine during 18 months after vaccination: a phase 3 randomized, controlled trial in children and young infants at 11 African sites. *PLoS Med*. 2014 /journal.pmed.1001. juill 2014;
- 39. RTS, S Clinical Trials Partnership.** Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *Lancet*.2015 Apr 23. 2015;

- 40. Robert A. Seder, Lee-Jah Chang, Mary E. Enama, Kathryn L. Zephir, Stephen L. Hoffman et al.**, Protection Against Malaria by Intravenous Immunization with a Non replicating Sporozoite Vaccine. *Science* 20 September 2013. 2013;1359-1365.
- 41. ANR-12-BSV3-0006.** <http://www.agence-nationale-recherche.fr>. Agence Nationale de Recherche;
- 42. Borst J, Coligan JE, Oettgen H, Pessano S, Malin R, Terhorst C.** The delta- and epsilon-chains of the human T3/T-cell receptor complex are distinct polypeptides. *Nature*. 1984;
- 43. Brenner MB, McLean J, Dialynas DP, Strominger JL, Smith JA, Owen FL, et al.** Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature*. 1986;
- 44. SALOT Samuel.** Développement du produit de thérapie cellulaire Innacell GD à base de lymphocytes T $\gamma$ 9d2 [Science de la Vie et de la Terre]. Université de Bourgogne; 2006.
- 45. FOURNIER J. -J., BONNEVILLE M.** « Les lymphocytes T gamma-delta: des chasseurs polyvalents ». *Science*. Juin 2008;(no 368):50-5.
- 46. CATROS V. et al.** Lymphocytes T  $\gamma\delta$  en cancérologie: Des lymphocytes tueurs non conventionnels. *Médecine et Science*. :185-191.
- 47. Hassane M.** Etude des lymphocytes T Gamma-delta producteurs d'interleukine-17 au cours des infections respiratoires. L'Université Lille 2 Droit et Santé. Spécialité: Immunologie;2016.
- 48. Dranoff G.** Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev*.
- 49. CHAPEL Helen, HAENEY Mansel, MISBAH Siraj, SNOWDEN Neil.** Immunologie clinique de la théorie à la pratique avec cas cliniques. 4e édition. De Boeck; 2004.
- 50. Lefranc, M.P. and Rabbits, T.H.** The human T-cell receptor gamma (TRG) genes. *Biochemical Sciences* 14. 1989;214-218.
- 51. Hayday, A.** Orchestrated leak provokes a thymus reassessment. *Nat Immunol* 7, 9-11. 2006;9-11.

- 52. GRANEL B. et al.** Étude rétrospective de 55 patients présentant une lymphocytose  $T\gamma/\delta$  dans le sang circulant. *Medecine interne*. 2002;137-43.
- 53. Falini, B., Fenghi, L., Pileri, S., Pelici, P., Fagioli, M., Martelli, M.F., Moretta, L. and Ciccone, E.** Distribution of T cells bearing different forms of T cell receptor  $g/\delta$  in normal and pathological human tissues. *Journal of Immunology* 143. 1989;2480-2488.
- 54. Groh, V., Porcelli, S., Fabbi, M., Lanier, L.L., Picker, L.J., Anderson, T., Warnke, R.A., Bhan, A.K., Strominger, J.L. and Brenner, M.B.** Human lymphocytes bearing T cell receptor  $g/\delta$  are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *Journal of Experimental Medicine* 169. 1989;1277-1294.
- 55. Bucy, R.P., Chen, C.H.L. and Cooper, M.D.** Tissue localization and CD8 accessory molecule expression of T  $g/\delta$  cells in humans. *Journal of Immunology* 142. 1989;3045-3049.
- 56. Inghirami, G., Ying Zhu, B., Chess, L. and Knowles, D.M.** Flow cytometric and immunohistochemical characterization of the  $g/\delta$  T-lymphocyte population in normal human lymphoid tissue and peripheral blood. *American Journal of Pathology* 136. 1990;357-367.
- 57. Vroom, T.M., Scholte, G., Ossendorp, F. and Borst, J.** Tissue distribution of human gamma delta T cells: no evidence for general epithelial tropism. *J Clin Pathol* 44. 1991;
- 58. Bordessoule, D., Gaulard, P. and Mason, D.Y.** Preferential localisation of human lymphocytes bearing  $g/\delta$  T cell receptors to the red pulp of the spleen. *Journal of Clinical Pathology* 43. 1990;461-4.
- 59. Ullrich, R., Schieferdecker, H.L., Ziegler, K., Riecken, E.O. and Zeitz, M.** Gamma delta T cells in the human intestine express surface markers of activation and are preferentially located in the epithelium. *Cell Immunol* 128. 1990;
- 60. Jarry, A., Cerf-Bensussan, N., Brousse, N., Selz, F. and Guy-Grand, D.** Subsets of CD3<sup>+</sup> (T cell receptor alpha/beta or gamma/delta) and CD3<sup>-</sup> lymphocytes

isolated from normal human gut epithelium display phenotypical features different from their counterparts in peripheral blood. *Eur J Immunol* 20. 1990;

**61. Deusch, K., Lüling, F., Reich, K., Wagner, H. and Pfeffer, K. Deusch, K., Lüling, F., Reich, K., Wagner, H. and Pfeffer, K.** A major fraction of human intraepithelial lymphocytes simultaneously expresses the g/□□T cell receptor, the CD8 accessory molecule and preferentially uses the V□1 gene segment. *European Journal of Immunology* 21, 1053-1059. . *European Journal of Immunology* 2. 1991;1053-1059.

**62. Lundqvist, C. and Hammarstrom, M.L.** T-cell receptor gamma delta-expressing intraepithelial lymphocytes are present in normal and chronically inflamed human gingiva. *Immunology* 79. 1993;38-45.

**63. Norris, S., Collins, C., Doherty, D.G., Smith, F., McEntee, G., Traynor, O., Nolan, N., Hegarty, J. and O'Farrelly, C.** Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes. *J Hepatol* 28. 1998;84-90.

**64. EL HENTATI Fatima Zahra, IOBAGIU Christiana, LAMBERT Claude.** «Cytométrie et ses applications en immunologie clinique / Cytometry an dits applications in immunology ». *Rev Francoph Lab.* mars 2009;(no 410):23-32.

**65. Ho, M., Webster, H.K., Tongtawe, P., Pattanapanyasat, K. and Weidanz, W.P.** Increased g□□T cells in acute *Plasmodium falciparum* malaria. 1990.

**66. Roussilhon, C., Agrapart, M., Ballet, J.J., and Bensussan, A.** T lymphocytes bearing the g T cell receptor in patients with acute *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 162. 1990;283-285.

**67. Schwartz, E., Shapiro, R., Shina, S. and Bank, I.** Delayed expansion of V delta 2+ and V delta 1+ gamma delta T cells after acute *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria. *J Allergy Clin Immunol* 97. 1996;

**68. Nakazawa, S., Brown, A.E., Maeno, Y., Smith, C.D. and Aikawa, M.** Malaria-induced increase of splenic □□□T cells in Humans, Monkeys, and Mice. *Experimental Parasitology* 79. 1994;391-8.

- 69. Perera, K.M., Carter, R., Goonewardene, R. and Mendis, K.N.** Transient increase in circulating g/□□T cells during Plasmodium vivax malarial paroxysms. *Journal of Experimental Medicine* 179. 1994;311-315.
- 70. Vantourout P, Hayday A.** Six-of-the-best: unique contributions of gamma delta T cells to immunology. *Nature reviews*. 2013.
- 71. OMS.** Manuel des techniques de base pour le laboratoire. 1997.
- 72. Darar Y.** Etude épidémio-clinique et moléculaire du paludisme à Plasmodium falciparum par la MSP-1 à Missira (cercle de Kolokani). [Thèse de Médecine, FMPOS, 2004]. FMPOS; 2004.
- 73. Diarra K.** Impact de la chimioprévention du paludisme saisonnier (CPS) sur la parasitémie, l'anémie et les anticorps antipalustres chez les enfants âgés de 3 à 59 mois avant et après la saison de transmission dans le district sanitaire de Ouélessébougou en 2014, Mali. [Thèse de pharmacie.]. [Bamako,µ]: FAPH; 2016.
- 74. Diawara F, Steinhardt LC, Mahamar A, Traore T, Daouda T Kone, MD; Diawara H, Kamate B, Kone D, MD; Diallo M, Sadou A, Muhigo J, Sagara I, Djimde AA, Eckert E, Dicko A.** Measuring the impact of seasonal malaria chemoprevention as part of routine malaria control in Kita, Mali. *u. review BMC Infect Dis*, 2014.
- 75. Tapily A S.** Rôle potentiel des cellules gamma delta et T régulatrices dans la protection contre le paludisme dans deux groupes ethniques (Peulh et Dogon) vivant en symétrie au Mali. [Thèse de pharmacie]. FMPOS; 2009.
- 76. Sangaré B.** Etude des cellules T régulatrices dans la protection contre le paludisme dans une cohorte d'enfants vivant en zone d'endémie palustre. [Thèse de Médecine]. FMPOS; 2011.
- 77. Traoré M B.** Etude des cellules gamma delta T dans la protection contre le paludisme dans une cohorte d'enfants vivant d'une zone d'endémie palustre au Mali. [Thèse de Médecine]. FMPOS; 2011.
- 78. Emiliana Tjitra, Sri Suprianto, Bart J Currie, Peter S Morris, Jocelyn R Saunders, And Nicholas M Anstey.** Therapy of uncomplicated falciparum malaria: a randomized trial comparing artesunate plus sulfadoxine-pyriméthamine versus

sulfadoxine-pyriméthamine alone in Irian Jaya, Indonesia. *Am J Trop Med and Hyg.* 2001;309-317.

**79. DIELI F, TROYE-BLOMBERG M, FAROUK S. E, SRECIL G.AND, SALERNO A.** Biology of gamma delta T cells in tuberculosis and malaria. *Curr. Mol. Med,* 2001.

**80. TROYE-BLOMBERG M, WORKU S, TANGTEERAWATA P, JAMSHAIID R, SODERSTON K, ELGHAZALI G, MORETTA L, HAMMARSTOM M, MINCHEVA-NILSON L.** Human gamma delta T cells that inhibit. *Scand J Immunol,* 1999.

**81. Tomoyo Taniguchi, Kaiissar Md Mannoor, Daisuke Nonaka, Hiromu Toma, Changchun Li, Miwako Narita, Viengxay Vanisaveth, Shigeyuki Kano,, Masuhiro Takahashi and Hisami Watanabe.** A Unique Subset of gd T Cells Expands and Produces IL-10 in Patients with Naturally Acquired Immunity against *Falciparum* Malaria. *Fontiers in Microbiology,* 2017.

# FICHE SIGNALÉTIQUE

**Nom** : DEMBELE

**Prénom** : Boubacar

**Nationalité** : Malienne

**Année de soutenance** : 2018

**Ville de soutenance** : Bamako

**Titre de thèse** : EFFET DE L'ARTESUNATE-AMODIAQUINE SUR LES CELLULES T GAMMA DELTA AU COURS D'UN ESSAI VACCINAL ANTIPALUDIQUE, MALI.

**Lieu de dépôt** : Bibliothèque de la Faculté de Médecine.

**Secteur d'intérêt** : Santé publique, Immunologie, Parasitologie, Essai clinique.

**Origine de la thèse** : Mali

## Résumé

### Introduction

Le paludisme reste un problème majeur de santé publique, surtout en Afrique subsaharienne. Toutes les couches de la population sont touchées. Le développement d'un vaccin reste sans doute l'un des moyens pour l'éradication de ce fléau. Nous avons saisi l'opportunité du développement du candidat vaccin Pf SPZ à Donéguébougou pour étudier l'effet d'antipaludiques (ASAQ) sur l'immunité antipalustre et la parasitémie.

### Méthodes

Nous avons mené cette étude dans le village de Donéguébougou, pour étudier l'effet de deux schémas différents d'administration ( une dose et trois dose ) d'antipaludiques en l'occurrence Artésunate-Amodiaquine sur l'infection palustre et sur l'expression de cellules T gamma delta. Au total 30 participants (dont 15 dans le groupe à 3 doses et 15 dans le groupe à une seule dose) adultes âgés de 18 à 50 ans ont été inclus dans l'étude en Novembre 2015. Deux enquêtes transversales ont été effectuées après l'administration des antipaludiques pour mesurer les proportions d'expression des

cellules gamma delta sur la population des cellules T ainsi que la prévalence de l'infection palustre.

### **Résultats**

La moyenne d'expression des cellules T gamma delta était comparable dans les deux groupes au début et à la fin de l'étude, la prévalence de l'infection palustre était nulle à la fin de l'étude dans les deux groupes de traitement.

### **Conclusion**

Il n'y a pas eu de différence significative entre le schéma à une dose et le schéma à trois doses d'antipaludiques (Artésunate-Amodiaquine) quant à leurs effets sur la prévalence de l'infection palustre et la moyenne d'expression de gamma delta TCR.

**Mots clés** : Paludisme, vaccin Pf SPZ, cellules T gamma delta, Artésunate-Amodiaquine, Mali.

**Last Name:** DEMBELE

**First Name:** Boubacar

**Nationality:** Malian

**Defense year:** 2018

**Defense city:** Bamako

**Thesis title:** EFFECT OF ARTESUNATE-AMODIAQUINE ON T GAMMA DELTA CELLS DURING AN ANTIMALARIAL VACCINE ASSAY, MALI.

**Deposit place:** Library of the Faculty of Medicine and Dentistry.

**Interest areas:** Public health, Immunology, Parasitology, Clinical trial.

**Origin of the thesis:** Mali

## **Introduction**

Malaria remains a major public health problem, especially in sub-Saharan Africa. All the layers of the population are affected. The development of a vaccine is undoubtedly one of the means for the eradication of this scourge. We have seized the opportunity to develop the Pf SPZ vaccine at Donéguébougou to study the effect of antimalarial drugs on immunity and parasitaemia.

## **Methods**

We conducted this study in the village of Donéguébougou, to study the effect of two different regimens of administration (one dose and three doses) of antimalarial drugs in this case Artesunate-Amodiaquine on wetland infection and on the expression of Gamma Delta T cells. A total of 30 participants (15 of them in the 3-dose group and 15 in the one-shot group) adults aged 18 to 50 years were included in the study in November 2015. Two cross-sectional surveys were carried out following the administration of antimalarial drugs to measure the proportions of gamma delta cell expression on the T cell population and the prevalence of infection.

## **Results**

The mean of Gamma Delta TCR expression on T cells was comparable in both groups at the beginning and end of the study; the prevalence of malaria infection was zero at the end of the study.

## **Conclusion**

There was no significant difference between the one-dose regimen and the three-dose regimen of antimalarial drugs (Artesunate-Amodiaquine) with respect to their effects on the prevalence and average expression of gamma Delta TCR.

Key words: Malaria, Pf SPZ vaccine, gamma Delta T cells, Artesunate-Amodiaquine, Mali.

## **SERMENT D'HIPPOCRATE**

**En présence des maîtres de cette faculté, de mes chers condisciples devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et jure, au nom de l'Être suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.**

**Je donnerai les soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail, je ne participerai jamais à aucun partage clandestin d'honoraires.**

**Admis dans l'intérieur des maisons mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.**

**Je ne permettrai pas des considérations de religion de nation, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.**

**Je garderai le respect absolu de la vie humaine dès sa conception.**

**Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.**

**Respectueux et reconnaissant envers mes maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçu de leur père.**

**Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.**

**Je le jure.**

# ANNEXES

## PfSPZ 2 staining Protocol

### Materials:

- FACS tubes
- Pipettes: 2ul, 20ul, 200ul
- Stripettes: 10ml
- Bench top centrifuge

### Solutions: (for 15 samples)

- Phosphate buffered saline (PBS)
- Freshly prepared:
- 1X FACS Lysis buffer: 1.5ml (10X soln) + 13.5 ml of DI H<sub>2</sub>O

### Procedure:

1. Pipette 150 uL blood into FACS tubes labeled with the subject ID
2. Prepare the surface antibody cocktail. See below:

Panel	Per tube	X16
CD3Alexa700	1	16
CD8APCH7	1	16
CD4PE-Cy5	1	16
gdTCRPE	1	16
TCRvd2FITC	1	16
CD45ROBV421	1	16
CD27PE-Cy7	1	16
CD103APC	1	16
CD69BV650	1	16
Per tube	9	

3.

4. Add **9ul** of the antibody cocktail to each tube. **VORTEX** 3s
5. Incubate for 20 mins at room temperature in the dark
6. Wash with 2 mL PBS, spin at 1700 RPM for 5 minutes, discard supernatant.
7. Add 1 ml of 1X FACS Lysis buffer per tube. **VORTEX!**
8. Incubate in the dark at room temperature for 20 mins
9. Wash with 2 mL PBS, spin at 1700 RPM for 5 minutes, discard supernatant. (1<sup>st</sup> wash)
10. Was with 2 ml PBS , spin at 1700 RPM for 5 minutes, discard supernatant. (2<sup>nd</sup> wash)
11. Resuspend cells in 200ul of PBS. **VORTEX!**
12. Store in fridge until you are ready to acquire the samples on the flow cytometer.

### Compensation tubes:

Labels tubes as below:

Panel	Per tube
<b>CD3Alexa700</b>	1
<b>CD8APCH7</b>	1
<b>CD4PE-Cy5</b>	1
<b>gdTCRPE</b>	1
<b>TCRd2FITC</b>	1
<b>CD45ROBV421</b>	1
<b>CD27PE-Cy7</b>	1
<b>CD103APC</b>	1
<b>CD69BV650</b>	1

1. Add one drop of compensation beads (One Comp beads) to each FACS tube.
2. Add the same amount of the antibody that was used to stain the sample in the appropriate tube. (see table above)
3. Incubate for 15mins in the dark at room temperature.
4. Wash with 1ml of PBS. Spin at 1700rpm for 5 mins. Discard supernatant.
5. Add 300ul of PBS to each tube. Vortex!
6. Keep in the 4C fridge until ready for use.

### **Running samples on LSRII:**

1. Open FACS Diva software
2. Login using the following user name: Irfan (password: salman)
3. Open a new experiment and select the markers listed below.
4. Change the voltages to those listed for each channel
5. Create compensation controls
6. Run Compensation tubes and calculate compensation. Click “Link and Save”
7. Change to the Global worksheet
8. Label channels in Experiment Layout
9. Run your samples making sure the files are correctly labeled
10. Export FCS files (make sure it is FCS 3.0) and save on to a external hard drive
11. Upload the file with the FCS files on to the [sharingwith.niaid.nih.gov](http://sharingwith.niaid.nih.gov)

<b>Laboratoire de Biologie Clinique MON N<sup>o</sup>:ML- 005-05</b>	Making , staining and reading Thick films for Malaria Diagnosis for PFSPZ study	<b>Effective Date</b>  <b>20-03-18</b>
--	--	--

#### PURPOSE

This document describe the procedure of slide making and reading during PfSPZ study at Ouelessebougou in Mali

#### SCOPE

PharmD, Clinicians , Biologists, Technicians, student working in MRTC Clinical Laboratory.

#### REFERENCES

SOP UWF-C-001

Sanaria SOP version 1.1

Dr Niangaly training Slides

#### HISTORIQUE

Version	Objet	Written By	Approved by	Signature	Date
1.0	creation	<b>Dr Agnes Guindo</b>	<b>Pr Boubacar Traore</b>		<b>29-03-2013</b>

Version	Objet	Written By	Date Signature	Approved by	Date Signature
1.1	Révision biannuelle 2016	Dr Merepen dite Agnes Guindo	30-01-2016	Pr Boubacar Traore	01-02-2016
<u>1.2</u>	Révision biannuelle 2018	<u>Dr Amatigue</u> <u>Zeguime</u>	<u>20-03-2018</u>	Pr Boubacar Traore	<u>20-03-2018</u>

## SOMMAIRE

- I. Principe
- II. Matériel and reagents
- III. Safety and Precautions
- IV. Technique
- V. Results Report
- VI. Limites of procedure
- VII. Annexes
- VIII. Training

## I- PRINCIPLE

Consensus procedures providing instructions for making staining and reading thick films for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* and *others malaria Plasmodium* during human malaria trials.

This standardized operating procedures (SOP) is designed to be compatible with the WHO guidelines for microscopy in clinical trials. This SOP is written to standardize the microscopic evaluation of slides in PFSPZ clinical trials so as to allow results to be compared to different laboratories.

## II- MATERIAL AND REAGENTS

### Specimen processing

For the planned PfSPZ trial in Mali, slides will be prepared from blood in microtainer EDTA or from a drop into slides, and will be stained and read at the trial site.

### Materials and reagents

- Preclean Microscope slides with frosted ends
- Pencils
- P10 pipettor
- Pre-sterilized filtered 10-microliter tips
- Slide warmer or heat block
- Methanol
- Timers
- Giemsa buffer
- Giemsa stain
- Transfer pipettes (4-ml or 6-ml)
- Slide staining racks
- Washing plastic squeeze bottles
- Fan
- Type A immersion oil (Cargille)
  
- Microscopes with 100x objective
- Lens paper
- Counters
- Paper towels
- Pens
- Report forms
- Slide template with 2 rectangles each 1cm x 2cm
- Water at neutral pH. If water isn't at neutral pH use buffer tablets from Sigma

- Positive control slide
- Sharp container

### III- SAFETY AND PRECAUTIONS

Make sure to put on gloves and lab coat before starting

### IV- TECHNIQUE

Thick films preparation with Microtainer EDTA Blood

1. Label with pencil two microscope slides (free of grease and scratches) with Subject ID, date /and visit day

If the clinic indicates this patient has malaria symptoms, mark the slide accordingly

2. Place the slide over a template with two 1-cm x 2-cm rectangles
3. Place 10  $\mu$ L of blood on the slide over the middle of one of the rectangles and spread the blood
4. Using the tip or the corner of another slide to spread the blood around to fill the rectangular area. (Avoid creating bubbles)
5. Deliver 10  $\mu$ L of blood to the second rectangular area on the slide and repeat step 3
6. Dry slides on a 37°C heat block or slide warmer for 15 minutes.

Note: Microtainer EDTA blood will not be used after 30 minutes.

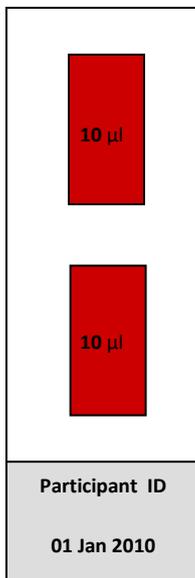


Fig1: Slide template

Thick films preparation with Drop Blood or vacutainer Blood

- 1) Label with pencil two microscopes slides (free of grease and scratches) with Subject ID, date /and visit day, If the clinic indicates this patient has malaria symptoms, mark the slide accordingly
- 2) Place the slides over a template with two 1-cm x 2-cm rectangles
- 3) Prepare third slide and Put 3 drops of blood onto this slide(slide1)
- 4) Now, take a calibrated 10 $\mu$ L pipette, add a filtered sterile tip, and take up 10 $\mu$ L of blood from one of the drops of blood on slide 1
- 5) Dispense 10 $\mu$ L of blood into the center of both rectangles on each slide 2 and 3 and spread evenly the blood over the entire rectangle using the flat part of the pipettor tip. Remove bubbles if they form using the corner of another slide. Two thick smears should be made on each slide to provide backup in case of sloughing of one side during the staining process
  
- 6) Dry the slides uncovered for 15 minutes on a 35°C slide warmer OR for 30 minutes in a 35-37°C incubator OR at room temperature in case it is at 35-37°C or warmer by protecting from the dust

### Thick films Staining

- 1- Prepare a fresh, daily working solution of 4% Giemsa stain using the stock Giemsa stain and distilled water at a neutral pH. If necessary, use buffer tablets from Sigma as instructed:

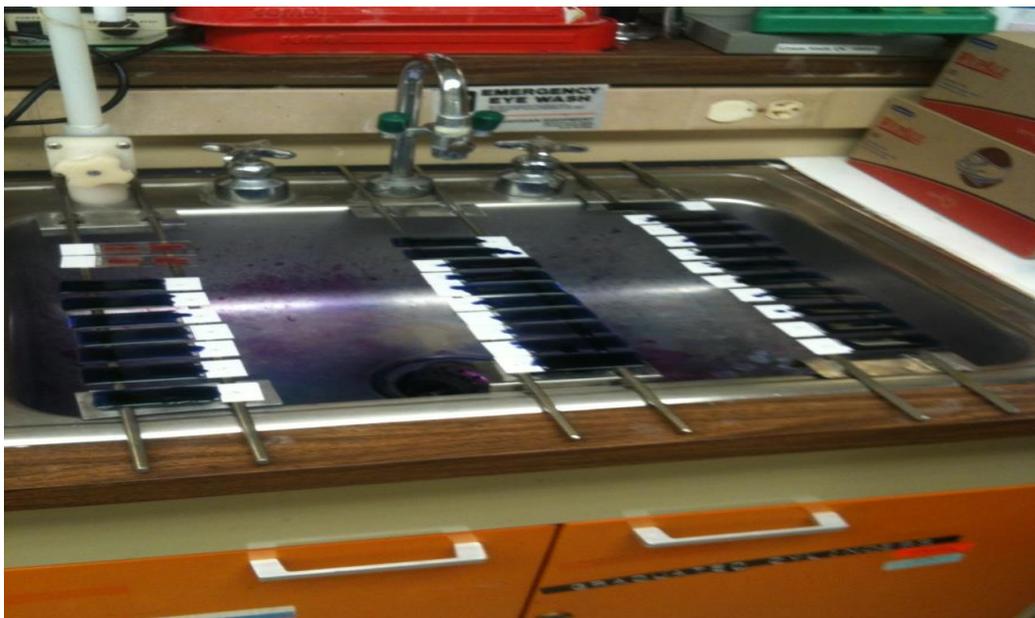
Giemsa Stain (stock)	Buffered Water	Total volume
400 $\mu$ L	9.6 mL	10 mL
800 $\mu$ L	19.2 mL	20 mL
1,200 $\mu$ L	28.8 mL	30 mL

**Note: Giemsa working solution gives better staining with no artifacts if used within 45 minutes after preparation. Thus, only prepare the amount of stain you anticipate using within that time.**

Some precautions when preparing the Giemsa stain:

- Keep the Giemsa stock solution in dark area
- Do not disturb(Shake) Giemsa stock solution while pipetting
- Avoid to pipette Giemsa stock solution from the bottom of the bottle (Giemsa crystals create artifacts on the smear
- Use dry serological pipette or tip to take Giemsa stock solution. Never allow even a small amount of water to get into the stock bottle of Giemsa stain.

- Do not shake, or invert the stock bottle before taking stain from it. There is sediment that accumulates at the bottom of a Giemsa stock bottle,
- 2- Place the slides face-up on the staining rack over a sink. This bench should allow individual staining of each slide, without a chance that Giemsa stain added to one slide might float onto a neighboring slide
- 3- Using a 4-ml or 6-ml transfer pipette, cover each smear with 4% Giemsa solution and allow the slides to sit at room temperature for 45-60 minutes: carefully drop the stain onto the labeling part of the slide, don't squeeze it directly onto the rectangles with the thick smear! Ensure the entire slide is covered
- 4- After staining for 45 minutes, rinse each slide individually and gently with distilled water using a squirt bottle. Using a squeeze bottle, carefully squirt water onto the label portion of a slide, allowing the stain to wash off. **Do not allow the stream of water from the squeeze bottle to touch the smears directly, or they may wash off.**
- 5- Blot tip of the slide on a piece of paper, and dry slides in front of the fan.
- 6- For symptomatic patients and if a quick result is needed, slides are stained with 10% Giemsa for 10 minutes
- 7- Stain each batch of slides with a positive control slide



**Fig3: Slides staining picture**

### Tick film reading

- In clinical trials of malaria vaccines, slides reading must be done only with microscopes calibrated according to WHO standards.
- Clean the microscope lens with lens paper soaked in lens cleaner if necessary.
- Use Type A immersion oil
- Quality Control of the staining: read the positive control slide first.

If no malaria parasite is seen on the positive control, do not continue reading subject slides

The **width of a HPF x the thickness of the film x length of a pass = volume read/pass**

- Volume of blood read/pass = diameter of field x thickness of the smear x length of a pass
- Exple: with the 100x objective, the diameter of the field = 0.22mm
- Spreading 10 $\mu$ L of blood in a 1cm x 2cm rectangle  $\rightarrow$  a thickness of 0.05mm:  
 $10\mu\text{L} = 20\text{mm} \times 10\text{mm} \times h \rightarrow h = 10\text{mm}^3 / (20\text{mm} \times 10\text{mm}) = 0.05\text{mm}$
- The length of a pass is 10mm
- With the formula, volume read/pass =  $0.22 \times 0.05 \times 10 = 0.11\text{mm}^3 = 0.11\mu\text{L}$
- To examine 0.5 $\mu$ L of blood, we need to read  $0.5/0.11 = 4.55 \approx 5$  passes of 10mm

- Appendix 1 gives examples how many passes need to be read should other microscopes be used.

➤ Before you read the patient's slide, make sure the optical axis of your microscope is aligned. Then, examine the control slide first. This is a high parasitemia slide, and the purpose of this slide is to confirm that the staining procedure has been adequate to allow parasite identification. Note, you do not need to read 5 passes of the control slide. You do not need to count # of parasites on the control slide.

- Do not read patient's thick films if no parasites are seen on the control slide.

➤ Examine the thick films using the high power oil objective (100X) and Type A immersion oil supplied for this study (do not use other immersion oil!). Starting at the edge of the rectangle make 5 passes across the entire length of 10mm. When you reach the end of the pass, make sure you move the stage of the microscope enough to the left or the right so that you avoid reading parts of the previous pass again. A thick film is considered positive if at least 2 unambiguous malaria parasite structures are seen in 5 passes (i.e. 0.5  $\mu$ L of blood).

➤ When you detect a parasite, don't move the stage further, but call the expert microscopist so (s) he can check to confirm or dispute if what you have seen is a real parasite. Once two confirmed parasites were detected, notify the physician on charge present at the clinic or on call.

- Or the reader should see at least the 2 unambiguous malaria parasites to a second reader for confirmation.
- If only 1 parasite is detected, or if no parasite is detected, but the patient is symptomatic, another 5 complete passes need to be read by another expert slide reader.
- Place the remaining thick film (reserve slide) in a box for storage

## **QUALITY CONTROL**

A positive control slide must be stained with each set of slides. The QC slide should be examined before patient slides are read. Do not read patient slides if no malaria parasites are observed on the QC slide.

## **V- RESULTS REPORT**

- Record results for all smears on the malaria vaccine protocol result sheet. Place a patient's label on the results sheet and record the reader, date, QC result, microscope number, number of passes, the thick film result and the number of parasites seen (if any). Enter "No parasites seen" if negative OR "Positive for Malaria" if 2 or more unambiguous malaria parasites were observed.
- Enter the result of the read onto the appropriate page of the CRF

## **VI- LIMITES OF PROCEDURE**

N/A

## **VII- ANNEXES**

### **APPENDIX 1**

Assuming the thick film is prepared as described above, the only variable that affects the number of passes (or high power fields) required to read a volume of 0.5  $\mu$ L at a 1000-fold magnification is the width of the HPF, which is indicated as an FN number on the ocular lens of the microscope as shown in the picture:



Using the formula explained under point 12, the following table was created:

FN	Width of HPF	volume red per pass	passes required for 0.5uL	passes to be read	volume per HPF (µL)	# of HPF required for 0.5microlitres
18	0.18	0.09	5.56	<b>6</b>	0.001273	393
19	0.19	0.095	5.26	<b>6</b>	0.001418	353
20	0.2	0.1	5.00	<b>5</b>	0.001571	318
21	0.21	0.105	4.76	<b>5</b>	0.001732	289
22	0.22	0.11	4.55	<b>5</b>	0.001901	263

The number of passes should always be rounded to the next higher full number.

#### VIII- FORMATION

See Training Log.