

Ministère de l'Enseignement,
Supérieur et de la Recherche Scientifique
* * * * *

République du Mali
un peuple-un but-une foi



Faculté de Médecine, de Pharmacie et
d'Odontostomatologie

Thèse de Pharmacie

Année universitaire 2012-2013

Analyse de la réponse anticorps naturelle contre trois antigènes de *P.falciparum* chez les enfants de 1 à 5 ans vivant à Bandiagara, Mali

Présentée et soutenue publiquement le -----devant le jury de la Faculté de
Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie du Mali

Par Amassagou Raymond DOUYON

Pour obtenir le grade de Docteur en pharmacie (DIPLOME D'ETAT)

Jury

Professeur Ogobara K. DOUMBO	Président
Professeur Boubacar TRAORE	Membre
Docteur Chiompêré KONE	Membre
Docteur Charles ARAMA	Membre
Professeur Bourèma KOURIBA	Directeur de Thèse

Ce travail a été financé par African Malaria Network Trust (AMANET) dans le cadre
du réseau Afro-Immuno-Assay

DEDICACES

Je rends grâce à :

- Dieu le père tout puissant, créateur du ciel et de la terre; l'Alpha et l'Oméga
- Au seigneur Jésus Christ ; mon sauveur
- A l'Esprit saint source de toute inspiration
- A mon père Amadou Casimir DOUYON

Comment puis-je te récompenser, Papa, si ce n'est par le travail. Voici que je te présente un cadeau, accepte le comme le couronnement de tes efforts. Par ta simplicité et ton humilité tu es et tu resteras pour nous un père exemplaire. Soucieux de l'avenir de tes enfants tu es toujours présent à nos côtés. Tes conseils, ton accompagnement ne nous ont jamais fait défaut et me donnent le courage d'aller toujours de l'avent. C'est toi, papa qui a fait de moi l'homme que je suis devenu aujourd'hui. Les mots me manquent pour énumérer tout le Bonheur que ta présence nous procure. Que le seigneur te donne longue vie et qu'il te garde longtemps à nos côtés. Amen.

- A mère Régina DOUGNON

Le souci premier de toute mère est la bonne éducation de ses enfants. Cette leçon de vie que nous avons reçue de toi est la meilleure. Je te dois ma vie maman; toi qui m'a enfanté et tout ce que je suis c'est grâce à toi. Par ton courage et ton dévouement dans le travail; tu as mis dans mon coeur le désir de vivre à la sueur de mon front. Je sais que je ne pourrais jamais te récompenser car aucun trésor de ce monde ne peut valoir la vie que tu m'as donnée; acceptes ce modeste travail comme hommage. Comme dit Camara Laye; femme noire femme africaine.

REMERCIEMENTS

- A mon oncle Allaye DOUYON à qui je dois la réussite de mon parcours universitaire. C'est grâce à toi que je suis arrivé à ce niveau de réussite. Tu m'as accueilli chez toi à bras ouvert et durant toutes ces années je m'y suis senti toujours bien. Permetts-moi en cette étape de ma jeune vie de t'exprimer toute ma gratitude et reconnaissance.
- A ma tante Florence DOUYON pour son hospitalité. Ce travail est aussi le tien, toi qui m'as donné à manger et à boire durant toutes ces années.
- A mes soeurs et frères : Manuelle, Nadège, Clément, Eugénie, Marie-Anne, qui m'ont toujours soutenu et encouragé tout au long de ce cheminement.
- A mon oncle Joseph Douyon qui m'a soutenu pendant les moments durs quand j'étais en neuvième année du cycle d'études fondamentales. Saches que je n'oublierai jamais ce moment.
- A tous les camarades de la promotion « Pr Moussa Harama ».
- A mon ami et compagnon de toujours Sidy Douyon pour son soutien.
- A tous le personnel du Bandiagara Malaria Project pour leur collaboration
- A tous mes maitres et aînés du MRTC: Dr Yamoussa Keita; Dr Seydou Arama; Dr Amadou Niangaly; Dr Antoine Dara; Dr Amadou Tapily; Dr Hamidou Niangaly; Dr Youssouf Tolo; Dr Ahmadou Dembélé.
- A Dr Modibo Daou pour son soutien, son encouragement et ses conseils qui ne m'ont à aucun moment fait défaut. Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance.
- A Dr Drissa Coulibaly pour m'avoir facilité l'intégration dans l'équipe BMP. Merci pour votre franche collaboration.

- A Dr Issa Diarra sans qui vous je ne serai pas arrivé jusque là. Vous avez guidez mes premiers pas au sein de l'unité. Vous m'avez initié aux différentes activités de terrain et de laboratoire. Vous avez été mon maitre; mon confident; mon conseiller; mon ami....Merci pour tout.
- A African Malaria Network Trust pour avoir financé ce travail.
- A la population de Bandiagara pour sa participation à l'étude

A notre Président de Jury

Professeur Ogobara K DOUMBO

Professeur Titulaire de Parasitologie-Mycologie

Directeur du pôle d'Excellence de Recherche « Malaria Research and Training Center - Département d'Epidemiologie des Affections Parasitaires »

(MRTC/DEAP) ;

Membre correspondant de l'Académie Nationale de Médecine de France ;

Membre Honoraire de la «Alpha Omega Alpha Honor Medical Society » des Etats- Unis d'Amérique ;

Chevalier de l'Ordre international des palmes académiques du CAMES,

Chevalier de l'Ordre National du Mali et Officier de la Légion d'honneur de France

Cher maître vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider ce jury malgré votre emploi de temps chargé. Votre esprit créatif et votre rigueur font de vous un homme de science respecté. Vos qualités de formateur et de meneur d'hommes sont connues de tous et en nous acceptant dans votre département vous avez montré votre volonté de pérenniser le savoir par la formation de jeunes. Nous vous remercions de nous avoir permis d'intégrer cette belle famille MRTC/DEAP. Puisse le tout puissant vous assister dans vos nobles oeuvres de tous les jours.

A notre maître et juge

Professeur Boubacar Traoré

Maître de Conférences de Parasitologie-Mycologie

Doyen de la Faculté de Pharmacie

Responsable de l'unité paludisme et grossesse au MRTC/DEAP

C'est cher maître, vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail. Votre disponibilité, votre rigueur nous ont toujours marqués. En acceptant de siéger dans ce jury vous montrez votre volonté d'être aux côtés des jeunes que nous sommes pour mieux nous guider. Recevez ici cher maître l'expression de notre profonde gratitude.

.

A notre maitre et juge

Docteur Chiompêre KONE

Docteur en Pharmacie

Chef du service de Biochimie à l'INRSP (Bamako-Coura)

Chargé de cours à l'INFSS

Cher maitre vous nous faites un grand honneur en acceptant de siéger dans ce jury malgré vos multiples occupations. Votre simplicité, votre rigueur scientifique et votre qualité de formateur sont connues de tous. Recevez ici l'expression de notre profonde gratitude.

A notre maitre et juge

Docteur Charles ARAMA

Pharmacien et immunologiste

Attaché de recherche au MRTC/DEAP

Cher maitre, c'est un honneur pour nous de vous avoir dans ce jury.

Votre disponibilité, votre rigueur scientifique et votre qualité d'encadreur sont admirées de tous. Recevez ici cher maitre l'expression de notre profonde reconnaissance.

A notre maître et directeur de thèse

Professeur Ag. Bourèma KOURIBA

Maître de Conférences Agrégé d'Immunologie

Responsable de l'Unité d'Immunologie Cellulaire et Moléculaire des Parasites
du MRTC/DEAP ;

Nous avons été émerveillés par la qualité de vos cours d'immunologie en troisième année de pharmacie. En acceptant de nous accueillir dans votre unité vous avez fait montre de votre volonté de transmettre votre savoir. Votre simplicité et votre disponibilité nous ont marqué. Les mots nous manquent aujourd'hui cher maître pour vous exprimer toute notre gratitude

Table des matières

Titres.....	Pages
I. Introduction	1
II. Objectifs	4
III. Généralités	6
1. Cycle biologique du <i>Plasmodium</i>	7
1.1. Schizogonie	7
1.2. Sporogonie	8
2. Immunité anti-palustre.....	10
2.1. Immunité innée dans le paludisme.....	10
2.1.1. Rôle des cellules.....	10
2.1.1.1. Granulocytes.....	10
2.1.1.2. Monocytes/Macrophages.....	12
2.1.1.3. Cellules dendritiques.....	13
2.1.1.4. Cellules tueuses naturelles.....	13
2.1.1.5. Cellules T tueuses naturelles.....	14
2.1.1.6. Cellules T gamma delta	14
2.1.2 Rôle du complément.....	17
2.2. Immunité adaptative dans le paludisme.....	16
2.2.1. Immunité à médiation cellulaire.....	18
2.2.2. Immunité humorale.....	18
3. Mécanisme d'évasion immune du <i>Plasmodium</i>	24
4. Conséquences immuno-pathologiques.....	25

5. Paludisme et génétique.....	27
6. Les antigènes du <i>Plasmodium</i>	28
6.1. Apical Membrane Antigen-1 : AMA-1.....	30
6.2. Glutamate Rich Protein: GLURP.....	33
6.3. Merozoite surface protein-1:MSP-1.....	33
7. Aperçu sur les Vaccins antipaludiques	36
7.1. Vaccins pre-érythrocytaires.....	36
7.2. Vaccins érythrocytaires.....	37
7.3. Vaccins bloquant la transmission.....	38
IV. Matériels et Méthodes.....	39
1. Lieu d'étude	40
2. Type et période d'étude	43
3. Population d'étude	43
4. Echantillonnage.....	39
5.Variables mesurées.....	44
6.Méthodes d'étude	44
7.Saisie et analyse des données	46
8.Considération éthique	47
V. Résultats.....	48
VI. Discussion.....	70
VII. Conclusion.....	76
VIII. Recommandations.....	78
IX. Références.....	80
X. Annexes.....	95

Liste des tableaux

TABLEAUX.....	PAGES
Tableau I.....	66
Tableau II.....	49
Tableau III.....	50
Tableau IV.....	50
Tableau V.....	51
Tableau VI.....	52
Tableau VII.....	53
Tableau VIII.....	71
Tableau IX.....	72
Tableau X.....	73
Tableau XI.....	74
Tableau XII.....	75
Tableaux XIII.....	76
Tableaux XIV.....	770
Tableaux XV.....	61
Tableaux XVI.....	62
Tableaux XVII.....	63

LISTE DES FIGURES

Figures	Pages
Figure1 : Cycle biologique du <i>plasmodium</i>	9
Figure2 : Origine et phénotypes des cellules de l'immunité innée	16
Figure 3 : Structure des Immunoglobines Gamma (IgG)	21
Figure 4 : Structure des sous-classes d'IgG	22
Figure 5 : Structure des sous-classes d'IgM	23
Figure 6 : Structure du "Apical membrane Antigen-1 "	32
Figure7 : Localisation de quelques antigènes de mérozoites cibles de la réponse immunitaire	35
Figure 8 : Situation géographique de la ville de Bandiagara au Mali :	42
Figure 9 : Courbe de survie en fonction de la séropositivité en IgG anti-AMA-1fvo chez les enfants de la cohorte à Bandiagara en 2008 :	64
Figure 10 : Courbe de survie en fonction de la séropositivité en IgM-AMA-1fvo chez les enfants de la cohorte à Bandiagara en 2008 :	65
Figure 11 : Courbe de survie en fonction de la séropositivité en IgG anti-MSP-1 hyb chez les enfants de la cohorte à Bandiagara en 2008	66
Figure 12 : Courbe de survie en fonction de la séropositivité en IgM MSP-1 hyb chez les enfants de la cohorte à Bandiagara en 2008 :	67
Figure13 : Courbe de survie en fonction de la séropositivité en IgM MSP-1 hyb chez les enfants de la cohorte à Bandiagara en 2008	68
Figure 14 : Courbe de survie en fonction de la séropositivité en IgM anti-	69

GLURP-R2 chez les enfants de la cohorte à Bandiagara en 2008

LISTE DES ABREVIATIONS

AA: acide aminé	GM-CSF: granulocytes and monocytes colony stimulating factor
ADCC: Antibody Dependent Cell mediated Cytotoxicity	
CMH: complexe majeur d'histocompatibilité	Hb: hémoglobine
	Hbc : hémoglobine C
ADN: acide dexocribonucleique	HbS: hémoglobine S
AMA1: apical membrane antigen 1	IFN- γ : interferon gamma
AMANET: African Malaria Network Trust	Ig: immunoglobine
BMP: Bandiagara malaria Project	IL: interleukine
C3: complement 3	KDa: kilodalton
CD: cluster of differentiation	MRTC: malaria research and training center
CRMT: centre régional de médecine traditionnelle	MSP1: merozoites surface protein 1
CTA: combinaison thérapeutique à base d'artémisinine	NIH: national institute of health
CSA : chondriotin surface antigen	NK: Natural Killer cells
DEAP: département d'épidémiologie des affections parasitaires	NKT : Natural Killer T cells
	OMS: organisation mondiale de la santé
EBA : erythrocyte binding Antigen	NO: nitric oxide
ELISA: enzyme linked immunosorbant assay	P450: cytochrome p 450
Fc: fragment cristallisable	PK66: <i>Plasmodium knowlesi</i> 66
GE: goutte épaisse	ROS : reactive oxygen species
GLURP-R2: glutamate rich protein- Repetitive Region 2	Th: T helper
	TNF: tumor necrosis factor

Analyse de la réponse anticorps naturelle contre trois antigènes de *P. falciparum* chez les enfants de 1 à 5 ans vivant à Bandiagara ; Mali

I. INTRODUCTION

Le paludisme est une érythrocytopathie fébrile, hémolysante due à la présence et à la multiplication dans les hépatocytes puis dans les érythrocytes d'un hématozoaire du genre *Plasmodium*, transmis à un hôte vertébré par la piqûre de l'Anophèle femelle infectée. Cinq espèces de *Plasmodies* : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* et *P. knowlesi* infectent *Homo sapiens*. Cette cinquième espèce est une espèce simienne chez la quelle des infections humaines ont été découvertes [102]. Parmi ces espèces, *Plasmodium falciparum* est la plus virulente et est responsable de la quasi-totalité des décès dus au paludisme. Grâce à sa capacité de variation antigénique [41], il peut échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. *Plasmodium falciparum* est responsable des formes graves compliquées, létales du paludisme (neuro-paludisme, anémie sévère....) [86]. Sa virulence est due en partie à la capacité des érythrocytes parasités à former des rosettes avec des globules rouges non parasités et à cytoadhérer dans les capillaires des organes nobles comme le cerveau, les poumons, l'intestin et le placenta [103]. Les globules rouges infectés adhèrent aux cellules endothéliales et à d'autres cellules sanguines par l'intermédiaire de « *P. falciparum* erythrocytes membrane protein-1 » (PfEMP-1) codée par une famille de gènes var [45].

De nos jours le paludisme reste un problème important de santé. Il a causé en 2010 environ 216 million de cas cliniques et 655000 décès [104]. Il atteint majoritairement les enfants de moins de cinq ans [72] et les femmes enceintes. Les primigestes sont particulièrement plus affectées que les multigestes; avec un risque d'accouchement prématuré et d'un faible poids à la naissance [17].

Les zones endémiques regroupent 106 pays et plus de 81% des cas et 90% de décès sont enregistrés en Afrique au sud du Sahara [104].

Au Mali le paludisme est l'une des principales causes de morbidité et de mortalité, avec une transmission saisonnière. Il constitue 44% des motifs des consultations dans la population générale [35]. Le taux de létalité du paludisme grave et compliqué au service de pédiatrie de l'hôpital Gabriel Touré était de 15,3% en 2001[95].

L'élimination/éradication du paludisme est un des objectifs du millénaire pour le développement. Pour atteindre cet objectif une stratégie intégrée de lutte utilisant plusieurs moyens est nécessaire. La vaccination antipaludique est l'outil idéal en santé publique. La mise au point d'un vaccin efficace contre le paludisme est cependant un défi majeur car malgré les efforts importants, aucun vaccin n'est de nos jours disponible. Ce retard dans le développement de vaccin antipaludique est lié à la complexité du cycle biologique du *Plasmodium* et la variabilité antigénique. Au cours de son cycle le parasite exprime plusieurs antigènes [47], menant à la variation antigénique [84]. Ce qui fait qu'il y'a une insuffisance de compréhension des mécanismes de protection immunitaire [64]. Il a été cependant établi que l'immunité antipaludique est âge-dépendant dans les zones endémiques. Plusieurs antigènes candidats vaccins, ont été identifiés et l'espoir repose sur un nombre réduit de candidats vaccins tels que le RTS,S et le MSP3, qui sont respectivement en phase III et IIB [29] et les vaccins bloquant la transmission. L'évaluation de l'immunogénicité et de l'efficacité des vaccins est confrontée à l'absence de corrélat immunitaire de protection. Par ailleurs une multitude de méthodes sont utilisées pour évaluer les réponses humorales et cellulaires spécifiques aux différents antigènes malariques. Ainsi, les données immunologiques générées par différents laboratoires sont difficilement comparables et souvent contradictoires. Il y'a donc une nécessité de mettre en place des procédures standardisées pour mieux analyser les données afin de parvenir à des résultats concluants.

C'est ainsi que le réseau Afro-Immuno-Assay (AIA), mis en place à travers African Malaria Network Trust (AMANET) en 2003, a développé des techniques immunologiques standardisées pour évaluer les réponses immunologiques au cours

Analyse de la réponse anticorps naturelle contre trois antigènes de *P. falciparum* chez les enfants de 1 à 5 ans vivant à Bandiagara ; Mali

des essais cliniques des candidats vaccins antipaludiques. Ce réseau regroupe huit pays africains qui participent à des essais de développement des vaccins antipaludiques. Le « Malaria Research and Training Center » (MTRC), ayant conduit plus d'une douzaine d'essais cliniques de phase I et II a été sélectionné pour participer à ce réseau. Cette étude se situe dans ce cadre.

Le présent travail a pour but d'évaluer les réponses humorales spécifiques contre trois antigènes de *Plasmodium falciparum* en utilisant les techniques standardisées de l'Afro-Immuno-Assay.

II. OBJECTIFS

1. Objectif général

Evaluer la réponse naturelle anticorps contre 3 antigènes de stade sanguin de *P. falciparum* chez les enfants âgés de 1 à 5 ans à Bandiagara.

2. Objectifs spécifiques

- Déterminer l'incidence des accès palustres simples chez les enfants de 1 à 5 ans vivant à Bandiagara
- Déterminer les taux d'IgM, d'IgG et de ses sous classes spécifiques des antigènes AMA-1fvo, MSP-1hyb et GLURP-R2 chez les enfants de 1 à 5 ans de Bandiagara
- Mesurer l'association entre les réponses IgM, IgG et sous classes d'IgG spécifiques de : AMA-1fvo, MSP-1hyb et GLURP-R2 et la protection contre les accès palustres

III. GENERALITES

1. Cycle biologique du *Plasmodium*

La vie du *Plasmodium* est parasitaire et se déroule chez deux hôtes successifs. Un hôte vertébré chez qui se déroule, le cycle asexué ou schizogonie et un hôte invertébré, un moustique femelle du genre *Anopheles* qui permet le cycle sexué ou sporogonie. C'est un cycle complexe faisant exprimer à chaque étape, de multiples antigènes entraînant ainsi des réponses immunitaires spécifiques de ces stades [85].

1.1. Schizogonie

➤ **Schizogonie intra-hépatocytaire:** Lors de son repas sanguin, l'anophèle femelle injecte à l'homme à travers sa salive des sporozoïtes qui sont les formes métacycliques infectantes du *plasmodium*. Après 30 min à une heure de temps dans la circulation sanguine, ces sporozoïtes atteignent le foie et pénètrent les hépatocytes. Dans ces cellules chaque sporozoïte se développe et se transforme alors en schizonte qui à maturité s'éclate pour libérer 20.000 à 30.000 mérozoïtes dans la circulation sanguine. Chez *P. vivax* et *P. ovale*, certains trophozoïtes n'engendrent pas des schizontes, mais donnent plutôt des formes dormantes ou hypnozoïtes. Ces hypnozoïtes peuvent se réveiller et subir des divisions schizogoniques et donner des trophozoïtes.

➤ **Schizogonie intra-érythrocytaire :** Dans la circulation sanguine, les mérozoïtes pénètrent activement dans les érythrocytes et se transforment en trophozoïtes. Après réplication de l'ADN et multiplication du noyau, chaque trophozoïte se transforme en schizonte ou corps en rosace. A maturité le schizonte éclate et libère des mérozoïtes qui vont immédiatement poursuivre un cycle intra-érythrocytaire [48].

Après plusieurs cycles schizogoniques certains mérozoïtes se transforment en éléments à potentiel sexué : les gamétocytes mâles et femelles.

1.2. Sporogonie

Au cours de son repas sanguin sur un individu infecté de gamétocytes, l'anophèle absorbe les éléments des différents stades parasitaires. Elle digère les éléments asexués. Les gamétocytes femelles se transforment en macrogamètes. Les gamétocytes mâles par exflagellation et division nucléaire se transforment en microgamètes (haploïde à n chromosomes).

La fécondation d'un macrogamète par un microgamète donne naissance à un zygote (diploïde à $2n$ chromosomes) qui se transforme en ookinète mobile. Ce dernier traverse la paroi de l'estomac du moustique et forme un oocyste à l'intérieur duquel s'individualisent les sporozoïtes haploïdes à n chromosomes. A maturité l'oocyste éclate et libère les sporozoïtes qui migrent dans la glande salivaire du moustique. Ils sont inoculés à l'homme lors d'un repas sanguin infectant.

Analyse de la réponse anticorps naturelle contre trois antigènes de *P. falciparum* chez les enfants de 1 à 5 ans vivant à Bandiagara ; Mali

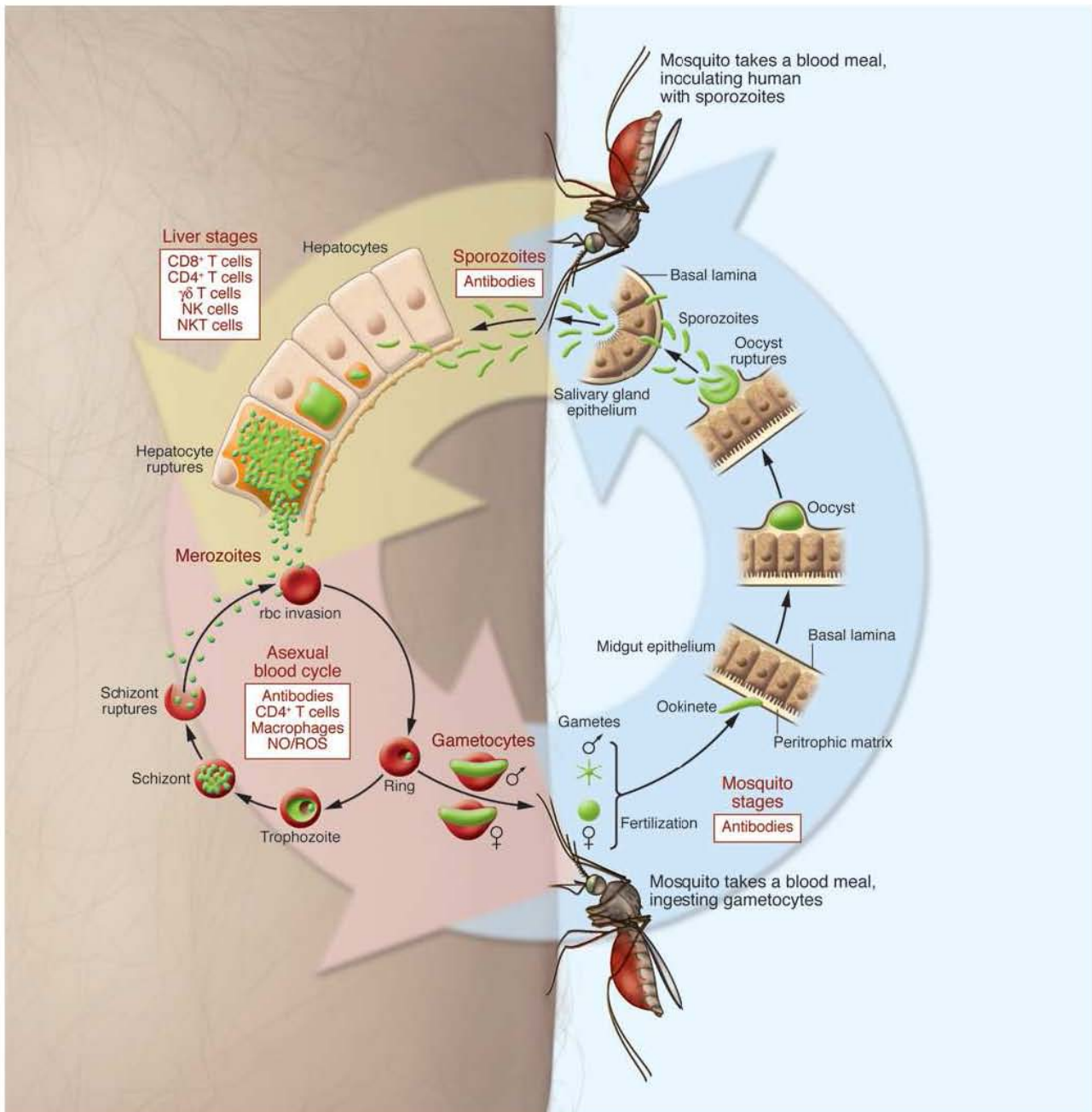


Figure 1: Cycle biologique du *Plasmodium* avec les différentes cibles de l'immunité.
Source : <http://www.jci.org> Volume 120 Number 12 December 2010, date d'accès: 14/07/12

2. Immunité anti-palustre

La connaissance des caractéristiques antigéniques du *Plasmodium* et la compréhension des mécanismes immunitaires au cours du paludisme sont nécessaires au développement des vaccins antipaludiques.

Les sujets vivants en zone d'endémie palustre acquièrent une immunité clinique (prémunition) contre le paludisme. L'acquisition d'une telle immunité est lente et nécessite une exposition prolongée et répétée au parasite [75]. Cette réponse immune anti-palustre varie en fonction du niveau d'endémicité, des facteurs épidémiologiques et génétiques, de l'âge de l'hôte, du stade de développement et de l'espèce plasmodiale [87].

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

2.1. Immunité innée dans le paludisme

2.1.1 Rôle des cellules

2.1.1.1 Les granulocytes

Les granulocytes ou polynucléaires sont des leucocytes caractérisés par un noyau polylobé et la présence de granules dans leur cytoplasme. Il existe 3 types de granulocytes : polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles. Les neutrophiles sont les plus nombreux et représentent les premières cellules phagocytaires. Il a été montré qu'ils sont capables de phagocyter les mérozoïtes [60]. Ils expriment à leur surface des récepteurs pour la fraction Fc des immunoglobulines et des récepteurs du complément. Ce qui facilitera la phagocytose des parasites par

Analyse de la réponse anticorps naturelle contre trois antigènes de *P. falciparum* chez les enfants de 1 à 5 ans vivant à Bandiagara ; Mali

l'intermédiaire du complément et des anticorps présents dans les sérums d'individus exposés **[60]**. Des cytokines telles que le TNF- α , IFN- γ , le GM-CSF et IL-1 β activent les neutrophiles et induisent significativement la phagocytose des mérozoïtes **[61]**.

L'expression du Human Leucocyte Antigen-B35 a été aussi associée à la résistance à l'infection palustre **[20]**

2.1.1.2 Monocytes/macrophages

Les monocytes ont pour origine la moelle osseuse et sont libérés dans la circulation périphérique. Ce sont de grosses cellules mesurant 15 à 30 μm , avec un noyau en fer à cheval caractéristique. La membrane plasmique a un contour irrégulier et le cytoplasme contient de nombreux lysosomes. Ils représentent 5-10% des leucocytes et sont morphologiquement et fonctionnellement hétérogènes [7]. Le marqueur spécifique des monocytes est le CD14. Ils peuvent exprimer également le CD16 et la co-expression de CD14 et de CD16 permet de distinguer 3 sous-classes de monocytes :

- les monocytes CD14⁺⁺CD16⁻ dits «monocytes classiques» ; ayant pour rôle le recrutement des neutrophiles sur le site de l'inflammation
- les monocytes CD14⁺CD16⁺ appelés «monocytes pro-inflammatoires» sécrétant de cytokines pro-inflammatoires et
- une population dite intermédiaire exprimant CD14⁺⁺CD16⁺ [12] appelés aussi monocytes anti-inflammatoires, sécrétant principalement l'IL-10.

Les monocytes se différencient en macrophages dans les tissus. Ces macrophages sont groupés en sous-populations ayant des fonctions différentes selon leur mode d'activation. Les monocytes/macrophages sécrètent des facteurs solubles comme les cytokines et libèrent l'oxyde nitrique (NO), les radicaux libres oxygénés (O_2^- , OH^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ces monocytes peuvent également inhiber la croissance des parasites par le mécanisme d'inhibition cellulaire dépendante des anticorps (ADCI) [16].

2.1.1.3 Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (CDs) constituent la première ligne de défense du système immunitaire. Elles sont issues de la moelle osseuse et se subdivisent en deux groupes : les CDs myéloïdes et les CDs lymphoïdes[105]. Les CDs lymphoïdes dérivent des cellules précurseurs issues de la moelle osseuse et colonisent principalement et secondairement les tissus lymphoïdes (thymus, rate, foie et ganglions lymphatiques) et y résident[21].

Les CDs ont une capacité migratoire et de présentation d'antigènes au niveau des organes lymphoïdes secondaires plus accrue que les macrophages qui vivent et meurent sur place après recrutement par les tissus. Ce sont les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles [21]. Les CDs sont fondamentales pour l'initiation de la réponse immune par éducation des cellules B et T, qui sont les cellules effectrices de l'immunité acquise. Les différents sous-groupes de CD sont réparties dans les tissus périphériques et dans le sang, reconnaissent les molécules de surface exprimées par les microbes et sécrètent des cytokines. Sous l'influence d'un stimulus inflammatoire, les CDs sont activées et entament leur processus de maturation conduisant à l'activation et à l'initiation de la réponse cellulaire T [21].

2.1.1.4 Les cellules tueuses naturelles

Les cellules tueuses naturelles (Natural killer ou NK) sont des types de lymphocytes, qui sont principalement trouvés dans le sang périphérique, la rate et dans la moelle osseuse. Elles constituent un composant important du système immunitaire inné[21]. Ces cellules jouent un rôle majeur dans la destruction des cellules infectées par les virus et des tumeurs. Leur rôle dans la protection contre l'infection palustre reste encore à être élucidé. Il a été prouvé que l'activité des NK augmente chez les sujets infectés par le *Plasmodium* et que cette activité dépend de la parasitémie et du taux

d'IFN- γ . Une autre étude a montré que lorsque les cellules mononuclées du sang périphérique sont exposées aux globules rouges parasités, les NK sont les premières à produire l'IFN- γ [6]. La production d'IFN- γ semble être liée à la fois à un contact direct entre les globules rouges parasités et les cellules NK et aussi à la présence des cellules accessoires lymphoïdes et myéloïdes [21].

2.1.1.5 Les cellules T tueuses naturelles (NKT)

Les cellules T tueuses naturelles (natural killer T cells : NKT) sont des cellules de l'immunité innée récemment décrite et ayant les mêmes caractéristiques que les cellules NK et les cellules T. Leur capacité à produire une grande quantité de cytokines après activation leur permet d'établir une immunité innée et adaptative[96]. L'activation des cellules NKT leur permet le recrutement et l'activation des cellules dendritiques, des NK, des CD4+ et CD8+. Le rôle des cellules NKT comme cellule T helper dans la régulation de la réponse humorale anti-palustre *in vivo* a été confirmé plus tard par deux études indépendantes. Les cellules NKT semblent ne pas avoir un rôle clair dans la réponse immune contre le stade érythrocytaire[21].

2.1.1.6 Les cellules T gamma-delta

Ce sont des sous-classes de lymphocytes ayant plusieurs caractéristiques des cellules de l'immunité innée, qui leur permet une activation rapide après la reconnaissance des ligands. Les cellules T $\gamma\delta$ réagissent avec une grande variété de cellules incluant les cellules de l'immunité innée, les cellules T, les cellules B aussi bien que les tissus non-immuns. Elles induisent les réponses innée et adaptative et peuvent promouvoir la réparation et la cicatrisation [15]. Elles ont les mêmes caractéristiques que les cellules NK et NKT, telle que la capacité de sécréter une grande quantité de cytokines pro-inflammatoires et une activité cytolytique contre les tumeurs et les pathogènes. Il est connu que les T $\gamma\delta$ constituent une forme de cellules à part de la réponse immune

Analyse de la réponse anticorps naturelle contre trois antigènes de *P. falciparum* chez les enfants de 1 à 5 ans vivant à Bandiagara ; Mali

contre *Plasmodium falciparum*. Il a été observé que les cellules T $\gamma\delta$ inhibent le développement des formes asexuées sanguines de *P. falciparum* par le mécanisme de cytotoxicité dépendant de l'exocytose des granules. En plus des études ont montré que *P. falciparum* induit une expansion des T $\gamma\delta$ jusqu'à 30% des cellules T circulant chez l'homme suggérant leur rôle potentiel dans la clairance des parasites [27].

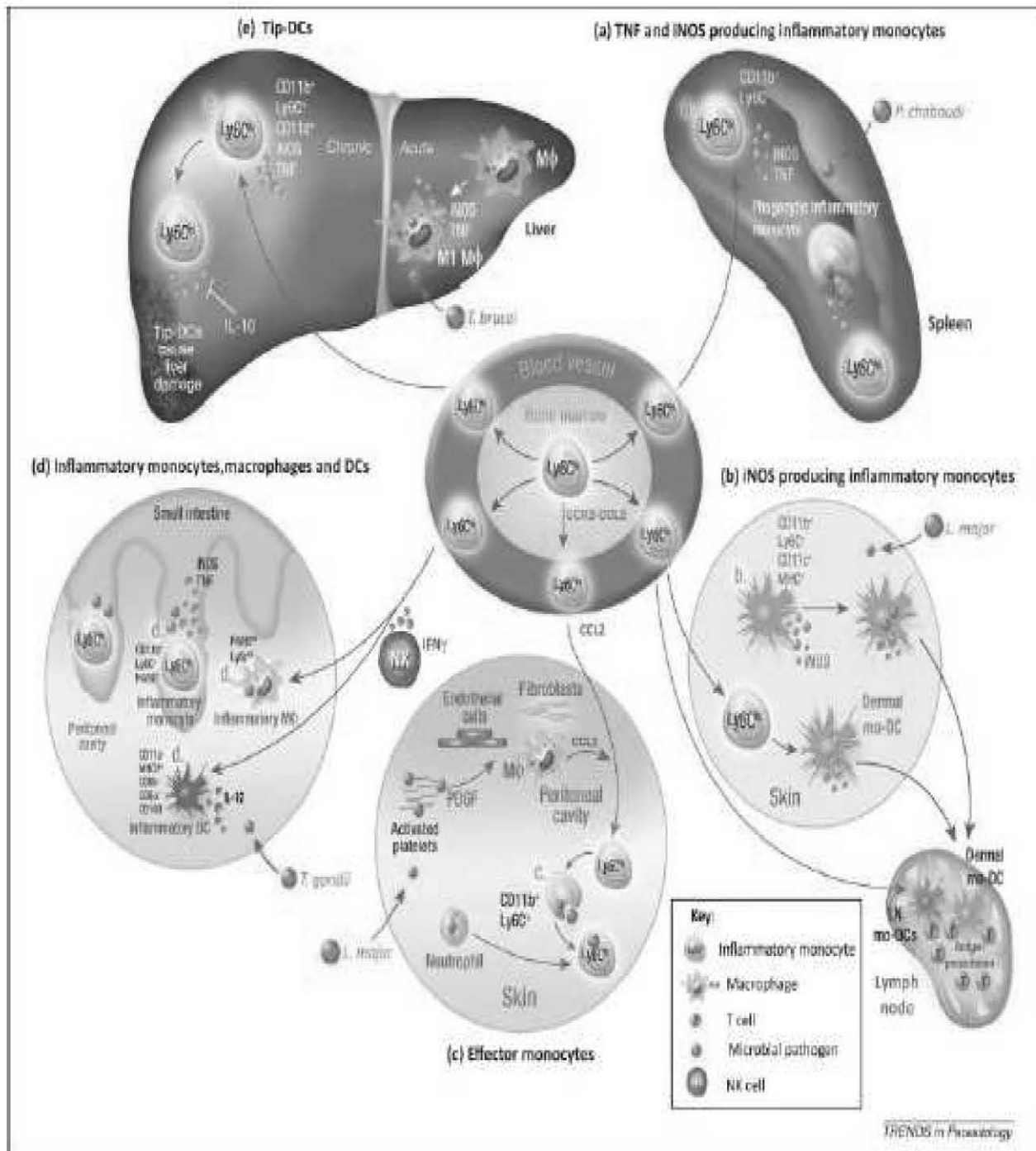


Figure 2 : Origine et phénotypes des cellules de l'immunité innée

Source : Trend in Immunology, date d'accès 20/03/2013

2.1.2 Rôle du complément

Le complément est présent dans le sérum d'une façon naturelle en dehors toute stimulation antigénique. Ce système nommé par C joue un rôle important dans la défense contre les pathogène par l'opsonisation, la réponse inflammatoire, l'élimination des complexes antigène-anticorps ou par destruction des pathogènes. Il est constitué d'une trentaine de protéines membranaires et plasmatiques [43].

Le système de complément connaît trois voies d'activation :

- La voie classique ; activée par reconnaissance d'un complexe antigène-anticorps
- La voie alterne ; par fixation directe sur le pathogène
- La voie des lectines ; par fixation des polysides sur la surface des pathogènes

Ces trois voies diffèrent par leur mode d'activation. Elles aboutissent toutes à la formation de deux complexes à activité enzymatique : C3a et C5a convertases[43].

Au cours du paludisme le système du complément est activé par les antigènes exprimés à la surface des globules rouges parasités [1;101]. L'hémoglobine et l'hématine libérés par la lyse intravasculaire des érythrocytes infectés par *P. falciparum* ont des propriétés inflammatoires et peuvent activer le complément [59;74]. Chez des enfants faisant le paludisme simple un taux faible de C3, C4 et C1q a été observé. Selon l'étude de Wenish, l'activation de la voie classique aussi bien que de la voie alterne est associée à une augmentation de Bb, Sc5b-9 et de C4d [101]. La voie des « Mannose Binding Lectines »(MLB) quant à elle pourrait être activée par la liaison des lectines aux érythrocytes infectés. Ainsi un déficit en lectine liant les mannoses, peut compromettre la capacité de l'organisme à lutter contre le paludisme [14;66]. Les fractions C3a et C5a obtenues par clivage de C ont des

propriétés chimiotactiques permettant le recrutement des cellules inflammatoires [22].

2.2 Immunité adaptative dans le paludisme

L'immunité adaptative se caractérise par sa spécificité pour l'agent pathogène. Son apparition remonte environ à 200 millions d'années avec l'acquisition de nouveaux outils et la mise en place de mécanismes plus complexe de défense de l'organisme [43]. Les mécanismes précurseurs de cette immunité ne préexistent pas mais s'acquièrent spécifiquement face à un pathogène donné. Ainsi les effecteurs sont conservés et mis en mémoire. Le système immunitaire se construit au cours de la vie de l'individu en fonction des micro-organismes qu'il rencontre. Les composants humoraux aussi bien que cellulaires participent à l'immunité adaptative[43].

2.2.1 Immunité à médiation cellulaire

Les cellules T CD8+ assurent la réponse cytotoxique alors que les cellules T CD4+ sont des cellules auxiliaires ou "T helper". Les cellules T CD8+ reconnaissent les fragments de peptide présentés en association avec la molécule CMH de classe I tandis que les T CD4+ réagissent avec ceux présentés par la molécule CMH de classe II sur les cellules présentatrices d'antigènes. Les cellules T CD4+ se subdivisent en sous groupes selon le type de cytokines qu'elles produisent. Initialement 2 sous-populations composées par les Th1 et les Th2 avaient été décrites [106]. Les cellules Th1 produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que IFN- γ et IL-2 alors que les Th2 produisent des cytokines anti-inflammatoires IL-4 et IL-13 régulant la réponse des anticorps. Les Th1 induites par le *Plasmodium* protègent aussi bien contre le stade hépatique qu'érythrocytaire[21]. D'autres sous populations ont été décrites plus tard notamment les Th17 et les T reg. Le rôle des cellules Th17 et des T reg dans la protection contre le paludisme reste à explorer. Les cellules T CD8+ se subdivisent en trois sous groupes selon l'expression de CD62 et de CD127. Les cellules T mémoires expriment à la fois CD62 et CD127L : CD62L+ CD127+ [21].

Les études de vaccination avec les sporozoïtes atténués ont montré que les cellules T cytotoxiques interviennent dans la destruction des hépatocytes infectés par le *Plasmodium* [56;99]. Les cellules T CD4+ et CD8+ seraient actives également contre les formes érythrocytaires par la production d'IFN- γ et l'induction d'oxyde nitrique (NO) [79].

2.2.2 Immunité humorale

Les cellules B, les seules capables de se différencier en plasmocytes sécréteurs d'anticorps, jouent un rôle important dans l'immunité humorale. Elles constituent 15% des lymphocytes [21]. Dans la rate le centre germinatif est l'un des sites essentiels pour l'initiation et la prolifération des cellules B activées. En réponse aux antigènes trois événements importants de différenciation des cellules B prennent place dans le centre germinatif : a) la maturation de l'affinité, b) la commutation isotypique des immunoglobulines et c) la constitution de cellules B mémoires qui se différencie rapidement dans le plasma lors d'un second contact avec l'antigène[21]. Chez les sujets vivant en zone d'endémie palustre, l'infection induit une forte réponse humorale avec production d'IgM et IgG ainsi que d'autres isotypes [76].

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

Le transfert passif d'IgG purifiées de sérums immuns aux sujets non immuns protège contre le paludisme [24].

Les nourrissons seraient protégés contre le paludisme pendant les premiers mois de leur vie grâce aux anticorps maternels d'isotypes IgG [86].

Dans des études longitudinales, la prévalence et le niveau des anticorps anti-plasmodiaux étaient associés à la protection contre le paludisme clinique [81].

Les mécanismes effecteurs des anticorps sont : l'opsonisation, la neutralisation ou le blocage, l'activation du complément et de la cytotoxicité anticorps dépendante. Les sous-classes d'IgG, particulièrement les sous classes cytophiliques IgG1 et IgG3 jouent un rôle important dans l'immunité anti-palustre. Ces anticorps cytophiliques se fixent par leur fragment cristallisable (Fc) aux récepteurs des monocytes, conduisant à l'activation de ces cellules lesquelles inhiberaient la croissance du parasite. C'est le mécanisme d'ADCI [50]. Par ailleurs des cas de protection liée à un taux élevé d'IgG2 ont été rapportés. Une étude plus récente a montré que le génotype FcγRIIα R131H peut influencer les réponses des sous classes d'IgG à la protection contre le paludisme et les porteurs de l'allèle H ont un niveau élevé d'IgG2 chez les peulhs. Il existe une association entre le taux d'anticorps et la protection contre le paludisme. La réponse anticorps peut être influencée par l'âge, l'exposition, le taux de transmission et les facteurs génétiques de l'hôte [21].

Analyse de la réponse anticorps naturelle contre trois antigènes de *P. falciparum* chez les enfants de 1 à 5 ans vivant à Bandiagara ; Mali

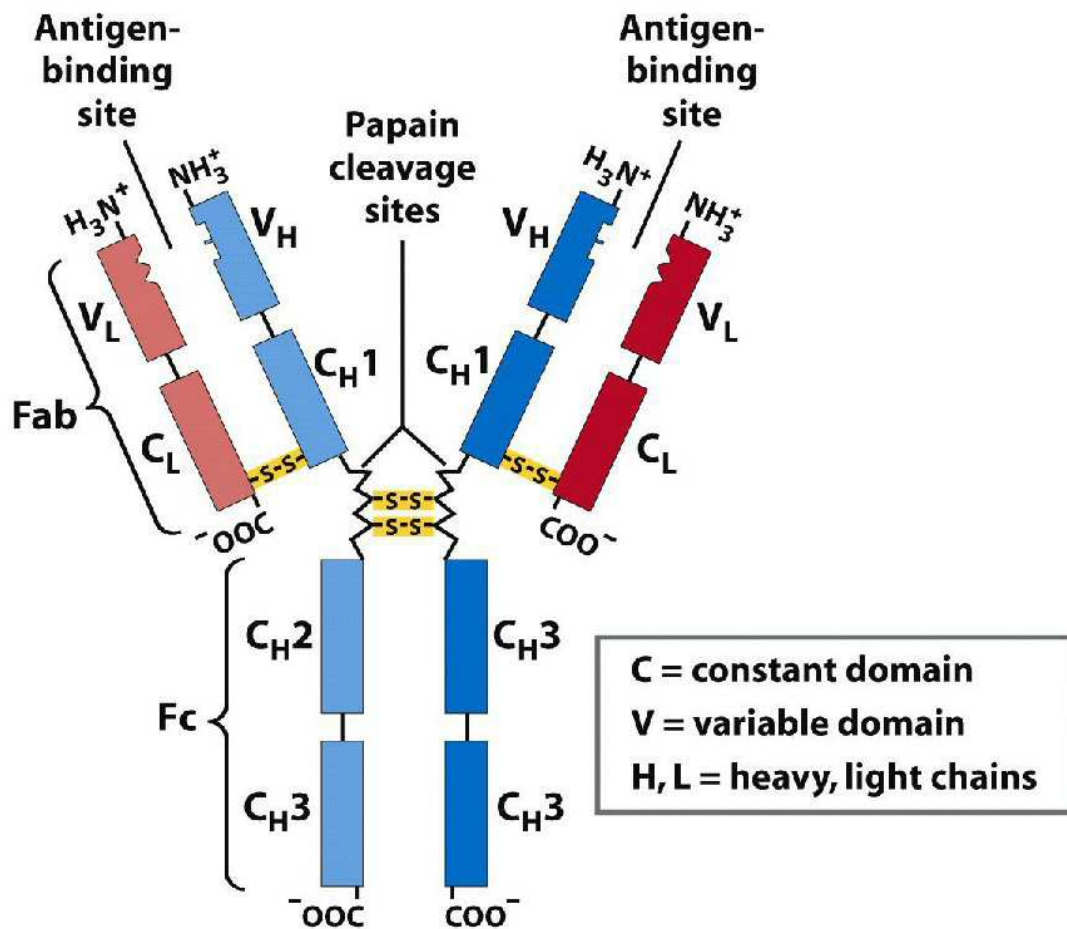


Figure 5-21a
 Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
 © 2008 W.H. Freeman and Company

Figure 3: Structure de l'Immunoglobine G (IgG) chez l'homme

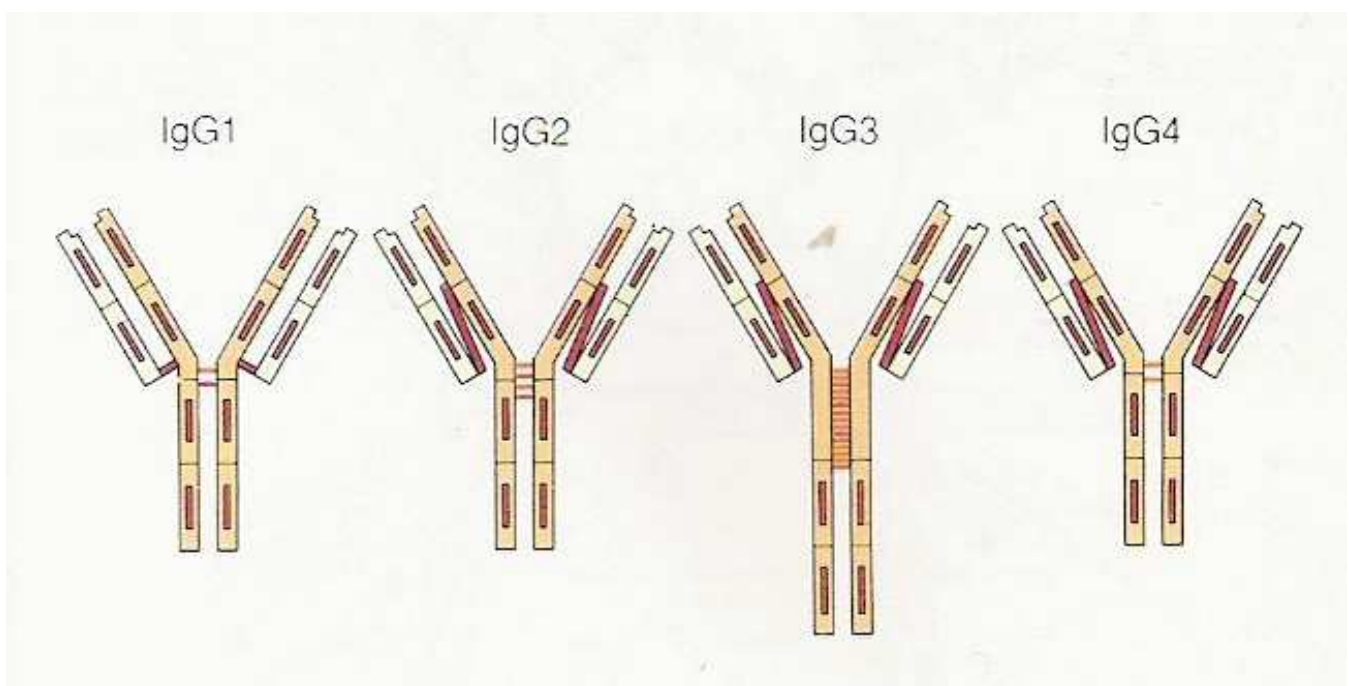


Figure 4 : Structure des sous-classes d'IgG chez l'homme (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4)

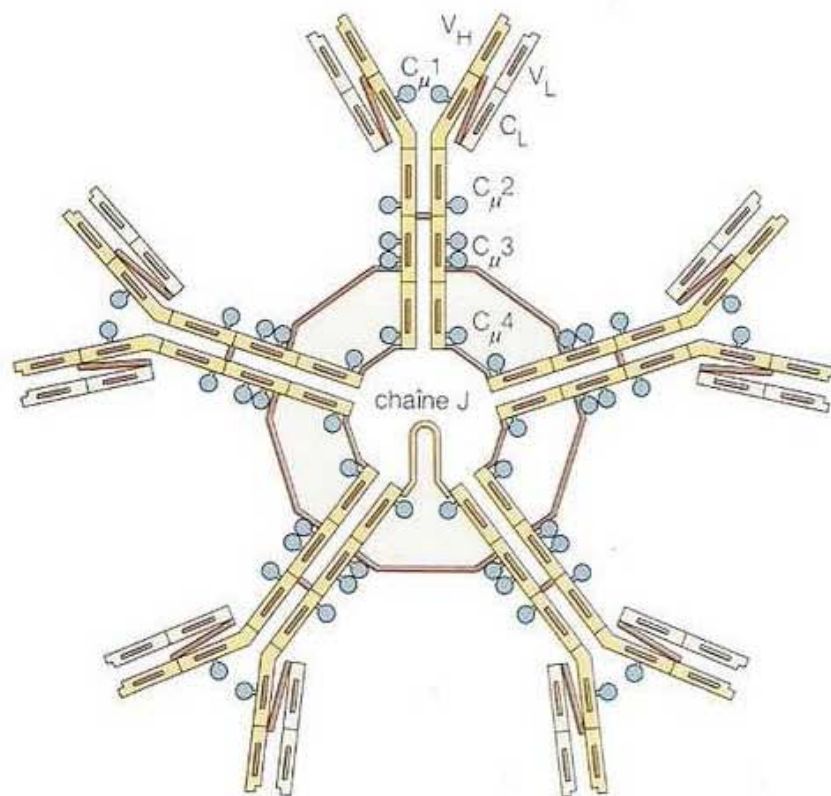


Figure 5: Structure de l'IgM sérique chez l'homme

3. Mécanisme d'évasion immune du parasite

La protection contre le paludisme à *P. falciparum* est corrélée avec l'acquisition de l'immunité humorale contre les différents antigènes exprimés par le parasite sur la surface des globules rouges infectés. La sensibilité au paludisme clinique est liée au manque d'anticorps spécifiques aux variant d'antigènes exprimés par le parasite. *Plasmodium falciparum* peut ainsi maintenir une infection chronique en subissant seulement une clairance partielle. La famille multigène *var* code un variant d'antigène: "*Plasmodium falciparum* Membrane Protéin 1" (PfEMP1) [88]. Cet antigène est impliqué dans la formation de rosettes des érythrocytes et la séquestration des globules rouges infectés. Chaque génome du parasite porte 40-60 gènes *var*, mais exprime en général une seule PfEMP1 à la fois, offrant un large répertoire de molécules de surface considérées comme importantes pour échapper au système immunitaire et pour la pathogénèse. Le changement d'antigènes permet l'expansion de clones des parasites exprimant un variant de gène différent entraînant une nouvelle vague de parasitémie. La différence d'affinité des variants de protéines pour les récepteurs de l'hôte est un facteur de virulence. Ceci permet l'apparition d'autres souches de parasites et expose l'hôte à d'autres infections. Chez la femme enceinte il existe des gènes *var* particuliers ; *var1csa* et *var2csa*, qui se lient spécifiquement à la "chondroïtin sulfate A" (CSA) et entraîne l'attachement des érythrocytes infectés aux syncytiotroblastes du placenta [78]. La capacité qu'a le *Plasmodium falciparum* à exprimer sélectivement *var1csa* et *var2csa* chez la femme enceinte pourrait expliquer la gravité du paludisme au cours d'une grossesse. Après plusieurs grossesses la femme produit des anticorps anti-*var1csa* et anti-*var2csa* qui la protège ainsi que son fœtus contre cette forme sévère de paludisme. Ceci montre le rôle des variant antigéniques dans l'évasion immune des parasites ; le mécanisme de virulence et le rôle des anticorps dans la protection [9].

La capacité des gamétocytes à produire des variations antigéniques constitue également un mécanisme d'évasion de plus du système immunitaire pour le

Plasmodium. Récemment Barry et *al* ont montré que pendant la phase de zygote et d'ookinète, des combinaisons entre des gènes de différentes souches de *Plasmodium falciparum* peuvent se produire. Ceci contribue à la diversité énorme de répertoire de ces gènes [97].

Les zones d'endémie palustre étant des zones où sévissent aussi les helminthiases, il est fréquent de rencontrer des cas de co-infection *Plasmodium*-helminthe. Le *Plasmodium* étant un parasite intracellulaire, induit la production de cytokines par la voie Th1. La présence d'helminthes entraîne une orientation vers la voie Th2. Ainsi chez le sujet ayant une co-infection, le système immunitaire n'est pas assez efficace contre le *Plasmodium*. En effet une étude au Madagascar a montré que les enfants porteurs, d'une co-infection *Plasmodium*-helminthe traités avec un anti-helminthe faisaient 2,5 fois moins d'accès palustres que ceux ayant reçu un placebo. Au Sénégal, il a été montré que l'incidence du paludisme augmentait chez des individus ayant un nombre élevé d'œufs de schistosome comparés à ceux ayant un nombre d'œuf faible [82]. A Bandiagara Kirsten E. LYKE et collaborateur ont mis en évidence

- a) une baisse de la densité parasitaire,
- b) une baisse d'incidence et
- c) un prolongement du temps au premier épisode de paludisme chez des enfants co-infectés avec le *Plasmodium* et le schistosome. Ces enfants excrétaient en effet une faible quantité d'œufs.

4. Conséquences immuno-pathologiques

Selon l'espèce de *Plasmodium* en cause et l'hôte; l'infection palustre peut se présenter sous différentes formes. Le *Plasmodium falciparum* présente la plus grande menace pour la vie. Dans les zones d'endémicité palustre; l'anémie sévère, l'hypoglycémie, la défaillance rénale et le neuro-paludisme constituent les manifestations pernicieuses et les causes de mortalité infantile.

Les signes cliniques apparaissent lorsque le parasite pénètre et commence à se multiplier dans les érythrocytes. Le *Plasmodium falciparum* de part sa capacité de multiplication et de séquestration des globules rouges dans les petits vaisseaux constitue l'espèce la plus virulente et responsable du paludisme sévère. A ce stade beaucoup de substances interviennent comme médiateurs de l'immunité.

Clark et *al.* ont suggéré que le « ROS » joue un rôle dans la pathogénicité du paludisme sévère. Les érythrocytes extravasculaires conduisent à la génération de « ROS » entraînant le coma et l'endommagement des tissus locaux, y compris le cerveau. Mais le « ROS » produit par les leucocytes détruit aussi les parasites. Il a été constaté que la production de cette substance augmente chez les adultes infectés par *Plasmodium falciparum*; particulièrement dans le cas sévère [34]. Chez les enfants, elle est associée à l'anémie et des produits de peroxydation de lipides ont été trouvés dans le liquide cébrospinal en cas de paludisme cérébral [30].

Clark et *al* en 1987, ont suggéré que le TNF- α était un médiateur possible du paludisme sévère. Ainsi plusieurs cytokines telles qu'IFN- γ , IL-1B et IL-10, ont été identifiées comme étant responsables des symptômes cérébraux. Un anticorps monoclonal anti-TNF- α atténue la fièvre chez les enfants ayant un paludisme cérébral [31]. Dans un début de paludisme à *Plasmodium vivax*, un taux très élevé de TNF- α a été mesuré, supposant qu'un tel taux ne peut pas en soit causer une maladie sévère. En plus, le TNF- α peut inhiber la multiplication des parasites[3]. Les parasites n'ont pas la même capacité à induire la libération des TNF- α . Chez les patients avec le paludisme cérébral, les parasites induisent plus de TNF- α que chez les patients avec un paludisme simple[98].

Les facteurs liés à l'hôte constituent un déterminant important dans la libération de TNF- α . Bien que le TNF- α soit le médiateur inflammatoire recherché dans le paludisme, il est évident qu'il y ait une augmentation de la production d'IL-10 dans le paludisme sévère. L'élévation du taux de TNF- α pourrait amplifier la séquestration

des récepteurs responsables de la cyto-adhérence des parasites (ICAM-1, VCAM-1). Il y a aussi une augmentation du taux d'IL-6 et d'IL-8 dans les infections à *Plasmodium falciparum*. Le taux d'IL-8 reste élevé pendant plus de quatre semaines après curation de l'infection aiguë.

Quant à l'oxyde nitrique, il a été identifié comme étant un médiateur potentiel du TNF- α . L'NO intervient dans la défense de l'hôte par destruction des micro-organismes intracellulaire[23] par maintien de la circulation de par son action sur les cellules endothéliales et par neurotransmission. Le NO est produit dans les cellules endothéliales cérébrales où il diffuse dans les tissus interférant avec la neurotransmission. Il peut causer un dommage neurologique par formation de peroxy-nitrite. Le NO se métabolise en nitrate et en nitrite.

5. Paludisme et génétique

Certains facteurs génétiques tel que les hémoglobinopathies, le déficit en G6PD et le défaut d'expression érythrocytaire de l'antigène Duffy confèrent à l'homme une résistance naturelle vis-à-vis de l'infection palustre. Les sujets porteurs des hémoglobines S et C font moins d'accès palustres graves comparativement aux sujets normaux AA. Les formes homozygotes SS et hétérozygotes AS de la maladie sont plus fréquentes en Afrique Subsaharienne où le paludisme sévit particulièrement. La forme homozygote confère une protection de 60% contre le paludisme simple et de 90% contre le paludisme grave [54]. En effet, des études *in vitro* ont apporté l'évidence que le développement de *Plasmodium falciparum* était inhibé dans les globules rouges contenant l'hémoglobine C que ceux ayant des hémoglobines normaux AA [44]. Une étude conduite chez les dogons au Mali a montré une réduction de 80% du risque de paludisme grave liée à l'Hb C [2], et au Burkina Faso une réduction de 90% et 30% respectivement de paludisme grave et simple [68]. Enfin, *P. falciparum* se développerait moins bien dans les érythrocytes homozygotes HbS [46;73], et plus récemment Lamonte et *al.* ont montré que les microARN

(miRNA) d'érythrocytes hétérozygotes HbAS ou homozygotes HbSS transloquent dans le génome du *Plasmodium* et inhibent ainsi sa croissance [63]. Les miARN sont des petits segments d'acides ribonucléiques (ARN) double-brin, régulateurs post-transcriptionnels capables d'extinction de l'expression d'un gène [10]. Le déficit en G6PD, est un déficit enzymatique qui protégerait contre le paludisme. La distribution géographique de cette enzymopathie se superpose à celle du paludisme. La forme (A-) du déficit en G6PD qui a été décrit comme protégeant préférentiellement les hémizygotés mâles contre le paludisme sévère [51;52;83]. L'infection à *Plasmodium vivax* est rare chez les personnes à peau noire à cause de l'absence de l'antigène érythrocytaire Duffy que *P. vivax* utilise pour pénétrer dans l'érythrocyte [20].

Des études dans les groupes ethniques sympatriques vivant ensemble dans la même localité ont montré que les peuls résistent plus à l'infection palustre que les Dogons et les Mossi. En effet Dolo A. et al en 2005 et Modiano D et al. en 2007-2008 ont respectivement montré que les Dogon et les Mossi ont plus d'accès palustres que leurs voisins sympatriques peulh, qui pourtant vivent dans les mêmes conditions d'exposition au paludisme [37;68]. Arama C, et al. en 2011 ont montré que cette différence de susceptibilité ethnique s'expliquerait par une différence d'activation des cellules dendritiques et de réponse spécifique à des ligands des "Toll Like Receptor" [5].

Avec le décryptage du génome humain d'autres gènes de susceptibilité au paludisme seront sans doute identifiés.

6. Les antigènes du *Plasmodium*

Le *Plasmodium* subit plusieurs modifications morphologiques au cours de son cycle biologique aussi bien chez l'homme que chez le vecteur. A chaque étape de développement correspond une expression de nouveaux antigènes. Ainsi, plus de deux mille antigènes ont été identifiés chez le *Plasmodium*. Ces antigènes peuvent être classés selon les étapes du cycle de développement du parasite, en antigènes de

Analyse de la réponse anticorps naturelle contre trois antigènes de *P. falciparum* chez les enfants de 1 à 5 ans vivant à Bandiagara ; Mali

stades pré-érythrocytaires (sporozoïtes et formes hépatiques), de stades érythrocytaires (mérozoïtes, trophozoïtes, schizontes) et de stade sexué (gamétocytes). Le génome nucléaire de *P. falciparum* a une taille de 22,8 Mb repartis sur 14 chromosomes comportant environ 5300 gènes. Les produits de nombreux gènes sont impliqués dans l'interaction hôte parasite et l'évasion immune [47].

Nous décrivons ici 3 antigènes du stade érythrocytaire utilisés dans cette étude

6.1. Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1)

AMA-1 est une protéine intégrale de type 1 de la membrane ayant un segment cytoplasmique et une région extracellulaire respectivement de 55 et de 550 aminoacides. Cette dernière partie est divisée par les ponts disulfures en trois domaines [55]. La protéine est codée par un gène localisé sur le chromosome 11. C'est une molécule qui a tout d'abord été identifiée comme une protéine de 66 kDa chez *P. knowlesi* (pk66). Son orthologue chez *P. falciparum* est "Apical Membrane Antigen"AMA-1, une protéine de 83kDa [77]. Au cours de la synthèse, elle est localisée d'abord sur le cou du rhoptrie, et détectée sur la surface des mérozoïtes au moment de la rupture des schizontes. Là elle est impliquée dans l'interaction mérozoïtes- globules rouges, précédant l'invasion. AMA-1 est une molécule polymorphe. Ce polymorphisme est dû à la substitution d'un aminoacide, elle-même liée à la pression immune de l'hôte sur le parasite. Bien que cela fait de AMA-1 une cible potentielle de la réponse immune naturelle ainsi que de celle induite par un vaccin, le polymorphisme présente un défi pratique pour le développement d'un vaccin effectif [38;39;89].

Des expériences faites avec des IgG purifiées à partir d'anticorps monospécifiques de FVO et 3D7 ont prouvé l'induction d'anticorps contre les épitopes communs. Plus de 80% des épitopes induisant une réaction croisée entre ces deux allèles de PfAMA-1 sont partagés avec HB3 et CAMP. En plus les IgG anti-3D7 et FVO sont capables de faire déplacer plus 80% des anticorps actifs contre les souches HB3 et CAMP. Cependant cette fraction «cross-réactive» n'est pas suffisante pour inhiber d'une façon effective l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes d'une souche hétérologue de parasite [62]. L'ectodomaine d'AMA-1 est une cible de vaccin. Il est reconstitué en protéines de 44kDa et 48 kDa alternantes sur les mérozoïtes pour l'invasion des globules rouges [80]. Des expériences d'immunisation actives et

passives *in vitro* ont montré qu'AMA-1 participe à l'effectivité des réponses immunes contre les stades érythrocytaires des parasites. La première évidence du potentiel vaccinal d'AMA-1 vient des études effectuées avec pk66. Un anticorps monoclonal a bloqué l'invasion des érythrocytes des rhésus par *P. knowlesi in vitro* [32]. La vaccination avec pk66 purifié a induit la protection de 4/6 des singes dans une expérience sur le stade érythrocytaire de *P. knowlesi*. En plus les sérums de singes protégés ont inhibé la croissance des parasites *in vitro*, supposant que pk66 induit des anticorps inhibiteurs [33]. Kennedy et al. ont montré que les anticorps anti-AMA-1 étaient augmentés chez les rats et qu'ils inhibaient l'invasion des globules rouges par les mérozoïtes de souches hétérologues de parasites. Mais il y avait une corrélation inverse entre le degré d'inhibition de croissance et la distance génétique entre les souches de parasite[25].

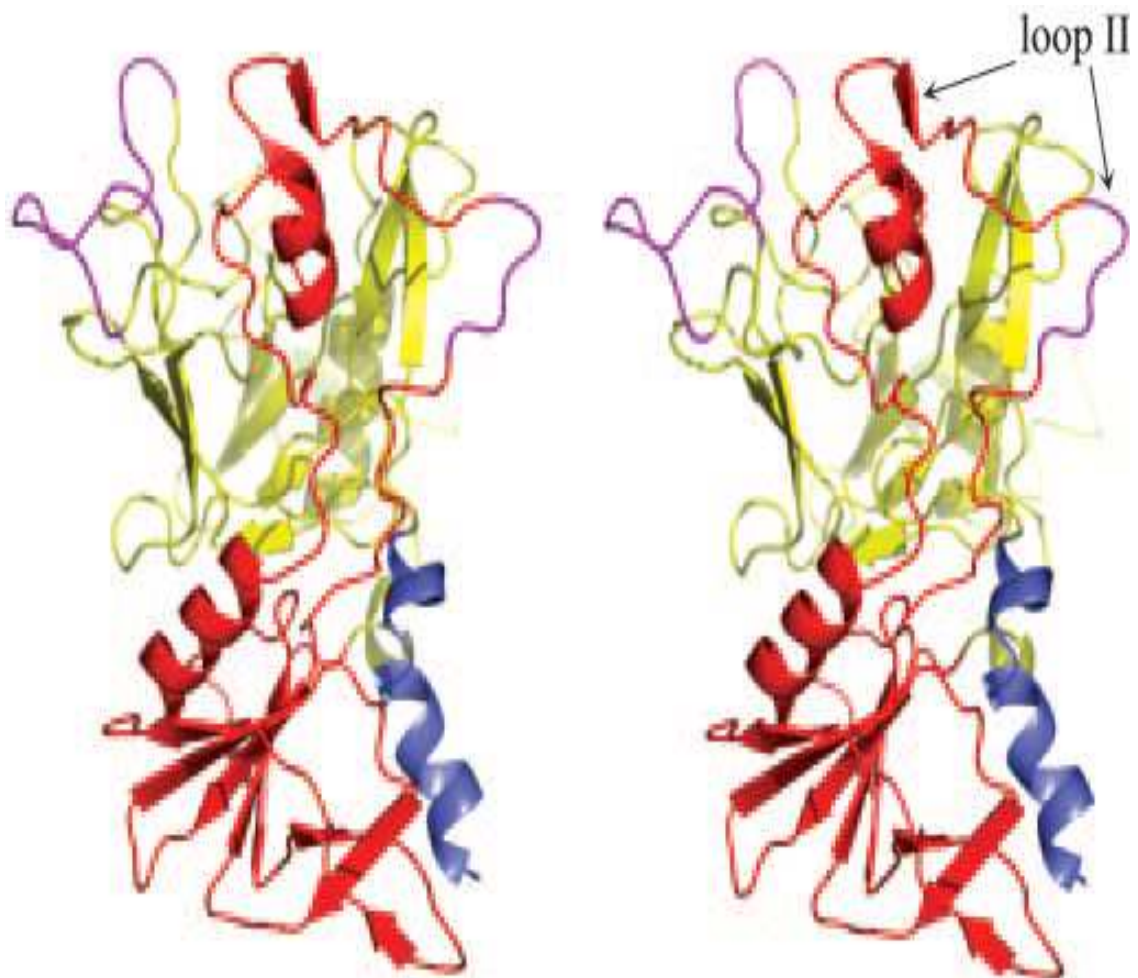


Figure 6: Structure d'Apical Membrane Antigen-1. Domaine I en jaune et domaine II en rouge. [8]

6.2. Glutamate Rich Protein-R2: GLURP-R2

GLURP est une protéine de 220kD exprimée aux stades hépatiques, asexués et sexués du cycle de vie du parasite [40]. Cette protéine peut être divisée en une région non répétée N-terminale (R₂₅₋₅₀₀ ou R0), de l'acide aminé 94 à l'acide aminé 489, une région centrale répétée (R1) et une région répétée C-terminale (R2) qui s'étend de l'acide aminé 705 à l'acide aminé 1178 [91]. Elle est codée par un gène localisé sur le chromosome 10. Plusieurs études immuno-épidémiologiques utilisant des sérums et des données cliniques de différents sites ont montré que de taux élevés d'IgG anti-GLURP-R0 étaient significativement corrélés à la protection contre les fortes parasitémies et les épisodes palustres fébriles [57]. Les anticorps protecteurs agiraient par le mécanisme "Antidody Dependent Cytotoxic Inhibition" (ADCI) [16;91]. Une étude au Sénégal a montré une forte corrélation entre la protection contre l'infection palustre et des taux élevés d'IgG2 et IgG3 spécifiques à GLURP-R0 (aa94-489), et d'IgG3 contre GLURP-R2 (aa705-1178). Bien que les anticorps anti-GLURP purifiés inhibent la croissance *in vitro* des parasites au stade érythrocytaire, il n'est pas clair que ces anticorps assurent la protection contre les parasites du stade hépatique. GLURP est un antigène exprimé à tous les stades de développement du cycle biologique du parasite [65]. Cet antigène combiné au MSP-3 en une protéine de fusion a été testé en Phase 1 et est actuellement en essai de Phase II multicentrique [11].

6.3. Merozoïtes Surface Protein-1: MSP-1.

MSP-1, est une protéine de 190 à 230 kDa qui a d'abord été identifiée sur la surface des mérozoïtes de stade sanguin [58]. C'est une protéine codée par un gène localisé sur le chromosome 9. Au moment de la rupture des schizontes et de la libération des mérozoïtes, le MSP-1 précurseur est scindé en deux fragments distincts. Parmi ces

fragments, le fragment C-terminal de 42 kDa (MSP1₄₂) a été bien étudié. MSP1₄₂ est aussi scindée en un fragment soluble de 33kDa et de 19kDa (MSP1₁₉) qui reste attaché à la membrane du mérozoïtes à travers le glucophosphatidyl inositol Anchor. MSP1₁₉ contient deux domaines épidermiques qui sont riches en résidus de cystéines [13]. Les données de plusieurs études épidémiologiques et de laboratoires ont démontré que MSP1 est une cible d'immunités protectrices. Il a été démontré que la présence d'anticorps contre MSP1₁₉ est associée à la protection contre le paludisme clinique à *P.falciparum* [42]. Les séquences de gènes *MSP1* obtenus de différents sites ont montré un polymorphisme suggérant que la molécule est sous une intense pression immune [67]. Des études *in vitro* ont montré que les anticorps monoclonaux et polyclonaux spécifiques au fragment de 19 ou 42 kDa bloquent la pénétration des mérozoïtes dans les hématies [19].

Plus récemment plusieurs équipes ont démontré que l'immunisation par MSP1₁₉ recombinant exprimée par *E. coli* en fusion avec le glutathionne s-transférase induisait une protection contre les parasites de *P. yoelii* [94]. Le mécanisme précis de l'immunité induite par le vaccin MSP1₁₉ n'est pas clair. Par ailleurs les données disponibles suggèrent que la protection immune est réalisée par les anticorps, et dépendante du locus H-2 de la souris [54]. Les études effectuées au Mali ont montré un polymorphisme de MSP-1 qui peut compromettre l'efficacité d'un vaccin à base de cet antigène [90].

□

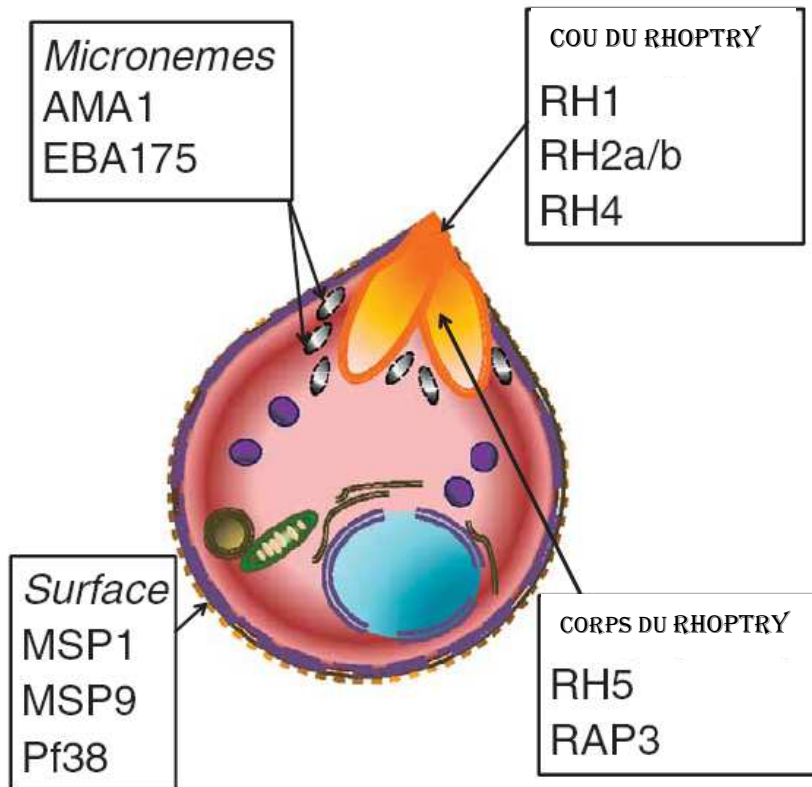


Figure 7: Localisation de quelques antigènes de mérozoites cibles de la réponse immunitaires. *Source:* Parasitology Today, vol.16, no.10, 2000

7. Aperçu sur les vaccins antipaludiques

Le vaccin est un outil efficient en santé publique pour le contrôle du paludisme mais toutes les tentatives n'ont pas permis d'avoir à ce jour un vaccin disponible. Cependant des progrès importants ont été accomplis : un certain nombre de candidats vaccins antipaludiques ont fait l'objet d'essais de phases I, II et III.

7.1. Vaccins de stade pré-érythrocytaire

Les vaccins du stade hépatique sont conçus pour prévenir l'infection de l'homme par la forme métacyclique infectante du *Plasmodium* ; les sporozoïtes. Ce type de vaccin doit être efficace à 100% pour assurer la protection contre l'accès palustre car du fait de la forte répllication des sporozoïtes, il est possible que certains échappent à l'immunité et pénètrent dans les hépatocytes. Cela peut conduire à une invasion des érythrocytes.

Ces vaccins sont ceux constitués de sporozoïtes entières tués et ceux constitués d'une partie antigénique de la protéine circumsporozoïte [71]. Le RTS, S est le plus avancé des vaccins du stade hépatique. Il est constitué de la protéine circumsporozoïte de *P. falciparum* (RTS) fusionnée avec l'antigène de surface du virus de l'hépatite B (S). RTS est un polypeptide constitué de 188 acides aminés, allant d'aa 207-395 du gène CS de la souche 3D7 de *P. falciparum*. S est un polypeptide de 226 acides aminés. Les résultats d'essai de phase II en Afrique indiquaient que ce candidat vaccin conférait une protection de 30-50% et présentait une bonne tolérance [53]. La protection obtenue est cependant de courte durée. Le RTS,S peut réduire les manifestations cliniques du paludisme par une réduction temporaire du nombre de mérozoïtes issus du foie. Plusieurs formulations de la CS ont été évaluées sans succès notamment celles utilisant les vecteurs viraux [28].

La protéine transversale de l'ookinète et du sporozoïtes (CelTos) a été récemment identifiée comme essentielle au parasite aussi bien chez le mammifère que chez l'insecte. Le CelTos est un candidat vaccin potentiel du stade pré-érythrocytaire dans le model murin. Il a expérimentalement induit une protection complètement stérilisante contre les sporozoïtes. D'autres antigènes comme la TRAP (Thrombospondin Related Adhesion Protein) et le LSA (Liver Stage Antigen) sont en cours d'évaluation chez l'homme. Parmi tous les candidats vaccins pré-érythrocytaires, le vaccin constitué de parasites génétiquement atténués, bloquant le cycle au stade hépatique tardif semble le meilleur choix [21].

7.2. Vaccins du stade érythrocytaire

Ce sont des vaccins conçus pour éviter l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes ou inhiber leur développement intraérythrocytaire et prévenir l'apparition des signes cliniques [5]. De nos jours certains vaccins du stade sanguin ont fait l'objet plusieurs essais cliniques. Ce sont le "Apical Membran Antigen 1"(AMA-1), le "Erythrocyte Binding Antigen-175" (EBA-175), "Glutamate Rich Protein"(GLURP), le "Merozoite Surface Antigen-1"(MSP-1), MSP-2, MSP-3 et le "Serine Repeat Antigen-5" (SERA-5). Ils sont hautement exprimés à la surface des mérozoïtes. Compte tenu de leur polymorphisme AMA-1 et MSP-1 n'ont pas fait preuve d'efficacité en Afrique. Pour accroître l'efficacité de ces vaccins, des stratégies comme l'utilisation de nouvel adjuvant, de vecteur viral ou la combinaison d'AMA-1 et de MSP-1 sont en cours d'investigation. En théorie il est possible de développer un vaccin qui pourrait protéger les enfants contre les accès palustres. La diversité génétique du parasite, la pression sélective de l'immunité de l'hôte sont des facteurs à prendre en compte pour le développement effectif de vaccins contre le stade sanguins [5].

7.3. Vaccins bloquant la transmission

Ces vaccins ont pour cible les gamètes, le zygote et l'ookinète pour prévenir le développement du parasite dans le tube digestif du moustique. Le but de ce genre de vaccin est de produire des anticorps contre les formes sexuées afin d'empêcher leur évolution en sporozoïtes dans la glande salivaire du moustique [18]. Ces vaccins ne préviennent pas l'infection par le *Plasmodium*, mais permettent de diminuer la charge de la maladie. Ils visent à protéger toute une communauté entière. Le pionnier des candidats vaccins de ce genre contient des antigènes de surface des ookinètes; Pfs25 et Pfs28 ou Pvs25 et Pvs28 de *P. vivax*. Ce type de vaccin serait un outil important pour l'élimination du paludisme [5].

IV. Matériels et méthodes

1. Lieu d'étude

L'étude s'est déroulée dans la ville de Bandiagara, chef lieu de cercle du même nom située sur le plateau Dogon dans la région de Mopti. Elle s'étend de l'isohyète 200 mm à l'isohyète 700 mm. La ville est traversée par un affluent du fleuve Niger : le "Yamé" qui constitue un gîte pour le développement des anophèles pendant une bonne partie de l'année. La végétation est de type sahélien sur un plateau rocailleux. Elle est dominée par des essences épineuses telles que *Balanites egyptiaca*, *Acacia pycnantha*, *Tamarindus indica*, *Lanea* etc.

Le climat est caractérisé par une courte saison de pluie allant de juillet à octobre avec une pluviométrie variant entre 400 et 700 mm d'eau par an et une saison sèche plus longue de novembre à juin. Le relief est dominé par une longue chaîne de montagne de grès.

L'activité économique est essentiellement agropastorale et le tourisme est également assez développé.

La ville de Bandiagara compte environ 15000 habitants. La population est composée majoritairement de Dogons (environ 65%), suivis dans l'ordre décroissant des Peuhls, Mossis, Bozos, Bambaras, Sonrhaïs, Sénoufos. Cette population est majoritairement jeune avec 57% de personnes âgées de moins de 20 ans. La transmission du paludisme est saisonnière et couvre toute la saison des pluies.

La ville dispose de trois groupes scolaires et d'un lycée. Par ailleurs plusieurs Organisations non gouvernementales et projets de développement communautaire y sont présents. En plus du centre de santé de référence, il existe un Centre Régional de Recherche en Médecine Traditionnelle (CRMT), un centre de santé communautaire et des cabinets de soins privés. Le site du BMP est situé dans le Centre de Santé de Référence.

La ville de Bandiagara est depuis 1993, le site d'études épidémiologiques et entomologiques du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires (DEAP)

Analyse de la réponse anticorps naturelle contre trois antigènes de *P. falciparum* chez les enfants de 1 à 5 ans vivant à Bandiagara ; Mali

de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie de l'Université de Bamako. Le paludisme y est méso-endémique et transmis de façon intensive pendant une durée de 6 mois (Juillet – Décembre). *P. falciparum* représente environ 97% de la formule parasitaire avec 3% de *P. malariae*[4] L'incidence du paludisme clinique est élevée avec près de 2 épisodes d'accès palustre par personne année chez les enfants. Des études réalisées depuis 1999 ont montré que 85% des enfants de moins de 10 ans faisaient au moins un accès de paludisme durant une saison de transmission, en moyenne 2,11 épisodes de paludisme par enfant et par saison de transmission. Depuis l'année 2003 Bandiagara est devenu un site d'essais cliniques de vaccins antipaludiques du MRTC/DEAP en partenariat avec l'Université de Maryland avec l'appui financier et technique des Instituts Nationaux de la Santé des USA (NIH). De 2003 à nos jours 5 essais vaccinaux contre le paludisme ont été effectués à Bandiagara notamment 3 essais adultes de phase 1 et deux essais pédiatriques de phase 1 et de phase 2. Les essais adultes ont concerné les antigènes candidats vaccins MSP-1₁₉ (Merozoite Surface Protein1-19kDa) et AMA-1 (Apical Membrane Antigène-1) des souches 3D7 et FVO. Les essais pédiatriques ont porté uniquement sur AMA-1

3D

Analyse de la réponse anticorps naturelle contre trois antigènes de *P. falciparum* chez les enfants de 1 à 5 ans vivant à Bandiagara ; Mali

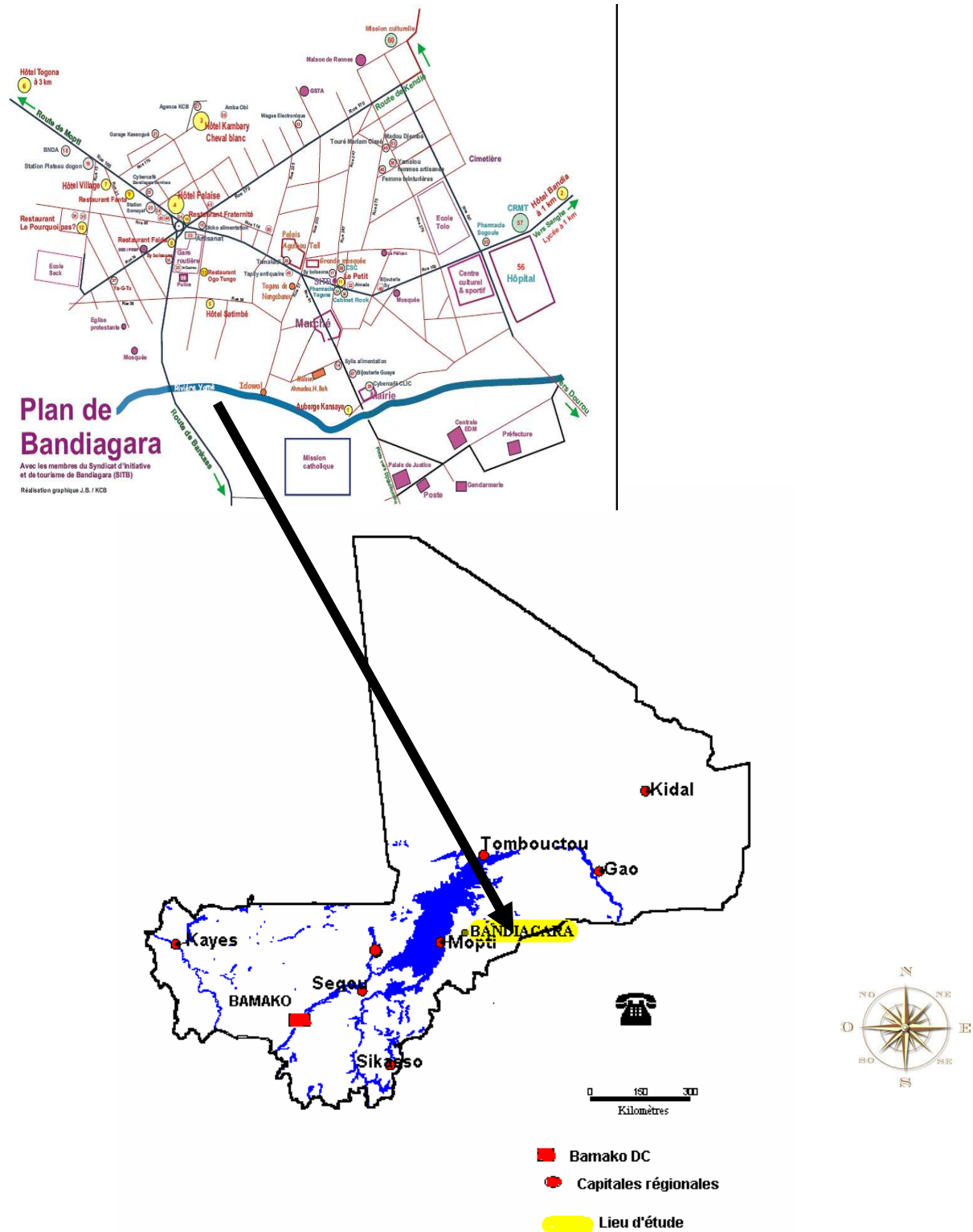


Figure 8 : Situation géographique de Bandiagara

2. Type et période d'étude

C'était une étude prospective de cohorte fermée effectuée de Mai 2008 à Avril 2009 avec 4 passages transversaux.

3. Population d'étude

L'étude a porté sur les enfants âgés de 1 à 5 ans vivant dans la ville de Bandiagara. Une cohorte de 211 enfants a été constituée et suivi pendant une année.

4. Echantillonnage

Le calcul de la taille de l'échantillon était basé sur l'estimation de l'incidence des accès palustres qui était de 2,11 par enfant/an selon les données d'études antérieures. La taille de l'échantillon a été estimée de façon à permettre de détecter une augmentation de 20% de taux d'incidence. Pour une puissance de 90% et un niveau de signification de 5% le nombre d'enfant nécessaire pour la cohorte est de 150 enfants de moins de 5 ans. En ajoutant 10% de perdus de vue alors 167 enfants de moins de 5 ans étaient nécessaires à l'étude. Le logiciel PASS 2008 (NCSS, LLC, Kaysville, Utah) a été utilisé pour le calcul de la taille de l'échantillon.

4.1. Critères d'inclusion

- Avoir obtenu le consentement écrit et signé des parents ou tuteurs des enfants avant le début de l'étude.
- Résider le site de l'étude et être disponible à participer au suivi pendant 12 mois.
- Etre disposé à fournir les informations demandées et les échantillons biologiques.
- Etre capable de respecter les visites cliniques.
- Etre âgé de 1 à 5 ans révolus à la date d'inclusion.

4.2. Critères de non inclusion

- Présenter un état physique altéré.
- Présenter des signes de malnutrition.
- Avoir participé à un essai vaccinal antipaludique
- Etre dans des conditions suspectes ou confirmées de déficit immunitaire, incluant l'infection par le VIH.

5. Variables mesurées

- Age en année
- Sexe : masculin ou féminin
- Taux d'IgG spécifique d'AMA-1, MSP-1 et GLURP-R2 en unité arbitraire
- Taux d'IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 spécifique d'AMA-1, MSP-1 et GLURP-R2 en unité arbitraire
- Taux d'IgM spécifique d'AMA-1, MSP-1 et GLURP-R2 en unité arbitraire

6. Méthodes d'étude

6.1. Dépistage clinique du paludisme et suivi

Les cas de paludisme ont été dépistés de façon passive et active. Le dépistage actif était effectué pendant les passages transversaux. Un examen clinique et une goutte épaisse et frottis mince étaient réalisés chez chaque enfant au cours de ces passages. Le dépistage passif consistait à l'examen de tout enfant de la cohorte venant pour une visite irrégulière au centre de santé de référence pendant la durée de l'étude. Les parents des enfants et les guides étaient sensibilisés pour emmener tout enfant présentant des signes de maladie à l'équipe du BMP/MRTC. L'enfant était ainsi examiné, une goutte épaisse et un frottis mince étaient effectués en cas de fièvre. Chaque enfant atteint d'accès simple ou compliqué était suivi pendant 14 jours. Des gouttes épaisses étaient effectuées à J3, J7 et J14. Toute goutte positive avant J28

chez un enfant ayant fait un accès palustre était considéré comme un échec thérapeutique. Par contre toute survenue de cas de paludisme après 28 jours était considérée comme un nouvel épisode.

6.2. Définition des cas de paludisme

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

Le paludisme grave était défini selon les critères de gravités de l'OMS : présence de formes asexuées de *P. falciparum* à l'examen microscopique du sang périphérique, associée à une ou plusieurs des manifestations suivantes :

- Neuropaludisme (Coma de stade II ou plus)
- Crises convulsives (> 1 / 24 h)
- Anémie grave (Hématocrite < 15 % et Hb < 5 g /dl),
- Insuffisance rénale (diurèse < 400ml ou créatinine > 265 μ mol /l),
- Œdème pulmonaire,
- Hypoglycémie (< 2,2 mmol/l ou 0,4g/l),
- Collapsus circulatoire,
- Hémorragie diffuse,
- Hémoglobinurie massive,
- Acidose sanguine.

Il existe d'autres signes contingents qui ne suffisent cependant pas à elles seules à définir l'accès grave :

- Obnubilation ou prostration moins marquée que le coma stade II,
- Parasitémie élevée (>5% chez les sujets non immuns),
- Ictère (clinique ou bilirubine >50 μ mol/l ou >30 mg/l),
- Hyperthermie ($\geq 41^\circ$) ou une hypothermie ($\leq 36^\circ$).

6.3. Diagnostic biologique du paludisme

6.3.1. La technique de la goutte épaisse (GE)

Principe : C'est une technique de micro concentration sur lame La goutte épaisse consiste à réaliser un étalement épais de sang circonscrit dans un cercle d'environ un centimètre de diamètre sur une lame porte-objet dégraissée. L'examen au microscope optique à l'objectif 100 en immersion de l'étalement coloré au Giemsa permet de mettre en évidence la présence des *Plasmodies*.

Mode opératoire (voir Mode opératoire en annexe)

6.3.2. Le Frottis mince (FM)

Principe : Il consiste à prélever une goutte de sang au bout du 3^{ème} ou 4^{ème} doigt que l'on étale en couche fine sur une lame porte-objet et que l'on examine après fixation au méthanol puis coloration au Giemsa à 3%.

Mode opératoire (voir Mode opératoire en annexe)

6.4. Dosage des anticorps spécifiques des antigènes du *P. falciparum* : Enzyme Linked Immune-Sorbant Assay (ELISA).

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

Mode opératoire : chaque isotype et sous classe d'IgG a été dosé en se basant sur un mode opératoire spécifique (voire Mode opératoire en annexe)

7. Saisie et analyse des données

Les données ont été collectées sur des cahiers d'observation individuels et ont fait l'objet d'un contrôle de qualité. Elles ont ensuite été saisies et analysées avec le

logiciel Stata (version 10). Nous avons utilisé le test de Chi carré ou le test de probabilité exact de Fisher pour la recherche de liens entre les variables avec un seuil de signification à 5%. La méthode de Kaplan-Meier a été utilisée pour la courbe de survie. Dans l'évaluation de l'incidence tout traitement d'un enfant par une combinaison thérapeutique conduisait à un retrait de 28 jours dans son temps de survie.

8. Considération éthique

Le protocole a été approuvé par le comité d'éthique de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie (Lettre N°08-17FMPOS). Les règles de bonnes pratiques cliniques et de laboratoire ont été rigoureusement suivies. La participation à l'étude était volontaire. Les participants étaient libres d'arrêter à tout moment leur participation à l'étude sans conséquence pour eux. Tous les cas de paludisme ont été traités selon les recommandations du Programme National de Lutte contre le Paludisme(PNLP).

V. RESULTATS

V.1. Données socio-démographiques

Tableau I: Répartition des enfants de la cohorte selon le sexe

Sexe	Fréquence	%
Masculin	100	47,4
Féminin	111	52,6
Total	211	100

Les enfants de sexe féminin étaient majoritaires. Le sex-ratio ($\frac{M}{F}$) était de 0,9

Tableau II: Répartition des enfants de la cohorte selon les classes d'âge.

Classes d'âge	Fréquence	%
1<3ans	103	48,8
3-5ans	108	51,2
Total	211	100

Les enfants de 3-5ans représentaient 51,2% et ceux de 1-3 ans étaient de 48,8%.

V.2 Données parasitologiques

Tableau III : Incidence du paludisme clinique au cours du suivi longitudinal chez les enfants de l'étude en 2008-2009.

Accès palustres	139
Incidence	0,69
Durée total en jours de suivi	73123
Nombre enfants suivis	211

L'incidence du paludisme à Bandiagara était de 0,69 épisode par enfant par an.

Tableau IV : Répartition du nombre d'accès palustre par classe d'âge chez les enfants de l'étude à Bandiagara au cours de la saison 2008-2009

Nombre d'épisodes	Classe d'âge				Total
	1<3 ans		3-5 ans		
	N	%	N	%	
1	50	74,6	17	25,4	67
2	12	57,1	9	42,9	21
3	5	83,3	1	16,7	6
4	1	33,3	2	66,7	3
Total	68	66,9	29	33,1	97

Analyse de la réponse anticorps naturelle contre trois antigènes de *P. falciparum* chez les enfants de 1 à 5 ans vivant à Bandiagara ; Mali

Au total 139 accès palustres ont été enregistrés dans l'échantillon au cours de la période d'étude. La plupart des enfants (31,8%) ont fait un seul accès palustre et 10% ont fait 2 accès. Le nombre maximum d'accès chez un enfant était de 4 et cela a été observé chez 3 enfants soit 1,4%. Par contre 2 enfants parmi les 3 qui ont fait 4 accès étaient âgés de 3-5 ans. Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les enfants de 1<3 ans et ceux de 3-5 ans quant à la répartition du nombre d'accès palustre ($p = 0,5$).

Tableau V : Portage de gamétocytes chez les enfants de la cohorte en début de saison de transmission en 2008.

Gamétocytes	Tranche d' age		Total
	1<3 ans	3-5ans	
Positif	0	3	3
Négatif	103	105	208
Total	103	108	211

L'indice gamétocytaire était de 1,4%. Les trois cas de portage de gamétocytes ont été observés chez les enfants de 3-5 ans. (test de probabilité exact de Fischer $p=0.247$)

V.3. Données immunologiques

Tableau VI : Moyenne géométrique des taux naturels d'anticorps spécifiques d'AMA-1 fvo selon le groupe d'âge chez les enfants de Bandiagara pendant la saison de transmission 2008.

Groupes d'âge	IgG	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM
1<3 ans	1802* (101)**	1857* (97)**	12* (90)**	4* (96)**	4* (100)**	809* (103)**
3-5 ans	4761* (104)**	4876* (104)**	22* (101)**	7* (93)**	6* (103)**	1298* (107)**
p	0,0001	0,0004	0,0015	0,0675	0,0108	0,0039

*Unité arbitraire ** Effectifs

Les taux d'IgG, d'IgG1 et d'IgM étaient plus élevés que ceux des IgG2, IgG3 et IgG4. Ces derniers sous classes d'IgG étaient presque non détectables chez les 2 groupes d'enfants. Les moyennes des taux d'anticorps spécifiques d'AMA1-fvo (d'IgG, d'IgG1 et d'IgM) étaient significativement plus élevées chez les enfants de 3-5 ans que chez les enfants de moins de 3 ans (respectivement $p=0,0001$; $p=0,0004$; $p=0,0039$). Les taux d'IgG1 anti-AMA-1 Fvo étaient plus élevés que ceux des autres anticorps dans les deux groupes d'âge. L'index cytophilique était de 101 chez les enfants de moins de 3 ans et de 129 chez ceux de 3-5 ans. La différence de cet index n'était pas statistiquement significative entre les 2 groupes ($p=0.3227$)

Tableau VII : Moyenne géométrique des taux naturels d'anticorps spécifiques de MSP-1hyb selon le groupe d'âge chez les enfants de Bandiagara pendant la saison de transmission 2008.

Groupes d'âge	IgG	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM
1<3ans	1484* (97)**	21* (87)**	12* (91)**	17* (93)**	1* (102)**	317* (103)**
3-5ans	1860* (98)**	17* (77)**	21* (102)**	18* (96)**	1* (97)**	543* (108)**
p	0.3227	0.4284	0.0010	0.7780	0.7610	0,0008

*Unité arbitraire ** Effectifs

Les IgG et IgM spécifiques de MSP-1 hyb étaient les seuls anticorps mesurables chez les enfants de la cohorte. Ces taux étaient globalement faibles chez les enfants de la cohorte. Seule la moyenne d'IgM spécifique de MSP1hyb était statistiquement plus élevée chez les enfants de 3-5 ans par rapport à ceux de moins de 3 ans. L'index cytophilique était de 4 chez les de moins de 3 ans et de 1,9 chez ceux de 3 à 5 ans. La différence était significative ($p=0.0017$)

Tableau VIII: Moyenne géométrique des taux naturels d'anticorps spécifiques de GLURP-R2 selon le groupe d'âge chez les enfants de Bandiagara pendant la saison de transmission 2008.

Groupes d'âge	IgG	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM
1<3ans	212* (96)**	139* (85)**	56* (93)**	27* (97)**	7* (98)**	5212* (101)**
3-5ans	324* (102)**	164* (91)**	107* (96)**	29* (98)**	7* (102)**	8878* (107)**
p	0.0080	0.3449	0.0002	0.7932	0.9176	0.0001

*Unité arbitraire ** Effectifs

Les taux d'IgG et des sous classes d'IgG spécifiques de GLURP-R2 étaient faibles chez les enfants de la cohorte. Les IgG4 n'étaient presque pas mesurables chez les enfants. Les taux d'IgM étaient généralement élevés comparés aux IgG. Les moyennes des IgM spécifiques de GLURP-R2 étaient statistiquement plus élevées chez les enfants de 3-5 ans que chez les enfants de moins de 1-3ans ($p < 0,0001$). Il n'y avait de différence statistiquement significative entre les taux d'IgG1 et d'IgG3 entre les deux classes d'âge ($p = 0.3449$ et $p = 0.7932$)

L'indice cytophilique était de 2,5 chez les enfants de moins de 3 ans et de 1,8 pour ceux de 3-5 ans ($p = 0.1894$)

Tableau IX : Moyennes géométriques des taux d'anticorps spécifique de l'antigène AMA-1 Fvo selon le portage du *Plasmodium* Chez les enfants de 1 à 5 ans de Bandiagara en 2008.

Anticorps	Infection par <i>P. falciparum</i>						<i>p</i>
	Positif			Négatif			
	N	Moyenne	95%IC	N	Moyenne	IC (95%)	
IgG	19	25553	9031-72303	186	2366	1882-2973	0,00001
IgG1	19	29001	9090 -92518	182	2419	1876 -3119	0,00001
IgG2	17	71	33-153	174	13	11-16	0,00001
IgG3	20	76	20-280	169	3	2-4	0,00001
IgM	20	795	403-1568	190	1057	894-1249	0,3

La moyenne d'IgG totaux chez les enfants portant des parasites à l'inclusion était significativement supérieure à celle des enfants non porteurs de parasite ($p < 0,0001$) par contre la différence des moyennes d'IgM entre les enfants porteurs de *Plasmodium* et ceux non porteurs n'était pas significative ($p=0,3$). Les moyennes des sous-classes d'anticorps cytophiliques: IgG1 et IgG3 étaient significativement plus élevées chez les enfants portant des parasites à l'inclusion ($p=0,00001$). La moyenne d'IgG2 était significativement plus élevée chez les enfants portant des parasites à l'inclusion ($p=0,0001$) que chez les enfants non parasités.

Tableau X : Moyennes géométriques des taux d'anticorps spécifiques de l'antigène MSP1 selon le portage du *Plasmodium* chez les enfants de 1 à 5 ans de Bandiagara.

Anticorps	N	Infection par <i>P. falciparum</i>		N	Négatif		p
		Positif	95%IC		Moyenne	IC(95%)	
IgG	18	3109	1876-5154	177	1559	1290-1885	0,02
IgG1	19	405	231-709	157	133	112-159	0.0001
IgG2	18	17	10-27	175	15	13-19	0,7
IgG3	16	59	16 -220	173	15	13-18	0,0001
IgM	20	354	198-633	188	423	357-500	0,5

La moyenne d'IgG totaux chez les enfants portant des parasites à l'inclusion était significativement supérieure à celle des enfants ne portant pas de parasites ($p=0,02$). Par contre la différence entre les deux groupes quant aux moyennes d'IgM n'était pas significative ($p=0,5$). Les moyennes des taux d'IgG cytophiliques (IgG1 et IgG3) étaient plus élevées chez les enfants portant des parasites que chez ceux ne portant pas de parasites ($p=0,0001$). Par contre la moyenne des taux d'IgG2 était comparable chez les deux groupes d'enfants ($p=0,7$).

Tableau XI : Moyennes géométriques des taux d'anticorps spécifiques de l'antigène GLURP-R2 selon le portage du *Plasmodium* chez les enfants de 1 à 5 ans de Bandiagara en 2008.

Anticorps	Infection par <i>P. falciparum</i>						p
	Positif			Négatif			
	N	Moyenne	IC	N	Moyenne	IC	
IgG	20	802	413-1559	178	232	199 -270	0,0001
IgG1	19	405	231-709	157	133	112-159	0,0001
IgG2	20	136	64-291	169	72	60-86	0,9
IgG3	20	229	81-642	175	21	18-26	0,0001
IgM	20	7182	4988-10341	188	6821	6164-7547	0,7

La moyenne d'IgG totaux chez les enfants portant des parasites à l'inclusion était significativement plus élevée que chez ceux ne portant pas de *Plasmodium* ($p=0,00001 < 10^{-3}$.) Par contre la différence des moyennes d'IgM entre les groupes d'enfants n'était pas significative ($p=0,7$). Les moyennes des taux d'anticorps cytophiliques (IgG1 et IgG3) étaient significativement plus élevées chez les enfants portant des parasites à l'inclusion que chez ceux ne les portant pas ($p=0,0001$). Les différences des moyennes de taux d'anticorps non cytophiliques (IgG2) entre les deux groupes n'étaient pas significatives ($p=0,9$).

V.3. Analyses de la réponse anticorps et accès palustres

Tableau XII: Séropositivité en anticorps IgG spécifiques de l'antigène AMA-1 selon le portage du *Plasmodium* chez les enfants de 1 à 5 ans de Bandiagara en 2008.

Infection palustre	IgG anti-AMA-1Fvo		
	Positif N (%)	Négatif N (%)	Total
Positive	17 (85)	3(15)	20(100)
Négative	78(40,8)	113(59,2)	191(100)
Total	95(45)	116(55)	211(100)

$$\chi^2=14,2 \quad p=0,0001$$

Dans la cohorte, au total 45% des enfants étaient séropositifs en anticorps IgG anti-AMA-1 spécifiques contre 55% qui n'avait ni parasites ni anticorps IgG. Parmi ceux qui portaient des parasites, 85% étaient positifs aux anticorps IgG AMA-1 spécifiques. Environ 40% des enfants ne portant pas de parasite étaient positifs aux IgG spécifiques et 60% de ces enfants n'avaient pas d'anticorps IgG AMA-1 spécifiques. (p=0,0001)

Tableaux XIII : Séropositivité en anticorps IgM spécifiques de l'antigène AMA-1 selon le portage du *Plasmodium* chez les enfants de 1 à 5 ans de Bandiagara en 2008

Infection palustre	IgM anti-AMA-1Fvo		
	Positif N (%)	Négatif N (%)	Total
Positive	4(20)	16(80)	20(100)
Négative	51(26,8)	139(73,2)	190(100)
Total	55(26,2)	155(73,8)	210(100)

$\chi^2=0,4$ $p=0,5$

Dans la cohorte, au total 26,2% étaient séropositifs en IgM anti-AMA-1 spécifiques contre 73,8% qui n'avait ni parasites ni anticorps IgM. Parmi ceux qui portaient des parasites, 20% étaient positifs aux anticorps IgM AMA-1 spécifiques contre 80% d'entre eux qui n'avaient pas d'anticorps. Environ 27% des enfants ne portant pas de parasite étaient positifs aux IgG spécifiques et 73% de ces enfants n'avaient pas d'anticorps IgG AMA-1 spécifiques. ($p=0,5$)

Tableaux XIV : Séropositivité en anticorps IgG spécifiques de l'antigène MSP1 hyb selon le portage du *Plasmodium* chez les enfants de 1 à 5 ans de Bandiagara en 2008.

Infection palustre	IgG anti-MSP1 hyb		
	Positif N (%)	Négatif N (%)	Total
Positive	3(16,6)	15(83,4)	18(100)
Négative	10(5,6)	167 (94,4)	177(100)
Total	13(6,7)	182(93,3)	193(100)

$$\chi^2 = 3,9 \quad p = 0,07$$

Dans la cohorte, au total 6,7% des enfants étaient en anticorps IgG anti-MSP1 hyb spécifiques contre 93,3% qui n'avait ni parasites ni anticorps IgG. Parmi ceux qui portaient des parasites, 16,6% étaient positifs aux anticorps anti-MSP1 hyb spécifiques contre 83,4% d'entre eux qui n'avaient pas d'anticorps. Environ 5,6% des enfants ne portant pas de parasite étaient positifs aux IgG spécifiques et 94,4% de ces enfants n'avaient pas d'anticorps IgG anti- MSP1 hyb spécifiques. ($p=0,07$)

Tableaux XV : Séropositivité en anticorps IgM spécifiques de l'antigène MSP1 hyb selon le portage du *Plasmodium* chez les enfants de 1 à 5 ans de Bandiagara en 2008.

Infection palustre	IgM anti-MSP1 hyb		
	Positif N (%)	Négatif N (%)	Total
Positive	2(10)	18(90)	20(100)
Négative	21(11,1)	167(88,9)	188(100)
Total	23(11,0)	185(89)	208(100)

$$\chi^2 = 0,02 \quad p = 0,8$$

Dans la cohorte, au total 11% des enfants étaient séropositifs en anticorps IgM anti-MSP1 hyb spécifiques contre 89% qui n'avait ni parasites ni anticorps IgM. Parmi ceux qui portaient des parasites, 10% étaient positifs aux anticorps IgM anti-MSP1 hyb spécifiques contre 90% d'entre eux qui n'avaient pas d'anticorps. Environ 11,1% des enfants ne portant pas de parasite étaient positifs aux IgG spécifiques et 88,9% de ces enfants n'avaient pas d'anticorps IgG anti-MSP1 hyb spécifiques ($p=0,8$).

Tableaux XVI : Séropositivité en anticorps IgG spécifiques de l'antigène GLURP-R2 selon le portage du *Plasmodium* chez les enfants de 1 à 5 ans de Bandiagara en 2008.

Infection palustre	IgG anti-GLURP-R2		
	Positif N (%)	Négatif N (%)	Total
Positive	12(60)	8(40)	20(100)
Négative	30(16,8)	148(83,2)	178(100)
Total	42(21,2)	156(78,8)	198(100)

$$\chi^2 = 20,02 \quad p < 0,001$$

Dans la cohorte, au total 21,2% des enfants étaient séropositifs en anticorps IgG anti-GLURP-R2 spécifiques contre 78,8% qui n'avait ni parasites ni anticorps IgG. Parmi ceux qui portaient des parasites, 60% étaient positifs aux anticorps IgG anti-GLURP-R2 spécifiques contre 40% d'entre eux qui n'avaient pas d'anticorps. Environ 16,8% des enfants ne portant pas de parasite étaient positifs aux IgG spécifiques et 83,2% de ces enfants n'avaient pas d'anticorps IgG anti-GLURP-R2 spécifiques.

Tableaux XVII : Séropositivité en anticorps IgM spécifiques de l'antigène GLURP-R2 selon le portage du *Plasmodium* chez les enfants de 1 à 5 ans de Bandiagara en 2008

Infection palustre	IgM anti-GLURP-R2		
	Positif N (%)	Négatif N (%)	Total
Positive	10(50)	10(50)	20(100)
Négative	99(52,6)	89(47,4)	188(100)
Total	109(52,4)	99(47,6)	208(100)

$$\chi^2 = 0,05 \quad p = 0,8$$

Dans la cohorte, au total % 52,4 enfants étaient séropositifs en anticorps IgM anti-GLURP-R2 spécifiques contre 47,6% qui n'avait ni parasites ni anticorps IgM. Parmi ceux qui portaient des parasites, 50% étaient positifs aux anticorps IgM anti-GLURP-R2 spécifiques contre 50% d'entre eux qui n'avaient pas d'anticorps. Environ 52,4% des enfants ne portant pas de parasite étaient positifs aux IgG spécifiques et 47,6% de ces enfants n'avaient pas d'anticorps IgG anti-MSP1 hyb spécifiques. ($p=0,8$)

V.4. Courbes de survie

1. Temps de survenue du premier épisode de paludisme

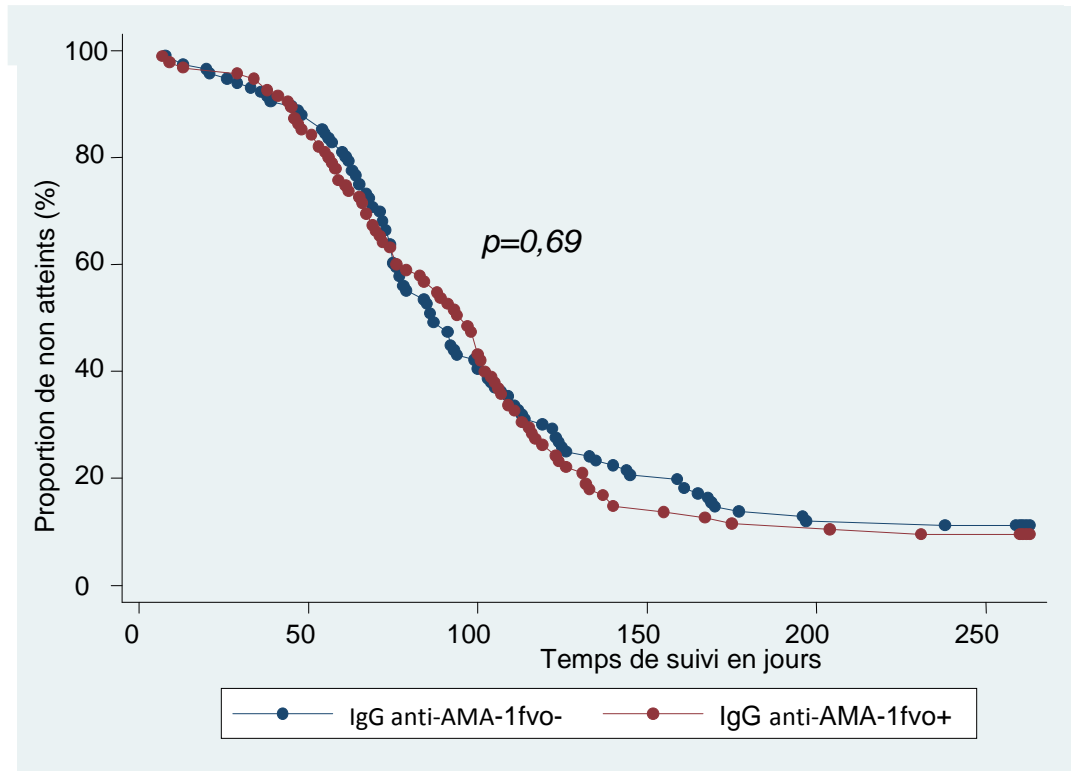


Figure 9: Courbe de survie en fonction de la séropositivité en IgG anti-AMA-1fvo chez les enfants de la cohorte à Bandiagara en 2008. En bleu la courbe pour les enfants n'ayant pas d'IgG spécifiques d'AMA-1Fvo et en rouge la courbe des enfants séropositifs en IgG spécifiques d'AMA-1Fvo.

Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les porteurs et les non porteurs d'IgG spécifiques d'AMA-1 quant au nombre d'épisode de paludisme survenus.

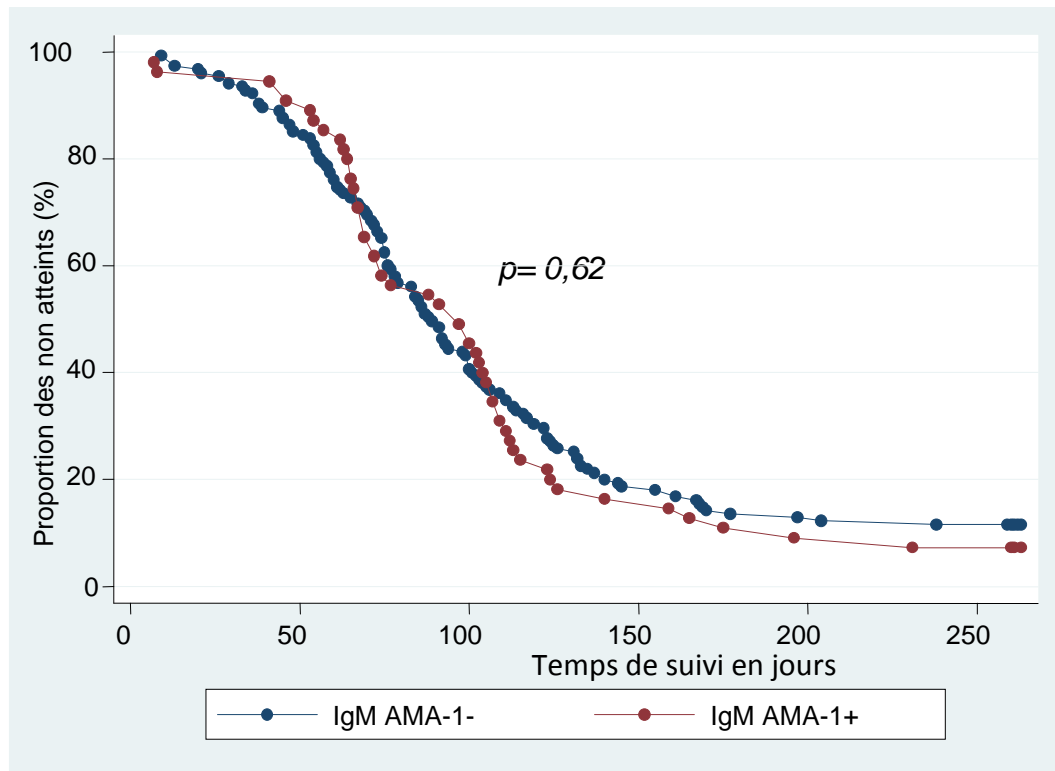


Figure 10 : Courbe de survie en fonction de la séropositivité en IgM AMA-1fvo chez les enfants de la cohorte à Bandiagara en 2008. En bleu la courbe pour les enfants n'ayant pas d'IgM spécifiques d'AMA-1Fvo et en rouge la courbe des enfants séropositifs en IgM spécifiques d'AMA-1Fvo.

Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les porteurs et les non porteurs d'IgM spécifiques d'AMA-1 quant au nombre d'épisodes de paludisme survenus.

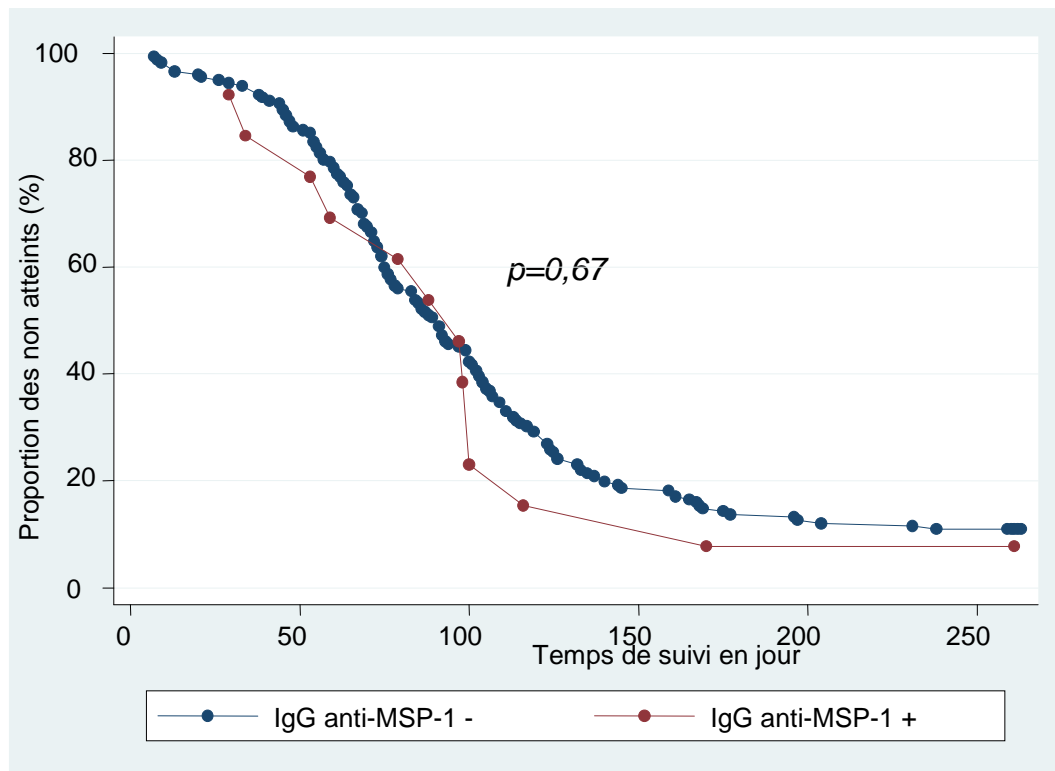
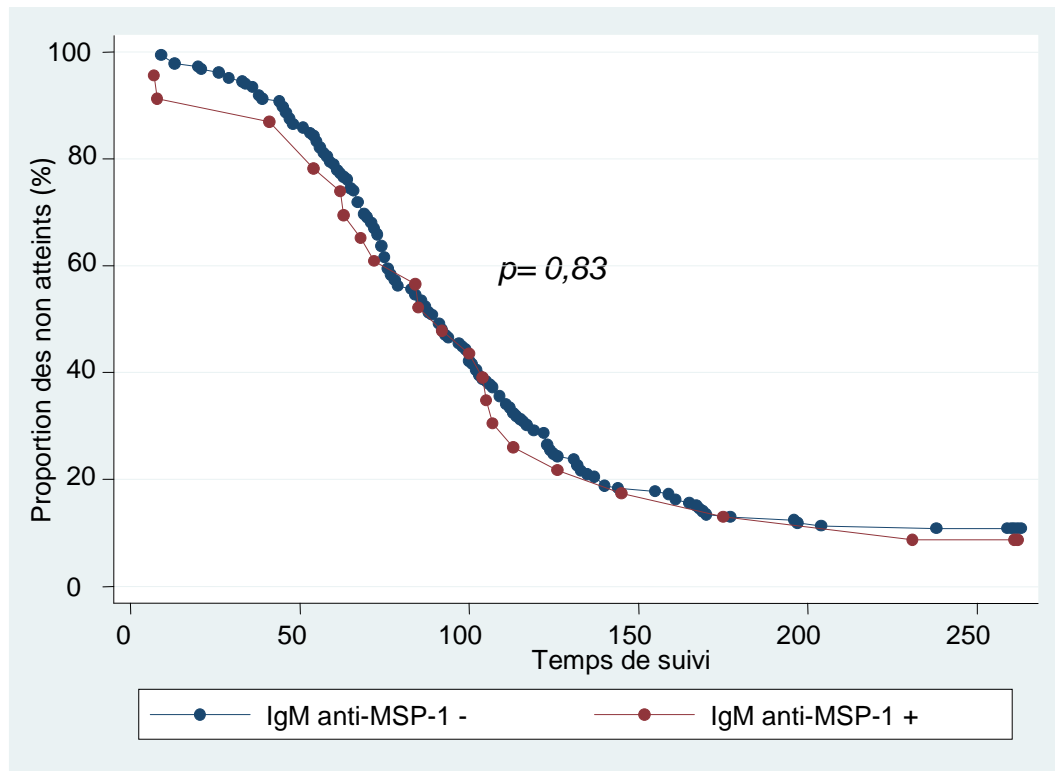


Figure 11: Courbe de survie en fonction de la séropositivité en IgG anti-MSP-1 hyb chez les enfants de la cohorte à Bandiagara en 2008. En bleu la courbe pour les enfants n'ayant pas d'IgG spécifiques MSP-1 hybet en rouge la courbe des enfants séropositifs en IgG spécifiques de MSP-1 hyb

Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les porteurs et les non porteurs d'IgG spécifiques de MSP-1 hyb quant au nombre d'épisode de paludisme survenus.



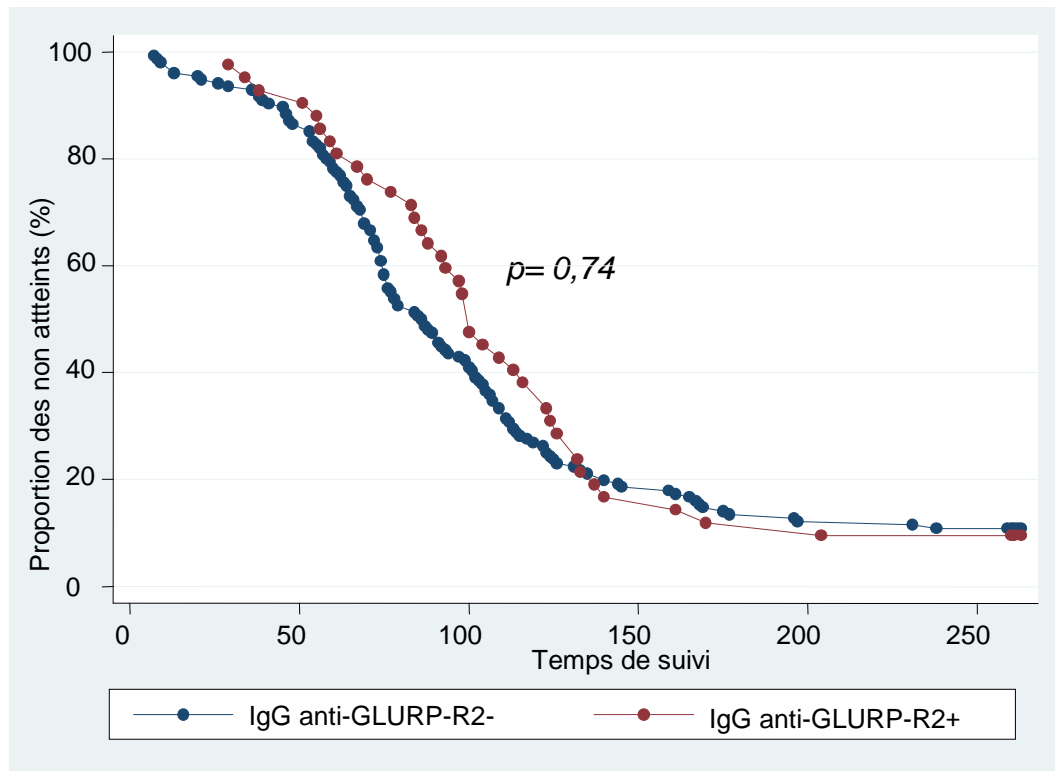


Figure 13 : Courbe de survie en fonction de la séropositivité en IgM MSP-1 hyb chez les enfants de la cohorte à Bandiagara en 2008. En bleu la courbe pour les enfants n'ayant pas d'IgG spécifiques de GLURP-R2 et en rouge la courbe des enfants séropositifs en IgG spécifiques de GLURP-R2.

Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les porteurs et les non porteurs d'IgG spécifiques de GLURP-R2 quant au nombre d'épisode de paludisme survenus.

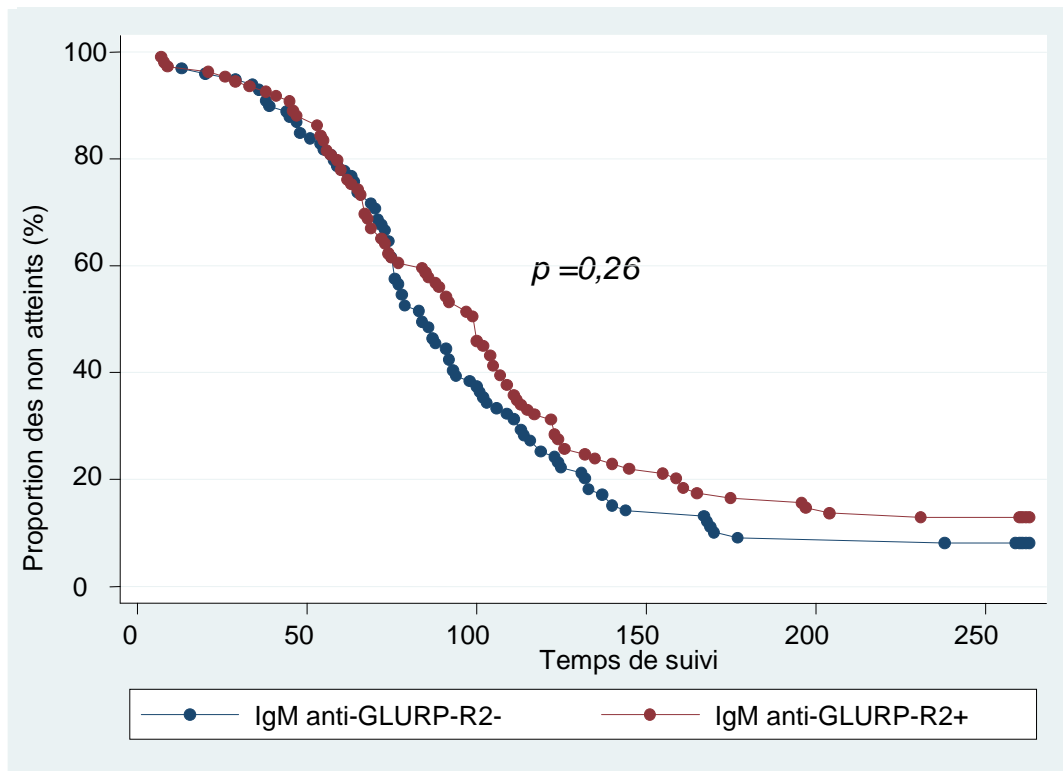


Figure 14: Courbe de survie en fonction de la séropositivité en IgM anti-GLURP-R2 chez les enfants de la cohorte à Bandiagara en 2008. En bleu la courbe pour les enfants n'ayant pas d'IgM spécifiques de GLURP-R2 et en rouge la courbe des enfants séropositifs en IgM spécifiques de GLURP-R2.

Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les porteurs et les non porteurs d'IgM spécifiques de GLURP-R2 quant au nombre d'épisode de paludisme survenus.

VI. DISCUSSION

VI.1 Matériels et méthodes

Le but de ce travail était d'évaluer les réponses anticorps naturelles spécifiques d'AMA-1fvo, de MSP-1hybride et de GLURP-R2 ; trois antigènes de stade sanguin de *P. falciparum* chez les enfants vivants en zone d'endémie. Nous avons effectué une étude de cohorte qui est appropriée pour atteindre notre objectif. La cohorte était composée de 211 enfants de 1 à 5 ans vivant à Bandiagara, au Mali. Nous avons choisi d'effectuer cette étude à Bandiagara car il est situé dans une zone endémique avec une forte transmission saisonnière d'environ 6 mois, allant de Juillet à Décembre. Depuis 1993 le MRTC y a installé un centre de recherche sur le paludisme avec une équipe permanente.

La technique ELISA indirect a été utilisée pour doser les anticorps spécifiques des antigènes. En effet cette méthode a été standardisée dans le cadre du projet « Afro-Immuno Assay » sponsorisée par AMANET. Elle a été utilisée par huit institutions de recherche africaines et un même panel de réactifs a été fourni par Afro-immuno Assay. L'utilisation d'une méthode standardisée par plusieurs laboratoires avait pour but de permettre une comparaison des résultats. Il faut cependant noter que nous avons eu des difficultés pour doser les IgG4 spécifiques des différents antigènes.

VI.2 Suivi et détection des cas de paludisme

La détection des cas de paludisme a été effectuée de façon active et passive et nous pensons avoir dépisté le maximum d'épisodes de paludisme.

L'incidence du paludisme observée dans la cohorte d'enfants de notre étude était de 0,69 épisodes par enfant/an, ce qui est inférieure à celle des études précédentes qui avaient trouvé 1,7 épisode par enfant par an [26;28]. Cette diminution de l'incidence est probablement due à la présence permanente de l'équipe BMP/MRTC, à la prise en charge correcte des enfants de la cohorte et à l'implémentation des stratégies de

lutte par le MOH (MII, TDR et CTA). Par exemple nous n'avons pas enregistré de cas grave de paludisme dans la cohorte.

VI.3 Données immunologiques

Les moyennes géométriques des taux d'anticorps étaient en générale plus élevées chez les enfants de 3 à 5 ans comparés aux enfants de 1<3ans. Une étude en Guinée Equatoriale a montré que les taux d'IgG spécifiques de PfAMA-1 étaient beaucoup plus élevés chez les grands enfants que chez ceux de 1-5ans [26]. L'acquisition naturelle des anticorps spécifiques d'AMA-1fvo est en général âge dépendante.

Les moyennes géométriques des taux d'IgG et sous-classes (IgG1, IgG2, IgG3) et d'IgM étaient plus élevées chez les enfants de 3 à 5 ans. Dodoo et al. en 2008 ont trouvé des résultats similaires au Ghana [36]. Les taux d'IgG et IgG1 étaient significativement plus élevée chez les enfants de 3-5 ans comparés à ceux de 1-3ans. Nous avons trouvé des taux d'IgG et d'IgG1 prédominants dans la réponse contre AMA-1. Les IgM étaient également plus élevées chez les enfants de 3 à 5 ans.

Les taux d'IgG anti-AMA-1 étaient plus élevés chez les porteurs asymptomatiques de *Plasmodium* en début de saison de transmission comparés aux enfants qui n'étaient pas infectés. Ceci indique que la présence du parasite permet de maintenir une réponse anticorps mémoire. Cependant il n'y avait pas d'association entre la présence de ces anticorps et la protection contre la survenue des accès palustres. Ceci est contraire à ce qui été observée dans les études de Dodoo et al. en 2008 et de Kusi [36;100]. Ceci n'est surprenant car l'essai clinique de Phase 2 chez les enfants à Bandiagara a montré une protection allèle spécifique [92].

En ce qui concerne la réponse anticorps contre MSP-1, les taux d'IgG spécifiques étaient globalement faibles chez les enfants. La différence entre les moyennes de ces taux d'IgG entre les deux groupes d'enfant n'était pas significative ($p>0,05$). Les taux d'IgG1, d'IgG2 et d'IgG3 étaient négligeables. Par contre la moyenne géométrique des taux d'IgM était significativement plus élevées chez les enfants de 3 à 5 ans ($p<0,001$). Nous n'avons pas observé d'association statistiquement significative entre

la présence d'IgG et IgM spécifiques de MSP1 et la protection contre les épisodes de paludisme bien que certains auteurs comme Doodoo et *al.* en 2008 ont trouvé que les IgG1 spécifiques de MSP-1₁₉ étaient les seuls isotypes associés à la protection. Par ailleurs Moss et *al.* ont décrit que les IgG anti-MSP1₁₉ étaient capables d'interférer avec la croissance du parasite *in vitro* et d'inhiber son développement intracellulaire [69]. La faiblesse des taux d'anticorps spécifiques de MSP1 dans notre étude serait probablement due au fait que nous les avons mesurés en saison de non transmission. En effet l'essai clinique de phase 1 portant sur la MSP-1₄₂ a montré que chez les adultes les taux d'anticorps anti- MSP-1₄₂ augmentent au cours de la saison de transmission progressivement et chute après la saison de transmission [93].

Les moyennes géométriques des taux d'IgG et sous-classes spécifiques de GLURP-R2 étaient faibles chez les deux groupes d'enfants. Seule la moyenne des taux d'IgM spécifiques de GLURP-R2 était significativement plus élevée chez les enfants de 3 à 5 ans. Les moyennes géométriques des taux d'anticorps (IgG et sous-classes) étaient significativement plus élevées chez les enfants portant des parasites à l'inclusion. Ces taux élevés d'IgG pourraient être induits par des infections chroniques. En effet Bandiagara est une zone d'endémie palustre les enfants qui y vivent peuvent maintenir l'infection pendant longtemps. Par contre la différence des moyennes géométriques des taux d'IgM n'était pas statistiquement significative entre les deux groupes. Les IgM sont des anticorps de la réponse primaire et donc leur titre devrait être plus élevé chez les enfants porteurs de *Plasmodium*. Le fait qu'il y ait pas de différence statistiquement significatives en IgM entre les enfants ne portant pas de parasite et ceux portant des parasites à l'inclusion, renforce notre idée que ces derniers auraient des portages chroniques de parasites. L'association entre les anticorps cytophiliques anti-GLURP et la protection contre le paludisme a été observée au Sénégal [70]. Nous n'avons pas trouvé une telle association. Plusieurs études comme la notre n'ont pas trouvé d'association avec la protection contre l'accès palustre.

D'une façon générale les moyennes des taux d'anticorps cytophiliques (IgG1, IgG3) étaient significativement plus élevées chez les enfants portants des parasites à l'inclusion par rapport à ceux ne portant pas de parasite.

VI.4. Courbes de survie : proportion de sujets non atteints durant le suivi selon la séropositivité en anticorps

Les temps au premier épisode de paludisme chez les enfants portants les IgG à l'inclusion et ceux n'en portant pas étaient similaires quelque soit l'antigène. Les mêmes observations sont effectuées pour les IgM. En effet il n'y avait pas de différences statistiquement significatives entre les temps de survenu du paludisme chez les enfants portant les IgG et IgM spécifiques de AMA-1fvo, de MSP-1hyb et GLURP-R2 et ceux ne portant pas ces anticorps spécifiques. Cela pourrait signifier que le portage d'anticorps à l'inclusion ne protège pas forcément contre la survenue des accès palustres chez les enfants vivants en zone endémique. Dans certaines études les anticorps contre AMA-1 et MSP-1 sont plutôt associés au risque d'accès palustre [49]. Cette situation est due probablement au fait que la réponse immunitaire est influencée par le polymorphisme antigénique.

P. falciparum renferme plusieurs souches et de multiples antigènes qui sont souvent polymorphiques. Ainsi il est possible que certains individus portant des anticorps anti-spécifique d'un antigène donné à l'inclusion aient été en contact avec des parasites des souches différentes de ceux responsables des épisodes de paludisme. Les anticorps induits précédemment ne pourraient pas reconnaître les antigènes exprimés par la nouvelle souche de parasite responsable de l'accès.

Dans tous les cas l'évaluation de la réponse anticorps naturelle contre plasmodium doit porter sur plusieurs antigènes en dans la population d'étude.

L'essai de phase 2 portant sur FMP2.1 menée à Bandiagara a montré des productions de taux élevés d'anticorps dans le groupe d'enfants ayant reçu des doses du vaccin de

Analyse de la réponse anticorps naturelle contre trois antigènes de *P. falciparum* chez les enfants de 1 à 5 ans vivant à Bandiagara ; Mali

l'étude par rapport au groupe de contrôle. Cependant ces taux élevés d'anticorps induits par le vaccin n'étaient pas protecteurs contre les épisodes de paludisme. En effet ni les taux d'anticorps de base (en début de saison de transmission), ni ceux obtenus un mois après la troisième dose n'étaient associés à la protection contre le paludisme clinique [93]

VII. CONCLUSION

Cette étude a montré :

- Que la survenue du paludisme clinique baisse avec l'âge et qu'il y'a une baisse d'incidence du paludisme à Bandiagara ;
- Que les taux d'anticorps spécifiques d'AMA-1Fvo, MSP-1 hybride et GLURP-R2 augmentaient avec l'âge dans notre cohorte ;
- qu'il n'y a pas de corrélation entre les taux élevés d'anticorps spécifiques d'AMA-1fvo, de MSP-1hyb et de GLURP-R2 induits avant la saison de transmission et la protection contre la survenu des accès palustres.

VIII. RECOMMANDATIONS

Analyse de la réponse anticorps naturelle contre trois antigènes de *P. falciparum* chez les enfants de 1 à 5 ans vivant à Bandiagara ; Mali

- Effectuer cette étude dans une autre zone en incluant les enfants de 1 à 15 ans, en augmentant la taille de l'échantillon
- Suivre la dynamique de variation des taux d'anticorps pendant la saison de transmission

IX. REFERENCES

1. **Adam,C., Geniteau,M., Gougerot-Pocidalò,M., Verroust,P., Lebras,J., Gibert,C., and Morel-Maroger,L.,** Cryoglobulins, circulating immune complexes, and complement activation in cerebral malaria *Infect.Immun.* 1981. **31**: 530-535.
2. **Agarwal,A., Guindo,A., Cissoko,Y., Taylor,J.G., Coulibaly,D., Kone,A., Kayentao,K., Djimde,A., Plowe,C.V., Doumbo,O., Wellems,T.E., and Diallo,D.,** Hemoglobin C associated with protection from severe malaria in the Dogon of Mali, a West African population with a low prevalence of hemoglobin S. *Blood.* 2000. **96**: 2358-2363.
3. **Allan RJ, Beattie P, Bate C, Van Hensbroek MB, Morris jones, Greenwood, B. M., and Kwiatkowski, D.** Strain variation in tumor necrosis factor induction by parasites from children with acute *falciparum* malaria. *Infect.Immun.* 63, 1173-1175. 1995.
4. **Arama S.** Incidence du paludisme chez les enfants de 1 à 5 ans à Bandiagara, Mali 51. Thèse Pharmacie, Bamako, Mali 11p15. 2011.
5. **Arama,C., Giusti,P., Bostrom,S., Dara,V., Traore,B., Dolo,A., Doumbo,O., Varani,S., and Troye-Blomberg,M.,** Interethnic differences in antigen-presenting cell activation and TLR responses in Malian children during *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS.One.* 2011. **6**: e18319.
6. **Artavanis-Tsakonas K and Riley, E. M.** Innate immunity response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *plamodium falciparum* infected erythrocytes. 169(6), 2956-2963. 2002. *J Immunol.*
7. **Auffray C, sieweke MH, and Giessmann F.** Blood monocytes: development, heterogenicity, and relationship with dendritic cells. (27), 669-692. 2009.
8. **Bai,T., Becker,M., Gupta,A., Strike,P., Murphy,V.J., Anders,R.F., and Batchelor,A.H.,** Structure of AMA1 from *Plasmodium falciparum* reveals a clustering of polymorphisms that surround a conserved hydrophobic pocket. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2005. **102**: 12736-12741.

9. **Barry AE, Leliwa-Sytek A, Tavul L, Imrie H, Migot-Nabias F, Brown SM, McVean GA, and Day KP.** population genomics of the immune evasion(var) genes of *plasmodium falciparum*. *PLoS.Pathog.* 3. 2007.
10. **Bartel,D.P.,** MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009. **136**: 215-233.
11. **Belard,S., Issifou,S., Hounkpatin,A.B., Schaumburg,F., Ngoa,U.A., Esen,M., Fendel,R., de Salazar,P.M., Murbeth,R.E., Milligan,P., Imbault,N., Imoukhuede,E.B., Theisen,M., Jepsen,S., Noor,R.A., Okech,B., Kremsner,P.G., and Mordmuller,B.,** A randomized controlled phase Ib trial of the malaria vaccine candidate GMZ2 in African children. *PLoS.One.* 2011. **6**: e22525.
12. **Belge,K.U., Dayyani,F., Horelt,A., Siedlar,M., Frankenberger,M., Frankenberger,B., Espevik,T., and Ziegler-Heitbrock,L.,** The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF *J.Immunol* 2002. **168**: 3536-3542.
13. **Blackman,M.J., Ling,I.T., Nicholls,S.C., and Holder,A.A.,** Proteolytic processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 produces a membrane-bound fragment containing two epidermal growth factor-like domains. *Mol.Biochem.Parasitol.* 1991. **49**: 29-33.
14. **Boldt,A.B., Luty,A., Grobusch,M.P., Dietz,K., Dzeing,A., Kombila,M., Kremsner,P.G., and Kun,J.F.,** Association of a new mannose-binding lectin variant with severe malaria in Gabonese children. *Genes Immun.* 2006. **7**: 393-400.
15. Bonneville M, O'Brien RL, and Born WK. Gammadelta T cells effectors: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol* 10(7), 467-478. 2010.
16. **Bouharoun-Tayoun,H., Ouevray,C., Lunel,F., and Druilhe,P.,** Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *J.Exp.Med.* 1995. **182**: 409-418.
17. **Brabin,B.J., Hakimi,M., and Pelletier,D.,** An analysis of anemia and pregnancy-related maternal mortality. *J.Nutr.* 2001. **131**: 604S-614S.
18. Carter R, Mendis KN, Miller LH, Molineaux L, and Saul A. Malaria transmission blocking vaccine- how can their development be supported? *Nat.Med.* 6(3), 241-244. 2000.

19. **Chang,S.P., Gibson,H.L., Lee-Ng,C.T., Barr,P.J., and Hui,G.S.,** A carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* gp195 expressed by a recombinant baculovirus induces antibodies that completely inhibit parasite growth. *J.Immunol.* 1992. **149**: 548-555.
20. **Chapel Helen, Haeney Mansel, Misbah Siraj, and Snowden Neil,** *Immunologie clinique: De la théorie à la pratique, avec cas cliniques.* 2004.
21. **Charles Arama.** Novel Immunization strategies and interethnic differences in response to malaria infection. 2012. Stocholm University.
22. **Chen,N.J., Mirtsos,C., Suh,D., Lu,Y.C., Lin,W.J., McKerlie,C., Lee,T., Baribault,H., Tian,H., and Yeh,W.C.,** C5L2 is critical for the biological activities of the anaphylatoxins C5a and C3a . *Nature* 2007. **446**: 203-207.
23. **Clark IA, Rockett KA, and Cowden WB.** Possible central role of nitric oxide in conditions clinically similar to cerebral. *Lancet.* 340, 894-896. 1992.
24. **Cohen,S., McGREGOR,I.A., and CARRINGTON,S.,** Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature* 1961. **192**: 733-737.
25. **Coley,A.M., Gupta,A., Murphy,V.J., Bai,T., Kim,H., Foley,M., Anders,R.F., and Batchelor,A.H.,** Structure of the malaria antigen AMA1 in complex with a growth-inhibitory antibody. *PLoS.Pathog.* 2007. **3**: 1308-1319.
26. **Cook,J., Kleinschmidt,I., Schwabe,C., Nseng,G., Bousema,T., Corran,P.H., Riley,E.M., and Drakeley,C.J.,** Serological markers suggest heterogeneity of effectiveness of malaria control interventions on Bioko Island, equatorial Guinea. *PLoS.One.* 2011. **6**: e25137.
27. **Costa,G., Loizon,S., Guenot,M., Mocan,I., Halary,F., de Saint-Basile,G., Pitard,V., Dechanet-Merville,J., Moreau,J.F., Troye-Blomberg,M., Mercereau-Puijalon,O., and Behr,C.,** Control of *Plasmodium falciparum* erythrocytic cycle: gammadelta T cells target the red blood cell-invasive merozoites. *Blood.* 2011. **118**: 6952-6962.

28. **Coulibaly,D., Diallo,D.A., Thera,M.A., Dicko,A., Guindo,A.B., Kone,A.K., Cissoko,Y., Coulibaly,S., Djimde,A., Lyke,K., Doumbo,O.K., and Plowe,C.V.,** Impact of pre-season treatment on incidence of *falciparum* malaria and parasite density at a site for testing malaria vaccines in Bandiagara, Mali. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2002. **67**: 604-610.
29. **Crompton,P.D., Pierce,S.K., and Miller,L.H.,** Advances and challenges in malaria vaccine development. *J.Clin.Invest.* 2010. **120**: 4168-4178.
30. **Das BS, Mohany S, Mishra SK, Patnaik JK, Satpathy SK, Mohady D, and Bose TK.** Increased cerebrospinal fluid protein and peroxydation products in patients with cerebral malaria. *Trans.R.Soc.Trop Med Hyg.* 85, 733-734. 1991.
31. **De Naotunne T, Karunaweera ND, Mendis KN, and Carter R.** Cytokine mediated inactivation of malarial gametocytes is dependent on the presence of white blood cells and involves reactive nitrogen intermediates. *Immunology* 78, 555-562. 1993.
32. **Deans,J.A., Alderson,T., Thomas,A.W., Mitchell,G.H., Lennox,E.S., and Cohen,S.,** Rat monoclonal antibodies which inhibit the *in vitro* multiplication of *Plasmodium knowlesi*. *Clin.Exp.Immunol.* 1982. **49**: 297-309.
33. **Deans,J.A., Knight,A.M., Jean,W.C., Waters,A.P., Cohen,S., and Mitchell,G.H.,** Vaccination trials in rhesus monkeys with a minor, invariant, *Plasmodium knowlesi* 66 kD merozoite antigen. *Parasite Immunol.* 1988. **10**: 535-552.
34. **Deschamps Latscha B, Lunel Fabiani F, Kara A, and Druilhe P.** Generation of reactive oxygen species in whole blood from patients with acute *falciparum* malaria. *parasite immunol.* 9, 275-129. 1987.
35. **DNS.** Système Local d'Information Sanitaire 2010. Direction Nationale de la Santé, Mali. 1-139. 1-5-2011.
36. **Dodoo,D., Aikins,A., Kusi,K.A., Lamptey,H., Remarque,E., Milligan,P., Bosomprah,S., Chilengi,R., Osei,Y.D., Akanmori,B.D., and Theisen,M.,** Cohort study of the association of antibody levels to AMA1, MSP119, MSP3 and GLURP with protection from clinical malaria in Ghanaian children. *Malar.J.* 2008. **7:142.**: 142.

37. **Dolo,A., Modiano,D., Maiga,B., Daou,M., Dolo,G., Guindo,H., Ba,M., Maiga,H., Coulibaly,D., Perlman,H., Blomberg,M.T., Toure,Y.T., Coluzzi,M., and Doumbo,O.,** Difference in susceptibility to malaria between two sympatric ethnic groups in Mali. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2005. **72**: 243-248.
38. **Duan,J., Mu,J., Thera,M.A., Joy,D., Kosakovsky Pond,S.L., Diemert,D., Long,C., Zhou,H., Miura,K., Ouattara,A., Dolo,A., Doumbo,O., Su,X.Z., and Miller,L.,** Population structure of the genes encoding the polymorphic *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1: implications for vaccine design. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2008. **105**: 7857-7862.
39. **Dutta,S., Lee,S.Y., Batchelor,A.H., and Lanar,D.E.,** Structural basis of antigenic escape of a malaria vaccine candidate. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2007. **104**: 12488-12493.
40. **Dziegiel,M., Borre,M.B., Jepsen,S., Hogh,B., Petersen,E., and Vuust,J.,** Recombinant *Plasmodium falciparum* glutamate rich protein; purification and use in enzyme-linked immunosorbent assay. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1991. **44**: 306-313.
41. **Dzikowski,R., Templeton,T.J., and Deitsch,K.,** Variant antigen gene expression in malaria. *Cell Microbiol.* 2006. **8**: 1371-1381.
42. **Egan,A.F., Morris,J., Barnish,G., Allen,S., Greenwood,B.M., Kaslow,D.C., Holder,A.A., and Riley,E.M.,** Clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria is associated with serum antibodies to the 19-kDa C-terminal fragment of the merozoite surface antigen, PfMSP-1. *J.Infect.Dis.* 1996. **173**: 765-769.
43. **Eric Espinoza and pascal Chillet.** Collection Parcours LMD- science de la vie et de la terre. ellipses edition S.A. 2010.
44. **Fairhurst,R.M., Fujioka,H., Hayton,K., Collins,K.F., and Wellems,T.E.,** Aberrant development of *Plasmodium falciparum* in hemoglobin CC red cells: implications for the malaria protective effect of the homozygous state. *Blood.* 2003. **101**: 3309-3315.
45. **Fernandez,V., Hommel,M., Chen,Q., Hagblom,P., and Wahlgren,M.,** Small, clonally variant antigens expressed on the surface of the *Plasmodium*

falciparum-infected erythrocyte are encoded by the rif gene family and are the target of human immune responses. *J.Exp.Med.* 1999. **190**: 1393-1404.

46. **Friedman,M.J.**, Erythrocytic mechanism of sickle cell resistance to malaria. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1978. **75**: 1994-1997.
47. **Gardner,M.J., Hall,N., Fung,E., White,O., Berriman,M., Hyman,R.W., Carlton,J.M., Pain,A., Nelson,K.E., Bowman,S., Paulsen,I.T., James,K., Eisen,J.A., Rutherford,K., Salzberg,S.L., Craig,A., Kyes,S., Chan,M.S., Nene,V., Shallom,S.J., Suh,B., Peterson,J., Angiuoli,S., Pertea,M., Allen,J., Selengut,J., Haft,D., Mather,M.W., Vaidya,A.B., Martin,D.M., Fairlamb,A.H., Fraunholz,M.J., Roos,D.S., Ralph,S.A., McFadden,G.I., Cummings,L.M., Subramanian,G.M., Mungall,C., Venter,J.C., Carucci,D.J., Hoffman,S.L., Newbold,C., Davis,R.W., Fraser,C.M., and Barrell,B.**, Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 2002. **419**: 498-511.
48. **Gentilini Marc, anis Martin, and Mouchet Jean**, Médecine tropicale . 1991.
49. **Greenhouse,B., Ho,B., Hubbard,A., Njama-Meya,D., Narum,D.L., Lanar,D.E., Dutta,S., Rosenthal,P.J., Dorsey,G., and John,C.C.**, Antibodies to *Plasmodium falciparum* antigens predict a higher risk of malaria but protection from symptoms once parasitemic. *J.Infect.Dis.* 2011. **204**: 19-26.
50. **Groux,H. and Gysin,J.**, Opsonization as an effector mechanism in human protection against asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*: functional role of IgG subclasses. *Res.Immunol* 1990. **141**: 529-542.
51. **Guindo,A., Fairhurst,R.M., Doumbo,O.K., Wellems,T.E., and Diallo,D.A.**, X-linked G6PD deficiency protects hemizygous males but not heterozygous females against severe malaria. *PLoS.Med.* 2007. **4**: e66.
52. **Guindo,A., Traore,K., Diakite,S., Wellems,T.E., Doumbo,O.K., and Diallo,D.A.**, An evaluation of concurrent G6PD (A-) deficiency and sickle cell trait in Malian populations of children with severe or uncomplicated *P. falciparum* malaria. *Am.J.Hematol.* 2011. **86**: 795-796.

53. 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 long-lasting protection induced by RTS,S/AS02A malaria vaccine further results from a phase IIb trial in Mozambique children. *Plosone* 4(4). 2009.
54. **Hill,A.V.,** Malaria resistance genes: a natural selection. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 1992. **86**: 225-6, 232.
55. **Hodder,A.N., Crewther,P.E., Matthew,M.L., Reid,G.E., Moritz,R.L., Simpson,R.J., and Anders,R.F.,** The disulfide bond structure of *Plasmodium* apical membrane antigen-1. *J.Biol.Chem.* 1996. **271**: 29446-29452.
56. **Hoffman,S.L., Weiss,W., Mellouk,S., and Sedegah,M.,** Irradiated sporozoite vaccine induces cytotoxic T lymphocytes that recognize malaria antigens on the surface of infected hepatocytes. *Immunol.Lett.* 1990. **25**: 33-38.
57. **Hogh,B., Petersen,E., Dziegiel,M., David,K., Hanson,A., Borre,M., Holm,A., Vuust,J., and Jepsen,S.,** Antibodies to a recombinant glutamate-rich *Plasmodium falciparum* protein: evidence for protection of individuals living in a holoendemic area of Liberia. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1992. **46**: 307-313.
58. **Holder,A.A. and Freeman,R.R.,** Immunization against blood-stage rodent malaria using purified parasite antigens. *Nature.* 1981. **294**: 361-364.
59. **Kaca,W. and Roth,R.,** Activation of complement by human hemoglobin and by mixtures of hemoglobin and bacterial endotoxin. *Biochim.Biophys.Acta* 1995. **1245**: 49-56.
60. **Kumaratilake LM, Ferrante A, Jaeger t, and Rzepczyk CM.** Effects of cytokines, complement, and antibody on the neutrophils respiratory burst and phagocytic responses to *Plasmodium falciparum* merozoites. (60), 3731-3738. 1992. *Infect Immun.*
61. Kumaratilake LM and Ferrante A. Opsonization and phagocytosis of plasmodium faciparum merozoites measured by flow cytometry. (7), 9-13. 2000. *Clin diag Lab Immunol.*
62. **Kusi,K.A., Faber,B.W., Thomas,A.W., and Remarque,E.J.,** Humoral immune response to mixed PfAMA1 alleles; multivalent PfAMA1 vaccines induce broad specificity. *PLoS.One.* 2009. **4**: e8110.

63. **LaMonte,G., Philip,N., Reardon,J., Lacsina,J.R., Majoros,W., Chapman,L., Thornburg,C.D., Telen,M.J., Ohler,U., Nicchitta,C.V., Haystead,T., and Chi,J.T.,** Translocation of sickle cell erythrocyte microRNAs into *Plasmodium falciparum* inhibits parasite translation and contributes to malaria resistance. *Cell Host.Microbe* 2012. **12**: 187-199.
64. **Langhorne,J., Ndungu,F.M., Sponaas,A.M., and Marsh,K.,** Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat.Immunol.* 2008. **9**: 725-732.
65. **Lusingu,J.P., Vestergaard,L.S., Alifrangis,M., Mmbando,B.P., Theisen,M., Kitua,A.Y., Lemnge,M.M., and Theander,T.G.,** Cytophilic antibodies to *Plasmodium falciparum* glutamate rich protein are associated with malaria protection in an area of holoendemic transmission. *Malar.J.* 2005. **4:48**.: 48.
66. **Luty,A.J., Kun,J.F., and Kremsner,P.G.,** Mannose-binding lectin plasma levels and gene polymorphisms in *Plasmodium falciparum* malaria. *J.Infect.Dis.* 1998. **178**: 1221-1224.
67. **Miller,L.H., Roberts,T., Shahabuddin,M., and McCutchan,T.F.,** Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1). *Mol.Biochem.Parasitol.* 1993. **59**: 1-14.
68. **Modiano,D., Luoni,G., Sirima,B.S., Simpoire,J., Verra,F., Konate,A., Rastrelli,E., Olivieri,A., Calissano,C., Paganotti,G.M., D'Urbano,L., Sanou,I., Sawadogo,A., Modiano,G., and Coluzzi,M.,** Haemoglobin C protects against clinical *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature.* 2001. **414**: 305-308.
69. **Moss,D.K., Remarque,E.J., Faber,B.W., Cavanagh,D.R., Arnot,D.E., Thomas,A.W., and Holder,A.A.,** *Plasmodium falciparum* 19-kilodalton merozoite surface protein 1 (MSP1)-specific antibodies that interfere with parasite growth *in vitro* can inhibit MSP1 processing, merozoite invasion, and intracellular parasite development. *Infect.Immun.* 2012. **80**: 1280-1287.
70. **Oouvray,C., Theisen,M., Rogier,C., Trape,J.F., Jepsen,S., and Druilhe,P.,** Cytophilic immunoglobulin responses to *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein are correlated with protection against clinical malaria in Dielmo, Senegal. *Infect.Immun.* 2000. **68**: 2617-2620.

71. **Okies S.** Betting on a malaria vaccine. *N.Engl.J.Med.* 353, 1877-1881. 3-11-2005.
72. **OMS,** Quelles perspectives pour faire reculer le paludisme . *Bulletin de l'OMS* 2001. 4.
73. **Pasvol,G., Weatherall,D.J., and Wilson,R.J.,** Cellular mechanism for the protective effect of haemoglobin S against *P. falciparum* malaria. *Nature* 1978. **274:** 701-703.
74. **Pawluczkowycz,A.W., Lindorfer,M.A., Waitumbi,J.N., and Taylor,R.P.,** Hematin promotes complement alternative pathway-mediated deposition of C3 activation fragments on human erythrocytes: potential implications for the pathogenesis of anemia in malaria. *J.Immunol* 2007. **179:** 5543-5552.
75. Perlman P and Troye Blomberg. malaria and the immune system in human. (80), 229-242. 2012. *Chem Immunology*.
76. **Perlmann,P. and Troye-Blomberg,M.,** Malaria and the immune system in humans. *Chem.Immunol* 2002. **80:** 229-242.
77. **Peterson,M.G., Marshall,V.M., Smythe,J.A., Crewther,P.E., Lew,A., Silva,A., Anders,R.F., and Kemp,D.J.,** Integral membrane protein located in the apical complex of *Plasmodium falciparum*. *Mol.Cell Biol.* 1989. **9:** 3151-3154.
78. *Petter M, Bonow J, and Klinkert MQ.* Diverse expression patterns of subgroups of the rif multigene family during *Plasmodium* gametocytogenesis. *Plosone* 3. 2008.
79. **Pombo,D.J., Lawrence,G., Hirunpetcharat,C., Rzepczyk,C., Bryden,M., Cloonan,N., Anderson,K., Mahakunkijcharoen,Y., Martin,L.B., Wilson,D., Elliott,S., Elliott,S., Eisen,D.P., Weinberg,J.B., Saul,A., and Good,M.F.,** Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. *Lancet* 2002. **360:** 610-617.
80. **Riganti,M., Pongponratn,E., Tegoshi,T., Looareesuwan,S., Punpoowong,B., and Aikawa,M.,** Human cerebral malaria in Thailand: a clinico-pathological correlation. *Immunol.Lett.* 1990. **25:** 199-205.

81. **Riley,E.M., Allen,S.J., Wheeler,J.G., Blackman,M.J., Bennett,S., Takacs,B., Schonfeld,H.J., Holder,A.A., and Greenwood,B.M.,** Naturally acquired cellular and humoral immune responses to the major merozoite surface antigen (PfMSP1) of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced malaria morbidity. *Parasite Immunol* 1992. **14**: 321-337.
82. **Roussilhon,C., Brasseur,P., Agnamey,P., Perignon,J.L., and Druilhe,P.,** Understanding human-*Plasmodium falciparum* immune interactions uncovers the immunological role of worms. *PLoS.One.* 2010. **%19;5**: e9309.
83. **Ruwende,C. and Hill,A.,** Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria. *J.Mol.Med.(Berl).* 1998. **76**: 581-588.
84. **Scherf,A., Lopez-Rubio,J.J., and Riviere,L.,** Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *Annu.Rev.Microbiol.* 2008. **62:445-70.**: 445-470.
85. **Sherman W.Irwin,** *Plasmodium, a genus of parasitic protozoons that are causative agents of disease malaria.* 2001.
86. **Snow,R.W., Guerra,C.A., Noor,A.M., Myint,H.Y., and Hay,S.I.,** The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature.* 2005. **434**: 214-217.
87. **Stanistic DI, Mueller I Butuela I, Siba P, Schofield L, and Robert Koch redux.** Malaria immunology in Papua New Guinea. (32), 623-632. 2010. *Parasite Immunol.*
88. **Su,X.Z., Heatwole,V.M., Wertheimer,S.P., Guinet,F., Herrfeldt,J.A., Peterson,D.S., Ravetch,J.A., and Wellems,T.E.,** The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell.* 1995. **82**: 89-100.
89. **Takala,S.L., Coulibaly,D., Thera,M.A., Batchelor,A.H., Cummings,M.P., Escalante,A.A., Ouattara,A., Traore,K., Niangaly,A., Djimde,A.A., Doumbo,O.K., and Plowe,C.V.,** Extreme polymorphism in a vaccine antigen and risk of clinical malaria: implications for vaccine development. *Sci.Transl.Med.* 2009. **1**: 2ra5.

90. **Takala,S.L., Coulibaly,D., Thera,M.A., Dicko,A., Smith,D.L., Guindo,A.B., Kone,A.K., Traore,K., Ouattara,A., Djimde,A.A., Sehdev,P.S., Lyke,K.E., Diallo,D.A., Doumbo,O.K., and Plowe,C.V.,** Dynamics of polymorphism in a malaria vaccine antigen at a vaccine-testing site in Mali. *PLoS.Med.* 2007. **4:** e93.
91. **Theisen,M., Soe,S., Oouvray,C., Thomas,A.W., Vuust,J., Danielsen,S., Jepsen,S., and Druilhe,P.,** The glutamate-rich protein (GLURP) of *Plasmodium falciparum* is a target for antibody-dependent monocyte-mediated inhibition of parasite growth *in vitro*. *Infect.Immun.* 1998. **66:** 11-17.
92. **Thera,M.A., Doumbo,O.K., Coulibaly,D., Diallo,D.A., Sagara,I., Dicko,A., Diemert,D.J., Heppner,D.G., Jr., Stewart,V.A., Angov,E., Soisson,L., Leach,A., Tucker,K., Lyke,K.E., and Plowe,C.V.,** Safety and allele-specific immunogenicity of a malaria vaccine in Malian adults: results of a phase I randomized trial. *PLoS.Clin.Trials.* 2006. **1:** e34.
93. **Thera,M.A., Doumbo,O.K., Coulibaly,D., Laurens,M.B., Ouattara,A., Kone,A.K., Guindo,A.B., Traore,K., Traore,I., Kouriba,B., Diallo,D.A., Diarra,I., Daou,M., Dolo,A., Tolo,Y., Sissoko,M.S., Niangaly,A., Sissoko,M., Takala-Harrison,S., Lyke,K.E., Wu,Y., Blackwelder,W.C., Godeaux,O., Vekemans,J., Dubois,M.C., Ballou,W.R., Cohen,J., Thompson,D., Dube,T., Soisson,L., Diggs,C.L., House,B., Lanar,D.E., Dutta,S., Heppner,D.G., Jr., and Plowe,C.V.,** A field trial to assess a blood-stage malaria vaccine. *N.Engl.J.Med.* 2011. **365:** 1004-1013.
94. **Tian,J.H., Kumar,S., Kaslow,D.C., and Miller,L.H.,** Comparison of protection induced by immunization with recombinant proteins from different regions of merozoite surface protein 1 of *Plasmodium yoelii*. *Infect.Immun.* 1997. **65:** 3032-3036.
95. **Traore AM.** Analyse de la situation du paludisme au Mali et les stratégies de prise en charge des formes graves et compliquées dans le service de pédiatrie de l'hôpital Gabriel Touré. Thèse de Médecine, Bamako, Mali **83p; 121.** 2001.
96. **Vasan S and Tsuji M,** A double-edged sword: the role of NKT cells in malaria and HIV infection and immunity. *semin immunol* 2010. **22:** 87-96.

97. **Walkers O, Salako LA, Sowunmi A, Thomas JO, Sodeine O, and Bnodi FS.** pronostic risk factors and post mortem findings in cerebral malaria children. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 86, 491-493. 1992.
98. **Wei X, Charles IG, Smith A, Ure J, Freng G, Huang F, Xu D, Muler W, Moncada S, and Liew FY.** Altered immune response in mice lacking inducible nitric oxide synthetase. *Nature* 375, 408-411. 1995.
99. **Weiss,W.R.,** Cytotoxic T cells recognize a peptide from the circumsporozoite protein on malaria-infected hepatocytes. 1990.
100. **Weiss,W.R. and Jiang,C.G.,** Protective CD8+ T lymphocytes in primates immunized with malaria sporozoites. *PLoS.One.* 2012. **7:** e31247.
101. **Wenisch,C., Spitzauer,S., Florris-Linau,K., Rumpold,H., Vannaphan,S., Parschalk,B., Graninger,W., and Looareesuwan,S.,** Complement activation in severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin.Immunol Immunopathol.* 1997. **85:** 166-171.
102. **White,N.J.,** *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. *Clin.Infect.Dis.* 2008. **46:** 172-173.
103. **White,N.J. and Ho,M.,** The pathophysiology of malaria. *Adv.Parasitol.* 1992. **31:83-173.:** 83-173.
104. WHO. **World Malaria Report 2011.** www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/en/ . 2011.
105. Wu L and Liu YJ. Development of dendritic cells lineages. (26), 741-750. 2007. immunity.
106. Zhu J, Yamane H, and Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations. 28, 445-489. 2010.

Fiche signalétique

Nom: **DOUYON**

Prénom: **Amassagou Raymond**

Nationalité: **Malienne**

Année de soutenance: **2012**

Ville de soutenance : **Bamako**

Lieu de dépôt : **Bibliothèque de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie.**

Secteur d'intérêt : **Parasitologie, Immunologie, Epidémiologie.**

TITRE: Analyse de la réponse anticorps naturelle contre trois antigènes de *P. falciparum* et protection contre les accès palustres chez les enfants de 1 à 5 ans vivant à Bandiagara ; Mali.

RESUME : Le but de ce travail était d'évaluer le rôle des réponses anticorps naturelles contre trois antigènes de stade sanguin de *P. falciparum* : AMA1, MSP1 et GLURP-R2, dans la protection contre la survenue des accès palustres. Pour cela l'étude a été effectuée chez 210 enfants âgés de 1 à 5 ans à Bandiagara de juin 2008 à février 2009. Le dépistage des cas de paludisme a été effectué d'une façon active et passive par des visites régulières hebdomadaires, des passages mensuels et des visites irrégulières. Les anticorps spécifiques de chaque antigène ont été dosés à par la technique d'ELISA standardisée.

Le résultat a montré que les taux d'anticorps spécifiques d'AMA-1Fvo, MSP-1 hybride et GLURP-R2 augmentaient avec l'âge dans notre cohorte. Il n'y a pas de corrélation entre les taux élevés d'anticorps spécifiques d'AMA-1, de MSP-1 et de GLURP-R2 induits avant la saison de transmission et la protection contre la survenue des accès palustres.

Analyse de la réponse anticorps naturelle contre trois antigènes de *P. falciparum* chez les enfants de 1 à 5 ans vivant à Bandiagara ; Mali

Mots clés : **Anticorps, Antigène, Paludisme, *Plasmodium falciparum*, enfants, Bandiagara**

Last name : **DOUYON**

First name : **Amassagou Raymond**

Nationality : **Malian**

Year of completion : **2012**

City of defense: **Bamako**

Filing location: **Library of the Faculty of Medicine, Pharmacy and Dentistry.**

Relevant area of Interest: **Parasitology, Immunology, Epidemiology**

Title: Natural antibodies responses to three blood stage antigens and protection against malaria episodes in children aged from 1 to 5 years living in Bandiagara, Mali.

Summary: The aim of this study was to evaluate the role of natural antibody responses against three blood stage antigens of *P. falciparum*: AMA-1, MSP-1 and GLURP-R2, in protection against the occurrence of malaria attacks. The study was performed in a cohorte of 210 children aged 1 to 5 years at Bandiagara from June 2008 to February 2009. Malaria episodes were passively and actively detected through weekly regular visits, monthly passages and irregular visits. Antibodies specific to each of the 3 malaria antigens were measured by Afro-Immuno-Assay standardized indirect ELISA methods. The result showed that the levels of specific antibodies to AMA-1Fvo, MSP-1 hybrid and GLURP-R2 increased with age in our cohort. There were no correlation between high levels of specific antibodies for AMA-1, MSP-1 and GLURP-R2 induced before the transmission season and protection against malaria episode. It would be more interesting in the future to extend the cohort by including children of 6-15 years and use news *P. falciparum* antigens.

Key words: **Antibody, Antigen, malaria, *Plasmodium falciparum*, children, Bandiagara**

X. ANNEXES

1-Mode opératoire de la goutte épaisse

-confection de la goutte

Prélever une goutte de sang au troisième ou au quatrième doigt et déposer au milieu d'une lame porte-objet. A l'aide du bout d'une seconde lame, faire un étalement circulaire uniforme de la goutte de façon à obtenir un diamètre de 1 à 1.5 cm . Colorer la lame au Giemsa dilué à 10% pendant 15 mn après séchage à la température ambiante. Enfin lire la lame au microscope à l'objectif 100. Son principal avantage est le diagnostic de la maladie dans les cas de faible parasitemie (10 à 20 parasites par μl de sang). C'est une technique très sensible.

Les résultats sont exprimés en nombre de parasites par μl de sang

-Evaluation de la densité parasitaire

La goutte épaisse était utilisée pour évaluer la parasitemie et le frottis mince pour identifier l'espèce parasitaire lorsque la goutte ne le permettait pas.

La lecture des lames était faite à l'aide d'un microscope optique binoculaire (Olympus CX 31). La lame était examinée et lorsqu'elle contenait des formes parasitaires, la parasitemie était évaluée et le stade du parasite identifié. La méthode leucocytaire quantitative (sur la base de 7500 leucocytes par mm^3 de sang) était utilisée pour la détermination de la parasitemie. Le nombre de parasites était compté sur 300 leucocytes et la parasitemie exprimée selon la formule suivante :

$$P = N \times \text{GB/L}$$

P est le nombre de parasites par mm^3 de sang

N est le nombre de parasites comptés sur L leucocytes

L est le nombre de leucocytes comptés (300).

GB est le nombre de leucocytes (globules blancs) dans la formule sanguine du sujet

Si le nombre exact de leucocytes du sujet n'est pas connu, on assume que ce nombre est égal à 7500 et la formule de calcul de la parasitemie devient, si L=300:

$$P=N \times 7500/(300)= N \times (25)$$

2-Mode opératoire du frottis mince

-confection du frottis mince

Déposer une goutte de sang sur une lame porte objet dégraissé. Disposer une deuxième lame au contact de la première à environ 45°. Avec un mouvement régulier et ininterrompu, faire entraîner la goutte de sang par la lame inclinée. La goutte s'étale ainsi 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 coloré en bleu et le noyau en rouge. La lecture est faite au microscope optique à immersion à l'objectif 100. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'hématies parasités.

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 parasitemie (moins de 200 parasites par μ l). C'est une technique plus spécifique mais moins sensible que la goutte épaisse.

3-ELISA

3-1-Préparation des solutions de travail

-Préparation du coating buffer

Volume: 1L

Preparation date: _____

Components	Amount	lot no.:	Amount used	Check steps done ()
PBS	2 tablets			
0.001% Phenol red	Add 1 ml of 1 % to 1L			
De-ionized H ₂ O	1000 ml			

PROCEDURE

- Add 2 tablets of PBS to a beaker containing 1000ml deionised water.
- Place the flask on a magnetic stirrer without heating and stir until all is in solution.
- Add 1 ml of a 1 % Phenol red solution. The 1 % phenol red solution is prepared by adding 10 ml of deionised water to 0.1 g of phenol red.

LABEL:

- "Coating buffer" + date + initials

STORAGE: 3 months at 2–8 °C Made by: _____ on the _____ Name

Date

Analyse de la réponse anticorps naturelle contre trois antigènes de *P. falciparum* chez les enfants de 1 à 5 ans vivant à Bandiagara ; Mali

-Préparation du bloking buffer

Volume: 1L

Preparation date: _____

Components	Amount	Lot no.:	Amount used	Check steps done ()
PBS	2 tablets			
milkpowder	50 g			
Tween 20	1 ml			
De-ionized H ₂ O	1000 ml			

PROCEDURE:

- Add 2 tablets of PBS to a beaker containing 1000 ml deionised water and place the flask on a magnetic stirrer without heating and stir until all is in solution.
- Add 50 g of skimmed milk.
- Add 1 ml of Tween 20 and continue stirring until all is in solution.

LABEL:

- "Blocking buffer" + date + initials

STORAGE:

Use fresh blocking buffer.

Made by: _____, on the _____

Name

Date

-Préparation du sérum dilution buffer

Volume: 1L

Production date: _____

Components	Amount	Lot no.:	Amount used	Check steps done ()
PBS	2 tablets			
milk powder	25 g			
Tween 20	1 ml			
10% Na-azide sol.	2 ml			
De-ionized H ₂ O	1000 ml			

PROCEDURE:

- Add 2 tablets of PBS to a beaker containing 1000 ml de ionised water and place the flask on a magnetic stirrer without heating and stir until all is in solution.
- Add 25 g of skimmed milk.
- Add 1 ml of Tween 20
- Add 2 ml of 10 % Na-azide solution and continue stirring until all is in solution. The 10 % Na-azide solution is prepared by adding 40 ml of deionised water to 4 g of Na-azide.

LABEL:

- "Serum dilution buffer + date + initials

STORAGE:

3 weeks at 2 – 8 °C

Made by: _____, on the _____

Name

Date

-Préparation du washing buffer

Volume: 5L

Preparation date: _____

Components	Amount	Lot no.:	Amount used	Check steps done ()
PBS	10 tablets			
Tween 20	5 ml			
NaCl	146.25g			
De-ionized H ₂ O	5000 ml			

PROCEDURE:

- Add 10 tablets of PBS to a beaker containing 5000 ml deionised water and place the flask on a magnetic stirrer without heating and stir until all is in solution.
- Add 146.25g of NaCl.
- Add 5 ml of Tween 20 and continue stirring until all is in solution.

LABEL:

- "Washing Buffer"+ date + initials

STORAGE:

1 week at room temperature

Made by: _____, on the _____

Name

Date

Analyse de la réponse anticorps naturelle contre trois antigènes de *P. falciparum* chez les enfants de 1 à 5 ans vivant à Bandiagara ; Mali

-Préparation de la color solution

Volume: 120 ml (12 plates)

Components	Amount	Batch no.:	Amount used	Check steps done ()
TMB(3,3', 5,5'- <i>Tetramethylbenzidine</i>) substrate solution	Ready to use, add 100ul/we II			

PROCEDURE:

TMB comes already prepared.

- Transfer the amount needed into 50ml centrifuge tubes covered with aluminium foil.

LABEL:

- "TMB Colour solution"

STORAGE:

TMB stock solution is kept at 4C, however the solution for immediate use must be brought to room temperature.

Made by: _____, on the _____

Name

Date

-Préparation de la dilution buffer

Volume: 1L

Production date: _____

Components	Amount	Lot no.:	Amount used	Check steps done ()
PBS	2 tablets			
milk powder	25 g			
Tween 20	1 ml			
De-ionized H ₂ O	1000 ml			

PROCEDURE:

- Add 2 tablets of PBS to a beaker containing 1000 ml deionised water and place the flask on a magnetic stirrer without heating and stir until all is in solution.
- Add 25 g of skimmed milk.
- Add 1 ml of Tween 20 and continue stirring until all is in solution.

LABEL:

- "Dilution buffer" + date + initials

STORAGE:

1 week at 2 – 8 °C

Made by: _____, on the _____

Name

Date

-Préparation de la solution d'arrêt : H₂SO₄ 0.2M

Volume: 1L

Preparation date: _____

Components	Amount	Batch no.:	Amount used	Check steps done ()
10M H ₂ SO ₄	20 ml			
De-ionized H ₂ O	980 ml			

PROCEDURE:

- Add the indicated amount of water to a flask.
- Add the indicated amount of 10M H₂SO₄.
- Cool to room temperature.

LABEL:

- "0.2 M H₂SO₄" + date + initials

STORAGE:

- 8 months at room temperature

Made by: _____, on the _____

Name

Date

3-2-Modes opératoires

Afin d'exécuter cette procédure, il est recommandé au personnel de porter les gants et d'être vacciné contre l'hépatite B. Les réactifs doivent être manipulés selon les règles de bonnes pratiques de laboratoires. L'exécution des analyses doit strictement suivre la procédure écrite (SOP).

-Dosage des IgG spécifiques d'AMA-1, GLURP-R2 et MSP1

- Sensibilisation des puits de plaque avec l'antigène (Coating)
- D'abord l'initiale du technicien et la date de réalisation sont inscrites sur la plaque.
- Sensibiliser les puits des colonnes 1 à 12 avec 100 µl de l'antigène AMA-1, GLURP-R2, MSP1 dilué à 1.0 µg/ml.
- Couvrez la plaque avec la feuille de plastique adhésive.
- Incuber la plaque pendant une nuit à 2-8°C (la plaque ainsi sensibilisée peut être conservée pendant 21 jours dans le réfrigérateur à 2 à 8°C).
- Blocage des plaques
- Laver la plaque 4 fois avec le tampon de lavage et essorer en tapant contre un papier absorbant.
- Distribuer 200 l de la solution de blocage dans tous les puits.
- Incuber pendant 1 heure, la plaque à la température du laboratoire dans une chambre humide et en agitation lente.
- Addition du premier anticorps (plasma)
- Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et essorer.
- Pendant la période d'incubation du blocage, diluer les sérums témoins positif et négatifs et les plasmas de volontaires au 1:200 dans le tampon de dilution.
- Distribuer 100l des sérums et plasmas dilués dans les puits conformément au schéma de plaque.
- Incuber pendant 2heures la plaque à la température du laboratoire dans une chambre humide en agitation lente.
- Addition du second anticorps ou conjugué
- Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et essorer.
- Distribuer dans les puits 100l du conjugué anti-IgG humaine de chèvre dilué à 1:80000 dans le tampon de dilution.
- Incuber pendant 1heure la plaque à la température du laboratoire dans une chambre humide en agitation lente.
- Addition de substrat (TMB)
- Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et bien essorer.
- Distribuer 100 l de substrat dans chaque puits.
- Incuber pendant 30 minutes à l'abri de la lumière.
- Arrêter la réaction en ajoutant 100l d'une solution H₂SO₄ 0.2M dans chaque puits.

Analyse de la réponse anticorps naturelle contre trois antigènes de *P. falciparum* chez les enfants de 1 à 5 ans vivant à Bandiagara ; Mali

- Lecture et expression des résultats
- Mesurer les densités optiques des puits à l'aide d'un spectrophotomètre à 450 nm avec un filtre de référence de 620 nm en utilisant le logiciel SOFTmaxPRO 5.0.
- Analyser les résultats avec le logiciel ADAMSEL®

Dosage des IgG1 spécifiques d'AMA-1, GLURP-R2 et MSP1

- Sensibilisation des puits de plaque avec l'antigène (Coating)
- D'abord l'initiale du technicien et la date de réalisation sont inscrites sur la plaque.
- Sensibiliser les puits des colonnes 1 à 12 avec 100 µl de l'antigène AMA-1, GLURP-R2, MSP1 dilué à 1.0 µg/ml.
- Couvrir la plaque avec la feuille de plastique adhésive.
- Incuber la plaque pendant une nuit à 2-8°C (la plaque ainsi sensibilisée peut être conservée pendant 21 jours dans le réfrigérateur à 2 à 8°C).
- Blocage des plaques
- Laver la plaque 4 fois avec le tampon de lavage et essorer en tapant contre un papier absorbant.
- Distribuer 200 l de la solution de blocage dans tous les puits.
- Incuber pendant 1 heure, la plaque à la température du laboratoire dans une chambre humide et en agitation lente.
- Addition du premier anticorps (plasma)
- Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et essorer.
- Pendant la période d'incubation du blocage, diluer les sérums témoins positif et négatifs et les plasmas de volontaires au 1:200 dans le tampon de dilution.
- Distribuer 100l des sérums et plasmas dilués dans les puits conformément au schéma de plaque.
- Incuber pendant 2 heures la plaque à la température du laboratoire dans une chambre humide en agitation lente.
- Addition du second anticorps ou conjugué
- Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et essorer.
- Distribuer dans les puits 100l du conjugué anti-IgG humaine de chèvre dilué à 1:5000 dans le tampon de dilution.
- Incuber pendant 1 heure la plaque à la température du laboratoire dans une chambre humide en agitation lente.
- Addition de substrat (TMB)
- Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et bien essorer.
- Distribuer 100 l de substrat dans chaque puits.
- Incuber pendant 30 minutes à l'abri de la lumière.
- Arrêter la réaction en ajoutant 100l d'une solution H₂SO₄ 1M dans chaque puits.
- Lecture et expression des résultats
- Mesurer les densités optiques des puits à l'aide d'un spectrophotomètre à 450 nm avec un filtre de référence de 620 nm en utilisant le logiciel SOFTmaxPRO 5.0.
- Analyser les résultats avec le logiciel ADAMSEL®

Analyse de la réponse anticorps naturelle contre trois antigènes de *P. falciparum* chez les enfants de 1 à 5 ans vivant à Bandiagara ; Mali

-Dosage des IgG2 spécifiques d'AMA-1, GLURP-R2 et MSP1

- Sensibilisation des puits de plaque avec l'antigène (Coating)
- D'abord l'initiale du technicien et la date de réalisation sont inscrites sur la plaque.
- Sensibiliser les puits des colonnes 1 à 12 avec 100 µl de l'antigène AMA-1, GLURP-R2, MSP1 dilués à 1.0 µg/ml.
- Couvrez la plaque avec la feuille de plastique adhésive.
- Incuber la plaque pendant une nuit à 2-8°C (la plaque ainsi sensibilisée peut être conservée pendant 21 jours dans le réfrigérateur à 2 à 8°C).
- Blocage des plaques
- Laver la plaque 4 fois avec le tampon de lavage et essorer en tapant contre un papier absorbant.
- Distribuer 200 µl de la solution de blocage dans tous les puits.
- Incuber pendant 1 heure, la plaque à la température du laboratoire dans une chambre humide et en agitation lente.
- Addition du premier anticorps (plasma)
- Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et essorer.
- Pendant la période d'incubation du blocage, diluer les sérums témoins positif et négatifs et les plasmas de volontaires au 1:200 dans le tampon de dilution.
- Distribuer 100 µl des sérums et plasmas dilués dans les puits conformément au schéma de plaque.
- Incuber pendant 2 heures la plaque à la température du laboratoire dans une chambre humide en agitation lente.
- Addition du second anticorps ou conjugué
- Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et essorer.
- Distribuer dans les puits 100 µl du conjugué anti-IgG humaine de chèvre dilué à 1:2000 dans le tampon de dilution.
- Incuber pendant 1 heure la plaque à la température du laboratoire dans une chambre humide en agitation lente.
- Addition de substrat (TMB)
- Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et bien essorer.
- Distribuer 100 µl de substrat dans chaque puits.
- Incuber pendant 30 minutes à l'abri de la lumière.
- Arrêter la réaction en ajoutant 100 µl d'une solution H₂SO₄ 1M dans chaque puits.
- Lecture et expression des résultats
- Mesurer les densités optiques des puits à l'aide d'un spectrophotomètre à 450 nm avec un filtre de référence de 620 nm en utilisant le logiciel SOFTmaxPRO 5.0.
- Analyser les résultats avec le logiciel ADAMSEL®

-Dosage des IgG3 spécifiques d'AMA-1, GLURP-R2 et MSP1₁₉,

- Sensibilisation des puits de plaque avec l'antigène (Coating)
- D'abord l'initiale du technicien et la date de réalisation sont inscrites sur la plaque.
- Sensibiliser les puits des colonnes 3 à 12 avec 100 µl de l'antigène AMA-1, GLURP-R2, MSP1 dilué à 1.0 µg/ml.
- Couvrez la plaque avec la feuille de plastique adhésive.
- Incuber la plaque pendant une nuit à 2-8°C (la plaque ainsi sensibilisée peut être conservée pendant 21 jours dans le réfrigérateur à 2 à 8°C).
- Blocage des plaques
- Laver la plaque 4 fois avec le tampon de lavage et essorer en tapant contre un papier absorbant.
- Distribuer 200 l de la solution de blocage dans tous les puits.
- Incuber pendant 1 heure, la plaque à la température du laboratoire dans une chambre humide et en agitation lente.
- Addition du premier anticorps (plasma)
- Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et essorer.
- Pendant la période d'incubation du blocage, diluer les sérums témoins positif et négatifs et les plasmas de volontaires au 1:200 dans le tampon de dilution.
- Distribuer 100l des sérums et plasmas dilués dans les puits conformément au schéma de plaque.
- Incuber pendant 2heures la plaque à la température du laboratoire dans une chambre humide en agitation lente.
- Addition du second anticorps ou conjugué
- Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et essorer.
- Distribuer dans les puits 100l du conjugué anti-IgG humaine de chèvre dilué à 1:3000 dans le tampon de dilution.
- Incuber pendant 1heure la plaque à la température du laboratoire dans une chambre humide en agitation lente.
- Addition de substrat (TMB)
- Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et bien essorer.
- Distribuer 100 l de substrat dans chaque puits.
- Incuber pendant 30 minutes à l'abri de la lumière.
- Arrêter la réaction en ajoutant 100l d'une solution H₂SO₄ 1M dans chaque puits.
- Lecture et expression des résultats
- Mesurer les densités optiques des puits à l'aide d'un spectrophotomètre à 450 nm avec un filtre de référence de 620 nm en utilisant le logiciel SOFTmaxPRO 5.0.
- Analyser les résultats avec le logiciel ADAMSEL®

-Dosage des IgG4 spécifiques d'AMA-1, GLURP-R2 et MSP1

- Sensibilisation des puits de plaque avec l'antigène (Coating)
- D'abord l'initiale du technicien et la date de réalisation sont inscrites sur la plaque.
- Sensibiliser les puits des colonnes 1 à 12 avec 100 µl de l'antigène AMA-1, GLURP-R2, MSP1 dilué à 1.0 µg/ml.
- Couvrez la plaque avec la feuille de plastique adhésive.
- Incuber la plaque pendant une nuit à 2-8°C (la plaque ainsi sensibilisée peut être conservée pendant 21 jours dans le réfrigérateur à 2 à 8°C).
- Blocage des plaques
- Laver la plaque 4 fois avec le tampon de lavage et essorer en tapant contre un papier absorbant.
- Distribuer 200l de la solution de blocage dans tous les puits.
- Incuber pendant 1 heure, la plaque à la température du laboratoire dans une chambre humide et en agitation lente.
- Addition du premier anticorps (plasma)
- Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et essorer.
- Pendant la période d'incubation du blocage, diluer les sérums témoins positif et négatifs et les plasmas de volontaires au 1:200 dans le tampon de dilution.
- Distribuer 100l des sérums et plasmas dilués dans les puits conformément au schéma de plaque.
- Incuber pendant 2heures la plaque à la température du laboratoire dans une chambre humide en agitation lente.
- Addition du second anticorps ou conjugué
- Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et essorer.
- Distribuer dans les puits 100l du conjugué anti-IgG humaine de chèvre dilué à 1:1000 dans le tampon de dilution.
- Incuber pendant 1heure la plaque à la température du laboratoire dans une chambre humide en agitation lente.
- Addition de substrat (TMB)
- Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et bien essorer.
- Distribuer 100 l de substrat dans chaque puits.
- Incuber pendant 30 minutes à l'abri de la lumière.
- Arrêter la réaction en ajoutant 100l d'une solution H₂SO₄ 1M dans chaque puits.
- Lecture et expression des résultats
- Mesurer les densités optiques des puits à l'aide d'un spectrophotomètre à 450 nm avec un filtre de référence de 620 nm en utilisant le logiciel SOFTmaxPRO 5.0.
- Analyser les résultats avec le logiciel ADAMSEL®

-Dosage des IgM spécifiques d'AMA-1, GLURP-R2 et MSP1

- Sensibilisation des puits de plaque avec l'antigène (Coating)
- D'abord l'initiale du technicien et la date de réalisation sont inscrites sur la plaque.
- Sensibiliser les puits des colonnes 1 à 12 avec 100 µl de l'antigène AMA-1, GLURP-R2, MSP-1 dilué à 1.0 µg/ml.
- Couvrir la plaque avec la feuille de plastique adhésive.
- Incuber la plaque pendant une nuit à 2-8°C (la plaque ainsi sensibilisée peut être conservée pendant 21 jours dans le réfrigérateur à 2 à 8°C).
- Blocage des plaques
- Laver la plaque 4 fois avec le tampon de lavage et essorer en tapant contre un papier absorbant.
- Distribuer 200 l de la solution de blocage dans tous les puits.
- Incuber pendant 1 heure, la plaque à la température du laboratoire dans une chambre humide et en agitation lente.
- Addition du premier anticorps (plasma)
- Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et essorer.
- Pendant la période d'incubation du blocage, diluer les sérums témoins positif et négatifs et les plasmas de volontaires au 1:200 dans le tampon de dilution.
- Distribuer 100l des sérums et plasmas dilués dans les puits conformément au schéma de plaque.
- Incuber pendant 2 heures la plaque à la température du laboratoire dans une chambre humide en agitation lente.
- Addition du second anticorps ou conjugué
- Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et essorer.
- Distribuer dans les puits 100l du conjugué anti-IgM humaine de chèvre dilué à 1:6000 dans le tampon de dilution.
- Incuber pendant 1heure la plaque à la température du laboratoire dans une chambre humide en agitation lente.
- Addition de substrat (TMB one)
- Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et bien essorer.
- Distribuer 100 l de substrat dans chaque puits.
- Incuber pendant 30 minutes à l'abri de la lumière.
- Arrêter la réaction en ajoutant 100l d'une solution H₂SO₄ 1M dans chaque puits.
- Lecture et expression des résultats
- Mesurer les densités optiques des puits à l'aide d'un spectrophotomètre à 450 nm avec un filtre de référence de 620nm en utilisant le logiciel SOFTmaxPRO 5.0.
- Analyser les résultats avec le logiciel ADAMSEL®
Les seuils de détection étaient de 1000 ng/ml pour les IgG et IgM.

3-3- Feuilles de pailasse

Protocol de travail ELISA IgG												
Date :	Objectif: quantification d'anticorps IgG spécifiques à l'antigène AMA1-FVO ou MSP1 hyb ou GLURP-R2											Cocher les étapes faites ()
N° de série :												
Initiales :												
Sensibilisation	Distribuer 100 µl par puits de rAg : AMA1-FVO ou MSP1 hyb ou GLURP-R2 dans le PBS à 1 µg/ml des colonnes 1 - 12. Plaque: NUNC 439454 Maxisorb								Date de sensibilisation		4C	
Lavage	Tampon de lavage								4 x 1 min.			
Blocage	200 l par puits du tampon de blocage								1 h en agitation			
Lavage	Tampon de lavage								4 x 1 min.			
Incubation avec le premier anticorps.	Distribuer 100 l par puits de a) de standard dans les lignes 1 et 2 et b) les contrôle positif(PC) et négatif (NC) et le blanc c) les échantillons de sérum sont dilués distribuer comme ci-dessous.								2 h en agitation			
Lavage	Tampon de lavage								4 x 1 min.			
Incubation avec le second anticorps.	Conjuguée Anti-IgG humaine de chèvre couplé à la Peroxydase (Caltag) diluée à 1:80000 dans le tampon de dilution. Ajouter 100 l dans les puits								1 h en agitation			
Lavage	Tampon de lavage								4 x 1 min.			
Réaction de coloration	100 l de la solution de mélange à part égale de TMB et H ₂ O ₂ dans chaque puits.								30 min. à la température du labo à l'obscurité			
Arrêt	100 l de 0.2 M H ₂ SO ₄ puis Lecture à 450 nm, réf. 620 nm											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std IgG*	50	125	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.195	0.097	0.048
	100ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml
B	Std IgG	50	P25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.195	0.097	0.048
	100ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml
C	PC	PC	S-1	S-1	S-2	S-2	S-3	S-3	S-4	S-4	S-5	S-5
D	NC	NC	S-6	S-6	S-7	S-7	S-8	S-8	S-9	S-9	S-10	S-10
E	Blanc	Blanc	S-11	S-11	S-12	S-12	S-13	S-13	S-14	S-14	S-15	S-15
F	Blanc	Blanc	S-16	S-16	S-17	S-17	S-18	S-18	S-19	S-19	S-20	S-20
G	S-21	S-21	S-22	S-22	S-23	S-23	S-24	S-24	S-25	S-25	S-26	S-26
H	S-27	S-27	S-28	S-28	S-29	S-29	S-30	S-30	S-31	S-31	S-32	S-32

Analyse de la réponse anticorps naturelle contre trois antigènes de *P. falciparum* chez les enfants de 1 à 5 ans vivant à Bandiagara ; Mali

Protocole de travail ELISA IgG1

Date: N° de série : Initiales :	Objectif: quantification d'anticorps IgG1 spécifiques à l'antigène AMA1-FVO ou MSP1 hyb ou GLURP-R2										Cocher les étapes faites ()	
Sensibilisation	Distribuer 100 µl par puits de rAg : AMA1-FVO ou MSP1hyb ou GLURP-R2 dans le PBS à 1 µg/ml des colonnes 1 - 12. Plaque: NUNC 439454 Maxisorb								Date de sensibilisation 4C			
Lavage	Tampon de lavage								4 x 1 min.			
Blocage	200 l par puits du tampon de blocage								1 h en agitation			
Lavage	Tampon de lavage								4 x 1 min.			
Incubation avec le premier anticorps.	Distribuer 100 l par puits de a) de standard dans les lignes 1 et 2 et b) les contrôle positif(PC) et négatif (NC) et le blanc c) les échantillons de sérum sont dilués distribuer comme ci-dessous.								2 h en agitation			
Lavage	Tampon de lavage								4 x 1 min.			
Incubation avec le second anticorps.	Conjuguée Anti-IgG humaine de chèvre couplé à la Peroxydase (Caltag) diluée à 1:5000 dans le tampon de dilution. Ajouter 100 l dans les puits								1 h en agitation			
Lavage	Tampon de lavage								4 x 1 min.			
Réaction de coloration	100 l de la solution de mélange à part égale de TMB et H ₂ O ₂ dans chaque puits.								30 min. à la température du labo à l'obscurité			
Arrêt	100 l de 0.2 M H ₂ SO ₄ puis Lecture à 450 nm, réf. 620 nm											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std IgG*	50	125	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.195	0.097	0.048
	100ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml
B	Std IgG	50	P25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.195	0.097	0.048
	100ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml
C	PC	PC	S-1	S-1	S-2	S-2	S-3	S-3	S-4	S-4	S-5	S-5
D	NC	NC	S-6	S-6	S-7	S-7	S-8	S-8	S-9	S-9	S-10	S-10
E	Blanc	Blanc	S-11	S-11	S-12	S-12	S-13	S-13	S-14	S-14	S-15	S-15
F	Blanc	Blanc	S-16	S-16	S-17	S-17	S-18	S-18	S-19	S-19	S-20	S-20
G	S-21	S-21	S-22	S-22	S-23	S-23	S-24	S-24	S-25	S-25	S-26	S-26
H	S-27	S-27	S-28	S-28	S-29	S-29	S-30	S-30	S-31	S-31	S-32	S-32

Analyse de la réponse anticorps naturelle contre trois antigènes de *P. falciparum* chez les enfants de 1 à 5 ans vivant à Bandiagara ; Mali

Protocole de travail ELISA IgG2												
Date: N° de série : Initiales :	Objectif: quantification d'anticorps IgG2 spécifiques à l'antigène AMA1-FVO ou MSP1 hyb ou GLURP-R2										Cocher les étapes faites ()	
Sensibilisation	Distribuer 100 µl par puits de rAg : AMA1-FVO ou MSP1hyb ou GLURP-R2 dans le PBS à 1 µg/ml des colonnes 1 - 12. Plaque: NUNC 439454 Maxisorb								Date de sensibilisation 4C			
Lavage	Tampon de lavage								4 x 1 min.			
Blocage	200 l par puits du tampon de blocage								1 h en agitation			
Lavage	Tampon de lavage								4 x 1 min.			
Incubation avec le premier anticorps.	Distribuer 100 l par puits de a) de standard dans les lignes 1 et 2 et b) les contrôle positif(PC) et négatif (NC) et le blanc c) les échantillons de sérum sont dilués distribuer comme ci-dessous.								2 h en agitation			
Lavage	Tampon de lavage								4 x 1 min.			
Incubation avec le second anticorps.	Conjuguée Anti-IgG humaine de chèvre couplé à la Peroxydase (Caltag) diluée à 1:2000 dans le tampon de dilution. Ajouter 100 l dans les puits								1 h en agitation			
Lavage	Tampon de lavage								4 x 1 min.			
Réaction de coloration	100 l de la solution de mélange à part égale de TMB et H ₂ O ₂ dans chaque puits.								30 min. à la température du labo à l'obscurité			
Arrêt	100 l de 0.2 M H ₂ SO ₄ puis Lecture à 450 nm, réf. 620 nm											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std IgG*	50	125	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.195	0.097	0.048
	100ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml
B	Std IgG	50	P25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.195	0.097	0.048
	100ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml
C	PC	PC	S-1	S-1	S-2	S-2	S-3	S-3	S-4	S-4	S-5	S-5
D	NC	NC	S-6	S-6	S-7	S-7	S-8	S-8	S-9	S-9	S-10	S-10
E	Blanc	Blanc	S-11	S-11	S-12	S-12	S-13	S-13	S-14	S-14	S-15	S-15
F	Blanc	Blanc	S-16	S-16	S-17	S-17	S-18	S-18	S-19	S-19	S-20	S-20
G	S-21	S-21	S-22	S-22	S-23	S-23	S-24	S-24	S-25	S-25	S-26	S-26
H	S-27	S-27	S-28	S-28	S-29	S-29	S-30	S-30	S-31	S-31	S-32	S-32

Analyse de la réponse anticorps naturelle contre trois antigènes de *P. falciparum* chez les enfants de 1 à 5 ans vivant à Bandiagara ; Mali

Protocole de travail ELISA IgG3

Date: N° de série : Initiales :	Objectif: quantification d'anticorps IgG3 spécifiques à l'antigène AMA1-FVO ou MSP1 hyb ou GLURP-R2										Cocher les étapes faites	
Sensibilisation	Distribuer 100 µl par puits de rAg : AMA1-FVO ou MSP1hyb ou GLURP-R2 dans le PBS à 1 µg/ml des colonnes 1 - 12. Plaque: NUNC 439454 Maxisorb								Date de sensibilisation 4°C			
Lavage	Tampon de lavage								4 x 1 min.			
Blocage	200 l par puits du tampon de blocage								1 h en agitation			
Lavage	Tampon de lavage								4 x 1 min.			
Incubation avec le premier anticorps.	Distribuer 100 l par puits de a) de standard dans les lignes 1 et 2 et b) les contrôle positif(PC) et négatif (NC) et le blanc c) les échantillons de sérum sont dilués distribuer comme ci-dessous.								2 h en agitation			
Lavage	Tampon de lavage								4 x 1 min.			
Incubation avec le second anticorps.	Conjuguée Anti-IgG humaine de chèvre couplé à la Peroxydase (Caltag) diluée à 1:3000 dans le tampon de dilution. Ajouter 100 l dans les puits								1 h en agitation			
Lavage	Tampon de lavage								4 x 1 min.			
Réaction de coloration	100 l de la solution de mélange à part égale de TMB et H ₂ O ₂ dans chaque puits.								30 min. à la température du labo à l'obscurité			
Arrêt	100 l de 0.2 M H ₂ SO ₄ puis Lecture à 450 nm, réf. 620 nm											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std IgG*	50	125	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.195	0.097	0.048
	100ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml
B	Std IgG	50	P25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.195	0.097	0.048
	100ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml
C	PC	PC	S-1	S-1	S-2	S-2	S-3	S-3	S-4	S-4	S-5	S-5
D	NC	NC	S-6	S-6	S-7	S-7	S-8	S-8	S-9	S-9	S-10	S-10
E	Blanc	Blanc	S-11	S-11	S-12	S-12	S-13	S-13	S-14	S-14	S-15	S-15
F	Blanc	Blanc	S-16	S-16	S-17	S-17	S-18	S-18	S-19	S-19	S-20	S-20
G	S-21	S-21	S-22	S-22	S-23	S-23	S-24	S-24	S-25	S-25	S-26	S-26
H	S-27	S-27	S-28	S-28	S-29	S-29	S-30	S-30	S-31	S-31	S-32	S-32

Analyse de la réponse anticorps naturelle contre trois antigènes de *P. falciparum* chez les enfants de 1 à 5 ans vivant à Bandiagara ; Mali

Protocole de travail ELISA IgG4

Date: N° de série : Initiales :	Objectif: quantification d'anticorps IgG4 spécifiques à l'antigène AMA1-FVO ou MSP1 hyb ou GLURP-R2										Cocher les étapes faites	
Sensibilisation	Distribuer 100 µl par puits de rAg : AMA1-FVO ou MSP1hyb ou GLURP-R2 dans le PBS à 1 µg/ml des colonnes 1 - 12. Plaque: NUNC 439454 Maxisorb								Date de sensibilisation 4°C			
Lavage	Tampon de lavage								4 x 1 min.			
Blocage	200 l par puits du tampon de blocage								1 h en agitation			
Lavage	Tampon de lavage								4 x 1 min.			
Incubation avec le premier anticorps.	Distribuer 100 l par puits de a) de standard dans les lignes 1 et 2 et b) les contrôle positif(PC) et négatif (NC) et le blanc c) les échantillons de sérum sont dilués distribuer comme ci-dessous.								2 h en agitation			
Lavage	Tampon de lavage								4 x 1 min.			
Incubation avec le second anticorps.	Conjuguée Anti-IgG humaine de chèvre couplé à la Peroxydase (Caltag) diluée à 1:1000 dans le tampon de dilution. Ajouter 100 l dans les puits								1 h en agitation			
Lavage	Tampon de lavage								4 x 1 min.			
Réaction de coloration	100 l de la solution de mélange à part égale de TMB et H ₂ O ₂ dans chaque puits.								30 min. à la température du labo à l'obscurité			
Arrêt	100 l de 0.2 M H ₂ SO ₄ puis Lecture à 450 nm, réf. 620 nm											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std IgG*	50	125	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.195	0.097	0.048
	100ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml
B	Std IgG	50	P25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.195	0.097	0.048
	100ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml
C	PC	PC	S-1	S-1	S-2	S-2	S-3	S-3	S-4	S-4	S-5	S-5
D	NC	NC	S-6	S-6	S-7	S-7	S-8	S-8	S-9	S-9	S-10	S-10
E	Blanc	Blanc	S-11	S-11	S-12	S-12	S-13	S-13	S-14	S-14	S-15	S-15
F	Blanc	Blanc	S-16	S-16	S-17	S-17	S-18	S-18	S-19	S-19	S-20	S-20
G	S-21	S-21	S-22	S-22	S-23	S-23	S-24	S-24	S-25	S-25	S-26	S-26
H	S-27	S-27	S-28	S-28	S-29	S-29	S-30	S-30	S-31	S-31	S-32	S-32

Analyse de la réponse anticorps naturelle contre trois antigènes de *P. falciparum* chez les enfants de 1 à 5 ans vivant à Bandiagara ; Mali

Protocole de travail ELISA IgM

Date: N° de série : Initiales :	Objectif: quantification d'anticorps IgM spécifiques à l'antigène AMA1-FVO ou MSP1 hyb ou GLURP-R2										Cocher les étapes faites	
Sensibilisation	Distribuer 100 µl par puits de rAg : AMA1-FVO ou MSP1hyb ou GLURP-R2 dans le PBS à 1 µg/ml des colonnes 1 - 12. Plaque: NUNC 439454 Maxisorb								Date de sensibilisation 4°C			
Lavage	Tampon de lavage								4 x 1 min.			
Blocage	200 l par puits du tampon de blocage								1 h en agitation			
Lavage	Tampon de lavage								4 x 1 min.			
Incubation avec le premier anticorps.	Distribuer 100 l par puits de a) de standard dans les lignes 1 et 2 et b) les contrôle positif(PC) et négatif (NC) et le blanc c) les échantillons de sérum sont dilués distribuer comme ci-dessous.								2 h en agitation			
Lavage	Tampon de lavage								4 x 1 min.			
Incubation avec le second anticorps.	Conjuguée Anti-IgG humaine de chèvre couplé à la Peroxydase (Caltag) diluée à 1:6000 dans le tampon de dilution. Ajouter 100 l dans les puits								1 h en agitation			
Lavage	Tampon de lavage								4 x 1 min.			
Réaction de coloration	100 l de la solution de mélange à part égale de TMB et H ₂ O ₂ dans chaque puits.								30 min. à la température du labo à l'obscurité			
Arrêt	100 l de 0.2 M H ₂ SO ₄ puis Lecture à 450 nm, réf. 620 nm											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std IgG*	50	125	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.195	0.097	0.048
	100ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml
B	Std IgG	50	P25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.195	0.097	0.048
	100ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml
C	PC	PC	S-1	S-1	S-2	S-2	S-3	S-3	S-4	S-4	S-5	S-5
D	NC	NC	S-6	S-6	S-7	S-7	S-8	S-8	S-9	S-9	S-10	S-10
E	Blanc	Blanc	S-11	S-11	S-12	S-12	S-13	S-13	S-14	S-14	S-15	S-15
F	Blanc	Blanc	S-16	S-16	S-17	S-17	S-18	S-18	S-19	S-19	S-20	S-20
G	S-21	S-21	S-22	S-22	S-23	S-23	S-24	S-24	S-25	S-25	S-26	S-26
H	S-27	S-27	S-28	S-28	S-29	S-29	S-30	S-30	S-31	S-31	S-32	S-32

SERMENT DE GALIEN



JE JURE, EN PRÉSENCE DES MAÎTRES DE LA FACULTÉ, DES CONSEILLERS DE L'ORDRE DES PHARMACIENS ET DE MES CONDISCIPLES :

D'HONORER CEUX QUI M'ONT INSTRUIT DANS LES PRÉCEPTES DE MON ART ET DE LEUR TÉMOIGNER MA RECONNAISSANCE EN RESTANT FIDÈLE À LEUR ENSEIGNEMENT ;

D'EXERCER DANS L'INTÉRÊT DE LA SANTÉ PUBLIQUE, MA PROFESSION AVEC CONSCIENCE ET DE RESPECTER NON SEULEMENT LA LÉGISLATION EN VIGUEUR MAIS AUSSI LES RÈGLES DE L'HONNEUR, DE LA PROBITÉ ET DU DÉsINTÉRESSEMENT ;

DE NE JAMAIS OUBLIER MA RESPONSABILITÉ ET MES DEVOIRS ENVERS LE MALADE ET SA DIGNITÉ HUMAINE.

EN AUCUN CAS, JE NE CONSENTIRAI À UTILISER MES CONNAISSANCES ET MON ÉTAT POUR CORROMPRE LES MŒURS ET FAVORISER LES ACTES CRIMINELS.

QUE LES HOMMES M'ACCORDENT LEUR ESTIME SI JE SUIS FIDÈLE À MES PROMESSES.

QUE JE SOIS COUVERT D'OPPROBRE ET MÉPRISÉ DE MES CONFRÈRES SI J'Y MANQUE.

JE LE JURE !