

Ministère de l'Éducation Nationale

République du Mali

Un Peuple – Un But – Une Foi

UNIVERSITE DE BAMAKO

**FACULTE DE MEDECINE DE PHARMACIE ET
D'ODONTO-STOMATOLOGIE**



Année Universitaire 2005 - 2006

Thèse N° /...../

**VALIDATION D'UNE TECHNIQUE ELISA POUR
L'EVALUATION DE L'IMMUNOGENICITE EN PHASE Ib DU
CANDIDAT VACCIN AMA1-C1/ALHYDROGEL CONTRE LE
PLASMODIUM FALCIPARUM AU MALI.**

Présentée et soutenue publiquement le / / 2006

par : **Mlle Merepen dite Agnès GUINDO**

Pour obtenir le Grade de Docteur en Pharmacie (DIPLOME D'ETAT)

JURY

PRESIDENT: Professeur Ogobara K. DOUMBO

MEMBRES: Docteur Boubacar TRAORE

Docteur Alassane DICKO

DIRECTEUR DE THESE : Professeur Agregé Amagana DOLO

Ce travail a bénéficié de l'appui financier du NIH

DEDICACES

REMERCIEMENTS

DEDICACES.

A l'Emmanuel, Dieu d'Amour, à qui je dois toutes choses,

Louanges et gloire !

Je dédie ce travail

A mon père : Feu Jean GUINDO

Ton départ prématuré a laissé un grand vide dans mon cœur.

Tes conseils et ton souci permanent du travail bien fait ont forgé cet Homme que je suis devenue. Ton affection ne nous a jamais fait défaut. Ce modeste travail est l'occasion pour moi de te signifier ma gratitude.

Nous aurions voulu te voir là assis en ce jour solennel, mais Dieu en a décidé autrement. Dors en paix très cher papa, et que Dieu t'accorde le repos éternel. *Amen!*

A ma mère : Monique TOGO

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

A la mémoire des regrettés de la famille GUINDO : Feues oncles Alain, Maurice, Isidore GUINDO ; Sylvain, René TOGO, tantes Chantal GUINDO et Françoise TOGO, sœur Blandine GUINDO Merci pour tout ce que vous avez consenti pour moi. Reposez en paix mes chers et que Dieu vous accorde son paradis éternel. *Amen!*

A mes frères et sœurs : Rosalie, Samuel, Germaine, Joseph, Sylvain, Michel, Issaka, Moïse Amadou, Ivonne GUINDO

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

REMERCIEMENTS

A tous les Professeurs responsables de cours à la FMPOS, pour la qualité de l'enseignement que nous avons reçu d'eux.

Aux membres de l'unité d'immunologie et GLP : Dr Mounirou BABY, Dr Boureima KOURIBA, Dr Bakary MAIGA, Dr Modibo DAOU, Dr Charles ARAMA, Dr Mady SISSOKO, Dr Daniel YALCOUYE, Dr Issa DIARRA, Dr Yacouba CISSOKO, Mrs Moussa B. DEMBELE, Georges Amasagou DARA, Sekouba KEITA, Abdoul Salam KEITA, pour votre entière disponibilité, votre soutien, et votre sympathie. Ce travail est le vôtre. Je vous en suis sincèrement reconnaissant.

A l'équipe clinique de Donéguébougou pour la qualité de la récolte des données sur le terrain

Au Dr Issaka SAGARA pour l'analyse des données

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

A nos partenaires du NIH, particulièrement au Docteur David DIEMERT, aux Professeurs Louis MILLER, Allan SAUL, Carole LONG et à la technicienne Olga MURATOVA.

Au Docteur Richard SAKAI et a Mr KAREMBE pour l'organisation de la logistique sur le terrain.

Au moniteur clinique : Professeur Aly GUINDO

Aux moniteurs de l'OMS et du PPD

A mes maîtres et mes aînés: Pr Abdoulaye DABO , Dr Boubacar TRAORE, Dr Abdoulaye DJIMDE, Dr Mamadou DIAKITE, Dr Mouctar DIALLO, Dr Amed OUATARA, Dr Mahamadou SISSOKO, Dr Belco POUDIOUGO, Dr Aldiouma GUINDO, Dr Kassoum KAYENTAO, Dr Issiaka SAGARA, Mr Ousmane TOURE, Dr Habib BEAVOGUI, Dr Moussa SOGOBA, Dr DOUMBO Safi NIARE, Dr Mamadou TEKETE, Dr ONGOIBA Aissata ONGOIBA, Dr DOUMTABE Didier, Dr Aboubacar A. OUMAR, Dr Abdoulaye KATILE, Dr Abdoulaye K. KONE, Dr Drissa COULIBALY, Dr Ando GUINDO, Dr Karim TRAORE, Dr Sory DIAWARA, Dr Mohamed ASSADOU, Dr Ousmane GUINDO, Dr Beh KAMATE, Dr Touré Dinkorma Ina OUOLOGUEM, Dr Bakary SIDIBE, Dr Bakary FOFANA, Dr Hamma MAIGA, Dr Demba , Dr Cheik SANGARE, Mr Mamadou WELE, Mr Mamadou BA, Mr Seydou DIARRA, Mr Amadou ABATINA, merci pour vos enseignements et vos soutiens.

Au Pr. Moussa HARAMA, merci cher maître et grand père pour les conseils que vous me prodiguez régulièrement.

Aux : Dr Amadou NIANGALY, M^{lle} Aminatou KONE, Dr Modibo COULIBALY, Dr Karim TRAORE, Dr Renion SAYE, Dr Seidina DIAKITE, Dr Etienne GUIROU, Dr Souleymane DAMA, Mlle Christelle N'DONG, Mlle Oumou MAIGA, Dr Oumar YATTARA, Dr Cheik AT DABO, Dr Kourané SISSOKO, Dr Oumar BILA, Dr Abdoulaye ARAMA, Mr Zoumana TRAORE, Paul KAMATE, Younous KONE, Abdrahamane TRAORE, Aboudramane BATHILY, Boubacar NIARE, Hamidou NIANGALY, Moussa DJIMDE, Nouhoum GUINDO, Moussa NIANGALY, Hamidou TRAORE.

A mes cadets: Youssouf TOLO, Antoine DARA, Ousmane KANTE,

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

Aux autorités et notables de Kati et à toute la population de Donéguébougou.

A tout le personnel du MRTC/DEAP.

A tous les chauffeurs du MRTC / DEAP

A mon oncle **Edmond TOGO** et Famille Je vous dis grand merci

A **mes cousins et cousines** GUINDO, TOGO, TEMBELY, MAIGA, SAWADOGO

A mes amis tous et toutes merci.

A mon cousin **Ergoli TOGO** et sa famille, pour votre sympathie, vos conseils et tout votre soutien. Je vous en suis profondément reconnaissant et soyez rassurés de mon attachement.

Aux familles GUINDO à Sevaré, TOGO à Bandiagara, MAIGA au Point G, BAGAYOGO à Magnanbouyou, SYLLA au point G, Recevez ici l'expression de toute ma reconnaissance et merci votre soutien indéfectible.

A mon beau frère **Armand TOGO** : retrouvez ici le fruit de vos conseils et je vous remercie infiniment pour le soutien moral et matériel. Vous avez été pour moi comme un père. Que Dieu vous donne longue vie et guide vos pas.

Aux Pères Yves Pauwels, Manolo, et aux Abbés

A mes frères et sœurs de Ginna-Dogon et de la communauté catholique du point G et leurs accompagnateurs

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

Remerciements aux membres du jury

A notre Maître et Président de Jury

Professeur Ogobara K. DOUMBO

Professeur Titulaire de Parasitologie et de Mycologie à la faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie

Médecin chef du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires

Permettez-nous de vous remercier cher maître de la confiance que vous nous avez faites en nous acceptant à vos côtés.

Veuillez accepter le témoignage de notre sincère et profonde gratitude.

A notre Maître et juge

Dr Boubacar TRAORE

Assistant d'immunologie à la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie,

Responsable de l'unité Paludisme/Grossesse et Immuno-pathologie du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires

Cher Maître, c'est un grand honneur que vous nous faites en acceptant de siéger à ce jury.

Veuillez accepter, l'expression de notre profonde reconnaissance.

A notre Maître et juge

Dr Alassane DICKO

Maître assistant de Santé Publique à la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie,

Responsable de l'unité d'épidémiologie du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires

Cher maître, c'est un grand plaisir pour nous de travailler avec vous.

Permettez-nous de vous exprimer toute notre gratitude et notre profond respect.

A notre Maître et directeur de thèse

Professeur Amagana DOLO

Maître de conférence Agrégé de Parasitologie-Mycologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie.

Responsable de l'unité d'Immunologie du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires

Permettez-nous de vous réitérer, cher maître l'expression de notre profonde gratitude et de notre indéfectible disponibilité.

LISTE DES ABREVIATIONS

3D7:	Souche de <i>Plasmodium falciparum</i>
ADCI:	Antibody Dependant Cell-mediated Inhibition
ADN:	Acide désoxyribonucléique
AMA-1:	Apical Membrane Antigen1
AMM :	Autorisation de Mise sur le Marché.
CRF :	Case Report Form
CSP:	Circum Sporozoïte Protein
CTL:	Cytotoxic T Lymphocyte
DEAP : Parasitaires	Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires
DMB :	Data Monitoring Board
EDTA :	Ethylène Diamine Tetra-Acétique
ELISA :	Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
GIA :	Growth Inhibition Assay
GIS/GPS: System	Geographic Information System / Global Position System
G-6 PD :	Glucose-6 Phosphate Déshydrogénase
Hb :	Hémoglobine
HbA :	Hémoglobine A
HbC :	Hémoglobine C
HbF :	Hémoglobine Foetale
HbS:	Hémoglobine S
HCG:	Human Chorionic Gonatrophin
HLA:	Human Leucocyte Antigen
IFNγ :	Interféron gamma
Ig E :	Immunoglobuline E
Ig G :	Immunoglobuline G
IL :	Interleukine
KDa:	Kilo dalton

LSA :	Liver Stage specific Antigen
MM:	Moniteur Médical
MRTC:	Malaria Research and Training Center
MSP1:	Merozoite Surface Protein 1
MVDB:	Malaria Vaccine Development Branch
MVDU:	Malaria Vaccine Development Unit
NIAID:	National Institute of Allergy and Infectious Diseases
NIH:	National Institute of Health
NPP:	Nitro-Phenyl-Phosphate de sodium
OMS:	Organisation Mondiale de la Santé
OD:	Optic Density
PBS:	Phosphate Buffer Saline
PIB :	Produit Intérieur Brut
Pfs25:	Antigène du gaméocyte de <i>Plasmodium falciparum</i>
Pfs28:	Antigène du gaméocyte de <i>Plasmodium falciparum</i>
RESA:	Ring-infected Erythrocyte Surface Antigen
RTS, S:	Fusion protéique entre l'antigène circumsporozoite protéin du <i>Plasmodium falciparum</i> et HbsAg (Antigène de surface du virus d'hépatite B)
SCI:	Statistic Cooperative Initiative
SPf66:	Synthetic polypeptid <i>Plasmodium falciparum</i> 66
SST:	Serum Separator Tube
TBVs:	Transmission Blocking Vaccines
TH:	T Helper
TNF:	Tumor Necrosis Factor
TRAP:	Thrombospondin Related Adhesion Protein
WRAIR:	Walter Red Army Institute of Research.
WHO:	World Health Organization



SOMMAIRE

SOMMAIRE

I.	INTRODUCTION	17
II.	OBJECTIFS	21
III.	GENERALITES	23
1.	Immunologie du paludisme	24
1.1.	Les paramètres biologiques qui influencent le parasite	24
1.2.	La réponse immunitaire humorale au cours de l'infection palustre	25
1.3.	La phagocytose et l'opsonisation	27
1.4.	Immunité naturelle induite par <i>P. falciparum</i>	27
1.5.	Immunogénicité	28
2.	Vaccination antipalustre	30
2.1.	Les différents types de vaccin	30
2.2.	Les principales difficultés	33
2.3.	Evaluation de l'efficacité des vaccins sur le terrain	38
2.4.	Les vaccins antipaludiques en cours d'étude ou d'essais	39
3.	AMA1	41
3.1.	Historique	41
3.2.	Structure	41
3.3.	Mécanisme d'action	43
3.4.	Vaccin AMA1-C1	43
3.5.	Le Recombivax HB	44
IV.	METHODOLOGIE	45
1.	Lieu d'étude	46
2.	Période d'étude	51

3. Population d'étude-----	51
4. Type d'étude-----	51
5. Sélection et recrutement des volontaires-----	53
6. Organisation pratique du travail-----	55
7. Etude immunologique-----	57
8. Considérations éthiques : -----	64
9. Collecte, saisie, analyse des données-----	65
V. RESULTATS-----	66
V.1 Caractéristiques sociodémographiques de la population d'étude-----	67
V.2 Contrôle de qualité des résultats : comparaison des résultats NIH – MRTC--	68
V.3 Evaluation de l'immunogénicité-----	69
VI. DISCUSSION-----	91
VII. CONCLUSION-----	100
VIII. RECOMMANDATIONS-----	101
IX. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES-----	102
RESUME-----	115

<u>Figure 1</u> : Différents types de vaccins antipaludiques et leurs cibles.....	32
<u>Figure 2</u> : structure du gel de l'hydroxyde d'aluminium.....	37
<u>Figure 3</u> : Localisation de AMA 1.....	42
<u>Figure 4</u> : Localisation du site d'étude.....	48
<u>Figure 5</u> : Plan du village de Donéguébougou.....	49
<u>Figure 6</u> : Différentes étapes de l'ELISA.....	52
<u>Figure 7</u> : Correlation entre les tests ELISA réalisés au MRTC et MVDB.....	68
<u>Figure 8</u> : Niveau d'anticorps anti-AMA1 Fvo selon les groupes d'âge à l'inclusion et au cours du suivi.....	69
<u>Figure 9</u> : Niveau d'anticorps anti-AMA1 3D7 selon les groupes d'âge à l'inclusion et au cours du suivi.....	69
<u>Figure 10</u> : Evolution du niveau d'anticorps anti-AMA1 Fvo de la cohorte 1 dans les deux groupes d'étude.....	71
<u>Figure 11</u> : Evolution du niveau d'anticorps anti-AMA1 Fvo de la cohorte 2 dans les deux groupes d'étude.....	73
<u>Figure 12</u> : Evolution du niveau d'anticorps anti-AMA1 Fvo de la cohorte 3 dans les deux groupes d'étude.....	75
<u>Figure 13</u> : Evolution du niveau d'anticorps anti-AMA1 3D7 de la cohorte 1 dans les deux groupes d'étude.....	77
<u>Figure 14</u> : Evolution du niveau d'anticorps anti-AMA1 3D7 de la cohorte 2 dans les deux groupes d'étude.....	79
<u>Figure 15</u> : Evolution du niveau d'anticorps anti-AMA1 3D7 de la cohorte 3 dans les deux groupes d'étude.....	81
<u>Figure 16</u> : comparaison des titres d'anticorps anti AMA1 3D7 selon les trois doses...	82
<u>Figure 17</u> : comparaison des titres d'anticorps anti AMA1 Fvo selon les cohortes (5µg, 20µg et 80µg.....	83
<u>Figure 18</u> : Evolution du niveau des anticorps chez les mauvais répondeurs après les doses de vaccins AMA1-C1Fvo selon la cohorte d'étude.....	87
<u>Figure 19</u> : Evolution du niveau des anticorps chez les mauvais répondeurs après les doses de vaccins AMA1-C1 3D7 selon la cohorte d'étude.....	88

<u>Figure 20</u> : Réponse humorale spécifique de souche de <i>P. falciparum</i> selon la période de Mai-Juin (J0).....	89
<u>Figure 21</u> : Réponse humorale spécifique de souche de <i>P. falciparum</i> selon la période de Juillet – Août (J42).....	89
<u>Figure 22</u> : Réponse humorale spécifique de souche de <i>P. falciparum</i> selon la période de Octobre – Novembre (J540).....	90
<u>Figure 23</u> : Réponse humorale spécifique de souche de <i>P. falciparum</i> selon la période (J0 – J540).....	90

<u>Tableau I</u> : répartition des volontaires selon l'âge dans les différentes cohortes.....	67
<u>Tableau II</u> : répartition des volontaires selon l'ethnie.....	67
<u>Tableau III</u> : répartition des volontaires selon le sexe.....	67
<u>Tableau IV</u> : Coefficients de corrélation de concordance entre les tests ELISA réalisés au MRTC et MVDB/NIAID/ NIH.....	68
<u>Tableau V</u> : Distribution des anticorps anti-AMA1-C1 (Fvo) par type de vaccin dans la cohorte 1 au cours du suivi de J0 à J540.....	70
<u>Tableau VI</u> : Distribution des anticorps anti-AMA1-C1 (Fvo) par type de vaccin dans la cohorte 2 au cours du suivi de J0 à J540.....	72
<u>Tableau VII</u> : Distribution des anticorps anti-AMA1-C1 (Fvo) par type de vaccin dans la cohorte 3 au cours du suivi de J0 à J540.....	74
<u>Tableau VIII</u> : Distribution des anticorps anti-AMA1-C1 (3D7) par type de vaccin dans la cohorte 1 au cours du suivi de J0 à J540.....	76
<u>Tableau IX</u> : Distribution des anticorps anti-AMA1-C1 (3D7) par type de vaccin dans la cohorte 2 au cours du suivi de J0 à J540.....	78
<u>Tableau X</u> : Distribution des anticorps anti-AMA1-C1 (3D7) par type de vaccin dans la cohorte 3 au cours du suivi de J0 à J540.....	80
<u>Tableau XI</u> : Titre d'anticorps anti-AMA1-Fvo dans les deux groupes d'étude AMA1-C1 et Recombivax®	84
<u>Tableau XII</u> : Titre d'anticorps anti-AMA1-3D7 dans les deux groupes d'étude AMA1-C1 et Recombivax®.....	85
<u>Tableau XIII</u> : Evolution du niveau des anticorps chez les mauvais répondeurs après les doses de vaccins AMA1-C1 selon la cohorte d'étude.....	86

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

Le paludisme reste aujourd'hui l'une des maladies parasitaires les plus graves dans le monde et représente une menace majeure pour près de 3,2 milliards de personnes, avec 300 à 660 millions de cas cliniques par an [64]. Il tue 1 à 2 millions d'individus surtout les enfants de moins de 5 ans. Le paludisme tue un enfant toutes les 30 secondes dans le monde, la plupart en Afrique au sud du Sahara [50]. Le paludisme est endémique dans 107 pays dont 45 pays en Afrique [51]. Dans les pays d'endémie africains, il est à l'origine de 25% à 35% des consultations ambulatoires, de 20% à 45% des hospitalisations et de 15% à 35% des décès à l'hôpital, faisant ainsi peser une lourde charge sur des systèmes de santé déjà fragiles.[71, 20].

Le coût que le paludisme occasionne aux pays est estimé à plus de 12 milliards la perte annuelle de PIB (Produit Intérieur Brut) en Afrique, et se compose du coût de lutte et de celui des journées perdues [51]. Chez les enfants, il est une cause d'absentéisme scolaire chronique et parfois d'une baisse des facultés d'apprentissage. Les femmes enceintes, les voyageurs et les immigrés des zones non endémiques constituent un autre groupe à risque.

Les stratégies actuelles de lutte sont basées essentiellement sur :

- La chimioprophylaxie des femmes enceintes (Traitement Présomptif Intermittent).
- La prise en charge précoce des cas cliniques
- La réduction du contact homme - vecteur par l'utilisation de supports imprégnés d'insecticides.

Des quatre espèces inféodés à l'homme : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax* ; *Plasmodium falciparum* est de loin la plus redoutable car elle est responsable du neuropaludisme et des décès liés au paludisme et représente 85 à 95% de la formule parasitaire.

Les échecs des campagnes d'éradication menées jusqu'à présent sont essentiellement dus à la résistance acquise du vecteur, l'anophèle femelle, aux insecticides et celle progressive du parasite aux antipaludiques classiques notamment à la chloroquine. Aujourd'hui, pratiquement tous les médicaments antipaludiques semblent être touchés à des degrés divers par la chimiorésistance qui s'étend géographiquement et en intensité. De plus l'emploi d'antipaludiques efficaces telles que l'amodiaquine ou l'association sulfadoxine/pyriméthamine a dû être réduit à cause d'effets secondaires sérieux [8]. Les vaccins constituent à cet effet les outils privilégiés de lutte contre les maladies infectieuses, les outils les plus bénéfiques en santé publique. De nouvelles stratégies de lutttes antipalustres deviennent nécessaires. La vaccination en diminuant l'incidence des accès palustres, sera un atout majeur dans la lutte contre ce fléau. Les efforts de développement de vaccins antipaludiques se sont concentrés essentiellement sur deux étapes dans le cycle biologique de *Plasmodium falciparum* notamment l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes et des érythrocytes par les merozoïtes. Un vaccin visant les merozoïtes permettrait d'éviter les manifestations cliniques en bloquant l'invasion des érythrocytes.

Les signes cliniques du paludisme sont dus à la multiplication des parasites sous forme de merozoïtes dans les globules rouges. Un vaccin qui provoquerait la production d'anticorps dirigés contre ces merozoïtes de *P.falciparum*, pourrait réduire la morbidité et la mortalité liée au parasite mais n'empêchera pas l'infection. Les vaccins ciblant les stades sexués du parasite visent à interrompre la transmission du paludisme. Les anticorps produits par un tel vaccin sont ingérés par le moustique lors d'un repas sanguin en même temps que les gamétocytes et bloquent le développement du parasite dans l'estomac du moustique.

Le centre de recherche et de formation sur le paludisme (MRTC) de l'université de Bamako (Mali), en partenariat avec l'institut national de la santé (NIH) des Etats Unis a conduit depuis 1996 des études de préparation de sites à Donéguébougou en vue de tester les candidats vaccins antipaludiques à savoir la MSP1-42 (Protéine de Surface du Merozoïte) et AMA1 (Antigène Apicale de Membrane).

Donéguébougou est une zone d'endémie palustre où la transmission est saisonnière et intense. Après analyse des résultats de l'étude de l'incidence par âge, par sexe et par an [32], ce site a été choisi pour y effectuer des essais cliniques de phase I des candidats vaccins dans le but d'évaluer leur tolérance chez l'homme. Les études réalisées en 1999-2000 dans ce site ont montré que la morbidité palustre ne variait pas significativement d'une année à l'autre et que le paludisme affectait principalement les enfants de moins de 5 ans [32].

Le but de ce présent travail est d'évaluer le niveau de la réponse humorale dirigée contre le candidat vaccin AMA1 chez des volontaires de l'essai vaccinal à Donéguébougou.

OBJECTIFS

II. OBJECTIFS

Objectif général

Evaluer la réponse humorale contre le candidat vaccin AMA1 (Fvo et 3D7) chez les volontaires de l'essai vaccinal de Donéguébougou par la technique ELISA au laboratoire d'immunologie du MRTC.

Objectifs spécifiques

1. Effectuer le contrôle de qualité du dosage des anticorps anti-AMA1 (Fvo et 3D7) chez les volontaires de l'essai vaccinal de Donéguébougou par la technique ELISA au laboratoire d'immunologie du MRTC ;
2. Déterminer la dose de AMA1-C1 qui génère la concentration la plus élevée d'anticorps par la technique ELISA chez les volontaires de l'essai vaccinal de Donéguébougou ;
3. Mesurer et comparer la dynamique de la réponse des anticorps anti-AMA1 (Fvo et 3D7) selon l'âge chez les volontaires de l'essai vaccinal de Donéguébougou;
4. Comparer la réponse des anticorps anti-AMA1 (Fvo et 3D7) chez les volontaires qui ont reçu le vaccin AMA1-C1 et ceux qui ont reçu le vaccin Recombivax.
5. Déterminer la corrélation de la réponse humorale de souches Fvo et 3D7 *P.falciparum* à l'inclusion et au cours du suivi (J0-J540) chez les volontaires de l'essai vaccinal de Donéguébougou.



GENERALITES

III. GENERALITES

1. Immunologie du paludisme

Au cours d'une infection palustre l'organisme humain se défend par deux mécanismes immunitaires :

❖ L'immunité naturelle ou innée : cette résistance se traduit chez l'homme par un état réfractaire au parasite dès le premier contact, relevant de la constitution génétique de l'homme. Les mécanismes qui déterminent cette résistance innée impliquent les paramètres biologiques influant sur le parasite et la susceptibilité de l'hôte selon l'âge, la race, le sexe.

❖ L'immunité acquise qui est une réponse spécifique, impliquant la réponse humorale et cellulaire, un état immunitaire acquis progressivement, provoqué et entretenu par la présence du parasite dans l'organisme ou l'exposition en zone d'endémie.

1.1. Les paramètres biologiques influant sur le parasite

1.1.1. Diminution de la pathogénicité

❖ L'immunité congénitale, anticorps IgG passés de la mère immune au nouveau-né, protège celui-ci pendant environ six mois contre les accès graves du paludisme.

❖ Les hémoglobines anormales, HbF (thalassémies) et HbS (drépanocytose), HbC perturbent la schizogonie et diminuent donc la virulence du parasite.

❖ La déficience en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G-6PD) gêne considérablement le développement du parasite.

❖ La malnutrition protéique gêne également la croissance du parasite ; un régime exclusivement lacté entrave la schizogonie.

1.1.2. Obstacles à l'infection

❖ L'absence des antigènes de groupe sanguin Duffy sur la paroi de l'érythrocyte protège contre l'infection à *P. vivax*.

❖ L'ovalocytose, une anomalie du cytosquelette du globule rouge qui rend la membrane externe plus rigide, empêche la pénétration du mérozoïte.

1.2. La réponse immunitaire humorale au cours de l'infection palustre

L'acquisition de la réponse immunitaire antipaludique nécessite une longue période d'exposition à des infections répétées. L'installation de l'immunité acquise est d'autant plus précoce que la transmission est intense et stable ; son maintien dépend de la durée d'exposition.

A chaque stade du cycle de développement du parasite correspond une réponse immune spécifique. Ici nous parlerons seulement de la réponse humorale antipalustre du stade érythrocytaire.

Les anticorps agissent :

❖ Soit directement sur les globules rouges parasités par agglutination ou par lyse en présence du complément,

❖ Soit en association avec des cellules immunocompétentes par le système d'ADCI (Antibody Dependant Cell-mediated Inhibition) [62].

Les monocytes et les macrophages produisent des facteurs cytotoxiques, qui agissent sur le parasite.

1.2.1. Réponse immune dirigée contre les formes pré érythrocytaires

Les anticorps dirigés contre les sporozoïtes sont capables d'altérer leurs revêtements de surface, d'inhiber leur pénétration dans les hépatocytes ou de ralentir leur développement intra-hépatocytaire [44].

1.2.2. Blocage de l'invasion des hépatocytes

Le mécanisme par lequel les sporozoïtes atteignent les hépatocytes n'est pas bien connu.

Les anticorps anti-TRAP (Thrombospondin Related Adhesion Protein) inhibent *in vitro* l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes [44].

Les travaux récents ont montré que les « Liver Stage Antigen-3 » (LSA-3) exprimés à la surface des sporozoïtes induisent une réponse humorale spécifique [1].

Silvie *et al.* 2004 ont montré que la AMA1 était exprimée sur la surface des sporozoïtes, disparaît après l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes et des anticorps anti-AMA1 bloquaient l'invasion des hépatocytes.

1.2.3. Réponse immune dirigée contre les formes intra érythrocytaires

Au cours de la schizogonie érythrocytaire l'organisme réagit en mettant en place une défense immunitaire.

Celle-ci s'effectue principalement par des anticorps anti plasmodiaux dirigés contre les mérozoïtes. Ce sont des immunoglobulines G (IgG) cytophiliques qui activent les fonctions effectrices cytotoxiques et phagocytaires des neutrophiles et des monocytes [53]. L'infection plasmodiale implique aussi une production élevée d'immunoglobuline E (IgE). Le complexe immun IgE-antigène est impliqué dans l'activation des monocytes qui produisent du monoxyde d'azote qui est toxique pour les merozoïtes.

Les études attestent que ce complexe immun peut contribuer à la pathogénie de l'infection palustre. La surproduction locale du Tumor Necrosis factor (TNF) par les monocytes activés est un facteur de pathogénicité majeur de l'infection à *P. falciparum* [68].

Les travaux d'expérimentation sur le modèle animal, selon Miller 2001, ont montré que les antigènes AMA1 induisent une réponse immune de type humorale qui bloque la pénétration des merozoïtes dans les globules rouges.

Les mêmes travaux ont montré que les Merozoïtes Surface Antigène 1 (MSP1) sont très immunogènes et induisent une réponse de type humorale [60].

Aucan *et al.* 2000 ont établi une association entre la protection contre l'infection palustre, le taux élevé d'immunoglobuline G2 (IgG2) et le taux bas d'immunoglobuline G4 (IgG4).

1.3. La phagocytose et l'opsonisation

La phagocytose est connue comme un important moyen de défense contre l'infection plasmodiale depuis plus d'un siècle. Après les observations il a été conclu que l'opsonisation (processus facilitant la phagocytose par dépôt d'anticorps ou d'opsonines sur le parasite) est un moyen important de défense contre le parasite du paludisme. Le système réticulo-endothélial et l'ensemble des macrophages (surtout la rate) éliminent la plupart des globules rouges infectés et des merozoïtes libres par la phagocytose et l'opsonisation.

1.4. Immunité naturelle induite par *P. falciparum*

Dans les conditions naturelles de transmission connues à Donéguébougou, la population semi immune développe des anticorps dirigés contre divers antigènes parasitaires. Une partie de ces antigènes entre dans la composition du candidat vaccin AMA1. On s'attend donc à trouver un niveau de base de la réponse immune humorale contre les antigènes du vaccin. Par exemple des anticorps anti-AMA1 [antigène apicale de membrane 1, un des candidats vaccins fabriqués par le MVDU (Malaria Vaccine Development Unit)] ont été détectés dans le sang des adultes de Papouasie-Nouvelle Guinée et aussi dans le sang des enfants vivant au Sénégal et en Guinée-Bissau [27 ; 66], en dehors de tout contexte de vaccination. Le niveau de base des anticorps produits peut être utile pour permettre la mise en évidence d'une différence après la vaccination.

Peu de travaux ont exploré la réponse immune spécifique aux lymphocytes B induite par le paludisme en zone d'endémie. Migot *et al* 1995, ont comparé les lymphocytes B sécrétant des anticorps antipaludiques spécifiques dans une population de camerounais vivant en zone d'endémie et dans une population malgache vivant dans une zone relativement indemne de paludisme. Comme on aurait pu le prédire, la fréquence des lymphocytes B spécifiques au paludisme était plus élevée dans la population camerounaise, en dépit de la faible sensibilité de la méthode utilisée.

Il est nécessaire de caractériser d'avantage la réponse immune humorale induite par les plasmodies, particulièrement dans le contexte du développement du vaccin antipaludique. Une meilleure compréhension de la réponse immune induite par *P. falciparum* apportera des informations pertinentes pour le développement du vaccin antipaludique

1.5. Immunogénicité

La capacité inductrice de l'antigène est connue sous le nom d'immunogénicité. Le terme immunogène est utilisé à la place d'antigène lorsque l'accent est mis sur la capacité d'une substance à induire une réponse immunitaire qui accompagne la réactivité antigénique ou spécificité, capacité de réagir avec les produits de cette même réponse immunitaire. Cette réponse peut être humorale (la reconnaissance spécifique peut induire une prolifération de lymphocytes B qui, transformés en plasmocytes, secrètent des anticorps dirigés contre l'antigène inducteur) et/ou une réponse cellulaire (Apparition de lymphocytes T immuns porteurs de récepteurs spécifiques pour l'antigène). L'immunogénicité dépend de l'antigène, de l'hôte et/ou des deux à la fois :

1.5.1. Les conditions liées à l'antigène :

- ❖ La nature et la complexité d'un immunogène jouent sur l'immunogénicité. Les protéines sont plus immunogènes que les polysides lesquels en sont meilleurs que les lipides. L'absence de complexité chimique dans la structure de polymères organiques expliquerait leur non immunogénicité.
- ❖ Plus le poids moléculaire d'une substance est élevé, meilleure est son immunogénicité (Protéine $PM \geq 10$ kD).
- ❖ L'immunogénicité d'une protéine s'accroît avec sa taille car conjointement augmente le nombre d'épitopes. Mais la grande taille d'une substance n'est pas forcément synonyme d'immunogénicité (la gélatine).
- ❖ La voie parentérale est habituellement la meilleure voie pour obtenir une bonne immunisation car elle permet un contact efficace entre l'immunogène et les cellules de l'immunité.

❖ Il existe très peu d'immunogène qui n'entraîne pas une réponse immunitaire, et entraîner une tolérance immunitaire. La production d'anticorps et l'immunité à médiation cellulaire sont habituellement obtenues pour des doses moyennes d'immunogène qui en terme pondéral peuvent varier d'un immunogène à l'autre.

1.5.2. Conditions liées à l'hôte

❖ Les prédispositions génétiques jouent sur la réponse immunitaire. Selon l'espèce en cause la réponse immunitaire peut varier ; ainsi il est plus facile d'avoir une immunité à médiation cellulaire chez le cobaye que chez la souris.

Chez les individus d'une même espèce on peut avoir des bons répondeurs et des mauvais répondeurs vis-à-vis d'un même antigène cela peut être due à la différence de sensibilité individuelle.

❖ Le contact entre un antigène et le système immunitaire immature d'un individu jeune peut entraîner une tolérance immunitaire. La réponse immunitaire des sujets âgés est souvent déficiente.

❖ Les maladies affectant directement ou indirectement le système immunitaire affectent aussi la réponse immunitaire.

1.5.3. Les conditions liées à l'antigène et à l'hôte

Lorsque des antigènes induisent la production d'anticorps, cette production due aux lymphocytes B nécessite le plus souvent la présence de lymphocytes T. Les antigènes qui induisent la production d'anticorps en présence de lymphocytes thymodépendants sont dits antigènes thymodépendants. Plus rarement des antigènes provoquent la production d'anticorps en l'absence des lymphocytes T, ils sont dits thymoindépendants.

2. VACCINATION ANTIPALUSTRE

2.1. Les différents types de vaccin

La mise au point d'un vaccin antipalustre devient de plus en plus réelle. Plusieurs équipes de chercheurs, mènent actuellement des travaux orientés sur l'identification, la synthèse et l'emploi d'antigènes vaccinaux issus de l'un des stades de développement parasitaire, permettant ainsi le blocage du cycle.

2.1.1. Vaccins contre les stades pré érythrocytaires (vaccins antispozoïtes)

Un vaccin dirigé contre les sporozoïtes qui vise à assurer une protection très précoce, dès le moment de la piqûre infestante par un anophèle vecteur. Les vaccins pré érythrocytaires préviennent l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes ou entraînent la destruction des parasites dans les hépatocytes infectés.

Le mécanisme de cette immunité protectrice est encore mal connu mais le rôle des lymphocytes T est évident dans la lyse des hépatocytes infectés, en effet une expérience de vaccination, chez les souris déficientes en lymphocytes T CD8 n'ont pas été protégées par cette forme d'immunisation [28].

Les anticorps dirigés contre les antigènes du parasite du stade hépatique préviendraient l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes. La protéine la mieux caractérisée est le CSP (Circumsporozoite Protein) qui est exprimée avant et pendant l'infection des hépatocytes [38], beaucoup d'attentions ont été focalisées sur l'épitope immunodominant composé par un tetrapeptide répétitif NANP (Asn-Ala-Asn-Pro) de cette protéine.

Le RTS, S/AS02A a été un bon inducteur de la réponse cellulaire de type Th1 et a entraîné une forte réponse humorale avec production d'une forte concentration d'IgG dirigée contre la région répétitive du CSP [36].

2.1.2. Vaccins contre les stades asexués érythrocytaires (Vaccins antimerozoïtes)

Ce vaccin peut interrompre le cycle endoérythrocytaire et par conséquent, éviter la survenue des symptômes. La schizogonie érythrocytaire étant responsable des manifestations cliniques, les vaccins contre ces stades érythrocytaires pourraient réduire

la pathogénicité, la morbidité et la mortalité du paludisme donc permettrait d'éviter les complications telles que : le paludisme cérébral, l'anémie palustre, la défaillance rénale et d'autres formes graves du paludisme chez la femme enceinte en bloquant l'invasion des érythrocytes par les merozoïtes.

AMA1 et MSP1 sont les antigènes les plus étudiés pour le développement d'un tel vaccin.

2.1.3. Vaccins contre les stades sexués (Vaccin antigamétocytes)

Le point d'impact de ces vaccins se situe au niveau des formes infestantes pour les moustiques, ce qui permet d'interrompre la transmission et la contamination ultérieure d'autres sujets. Les stades sexués (gamètes, gamétocytes, zygotes et ookinètes) transmettent l'infection de l'homme au moustique, donc ces types de vaccins pourraient réduire ou interrompre la transmission de la maladie.

Les candidats vaccins les plus étudiés de ce stade ont été principalement le Pfs28 et le Pfs25 [19], les anticorps dirigés contre le Pfs28 entraînent un blocage de la transmission de *Plasmodium falciparum* et présentent une action synergique lorsqu'ils sont combinés aux anticorps dirigés contre le Pfs25. Ces deux antigènes sont très immunogènes et ont une diversité antigénique limitée [19].

Ces trois types de vaccins sont tous basés sur le principe classique de la vaccination qui consiste à induire l'immunité de l'hôte contre le parasite, de façon à contrôler la densité parasitaire ou à protéger des sujets vaccinés. Il faut noter la dernière approche de développement de vaccin, le vaccin anti-toxine, appelé aussi vaccin anti-maladie [11; 56]. Cette approche consiste à réduire la morbidité en supprimant l'immunopathologie chez l'hôte. Ces vaccins agissent sur la neutralisation des substances pathogènes du parasite sans affecter le parasite lui-même.

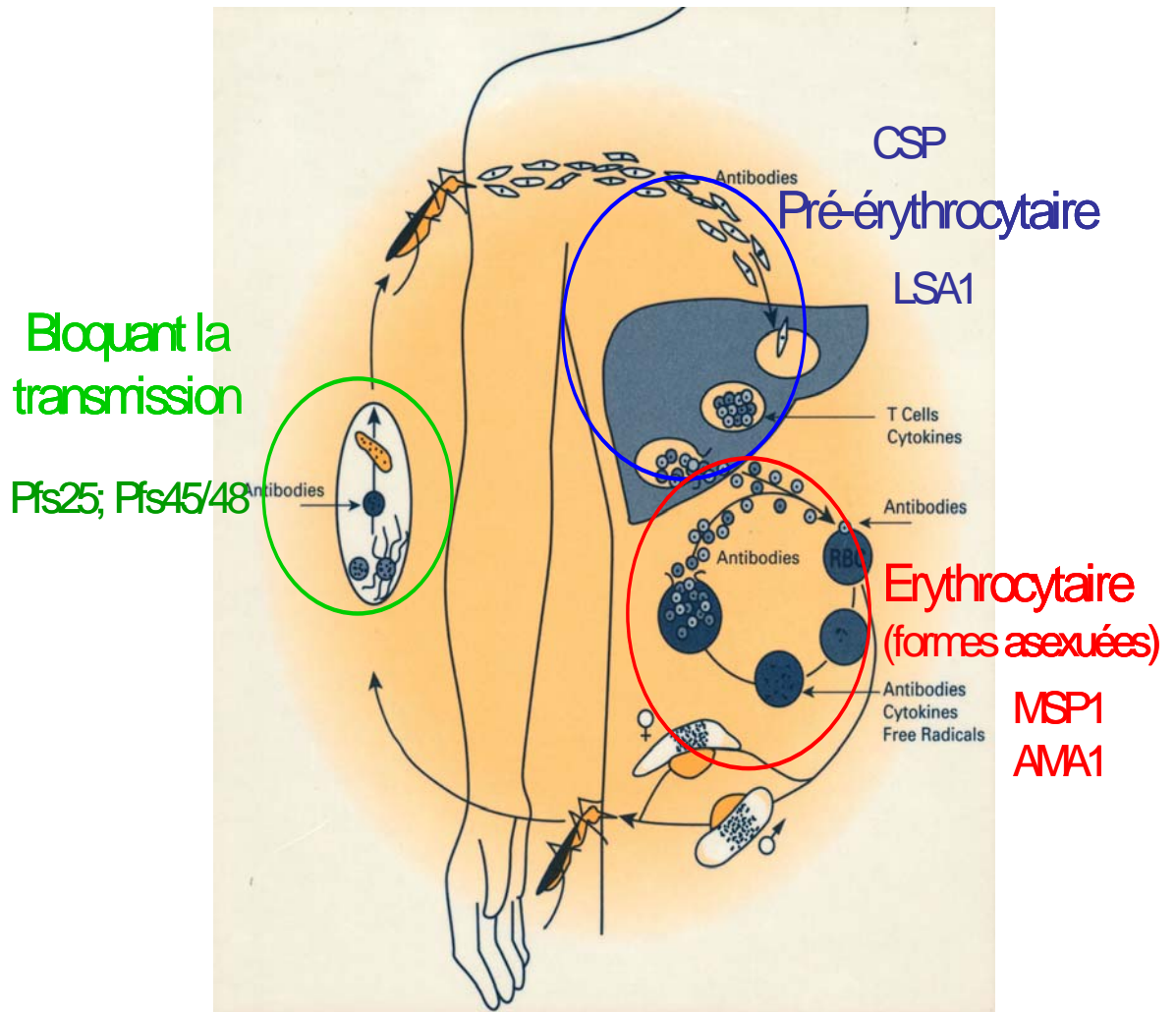


Figure 1 : Différents types de vaccins antipaludiques et leurs cibles. (Source : *Nat. Med*2000 page 6).

2.2. Les principales difficultés

Elles se situent essentiellement à trois niveaux :

- ❖ Complexité et variabilité des antigènes plasmodiaux, et difficultés de sélection des fractions antigéniques candidates
- ❖ Inadéquation des rares modèles disponibles
- ❖ Choix des adjuvants

2.2.1. La complexité et variabilité des antigènes plasmodiaux et difficultés de sélection des fractions antigéniques candidates

Quel que soit leur stade parasitaire, les plasmodiums ont une structure antigénique très complexe. Et cette complexité du parasite constitue le principal obstacle à la mise au point du vaccin contre le paludisme. Le génome des *Plasmodium* est environ 250-500 fois plus grand que celui des virus. Le *Plasmodium* présente une multiplicité d'antigènes et un polymorphisme antigénique. Cette multiplicité des antigènes est compliquée par leur variabilité au cours du cycle évolutif et selon les espèces plasmodiales ; parmi lesquelles, seules les formes asexuées de *P. falciparum* (intra-érythrocytaires) peuvent être mis en culture *in vitro*. Pour une espèce plasmodiale donnée, certains antigènes varient d'une souche à l'autre et tous sont modifiés au cours du cycle parasitaire. En effet, le polymorphisme naturel des antigènes plasmodiaux dans une population de parasite est important. Parmi ces antigènes polymorphes, nombreux sont considérés comme des candidats vaccins potentiels. A la lumière des études expérimentales effectuées chez l'homme et sur les modèles animaux, il apparaît que le polymorphisme antigénique est le principal mécanisme d'évasion immunitaire du parasite [40]. Le répertoire des spécificités antigéniques est bien limité dans une population de parasite, car dans les zones d'hyperendémie les adultes acquièrent une immunité protectrice partielle. Le polymorphisme antigénique doit être pris en compte dans l'élaboration du vaccin antipaludique.

La sélection des fractions antigéniques éventuellement utilisables pour la vaccination n'est pas facile.

2.2.2. Inadéquation des rares modèles disponibles

Il n'existe pas de modèle animal comparable à l'homme pour l'étude de l'immunogénicité de *Plasmodium falciparum*. Cependant des modèles expérimentaux ont rendu de grands services pour la recherche : plasmodiums des oiseaux, des singes et des rongeurs.

Par exemple, les singes ne présentent pas des symptômes de paludisme maladie mais sont en effet réceptifs à l'infestation palustre ; si bien qu'il est difficile d'apprécier les effets d'un éventuel vaccin face aux manifestations cliniques palustres du à *P. falciparum*.

2.2.3. Adjuvants

a. Définition

Le terme adjuvant dérive du latin « adjuvare » qui signifie aider, assister. Il désigne toute substance capable d'augmenter l'intensité de la réponse immune dirigée contre un antigène administré simultanément. IL existe une multitude d'adjuvants. On distingue parmi les adjuvants les agents stimulants et les « véhicules ». Les agents stimulants activent directement les cellules de l'immunité en se liant à différents récepteurs. Les véhicules contiennent l'antigène et déterminent la façon dont il sera présenté au système immunitaire. Cependant, ils ont souvent eux même des propriétés immunostimulantes, simplement parce qu'ils constituent des corps étrangers. Bien qu'ils soient également testés dans le cadre de certaines immunothérapies, les adjuvants sont surtout utilisés en tant que constituants du vaccin. La plupart du temps ils sont indispensables à l'induction d'une réponse immune protectrice.

b. Mode d'action

Les mécanismes par lesquels les adjuvants augmentent l'immunogénicité des vaccins sont les suivants :

1) Le phénomène de dépôt : la prolongation de l'exposition d'antigène aux cellules présentatrices par la création d'un dépôt au site de l'injection, ce dépôt peut produire une réponse inflammatoire bénéfique attirant un afflux des cellules immunocompétentes actives ;

- 2) La présentation de l'antigène aux cellules immunocompétentes : l'activation des cellules présentatrices, telles que les monocytes ou les macrophages, pour libérer les cytokines qui peuvent favoriser la coopération des lymphocytes T et lymphocytes B, et une réponse de type cytotoxiques, CTL (Cytotoxic T Lymphocytes) ;
- 3) La production des lymphocytes : l'adjuvant peut induire une réponse plus favorable avec les titres élevés d'anticorps, qui apparaissent au cours de l'immunisation et persistent avec le temps.

c. Classification

Les adjuvants peuvent être classés selon différents critères. Bien qu'il soit possible de les répartir en fonction de leur mode d'action, de leur effet sur la réponse immune cette classification s'avère arbitraire et compliquée. Il est donc plus simple de classer les adjuvants sur la base de leur espèce chimique et leur origine :

- 1) Les constituants bactériens : A l'origine ces adjuvants étaient constitués de bactéries entières inactivées par exemple différentes espèces de *Salmonella*. L'adjuvant complet de Freund bien connu est encore utilisé malgré des effets secondaires considérables.
- 2) Les adjuvants huileux : regroupent différents types d'émulsion. Les adjuvants huileux classiques sont des émulsions eau dans huile ou les gouttes de solution aqueuse d'antigène hydrophile, d'un diamètre de l'ordre du nanomètre au millimètre, sont englobés dans une phase lipophile continue. L'adjuvant incomplet de Freund est une émulsion d'huile de paraffine contenant comme émulsifiant l'Arlacel A (monolaurate de sorbitanne). La formulation émulsion eau dans huile permet la libération progressive de l'antigène au niveau du site d'injection et sa présentation sur une surface étendue ; elle le protège de la dégradation hépatique ou de l'action des protéases sériques.
- 3) Les adjuvants minéraux : Cette catégorie compte comme principaux représentants l'hydroxyde d'aluminium, le phosphate d'aluminium, de potassium, de calcium. Ces adjuvants se présentent sous forme de précipités insolubles de type gel, sur lequel sont adsorbées les protéines antigéniques en solution aqueuse. Les sels d'aluminium stimulent la production d'anticorps en passant par l'induction d'une réponse de type Th2 [47].
- 4) Les toxines bactériennes : Administrés par voie orale ou nasale, ces adjuvants induisent une réponse de type Th2 s'accompagnant de la production d'IgA sécrétoire

repartie au niveau de l'ensemble des muqueuses [29 ; 43]. La production d'anticorps au niveau systémique est également stimulée. La toxine cholérique de *vibrio cholerae* est un puissant adjuvant utilisé chez les animaux. Chez l'homme, naturellement beaucoup plus sensible à cette toxine c'est la sous unité B purifiée qui est utilisée.

5) Les oligodésoxynucleotides : ce type d'adjuvant est à rapprocher des constituants bactériens. Les séquences des génomes riches en dinucleotides CpG (Cytidine-guanosine) forment des « motifs CpG » reconnus par le système immunitaire de façon non spécifique. Ces adjuvants ont la capacité d'induire des réponses qui sont très nettement de type Th1, comme en témoigne notamment l'importante production d'IL-12 et d'IFN- γ qu'ils stimulent [25 ; 10].

6) Les cytokines : De très nombreuses cytokines ont été expérimentées en tant qu'adjuvants, ainsi que certains de leurs inhibiteurs (comme l'inhibiteur de l'IL-13, une cytokine immunosuppressive). Ces protéines de faible poids moléculaires agissent directement en leur qualité de médiateurs de la réponse immune, et à ce titre pourraient permettre d'orienter cette réponse de façon très précise. C'est par leur intermédiaire qu'agissent tous les autres immunostimulants.

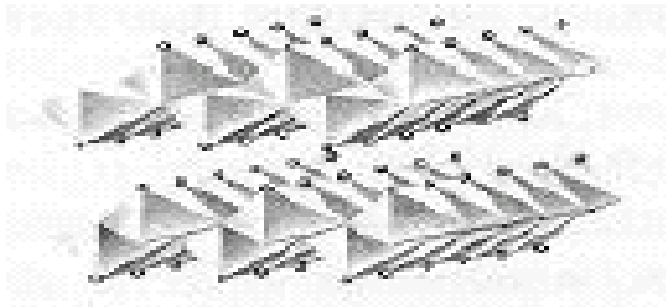
d. Efficacité et Toxicité

Un adjuvant efficace ne doit pas seulement renforcer la réponse immune mais aussi orienter cette réponse en fonction de la pathogenèse propre à chaque infection. Chaque adjuvant est d'abord caractérisé par sa capacité d'activer sélectivement les lymphocytes T auxiliaires (CD4+) de type TH2 ou TH1, qui correspondent aux deux grandes voies que peut emprunter la réponse immune, à savoir humorale et cellulaire. Cette dichotomie a été mise à jour chez la souris en comparant les effets des sels d'aluminium et de l'Adjuvant Complet de Freund, les premiers induisant une réponse de type Th2 et les seconds une réponse de type Th1 [22]. Un adjuvant peut aussi favoriser des aspects plus particuliers de la réponse immune, comme par exemple la réponse d'hypersensibilité de type retardé ou la réponse à lymphocytes T cytotoxiques (CTL), qui correspondent à deux paramètres de l'immunité à médiation cellulaire (IMC), ou encore la production d'IgA sécrétoires dans un contexte Th2. Il peut aussi influencer l'isotype des immunoglobulines produites.

Les antigènes vaccinaux sont généralement insuffisamment immunogènes par eux-mêmes. Malheureusement, les adjuvants les plus efficaces, qui stimulent à la fois la réponse anticorps et l'immunité cellulaire tel l'adjuvant de Freund utilisé chez l'animal présentent des effets secondaires (effets cancérogènes, effets pyrogènes, formation d'abcès et de nécroses) et sont donc interdits chez l'homme.

e. Le gel de l'hydroxyde d'aluminium

❖ **Structure** : Oxyhydroxide d'aluminium AlOOH cristalline est connu minéralogiquement comme boehmite. La structure est composée de feuilles d'aluminium octaèdres ondulées.



- **Figure 2** : structure du gel de l'hydroxyde d'aluminium (source : Frederick R. Vogel, Michael F. Powell, and Carl R. Alving, A Compendium of Vaccine Adjuvants and Excipients 2nd Edition)

❖ **Source** : Il est obtenu par précipitation d'hydroxyde d'aluminium en milieu alcalin.

❖ **Propriétés physico-chimique** : Précipité blanc gélatineux en suspension aqueuse, les particules primaires ont une morphologie de petite fibre ou fibrille et une grande superficie. Son point isoélectrique est 11. Sa grande superficie lui donne une forte capacité d'adsorption pour l'antigène. Faiblement soluble dans les solutions contenant les ions citrates, il se dissout dans les acides forts et les bases fortes.

❖ **Efficacité/Toxicité** : Il peut causer des réactions locales douces au niveau du site d'injection [23].

❖ **Propriétés d'adjuvant** : L'alhydrogel est la préparation standard pour la recherche immunologique sur le gel de l'hydroxyde d'aluminium. L'utilisation des adjuvants d'aluminium est accompagnée de stimulation d'IL-4 et de T-helper-2 chez la souris, avec production d'IgG1 et d'IgE [37].

Le gel de l'hydroxyde d'aluminium (Alun) est actuellement l'adjuvant autorisé et qui ne présente pas de danger. Les adjuvants contenant de l'aluminium sont utilisés de façon routinière chez les humains et sont contenus dans beaucoup de vaccins humains autorisés.

2.3. Evaluation de l'efficacité des vaccins sur le terrain

Les vaccins antipaludiques mis au point doivent être rigoureusement évalués. Les études sur l'efficacité et les effets secondaires doivent être faites avant et après la mise sur le marché (« Prelicensing vaccine trials ») comportent classiquement trois phases [48] :

❖ **Phase I** : concerne l'essai sur un nombre réduit d'adultes volontaires (20-50) ayant un faible risque de faire des accès palustres. L'immunogénicité est estimée par l'évaluation du niveau des anticorps et l'importance des effets secondaires. Les tests d'évaluation des niveaux d'anticorps permettent d'évaluer l'immunogénicité des vaccins et d'ajuster la dose de vaccin. Peu d'informations sont recueillies au cours de la phase 1 sur les effets néfastes du vaccin.

❖ **Phase II** : un effectif plus important de patients (100-200), ayant également un faible risque de faire des accès cliniques palustres font l'objet d'étude de la phase II. L'efficacité est testée et des informations plus précises sont obtenues sur la relation dose-effet et sur les effets secondaires ;

❖ **Phase III** : si la phase II ne fournit pas suffisamment d'informations on passe à la phase III, sur un échantillon de plus de 500 sujets à hauts risques (constitués d'enfants).

L'effet protecteur est évalué par rapport au risque de faire la maladie. La phase III devrait permettre d'évaluer le niveau et la durée de protection, l'importance des effets secondaires, de déterminer l'âge optimum d'administration du vaccin, la dose, le nombre et l'intervalle entre les doses, et les besoins d'adjuvants.

Les évaluations après la mise sur le marché (« Post-licensing monitoring ») du vaccin comprennent non seulement l'évaluation de l'efficacité du vaccin, mais aussi englobent l'amélioration des pratiques vaccinales et la détection des effets secondaires. Elles visent à : améliorer le mode d'administration ; réduire au maximum les doses ; mettre au point un système de chaîne de froid pratique surtout pour les pays chauds ; recherche sur le terrain, mettre au point les grandes lignes opérationnelles pour la conduite des vaccinations sur le terrain : formation des agents ou des équipes mobiles, instruments utilisés, surveillance et évaluation de chaque programme national ; améliorer et rationaliser la gestion , renforcer les efforts d'évaluation, utilisation rationnelle des chaînes de froid, extension des zones d'intervention.

Les considérations éthiques doivent être strictement respectées au cours des différentes phases des essais. Les femmes enceintes et allaitantes doivent être exclues du protocole au cours de ces essais.

L'efficacité du vaccin peut être estimée par :

- La comparaison des incidences des infections, des accès cliniques, des formes graves et de la mortalité spécifique palustre avant et après vaccination.
- L'évaluation par des tests immunologiques : les tests immunologiques englobent les scarifications de la peau (par exemple le test à la tuberculine) et les tests sérologiques. Ces deux types d'évaluation peuvent être combinés.

2.4. Les vaccins antipaludiques en cours d'étude ou d'essais

Toutes les études et les différents essais cliniques du premier candidat vaccin synthétique multivalent nommé SPf66, mis au point par Lopera TM et son équipe en 1998 en Colombie [67], qui n'a malheureusement pas induit une protection efficace dans la plupart des sites d'essai, ont fourni un espoir sérieux dans la possibilité d'immunisation contre le paludisme.

Certaines études d'immunisation avec des sporozoïtes irradiés ont montré une immunité protectrice partielle ou complète chez la souris, chez le singe et chez l'homme contre une infection expérimentale au laboratoire avec des sporozoïtes vivants [49 ; 12 ; 57]. D'autres études ont montré que des infections répétées entraînent une acquisition d'immunité naturelle mais partielle, de courte durée et souvent spécifique d'espèce [6]. Les transferts passifs d'immunoglobulines purifiées obtenues dans les sérums des sujets immuns en Afrique ont entraîné une diminution de l'infection chez les enfants Thaïlandais [58].

Une étude d'immunisation avec un vaccin à base de MSP1 menée par Kumar S, *et al.* 2000 a montré une protection efficace contre une infection létale chez le singe *Aotus nancynai* [35]. Une étude de phase 1 menée en 1999 à Washington DC avec une protéine recombinante de la partie C-terminale de la MSP1 fusionnée à des épitopes des cellules T helper de la toxine tétanique a entraîné une séroconversion qui a protégé 9 sur 16 volontaires immunisés à forte dose, mais avec des problèmes d'hypersensibilité après la 3^{ème} dose [34].

Des essais de vaccination effectués dans le modèle *Plasmodium fragile*/singe et *Plasmodium chabaudi adami*/souris avec AMA-1 exprimée sous forme de protéine recombinante dans le système *Baculovirus* a montré une protection chez le singe et la souris [2 ;12].

Les études préliminaires de fragment recombinant ou synthétique du CSP (Circumsporozoite protein) chez l'homme ont montré que ces vaccins sont bien tolérés et immunogènes, mais leur efficacité est limitée [7 ; 26]. Ceci pourrait être dû en une insuffisance de stimulation des cellules T auxiliaires.

Une approche récente développée par le WRAIR en collaboration avec le GSKbio a consisté à combiner une version recombinante de la partie C-terminale de la région répétitive NANP du CS avec des épitopes des cellules T auxiliaires constitués par l'antigène de surface du virus d'hépatite B [65], ce candidat vaccin dénommé RTS, S est associé à un puissant adjuvant SBAS2 à base de Monophosphoryl Lipide A (MPL) et du QS21 (un dérivé de l'écorce du *Quillaja saponaria*) renommé plus tard AS02A.

Le RTS, S/AS02A a été un bon inducteur de la réponse cellulaire de type Th1 et a entraîné une forte immunité humorale avec production d'une forte concentration d'IgG (immunoglobuline G) dirigée contre la région répétitive du CSP [36]. Le RTS, S/AS02 a montré une efficacité de 71% chez les adultes semi immun en Gambie durant les 9 premières semaines de suivi, mais cette efficacité est revenue à 0% à la fin de la 15^{ème} semaine [9].

3. AMA1

3.1. Historique

Avec l'émergence de résistance du plasmodium aux médicaments antipaludéens, le développement d'un vaccin est devenu prioritaire.

La plupart des recherches vaccinales de stade sanguin est concentrée sur les antigènes qui sont exprimés sur la surface du mérozoïte. Les antigènes les plus étudiés sont MSP1 (Merozoite surface protein-1) et AMA1 (apical membrane antigen-1) qui sont les principaux candidats de vaccin de la phase sanguine asexuée du cycle de développement de *P. falciparum*

3.2. Structure

AMA1 est une protéine membranaire de type 1 ; localisée dans le micronème, organelle présente dans la région apicale du mérozoïte qui contient les ligands pour les récepteurs des globules rouges, est produite par les schizontes matures des érythrocytes [14]. La protéine comporte une région ectoplasmique (546 acides aminés), un segment trans-membranaire (21 acides aminés) et un domaine cytoplasmique (55 acides aminés) [55]. Lors de l'invasion de l'érythrocyte par le parasite, AMA1 se repartie sur toute la surface externe de l'organisme et subit une série de coupures protéolytiques. AMA1, un polypeptide de 83 kda est transformé par dégradation protéolytique en une molécule de 66 kda qui est exportée à la surface du mérozoïte lors de la rupture des schizontes ou durant la phase d'invasion du globule rouge [69 ; 30]. AMA1 a une structure tridimensionnelle.

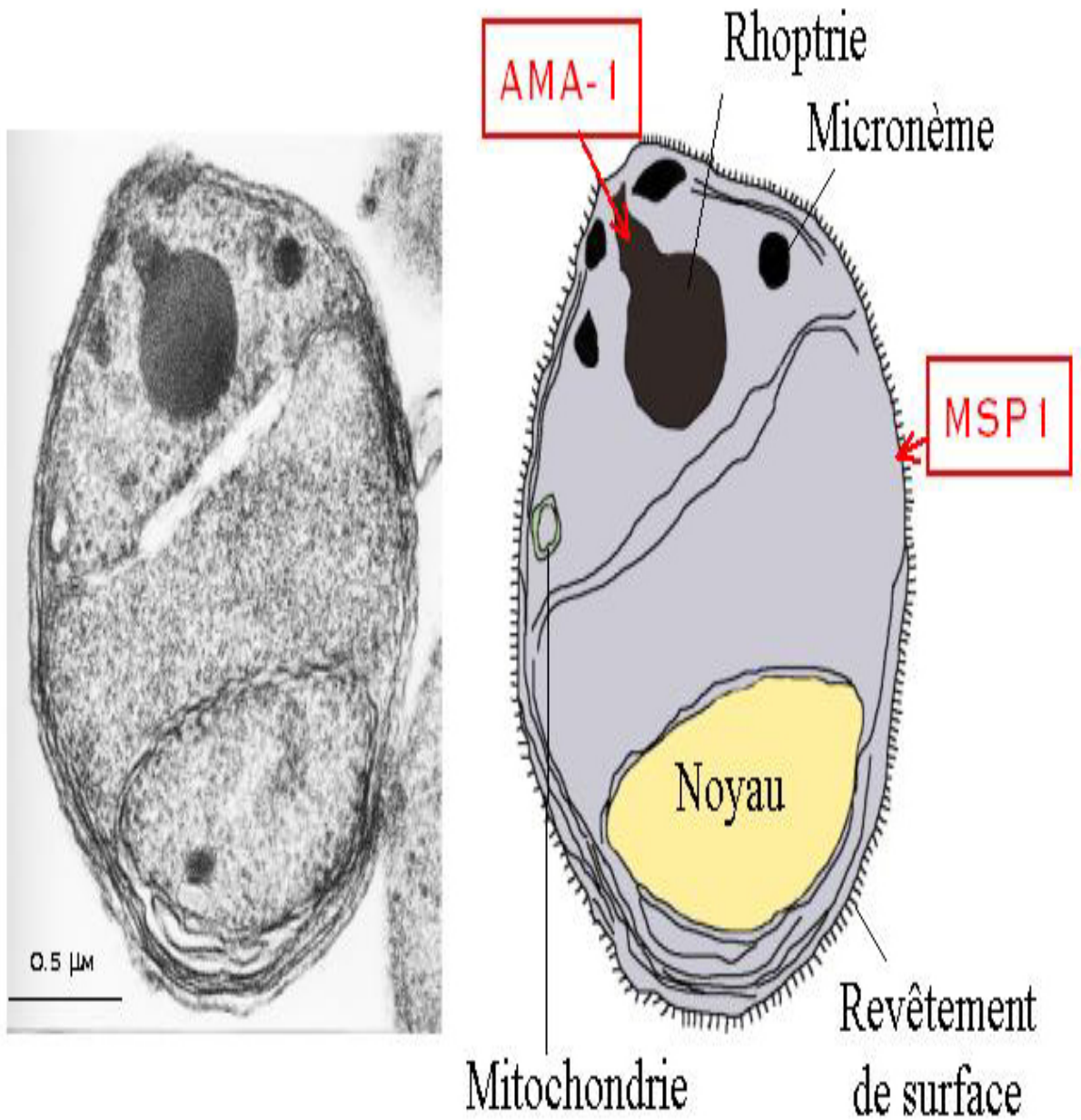


Figure 3 : Localisation de AMA 1 (Antigènes de surface du *Plasmodium* ; source : <http://www.pasteur.fr/recherche/unités/ImmStr>)

3.3. Mécanisme d'action

Bien que la fonction biologique d'AMA1 ne soit pas encore bien caractérisée au niveau moléculaire, un rôle important dans l'invasion érythrocytaire est fortement indiqué par l'observation que la présence d'anticorps anti-AMA1 peut inhiber ce processus. Le gène AMA1 est relativement conservé, les anticorps monoclonaux purifiés dirigés contre AMA1 ont entraîné une inhibition de l'invasion des érythrocytes par les merozoïtes [21]. En outre, chez le modèle primate et de la souris, les anticorps monoclonaux anti-AMA1 spécifiques, bloquent l'invasion des globules rouges *in vitro*, sans qu'il ne se produise une agglutination du parasite par les anticorps. L'antigène AMA1 est un candidat potentiel pour la vaccination contre les stades érythrocytaire de *P. falciparum* [14].

Plusieurs raisons amènent la AMA1 à la tête des candidats vaccins :

- Les anticorps naturels anti AMA1 existent chez une grande proportion d'individus (>90%) à Donéguébougou selon une étude préliminaire. Dans une étude transversale portant sur 200 individus âgés de 6 mois à 45 ans, conduite en 2002 et 2003, les médianes des titres des anticorps anti AMA1 ont atteint approximativement 1000 unités pendant le pic de la transmission palustre, bien qu'une variation significative ait été observée entre les groupes d'âge [18]. Les anticorps anti AMA1 ont été détectés par Thomas *et al.* en 1994.

En 2001, les travaux de Hodder *et al.* ont montré que ces anticorps inhibaient *in vitro* l'invasion des mérozoïtes.

- L'immunisation active de la souris et du singe par la AMA1 confère une protection contre le paludisme de la souris et du singe [36; 2].

3.4. Vaccin AMA1-C1

Le vaccin AMA1-C1 contient un mélange à part égal de la portion de l'ectodomaine correctement pliée de AMA1 recombinant de deux clones différents *P. falciparum* : les clones FVO et 3D7. Les protéines AMA1 FVO et AMA1 3D7 ont été exprimées séparément comme protéines du recombinant sécrétées dans *Pichia pastoris*, purifiées et combinées en quantité égale. Le choix du vaccin combiné est lié aux inquiétudes relatives au polymorphisme du parasite et l'évidence de protection spécifique

à la population de parasites. Ces deux clones ont été choisis parce que leurs séquences sont suffisamment différenciées parmi l'ensemble des clones de *P. falciparum* séquencés [21]. L'objectif est de fournir une protection contre les différents clones du parasite.

D'autres évidences indiquant que la combinaison des deux formes d'AMA1 permettra de mieux couvrir le polymorphisme de l'allèle AMA1 et une plus large protection, des études réalisées chez les lapins au MVDB (Branche de Développement du Vaccin contre le paludisme). Quand on a immunisé avec une combinaison de AMA1 FVO et AMA13D7 recombinant, les titres des anticorps de chacun des deux antigènes étaient similaires aux titres obtenus chez les lapins immunisés avec chaque antigène séparément.

3.5. Le Recombivax HB

C'est un vaccin recombinant contenant l'antigène HBs purifié du virus de l'hépatite B obtenu par clonage et expression du gène viral dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Ce vaccin est adsorbé sur hydroxyde d'aluminium et son conservateur est le thiomersal. Sa fabrication, son conditionnement et sa composition est similaire à HB-VAX DNA. Vaccin pour une immunisation active contre l'infection causée par tous les sous-types connus du virus de l'hépatite B.



METHODOLOGIE

IV. METHODOLOGIE

1. Lieu d'étude

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

1.1. Historique

Le village de Donégébougou a été fondé au 19^{ème} siècle par un chasseur du nom de Donégué Niaré. De retour d'une chasse, il trouva le site propice à l'agriculture et à la chasse. Il s'y installa et ceci près du grand puits sacré qui demeura l'unique puits du village jusqu'à son tarissement dans les années 1960 ; il est présentement réhabilité.

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

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

1.1. Relief

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

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

1.3. Climat, végétation et faune :

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

- une saison de pluies de juin à octobre, avec le maximum de pluies en août et une forte densité anophélienne en septembre ;
- une saison sèche comprenant une saison sèche fraîche de novembre à février et une saison sèche chaude de mars à juin avec des températures moyennes élevées (31-33⁰ c).

Les précipitations annuelles atteignant environ 1800 mm de pluies par an, sont principalement enregistrées pendant la saison des pluies ; cependant une petite quantité est enregistrée au début de la saison sèche.

La température journalière varie entre 19 et 40 degrés.

La végétation est une savane arborée avec un tapis herbacé plus ou moins dense. L'arbre le plus fréquent est le karité (*Vitellaria paradoxa*).

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

1.4. Hydrographie

Le village possède un cours d'eau, la rivière Koba alimentée par les eaux de pluies; se trouve au sud du village de Donéguébougou. Ce principal cours d'eau constitue un gîte permanent pour le développement des anophèles pendant une bonne partie de l'année. A l'est du village, le Farani et à l'ouest le Banifarani sont deux cours d'eau qui ne tarissent qu'au mois de février. Pour ce qui est du Koba, son assèchement n'est total qu'au mois de mars.

1.5. Population

Essentiellement constitué de Bambara, de Malinké et de Peulh ; Donéguébougou a une population d'environ 1300 habitants (recensement 2003) qui est majoritairement jeune. Les religions pratiquées sont l'Islam, le Christianisme et l'Animisme.

1.6 Infrastructures socio-sanitaires

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

Un centre de recherche du MRTC composé de :

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

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

Les autres édifices publics sont représentés par une mosquée, une église catholique, une église protestante et un centre d'alphabétisation.

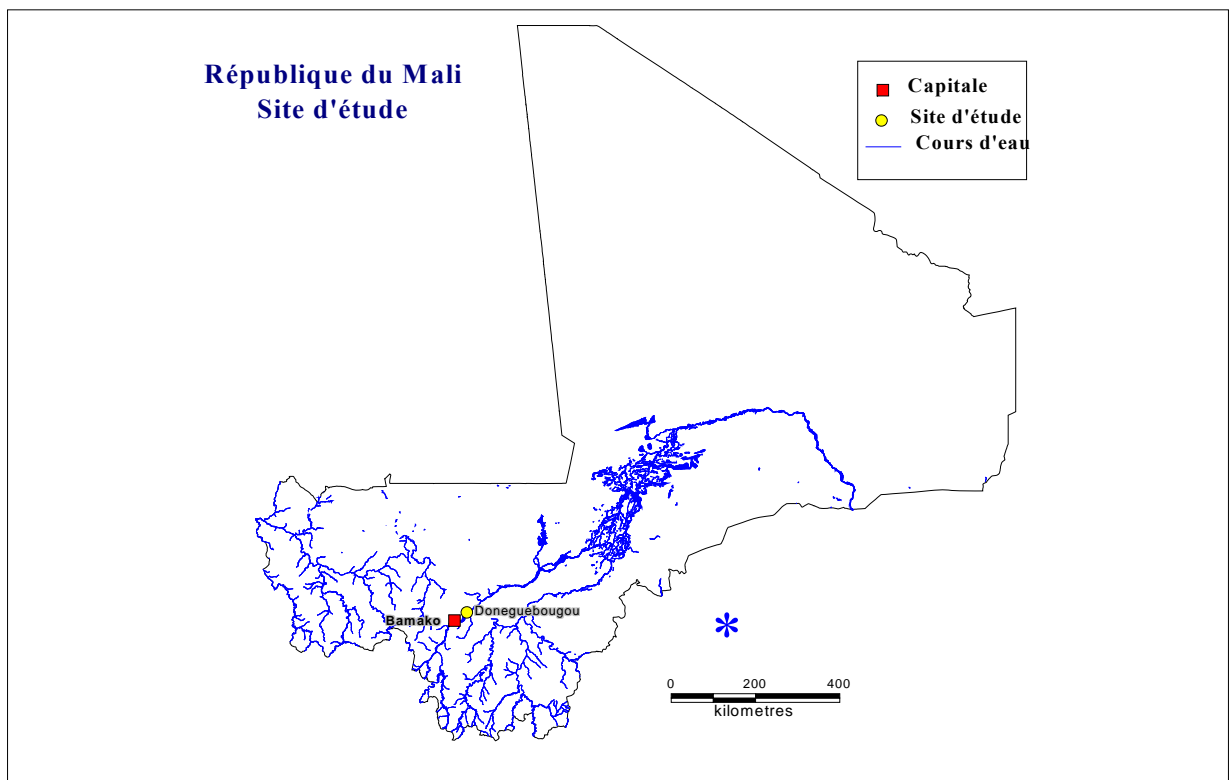


Figure 4: Localisation du site d'étude.

Source : Unité GIS du MRTC/FMPOS MALI.

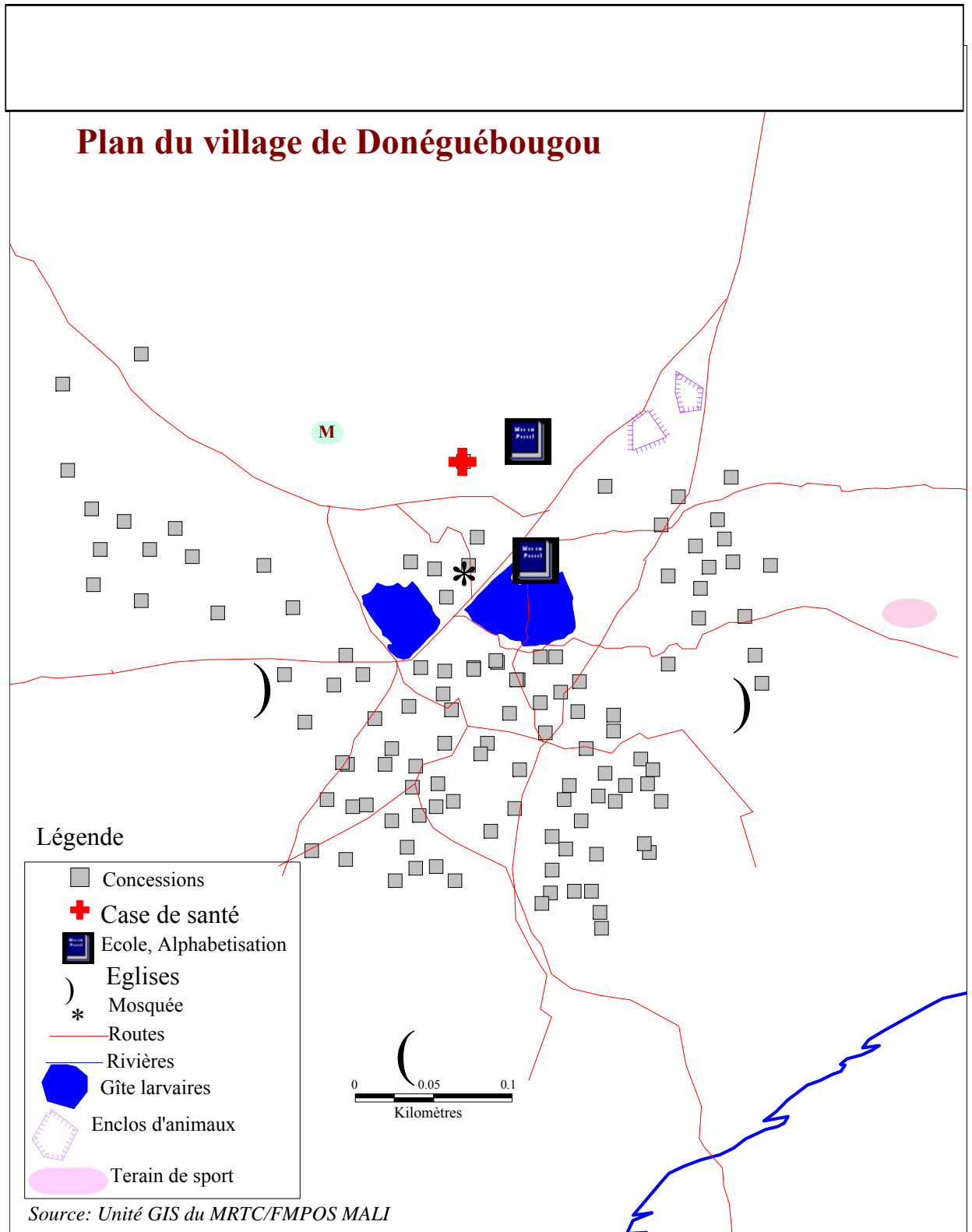


Figure 5 : Plan du village de Donéguébougou

2. Période d'étude

Cette étude s'est déroulée de Mai 2004 à Décembre 2005

3. population d'étude

La population d'étude était composée d'hommes et de femmes non enceintes en bonne santé, volontaires âgés de 18 à 45 ans exposés au risque du paludisme.

4. Type d'étude

Nous avons effectué un essai clinique randomisé contrôlé, double aveugle. Un suivi longitudinal sérologique a été effectué jusqu'à J540

Les prélèvements du sang ont été effectués sur tubes secs (SST) avant chaque immunisation et aux jours 0, 14, 28, 42, 90, 180, 270, 360, 374, 420, 480 et 540 pour le dosage des taux sériques d'anticorps anti AMA1.

Notre étude immunologique a été effectuée sur les sérums de ces prélèvements faits après la vaccination.

Randomisation: 54 enveloppes scellées, opaques et contenant le code (numéro de randomisation) du produit à administrer, dont l'allocation des codes a été faite par tirage aléatoire. Une enveloppe a été attribuée à chaque volontaire selon l'ordre d'arrivée à la vaccination.

Pour la vaccination, les volontaires ont reçu trois doses de vaccins, aux jours 0, 28 et 360.

L'étude a porté sur trois cohortes :

- Cohorte 1 : comprend 12 volontaires ayant reçu 5µg d'AMA1-C1 et 6 volontaires ayant reçu le Recombivax HB®,
- Cohorte 2 : comprend 12 volontaires ayant reçu 20µg d'AMA1-C1 et 6 volontaires ayant reçu le Recombivax HB®,
- Cohorte 3 : comprend 12 volontaires ayant reçu 80µg d'AMA1-C1 et 6 volontaires ayant reçu le Recombivax HB®.

Calendrier vaccinal selon la cohorte

	Cohorte 1 (n = 18)	Cohorte 2 (n = 18)	Cohorte 3 (n = 18)
période (calendrier en jour)	5 µg AMA1-C1 800 µg Alhydrogel® 424 µg Al ¹ (n=12) <u>ou</u> Recombivax HB® (n=6)	20 µg AMA1-C1 800 µg Alhydrogel® 424 µg Al ¹ (n=12) <u>ou</u> Recombivax HB® (n=6),	80 µg AMA1-C1 800 µg Alhydrogel® 424 µg Al ¹ (n=12) <u>Ou</u> Recombivax HB® (n=6)
0	Vaccination 1(jour 0)		
20		Vaccination 1 (Jour 0)	
28	Vaccination 2 (jour 28)		
40			Vaccination 1 (jour 0)
48		Vaccination 2 (jour 28)	
68			Vaccination 2 (jour 28)
360	Vaccination 3 (jour 360)		
380		Vaccination 3 (jour 360)	
400			Vaccination 3 (jour 360)

5. Sélection et recrutement des volontaires

5.1. Critères d'inclusion

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

- ✓ Sujets âgés de 18 à 45 ans, de sexe masculin ou féminin (sans grossesse)
- ✓ sujets résidents dans le village de Donéguébougou
- ✓ Pour les femmes, la volonté déclarée de ne pas tomber enceinte jusqu'à 1 mois après la dernière dose du vaccin
- ✓ Bon état général de santé déterminé sur la base des examens au dépistage
- ✓ Obtention d'un consentement éclairé par écrit des participants avant le début de l'étude
- ✓ Disponibilité et volonté de suivre les modalités du suivi pendant 78 semaines.

5.2. Critères de non inclusion

Non pas été inclus dans cette étude tous les volontaires qui avaient les critères suivants :

- ✓ grossesse déterminée par un test β -HCG des urines positives (pour les femmes)
- ✓ les participantes dont elles et/ou leurs époux ne désirent pas utiliser les méthodes contraceptives jusqu'à un mois après la 3^e dose de vaccin.
- ✓ les femmes allaitantes.
- ✓ l'évidence de maladies neurologiques, cardiaques, respiratoires, hépatiques, rhumatologiques, auto-immunes, infections chroniques ou maladies rénales, diagnostiquées cliniquement à l'interrogatoire, à l'examen physique et/ou par examen de laboratoire incluant l'analyse d'urine.
- ✓ maladie comportementale cognitive, ou psychiatrique, qui de l'avis du chercheur affecte la capacité du volontaire de comprendre et de coopérer avec l'exécution du protocole de l'étude.

- ✓ maladie hépatique évidente sur la base d'un examen de laboratoire (alanineaminotransférase [ALAT]) supérieur à 1,25 fois la limite supérieure des normes du laboratoire.
- ✓ maladie rénale évidente sur la base d'un examen de laboratoire (créatinémie supérieur à la limite supérieure de la norme du laboratoire ayant fait le test, ou plus que des traces de protéines ou de sang sur des bandelettes dans des urines).
- ✓ maladie hématologique évidente sur la base d'un examen de laboratoire (nombre de leucocytes inférieur à $3000/\text{mm}^3$ ou $13,510^3/\text{mm}^3$; hémoglobine $<0,9$ fois la limite inférieure de la norme du laboratoire ayant fait le test, par sexe ; nombre de lymphocytes $<1000/\text{mm}^3$ ou nombre de plaquettes $<120000/\text{mm}^3$).
- ✓ autres circonstances qui de l'avis du chercheur, porteraient atteinte à la sécurité ou au droit du participant ou qui rendraient le participant incapable d'adhérer au schéma de suivi de l'étude.
- ✓ participation à un autre essai de vaccin ou de médicament dans les 30 jours avant le début ou au cours cette étude.
- ✓ volontaires ayant eu des problèmes médicaux, occupationnels (thérapeutique), familiaux tels que l'alcoolisme ou usage illicite des drogues dans les 12 derniers mois.
- ✓ antécédent de réaction allergique sévère ou anaphylactique.
- ✓ antécédent d'asthme sévère.
- ✓ HCV positif à l'ELISA.
- ✓ Ag Hbs positif à l'ELISA.
- ✓ syndrome d'immunodéficience connu.
- ✓ prise de corticoïde ou de médicaments immunosuppresseurs dans les 30 jours précédents le début ou durant cette étude.
- ✓ administration d'un vaccin vivant atténué dans les quatre semaines ou d'un vaccin tué dans les deux semaines avant le début de l'étude.
- ✓ antécédent de splénectomie.
- ✓ administration des produits dérivés du sang dans les 6 derniers mois.

- ✓ sujets vaccinés avant par un vaccin antipaludique expérimental ou un vaccin de l'hépatite B.
- ✓ antécédent d'allergie connue au nickel.
- ✓ antécédent d'allergie connue à la levure.

6. Organisation pratique du travail :

6.1. Consentement

Après une rencontre avec les autorités sanitaires de Kati, une campagne d'information a été faite auprès de la population quelques semaines avant la première vaccination. Elle a consisté en une rencontre avec le chef du village et ses conseillers, les autorités politiques, administratives et locales de Kati et du village de Donéguébougou. La rencontre avait pour but d'expliquer le protocole et d'obtenir la permission communautaire. Un consentement éclairé individuel écrit de tous les volontaires a été obtenu après une explication plus détaillée du protocole à chaque volontaire en langue locale avec un témoin. Ce consentement était signé et daté par l'investigateur, le volontaire et le témoin ; avec la permission du mari pour les femmes. Tous les volontaires étaient soumis à un test pour évaluer le niveau de compréhension du consentement.

6.2. Dépistage

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

6.3. Vaccination

❖ **Poste d'identification :** Ce poste était composé d'un investigateur et d'un guide. Le travail consistait à identifier chaque volontaire par le guide au départ et aussi à travers le numéro de dépistage puis vérifier l'obtention du consentement éclairé. Après

cette vérification de l'identité, le volontaire était dirigé, vers les postes cliniques au cours de l'étude. .

❖ **Poste clinique :** composé de trois médecins tenant chacun une salle de consultation médicale. L'examen clinique et l'examen physique complet ont été effectués. Les participants étaient ensuite orientés vers la salle de prélèvement.

❖ **Poste de prélèvement :** tenu par les biologistes, dont l'un s'occupait de l'étiquetage des tubes SST et EDTA sur les quelles étaient inscrits: la date et l'heure du prélèvement, le numéro d'identification du participant et les initiales du technicien. L'autre biologiste était chargé du prélèvement du sang veineux sur un tube SST et un tube EDTA. Les prélèvements étaient chargés sur un portoir approprié ensuite transportés dans la salle d'analyse clinique dans un panier réservé à cet effet. Un échantillon d'urines était collecté pour chaque volontaire pour l'appréciation de l'hématurie et de la protéinurie, le test de grossesse pour les volontaires de sexe féminin.

La centrifugation, les tests hématologiques et biochimiques ont été effectués dans le laboratoire de GLP tenue par une partie des biologistes. Le participant était ensuite orienté vers la salle d'identification pour vérifier l'éligibilité pour la vaccination puis vers la salle de vaccination.

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

❖ **Postes de vaccination:** Constitué de deux médecins repartis dans deux petites salles réservées à cet effet et de deux pharmaciens chargés de la préparation des vaccins dans une autre salle séparée, communiquant avec les premières par deux petites fenêtres coulissantes. La randomisation à ce niveau était effectuée par l'attribution par ordre d'arrivée des volontaires des enveloppes randomisées opaques, scellées, contenant le code du produit à administrer. Après une vérification supplémentaire de l'identité du participant, il a reçu une dose de vaccin par injection IM dans le muscle deltoïde.

Préparation des vaccins : les deux pharmaciens étaient chargés de vérifier le numéro d'étude du participant en ouvrant l'enveloppe de randomisation correspondant à ce

numéro puis préparer le vaccin alloué au participant avec toutes les conditions requises, remplir le dossier des participants et passer la seringue étiquetée et le cahier d'observation aux vaccinateurs.

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

Les volontaires retournaient aux postes cliniques pour évaluation générale.

6.4. Suivi

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

6.5. Salle de réanimation : Tenue par un médecin anesthésiste réanimateur, équipée de deux lits d'hospitalisation, deux bonbonnes d'oxygène de capacité (7,5m³), un lot de matériels et produits de réanimation.

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

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

7. Etude immunologique

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

7.1. Technique d'ELISA

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

7.1.1. Principe

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

L'anticorps (sérum) à doser est ajouté dans le puits contenant l'antigène fixé (plaque sensibilisée). On rajoute le deuxième anticorps (conjugué) couplé à un marqueur enzymatique.

Le niveau des anticorps anti-AMA1 dans le sérum des volontaires a été mesuré par la technique ELISA. Le dosage a été effectué pour les deux souches 3D7 et FVO.

7.1.2. Matériel

Incubateurs ;

Réfrigérateurs ;

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

Pipettes multicanaux (*University Pipette Service*), 5-50µl et 50-300µl ;
(*ISB integra biosciences*)

Pipettes pasteur (*Gilson*) ;

Embouts pour pipette ;

Tubes ependorf ;

Tube falcon de 15 et 50 ml

Papier hygiénique ;

Gants ;

Un laveur de microplaques (*ULTRAWASH PLUS*) ;

Lecteur de microplaques (*VERSAmax microplate reader.*).

Le logiciel Softmaxpro programme.

Poubelles.

7.1.3. Réactifs

Carbonate de Sodium-Mallinckrodt AR Cat. No.7521;

Bicarbonate de Sodium-Mallinckrodt AR Cat. No.7412;

Eau désionisée fabriquée au laboratoire du DEAP ;

Eau distillée: Ultra pure Water-Advanced Biotechnologies, Inc.; Cat# 01-515-001;

Le lait : Bacto Skim Milk, DIFCO Laboratoireis, reorder # 0032-17-3 ;

TRIS Buffered saline (TBS) 10X, Biofluids, Cat# 616NS-000

Comprimés de Phosphatase : Sigma 104 Phosphatases substrate tablets. Cat# 104-105 ;

Hydroxyde de sodium 10N solution, J.T.Baker, Cat# 5674-02 ;

Tween-20 (Polyoxyéthylènesorbitan Monolaurate), Sigma, Cat# P-1379

Sodium azide 2% ;

Antigènes de sensibilisation : (Coating Antigens.) :

AMA1-Fvo: Lot: 0932 WRAIR

AMA1-3D7: Lot: 0942 WRAIR

Anticorps standard pour les deux clones d'AMA-1

Anticorps de chèvre anti-IgG humaine couplé à une phosphatase alcaline ;

Kirkegaard & Perry Labs, Inc. 1.0mg Cat# : 075-1006.

7-1-4 Préparation des solutions tampons

- Tampon carbonate (coating buffer 10X)

(Na)₂CO₃..... 15,74 g

NaHCO₃29,4 g

Q.S.P -----1000 ml

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

- Solution de lavage (Wash Buffer.) : 0.1% Tween-TBS.

TBS, 10X -----100 ml

Tween-20 -----1 ml

QSP -----1000 ml

L'ensemble est soumis à une agitation magnétique au moins 20 minutes à la température du laboratoire avant utilisation.

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

Skim Milk Powder -----25g

TBS, 1X----- 500 ml

QSP-----500 ml

L'ensemble est soumis à une agitation magnétique au moins 20 minutes à la température du laboratoire et gardé à 4 degré avant utilisation. Cette solution peut être utilisé jusqu'à deux semaines.

NB : pour la solution de dilution, ajouter du soduim azide à 0'1%

- Substrat (Révélateur.)

Pour préparer une solution de 10 ml de substrat :

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

- Solution stop. NaOH 5N

Pour préparer 50 ml de solution stop

NaOH 10N-----25 ml

Eau distillée-----25 ml

- Dilution du Standard :

La solution stock a une concentration de 100 UI. La concentration de travaille de la première dilution est de 20 UI. Donc on réalise une dilution de 1/5. Après on effectue une dilution en série à 10 gammes dans les puits d'une microplaque.

7.1.5. Mode opératoire

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

- 1) Etiqueter (Labeler) le nombre de plaque dont vous avez besoin : Mettre le nom du type d'antigène et la date sur chaque plaque.
 - 2) Chaque plaque requiert 10ml de solution coating ; Déterminer le volume total de la solution de coating dont on a besoin pour pouvoir sensibiliser le nombre de plaques utilisées.
 - 3) Diluer l'antigène à une concentration de 1µg/ml dans la solution 1X coating buffer. Mélanger cette solution.
 - 4) A partir de la pipette multichannel mettre 100µl dans chaque puits de chaque plaque. Couvrir les plaques avec une plaque vide et d'une fine membrane plastique (ClingWrap) et du papier aluminium.
 - 5) Incuber les plaques à 4 degrés pendant au moins une nuit.
- NB: Ces plaques peuvent être conservées à un maximum de 7 jours.

II. Blocage des plaques

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

Avec une pipette multichannel repartir dans chaque puits de chaque plaque 200 µl de la solution de blocage pour bloquer les espaces vides et placer les plaques à l'incubation à la température ambiante dans une chambre humide pendant 2 heures.

NB: on peut utiliser du lait avec sodium azide ou du lait sans sodium azide.

III. Premier anticorps (sérum)

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

2) Laver les plaques à la machine ULTRAWASHER PLUS et tapoter sur un chiffon propre.

3) Repartir 100µl par puits du premier anticorps (sérum dilué à tester) en « triplicate » à l'aide d'une pipette multichannel. Dans les deux dernières rangées H et G, mettre la solution du standard, incuber les plaques pendant 2 heures dans une chambre humide.

IV. Second anticorps

1) Laver les plaques à la machine avec du 0.1% Tween -TBS pour enlever les anticorps non liés.

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

V. Substrat

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

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

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

VI. Solution stop

Arrêter la réaction en ajoutant 25µl de la solution stop dans chaque puits.

VII. Lecture

Faire la lecture immédiatement après le stoppage à l'aide d'un spectrophotomètre (VERSAMAX) relié à un ordinateur à la longueur d'onde $\lambda_1 = 405$ et $\lambda_2 = 490$, et utiliser le programme SOFTmaxPRO 4.0

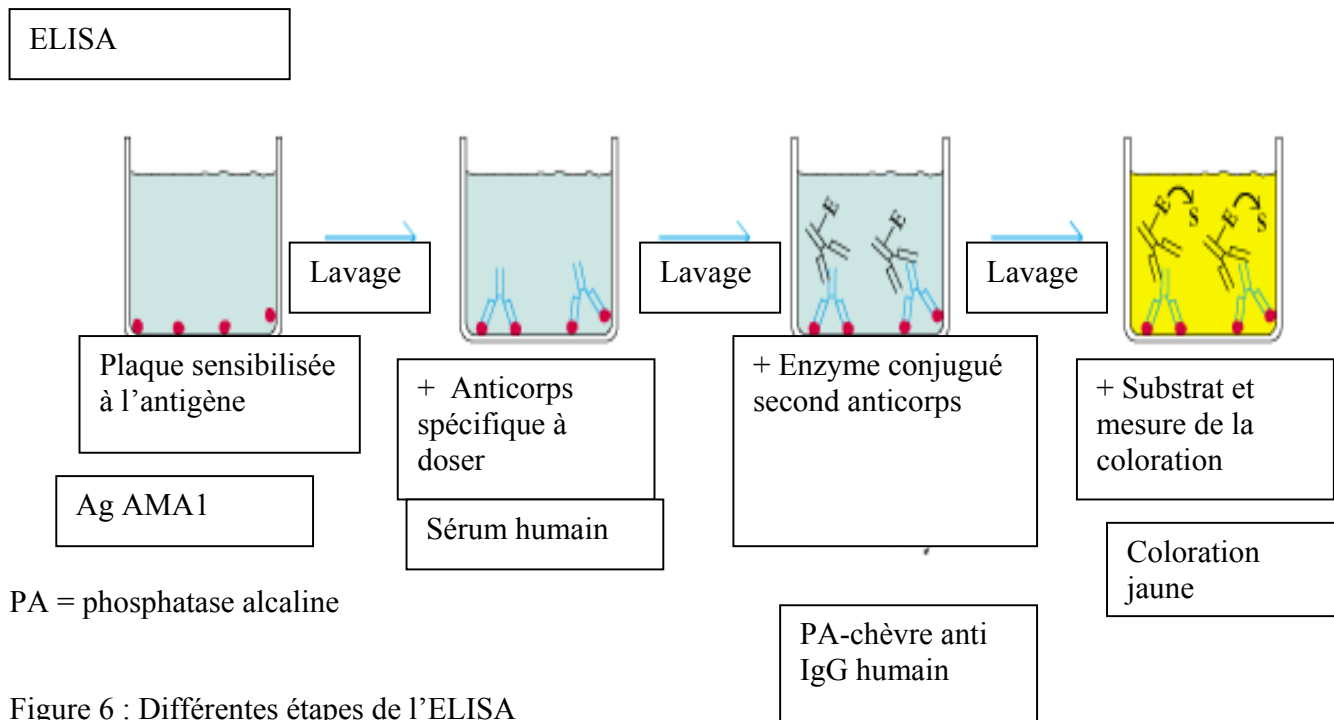


Figure 6 : Différentes étapes de l'ELISA

8. Considérations éthiques :

Nous avons obtenu préalablement l'approbation des comités d'éthique de l'université de Bamako, du NIAID /NIH.

Au tout début de l'étude nous avons entrepris des visites de courtoisie aux différentes autorités (sanitaire, municipale, chefs de quartier, notables).

Au cours de ces visites nous avons donné des explications détaillées sur l'étude et nous avons répondu aux questions. Nous avons obtenu la permission communautaire et le consentement éclairé individuel de tous les participants, toutes les dispositions ont été prises pour garantir la confidentialité. Ces mécanismes avaient pour but de surveiller de la façon la plus objective l'avènement d'effets indésirables, d'augmenter la protection des participants et de minimiser les risques.

Les participants ont bénéficié d'un suivi médical gratuit durant la durée de l'étude au centre de Donéguébougou. Toute affection diagnostiquée était traitée aux frais du programme vaccin et conformément aux normes et procédures de prise en charge des maladies en vigueur au Mali.

Pour les cas de paludisme, la prise en charge a été assurée conformément aux directives du programme National de Lutte contre le Paludisme. Pour le temps consacré à l'étude, les participants après approbation des comités d'éthique, ont reçu chacun une compensation de 75kg de riz et 75kg de mil donnée en trois tranches égales. Cette quantité a été rigoureusement calculée en fonction du temps perdu par volontaire pour la participation à l'étude, car les visites programmées étaient obligatoires même au moment des cultures. Cette compensation est donc un manque à gagner.

Les documents sources et les cahiers d'observations (CRF) étaient gardés dans des armoires métalliques fermées à clé.

9. Collecte, saisie, analyse des données:

Les données ont été récoltées sur les CRF. Les dossiers et les échantillons de produits biologiques des participants ne portaient pas leur nom. Un numéro d'étude et un numéro de randomisation avaient été attribués à tous les participants. Une double - saisie a été faite pour réduire les erreurs de saisie. Une série de monitorages internes et 7 monitorages externes (NIH, WHO) ont été instaurés pour une meilleure qualité des données. Le logiciel Microsoft Access a été utilisé pour la saisie des données, l'analyse a été faite sur les logiciels Stata et Epi Info.

Un plan d'analyse a été préalablement rédigé par le statisticien du MRTC responsable de la gestion des données. Les tests suivants ont été utilisés pour l'analyse des données :

-CCC (coefficient de corrélation de concordance) pour la comparaison les résultats des tests d'ELISA du NIH et du MRTC.

Degré d'accord et valeur de Kappa

Accord	Kappa
Excellent	> 0,81
Bon	0,80 - 0,61
Modéré	0,60 - 0,41
Médiocre	0,40 - 0,21
Mauvais	0,20 - 0,0
Très mauvais	< 0,0

-Le test χ^2 pour la comparaison des fréquences.

-Le Test T Student pour la comparaison de moyennes géométriques

Tous les sujets ayant un niveau d'anticorps inférieur à 100 UI ont été considérés comme mauvais répondeurs [39].



RESULTATS

V. RESULTATS

V.1 Caractéristiques sociodémographiques de la population d'étude

Tableau I: répartition des volontaires selon l'âge dans les différentes cohortes

Ethnie	Cohorte 1		Cohorte 2		Cohorte 3	
	AMA1-C1 (n=12)	Rec (n=6)	AMA1-C1 (n=12)	Rec (n=6)	AMA1-C1 (n=12)	Rec (n=6)
Moyennes age	29,83	28,83	31,75	28,00	36,58	30,33
Médianes	30,50	28,50	28,50	28,50	39,00	27,50
P	0,85		0,74		0,24	

Rec = Recombivax®

Les moyennes d'âge étaient comparables entre le groupe cas et témoin au sein des différentes cohortes.

Tableau II: répartition des volontaires selon l'ethnie

Ethnie	Cohorte 1		Cohorte 2		Cohorte 3		Total
	AMA1-C1 (n=12)	Rec (n=6)	AMA1-C1 (n=12)	Rec (n=6)	AMA1-C1 (n=12)	Rec (n=6)	
Bamanan	4	3	11	4	5	2	29 (53,7%)
Peulh	4	0	0	1	0	1	6 (11,1%)
Sarakolé	4	3	1	1	7	3	19 (35,2%)
Total	12	6	12	6	12	6	54 (100%)

Rec = Recombivax®

Les Bamanan étaient majoritaires avec 53,7 %.

Tableau III: répartition des volontaires selon le sexe.

Sexe	Cohorte 1	Cohorte 2	Cohorte 3	Total
Masculin	15	16	14	45 (83,3%)
Féminin	3	2	4	9 (16,7%)
Total	18	18	18	54 (100%)

Le sex-ratio est 5 en faveur des hommes.

V.2 Contrôle de qualité des résultats : comparaison des résultats NIH – MRTC

Tableau IV : Coefficients de corrélation de concordance entre les tests ELISA réalisés au MRTC et MVDB/NIAID/ NIH.

	AMA1 Fvo	AMA1 3D7	accord
J0	0,873	0,835	Excellent
J14	0,964	0,961	Excellent
J28	0,890	0,943	Excellent
J42	0,886	0,902	Excellent
J90	0.973	0,980	Excellent

Les concordances entre les résultats des tests réalisés au Mali et au MVDB étaient excellentes au cours des 5 premières visites (J0 à J90) pour les titres d'anticorps anti-AMA1Fvo et anti-AMA13D7.

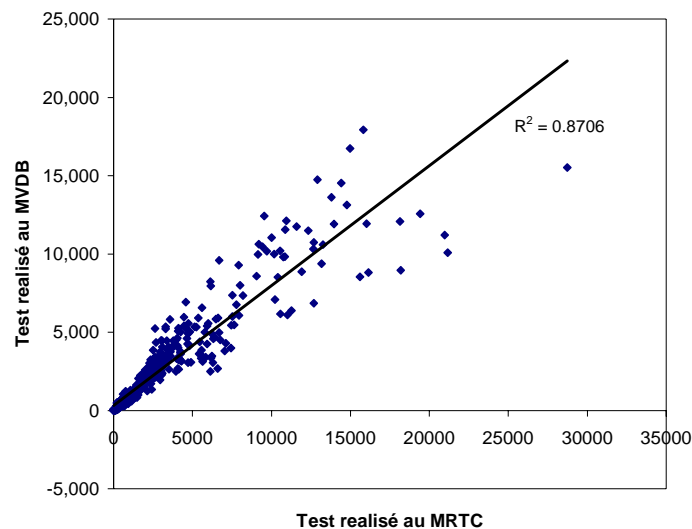


Figure7 : Corrélation entre les tests ELISA réalisés au MRTC et MVDB.

Nous avons observé qu'il existe une excellente concordance entre les tests ELISA réalisés au MRTC et au MVDB avec un coefficient de corrélation de 0,87.

NB : les résultats individuels comparatifs des tests ELISA réalisés au MRTC et au MVDB sont présentés en annexe.

V.3 Evaluation de l'immunogénicité

3.1 Evaluation de la réponse immunitaire anti-AMA1 dans la population d'étude à l'inclusion et au cours du suivi.

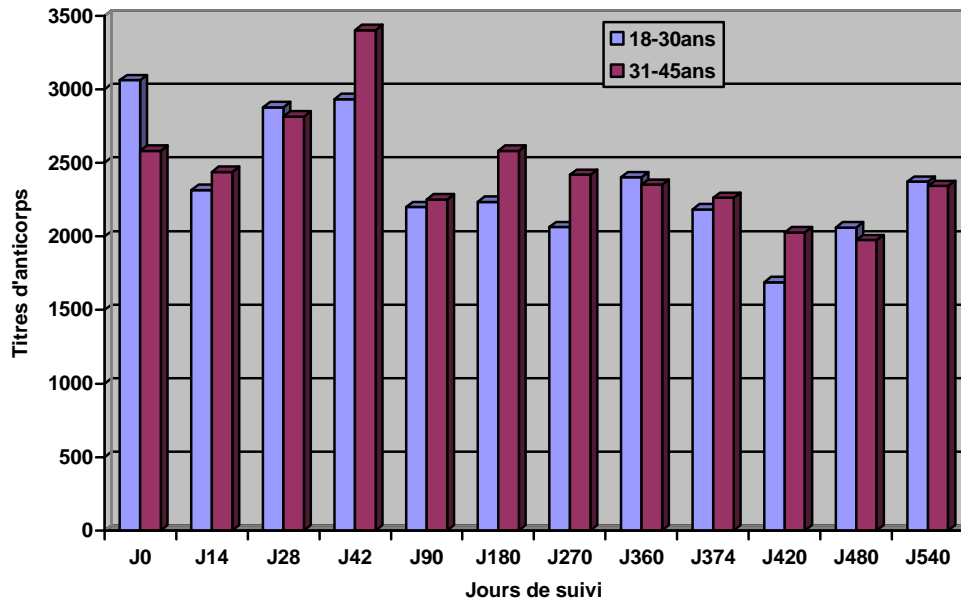


Figure8 : Niveau d'anticorps anti-AMA1 Fvo selon les groupes d'âge à l'inclusion et au cours du suivi.

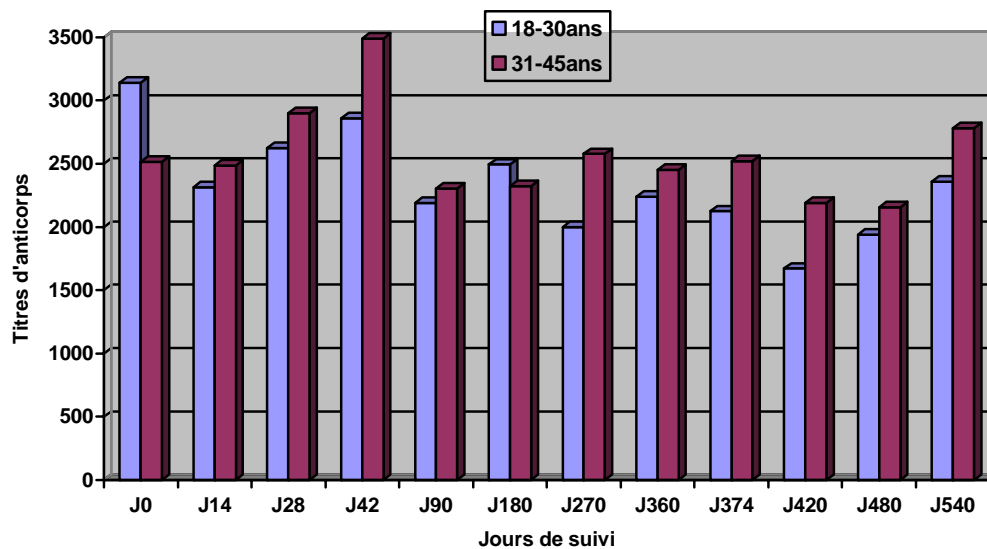


Figure9 : Niveau d'anticorps anti-AMA1 3D7 selon les groupes d'âge à l'inclusion et au cours du suivi.

3.2 Evaluation du niveau des anticorps AMA1 (Fvo et 3D7) dans les différentes cohortes de J0 à J540.

Tableau V: Distribution des anticorps anti-AMA1-C1 (Fvo) par type de vaccin dans la cohorte 1 au cours du suivi de J0 à J540.

Types de vaccin	Jours	Moyennes géométriques	Médianes	Valeurs minimales	Valeurs maximales
AMA1-C1 (5 µg) N = 12	J0	1417	1112,5	210	13254
	J14	915	692,5	130	11582
	J28	1019	825	233	9711
	J42	922	734	273	10857
	J90	1060	943,5	314	10746
	J180	1277	1519	321	15076
	J270	1387	1384	262	11748
	J360	1734	1928	358	13781
	J374	1149	1038,5	131	15674
	J420	1134	1048,5	238	10726
	J480	1140	1420	227	8862
J540	799	610	290	4696	
Recombivax N = 6	J0	1466	1126,5	321	7638
	J14	841	597	240	4292
	J28	835	551	189	4710
	J42	707	527	199	3428
	J90	627	477	167	2944
	J180	868	742,5	185	5540
	J270	716	586	191	3935
	J360	1011	846,5	192	5766
	J374	582	515,5	140	3243
	J420	536	407	135	3224
	J480	612	538	157	4213
J540	1468	1742	205	13525	

Le niveau d'anticorps le plus élevé a été enregistré à J360 dans le groupe ayant reçu 5 µg d'AMA1-C1.

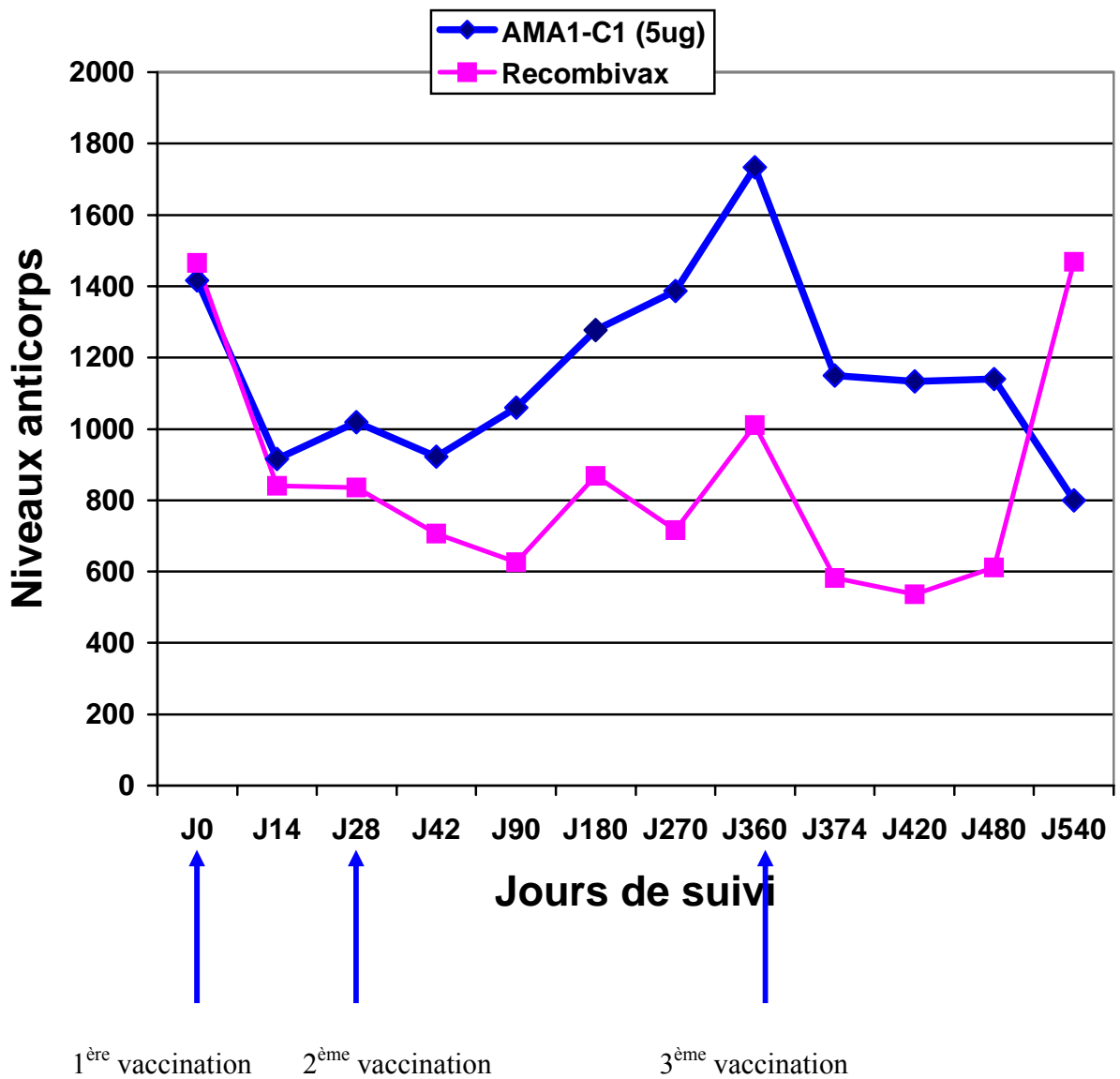


Figure 10: Evolution du niveau d'anticorps anti-AMA1 Fvo de la cohorte 1 dans les deux groupes d'étude.

Nous avons observé que les titres d'anticorps dans les deux groupes étaient statistiquement comparables, mais les titres sont en général plus élevés dans la groupe qui a reçu le vaccin AMA1-C1 que le groupe témoin. Le pic était atteint à J360 dans le groupe qui a reçu le candidat vaccin AMA1-C1.

Tableau VI: Distribution des anticorps anti-AMA1-C1 (Fvo) par type de vaccin dans la cohorte 2 au cours du suivi de J0 à J540

Types de vaccin	Jours	Moyennes géométriques	Médianes	Valeurs minimales	Valeurs maximales
AMA1-C1 (20 µg) N = 12	J0	956	972,5	46	15600
	J14	868	1428,5	79	10208
	J28	928	1152	38	11263
	J42	1340	1319,5	70	18192
	J90	1131	853,5	312	9057
	J180	909	589	253	7353
	J270	829	546	115	10077
	J360	628	334	51	6974
	J374	978	976	187	8207
	J420	784	494	191	6595
	J480	849	815	129	7162
	J540	1055	727	255	6309
Recombivax N = 6	J0	1236	2356,5	97	5832
	J14	879	1448,5	62	3464
	J28	1056	1532,5	153	4151
	J42	1190	1613	77	6168
	J90	1118	1709,5	111	3558
	J180	1044	1866,5	60	5966
	J270	809	1772	41	3454
	J360	749	1516,5	35	3449
	J374	727	1482	41	3207
	J420	676	1379	35	2799
	J480	1094	1470,5	320	2954
	J540	1491	1830	519	4295

Le niveau d'anticorps le plus élevé a été enregistré à J42 après la deuxième vaccination dans le groupe ayant reçu 20 µg d'AMA1-C1.

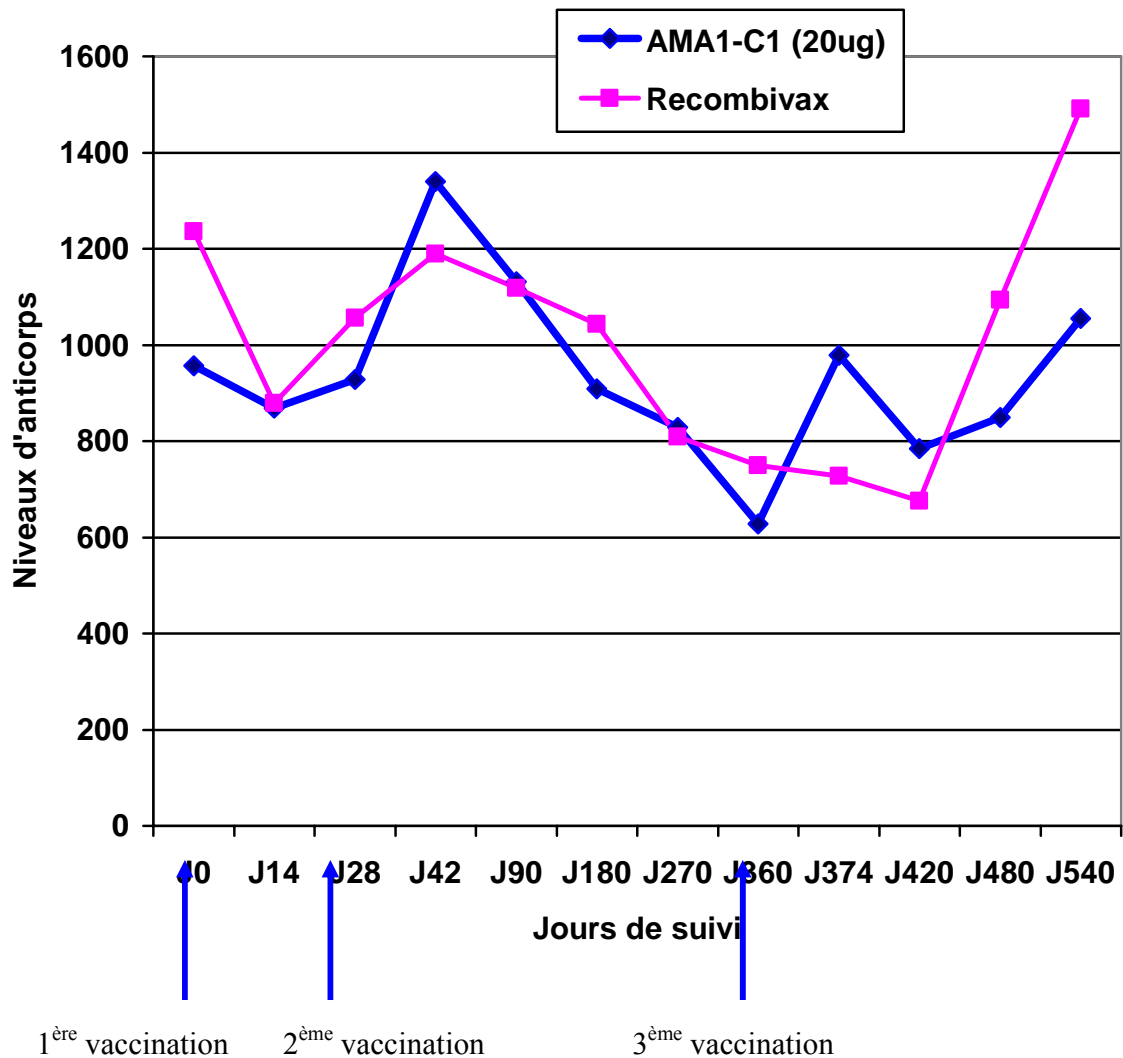


Figure 11 : Evolution du niveau d'anticorps anti-AMA1 Fvo de la cohorte 2 dans les deux groupes d'étude.

Nous avons observé que le pic était atteint à J42 dans le groupe qui a reçu le candidat vaccin AMA1-C1 et un léger « boosting » à J374 (2 semaines après la troisième dose) mais les titres d'anticorps dans les deux groupes étaient comparables.

Tableau VII : Distribution des anticorps anti-AMA1-C1 (Fvo) par type de vaccin dans la cohorte 3 au cours du suivi de J0 à J540

Types de vaccin	Jours	Moyennes géométriques	Médianes	Valeurs minimales	Valeurs maximales
AMA1-C1 (80 µg) N = 12	J0	1060	1456	76	6394
	J14	1771	1895,5	223	11920
	J28	2252	2432,5	215	12656
	J42	2772	2761	333	16014
	J90	1811	2062	195	10172
	J180	1588	1944,5	120	9806
	J270	1387	1629,5	129	9152
	J360	1267	1406,5	97	8085
	J374	1833	2080	339	10165
	J420	1143	1540,5	27	6729
	J480	1348	1594,5	155	7591
	J540	1466	1722,5	216	8976
Recombivax N = 6	J0	1008	1809	134	19422
	J14	685	1736	74	12340
	J28	831	1600	43	20982
	J42	787	1845	48	18150
	J90	674	1494	35	10542
	J180	731	1423	36	14961
	J270	582	1256	33	9441
	J360	594	972	38	14848
	J374	484	742	23	11667
	J420	580	784	38	9639
	J480	635	831,5	35	15658
	J540	942	925	57	15714

Le niveau d'anticorps le plus élevé a été enregistré à J42 après la deuxième vaccination dans le groupe ayant reçu 80 µg d'AMA1-C1.

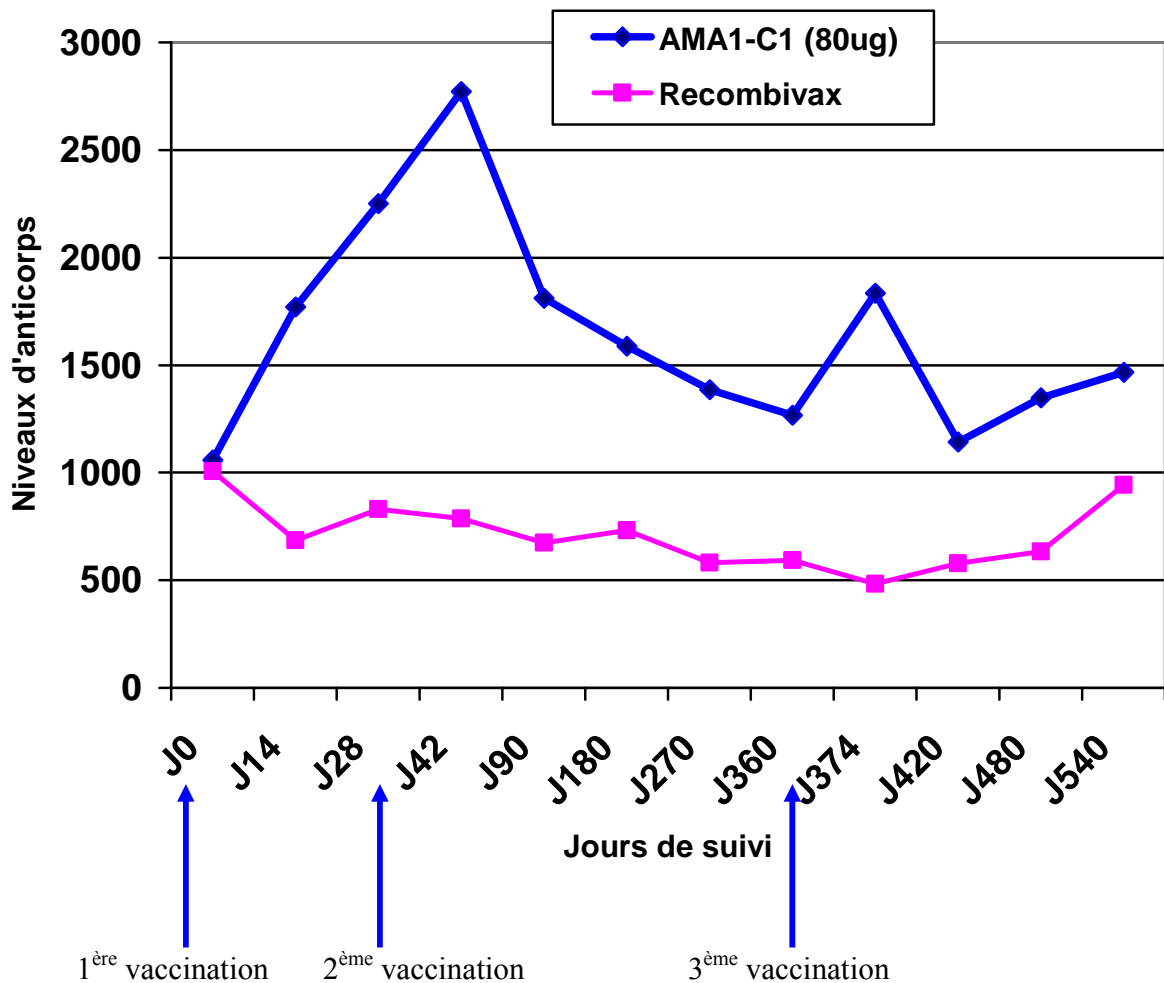


Figure 12 : Evolution du niveau d'anticorps anti-AMA1 Fvo de la cohorte 3 dans les deux groupes d'étude.

Nous avons observé que le pic était atteint à J42 dans le groupe qui a reçu le candidat vaccin AMA1-C1 et un léger « boosting » à J374. La moyenne géométrique des anticorps anti-AMA1 a progressivement augmenté dans le groupe AMA1-C1 après la première et deuxième vaccination, puis une diminution et un léger « boosting » après la troisième vaccination. Mais la courbe du groupe qui a reçu le candidat vaccin AMA1-C1 (dose de 80 µg) avait évolué constamment au dessus de courbe témoin.

Tableau VIII: Distribution des anticorps anti-AMA1-C1 (3D7) par type de vaccin dans la cohorte 1 au cours du suivi de J0 à J540

Types de vaccin	Jours	Moyennes géométriques	Médianes	Valeurs minimales	Valeurs maximales
AMA1-C1 (5 µg) N = 12	J0	1222	1176,5	99	28723
	J14	833	696,5	124	15818
	J28	901	916,5	153	12910
	J42	860	715	185	13803
	J90	931	796	137	14418
	J180	1175	1358,5	111	18324
	J270	1109	1073,5	121	15385
	J360	1395	1176	154	17273
	J374	1042	801,5	140	18646
	J420	992	735,5	164	14840
	J480	1030	964	122	11605
	J540	778	593,5	188	7298
Recombivax N = 6	J0	1129	731,5	323	7029
	J14	689	347,5	249	4706
	J28	676	376,5	176	4247
	J42	586	416	209	2887
	J90	514	335,5	146	2880
	J180	759	575	196	4756
	J270	609	408	133	3450
	J360	840	555,5	241	5205
	J374	538	447,5	138	3008
	J420	462	274	154	2940
	J480	517	340,5	168	3464
	J540	1736	1740,5	256	15058

Le niveau d'anticorps le plus élevé a été enregistré à J360 dans le groupe ayant reçu 5 µg d'AMA1-C1.

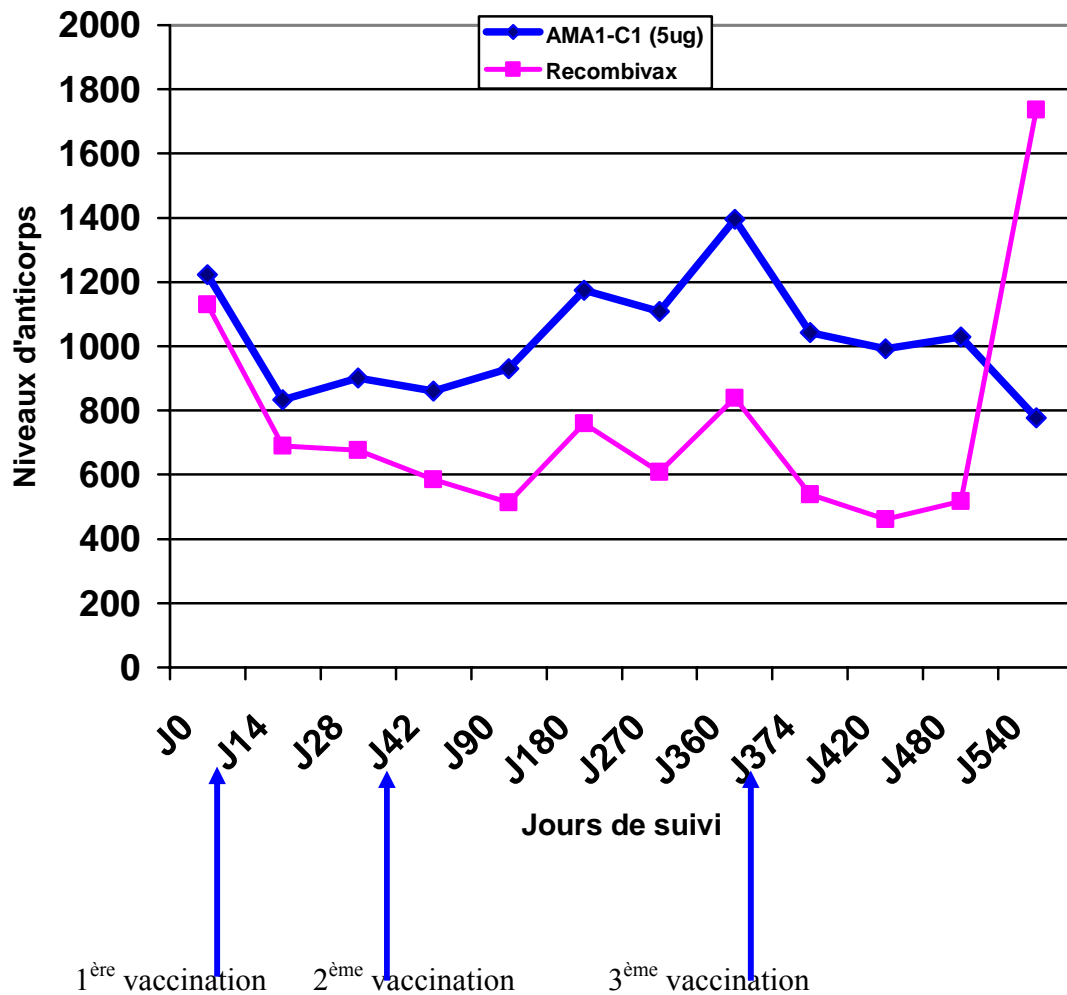


Figure 13 : Evolution du niveau d'anticorps anti-AMA1 3D7 de la cohorte 1 dans les deux groupes d'étude.

Nous avons observé que les titres d'anticorps dans les deux groupes étaient comparables, mais la courbe du groupe qui a reçu le vaccin AMA1-C1 était pratiquement au dessus de celle du témoin. Le pic était atteint à J360 dans le groupe qui a reçu le candidat vaccin AMA1-C1.

Tableau IX : Distribution des anticorps anti-AMA1-C1 (3D7) par type de vaccin dans la cohorte 2 au cours du suivi de J0 à J540

Types de vaccin	Jours	Moyennes géométriques	Médianes	Valeurs minimales	Valeurs maximales
AMA1-C1 (20 µg) N = 12	J0	462	553	1	16141
	J14	798	900,5	91	11018
	J28	593	755,5	1	12671
	J42	1168	1016,5	23	21156
	J90	1112	794	222	10416
	J180	931	559,5	138	8188
	J270	765	368	193	12080
	J360	645	508	124	8418
	J374	1011	855	152	9456
	J420	882	588	158	7554
	J480	921	798	139	8212
	J540	1283	1145	262	8419
Recombivax N = 6	J0	670	2212	5	5622
	J14	436	1461	1	4081
	J28	467	1771	1	4740
	J42	827	1456,5	10	7462
	J90	723	1736,5	7	4652
	J180	531	2003,5	1	6773
	J270	423	1902	1	3684
	J360	412	1570	1	4022
	J374	385	1540	1	3558
	J420	376	1494	1	3281
	J480	833	1532	46	3471
	J540	1272	2143	172	5764

Les niveaux d'anticorps le plus élevés ont été enregistrés à J42 après la deuxième vaccination et J540 dans le groupe ayant reçu 20 µg d'AMA1-C1.

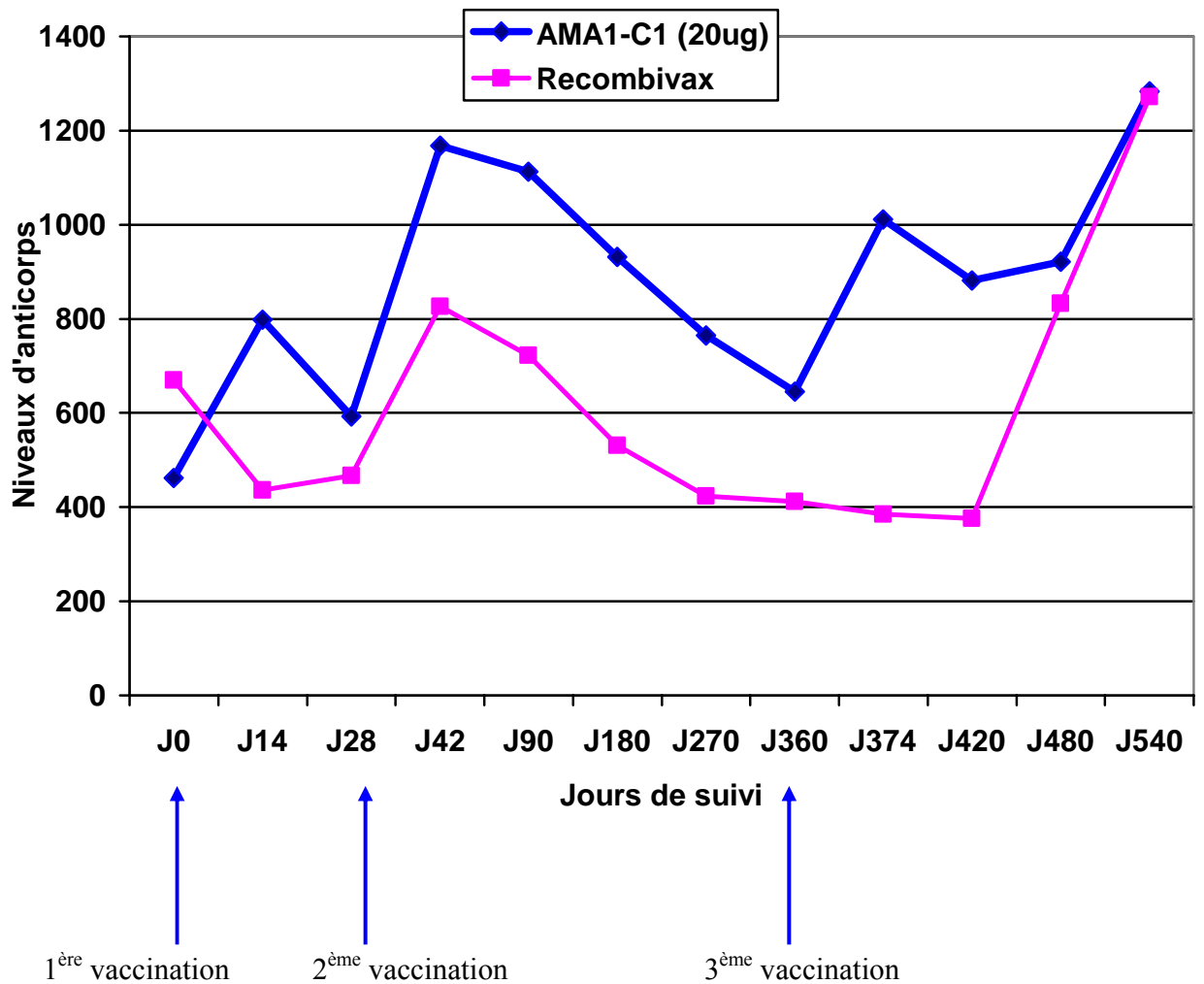


Figure 14 : Evolution du niveau d'anticorps anti-AMA1 3D7 de la cohorte 2 dans les deux groupes d'étude.

Nous avons observé que le pic était atteint à J42 dans le groupe qui a reçu le candidat vaccin AMA1-C1 et un léger « boosting » à J374 (2 semaines après la troisième dose) mais les titres d'anticorps dans les deux groupes étaient comparables mais la courbe du groupe qui a reçu le candidat vaccin AMA1-C1 était au dessus.

Tableau X : Distribution des anticorps anti-AMA1-C1 (3D7) par type de vaccin dans la cohorte 3 au cours du suivi de J0 à J540

Types de vaccin	Jours	Moyennes géométriques	Médianes	Valeurs minimales	Valeurs maximales
AMA1-C1 (80 µg) N = 12	J0	723	1332,5	1	10559
	J14	1751	1908	277	13956
	J28	2259	2470	177	14765
	J42	2845	2740	274	14986
	J90	1793	2062	142	10878
	J180	1110	2023	1	11271
	J270	1017	1648,5	3	14274
	J360	857	1493	1	11504
	J374	2006	2180	498	11344
	J420	1117	1740,5	24	10418
	J480	1330	1684,5	72	9370
	J540	1479	1652,5	57	9257
Recombivax N = 6	J0	736	1566	67	10945
	J14	467	1237,5	28	9440
	J28	880	1399,5	74	13170
	J42	860	1561	91	12679
	J90	574	1413	22	6121
	J180	716	1203	37	8395
	J270	590	1312	48	5470
	J360	581	924,5	57	8340
	J374	498	638,5	27	7859
	J420	646	896	40	5523
	J480	759	786,5	53	9293
	J540	1135	1009	96	8748

Le niveau d'anticorps le plus élevé a été enregistré à J42 après la deuxième vaccination dans le groupe ayant reçu 80 µg d'AMA1-C1.

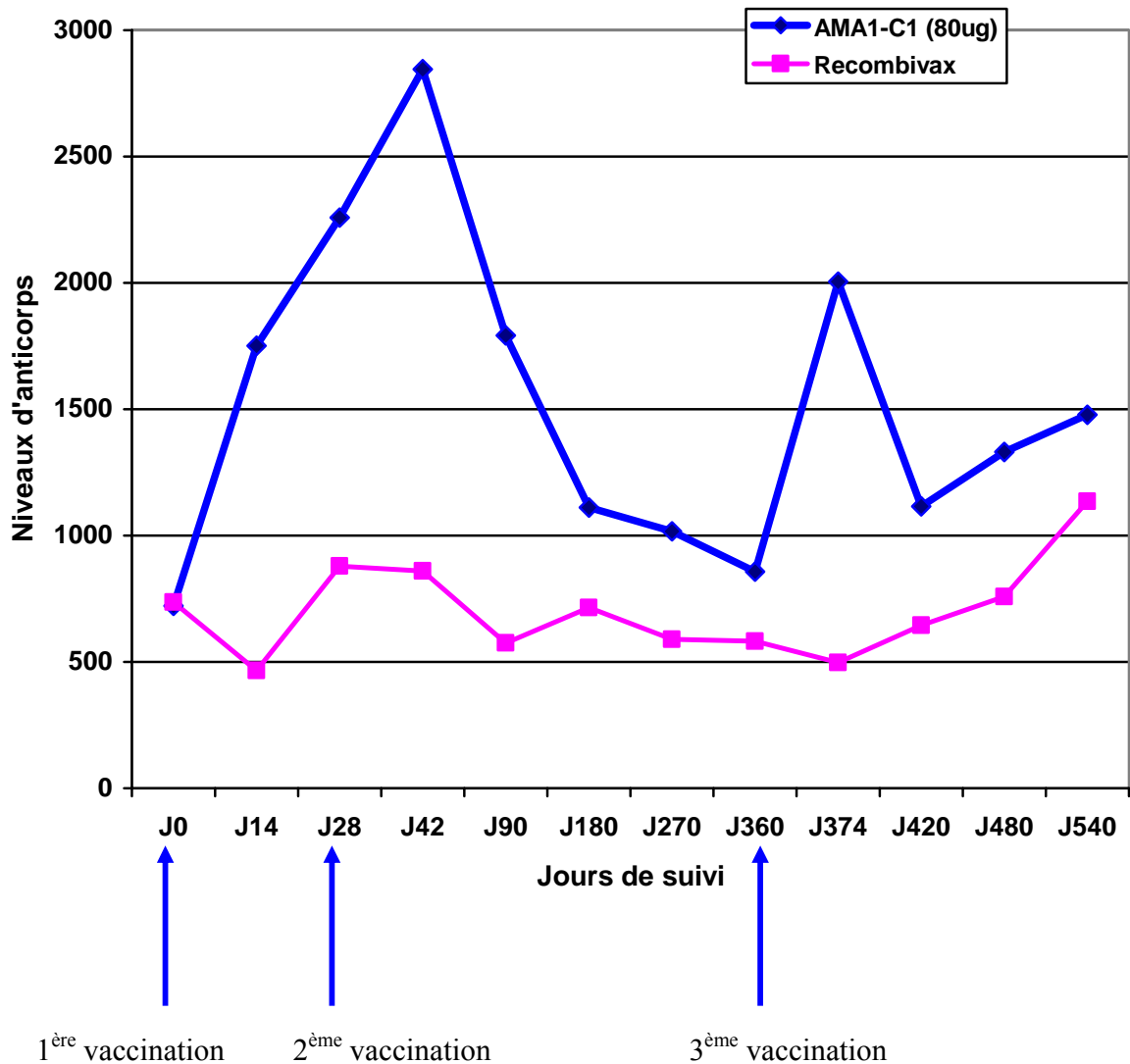


Figure 15: Evolution du niveau d'anticorps anti-AMA1 3D7 de la cohorte 3 dans les deux groupes d'étude.

Nous avons observé que le pic était atteint à J42 dans le groupe qui a reçu le candidat vaccin AMA1-C1 et un léger « boosting » à J374. La moyenne géométrique des anticorps anti-AMA1 a progressivement augmenté dans le groupe AMA1-C1 après la première et deuxième vaccination, puis une diminution et un léger « boosting » après la troisième vaccination. Mais la courbe du groupe qui a reçu le candidat vaccin AMA1-C1 (dose de 80 µg) avait évolué constamment au dessus de courbe témoin.

3.3. Détermination de la dose de AMA1-C1 qui génère la concentration la plus élevée d'anticorps

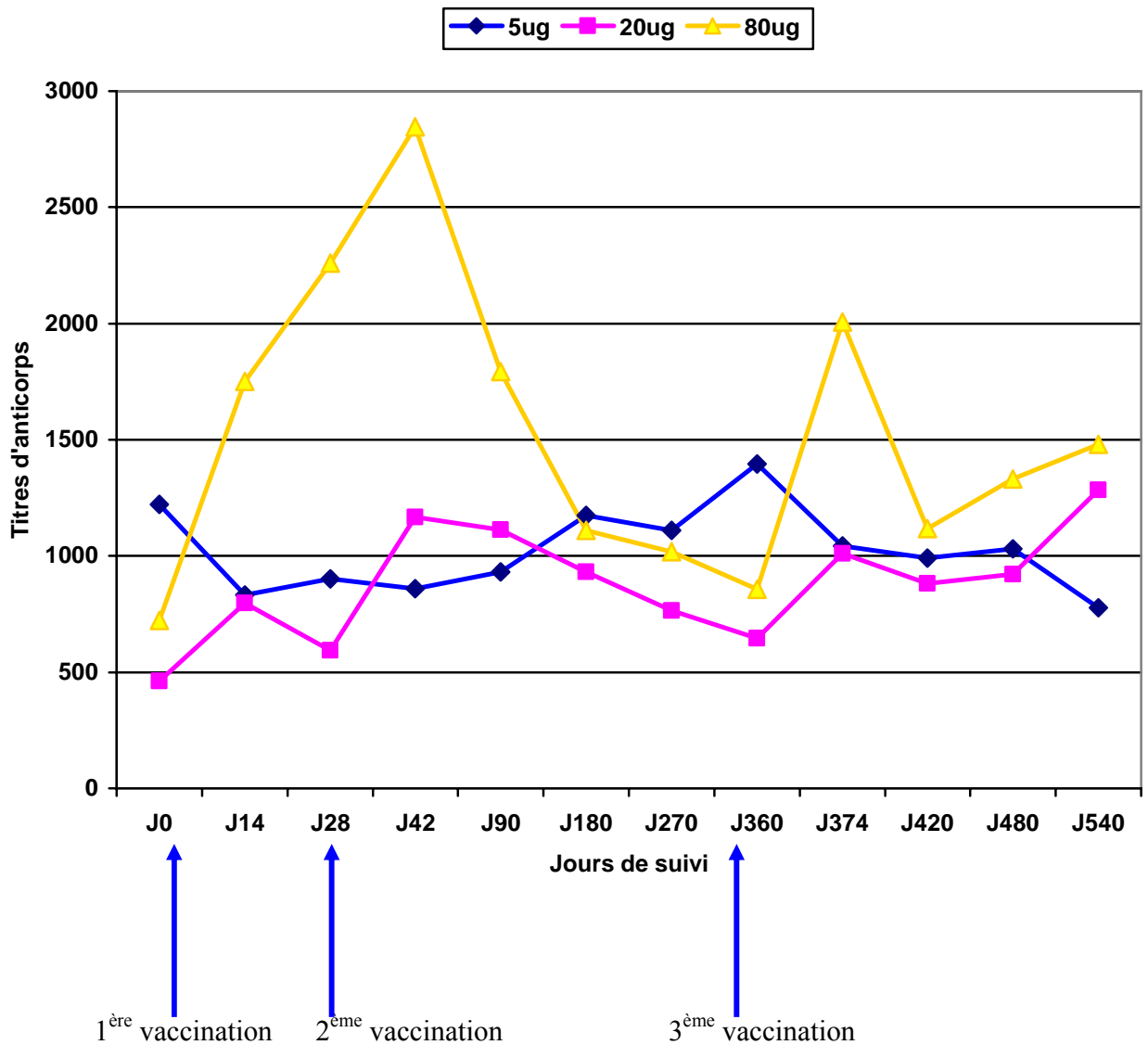


Figure 16 : comparaison des titres d'anticorps anti AMA1 3D7 selon les trois doses.

Les titres d'anticorps anti-AMA1-C1 dans le groupe de 80 μg étaient supérieurs aux groupes de 5 μg et de 20 μg . Le pic était atteint dans le groupe des 80 μg à J42 avec un léger « boosting » à J374 (2 semaines après la troisième dose)

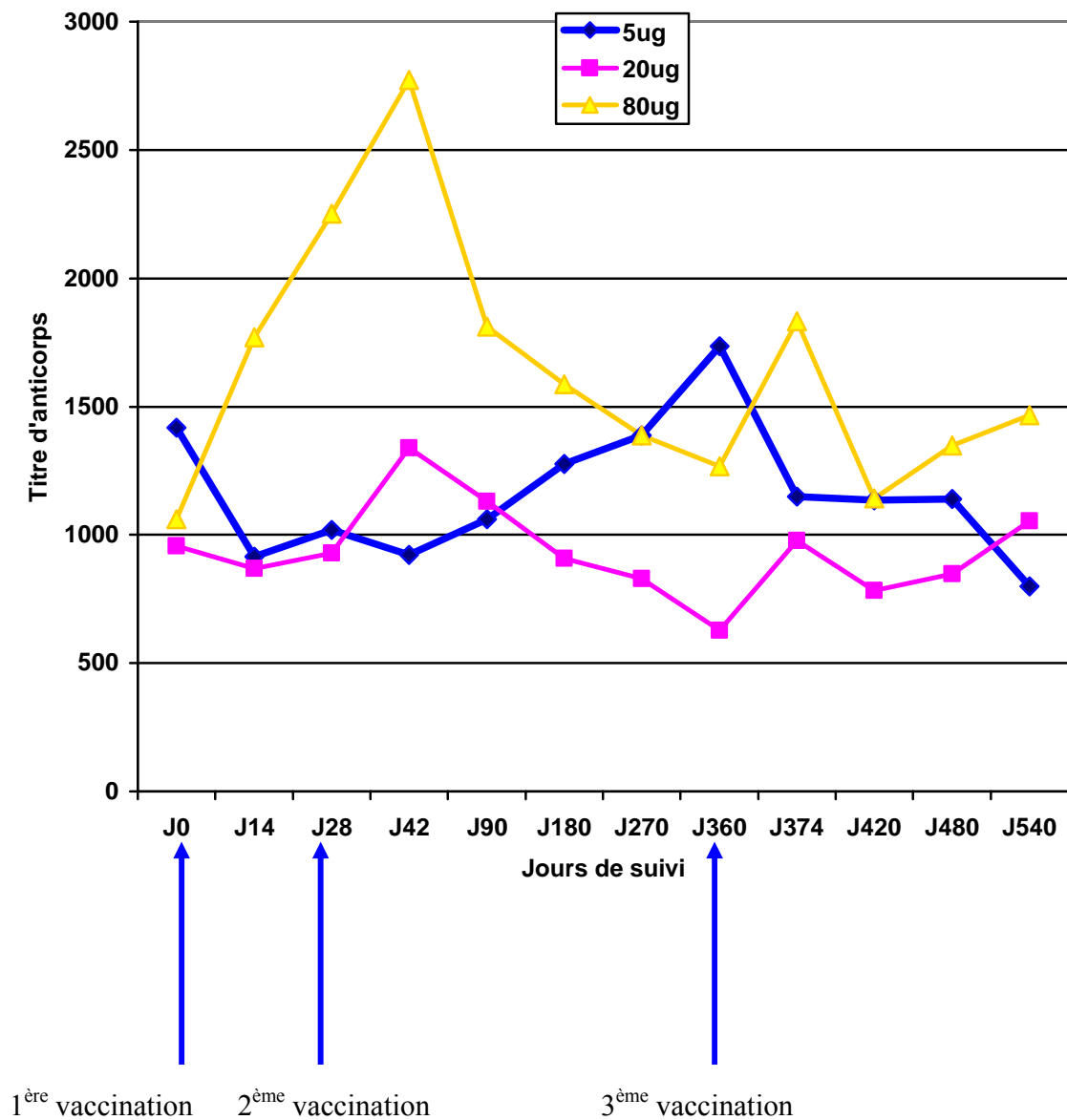


Figure 17: comparaison des titres d'anticorps anti AMA1 Fvo selon les cohortes (5µg, 20µg et 80µg).

Les titres d'anticorps anti-AMA1-C1 dans le groupe de 80 µg étaient supérieurs aux groupes de 5 µg et de 20 µg. Le pic était atteint dans le groupe des 80 µg à J42 avec un léger « boosting » à J374 (2 semaines après la troisième dose)

3.4 Comparaison du niveau des anticorps anti-AMA1 entre les deux groupes d'étude (AMA1 et Recombivax)

Tableau XI : Titre d'anticorps anti-AMA1-Fvo dans les deux groupes d'étude AMA1-C1 et Recombivax®

Jours	Cohorte1			Cohorte2			Cohorte3		
	AMA1-C1	Recombivax	p	AMA1-C1	Recombivax	P	AMA1-C1	Recombivax	p
	N=12	N=6		N=12	N=6		N=12	N=6	
J0	2670	1232	ns	2182	1905	ns	2893	1904	ns
J14	2583	1428	ns	2039	1782	ns	2581	2486	ns
J28	3467	1660	ns	1645	1743	ns	2571	2201	ns
J42	3287	1978	ns	1530	1618	ns	2379	3262	ns
J90	2937	988	ns	1958	1619	ns	3183	2040	ns
J180	2725	1114	ns	1804	1513	ns	2786	2671	ns
J270	2442	922	ns	1636	1580	ns	2477	1669	ns
J360	2149	1076	ns	1520	1442	ns	2265	2252	ns
J374	2265	1007	ns	1803	1668	ns	2505	2554	ns
J420	1951	1252	ns	1682	1542	ns	2274	3499	ns
J480	1599	4725	ns	2181	2416	ns	2748	2815	ns
J54	1303	4131	ns	1785	2049	ns	2508	3750	ns

ns = non significatif

Nous n'avons pas observé une différence statistiquement significative entre les deux groupes au sein d'une même cohorte

Tableau XII : Titre d'anticorps anti-AMA1-3D7 dans les deux groupes d'étude AMA1-C1 et Recombivax®.

Jours	Cohorte1			Cohorte2			Cohorte3		
	AMA1-C1	Recombivax	P	AMA1-C1	Recombivax	P	AMA1-C1	Recombivax	p
	N=12	N=6		N=12	N=6		N=12	N=6	
J0	3997	2462	ns	2265	2587	ns	2343	3306	ns
J14	2823	3019	ns	2654	2605	ns	2122	4651	ns
J28	2305	1508	ns	1967	1899	ns	3457	2704	ns
J42	1955	1638	ns	2049	1699	ns	3381	3262	ns
J90	2106	1571	ns	2246	2141	ns	4292	3808	ns
J180	1911	1763	ns	2331	1947	ns	4213	4979	ns
J270	2060	1093	ns	3588	2993	ns	4758	3563	ns
J360	1802	1236	ns	3494	2661	ns	4740	4458	ns
J374	2254	1058	ns	2006	2035	ns	3197	2198	ns
J420	1921	1180	ns	1946	1799	ns	3228	2849	ns
J480	2793	1580	ns	1856	2492	ns	2939	2459	ns
J540	2402	1878	ns	1790	2288	ns	2796	3589	ns

La différence observée n'était pas statistiquement significative entre les deux groupes au sein d'une même cohorte

3.5 Liste des sujets non répondeurs dans les groupes ayant reçu le vaccin AMA1-C1

Tableau XIII: Evolution du niveau des anticorps chez les mauvais répondeurs après les doses de vaccins AMA1-C1 selon la cohorte d'étude.

AMA1-C1 Fvo.

STDN	Dose	j0fvo	j14fvo	J28fvo	j42fvo	j90fvo	j180fvo	j270fvo	j360fvo	j374fvo	j420fvo	j480fvo	j540_fvo
15	5µg	210	219	233	300	456	458	473	692	492	379	314	411
26	20µg	120	79	219	342	520	275	115	51	1022	427	467	598
33		46	106	38	70	407	394	292	186	187	191	129	333
37	80µg	4569	4458	7526	8196	5917	4004	3500	3509	4066	27	3280	283
38		82	223	661	1190	655	423	281	182	339	552	347	4340
45		76	317	215	333	195	120	129	97	893	251	155	216

AMA1-C1 3D7

STDN	Dose	j03d7	j143d7	j283d7	j423d7	j903d7	j1803d7	j2703d7	j3603d7	j3743d7	j4203d7	j4803d7	j5403d7
15	5µg	99	134	153	256	137	111	121	159	250	185	122	188
26	20µg	106	110	139	499	825	595	230	136	1587	1104	970	1145
33		1	91	1	23	461	475	299	197	262	276	139	536
37	80µg	3649	4099	6621	7789	4819	3454	2824	322	3554	24	3052	561
38		120	313	926	1741	939	645	402	267	498	526	564	4459
45		1	277	177	274	142	1	3	1	793	176	72	57

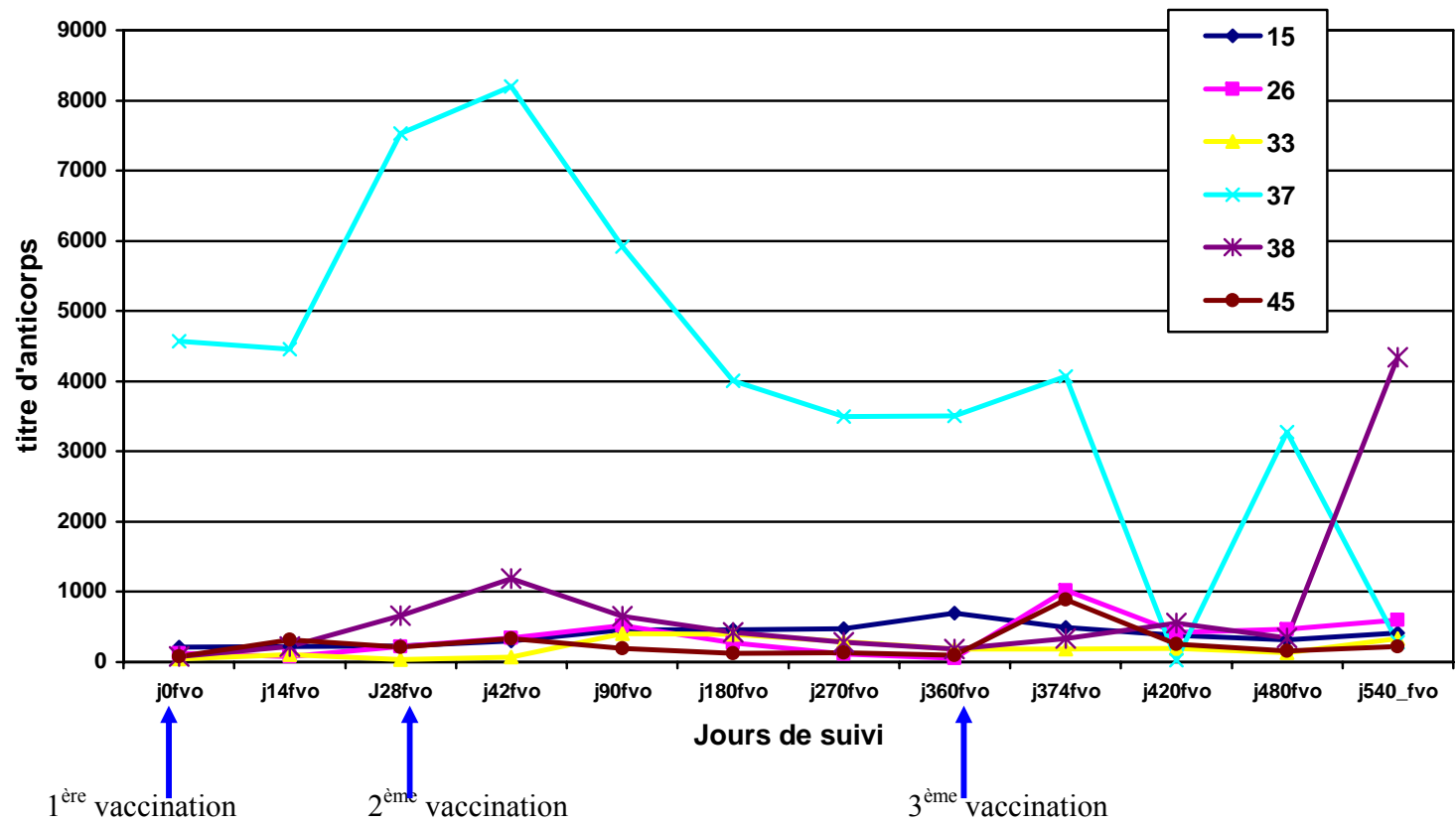


Figure18 : Evolution du niveau des anticorps chez les mauvais répondeurs après les doses de vaccins AMA1-C1Fvo selon la cohorte d'étude.

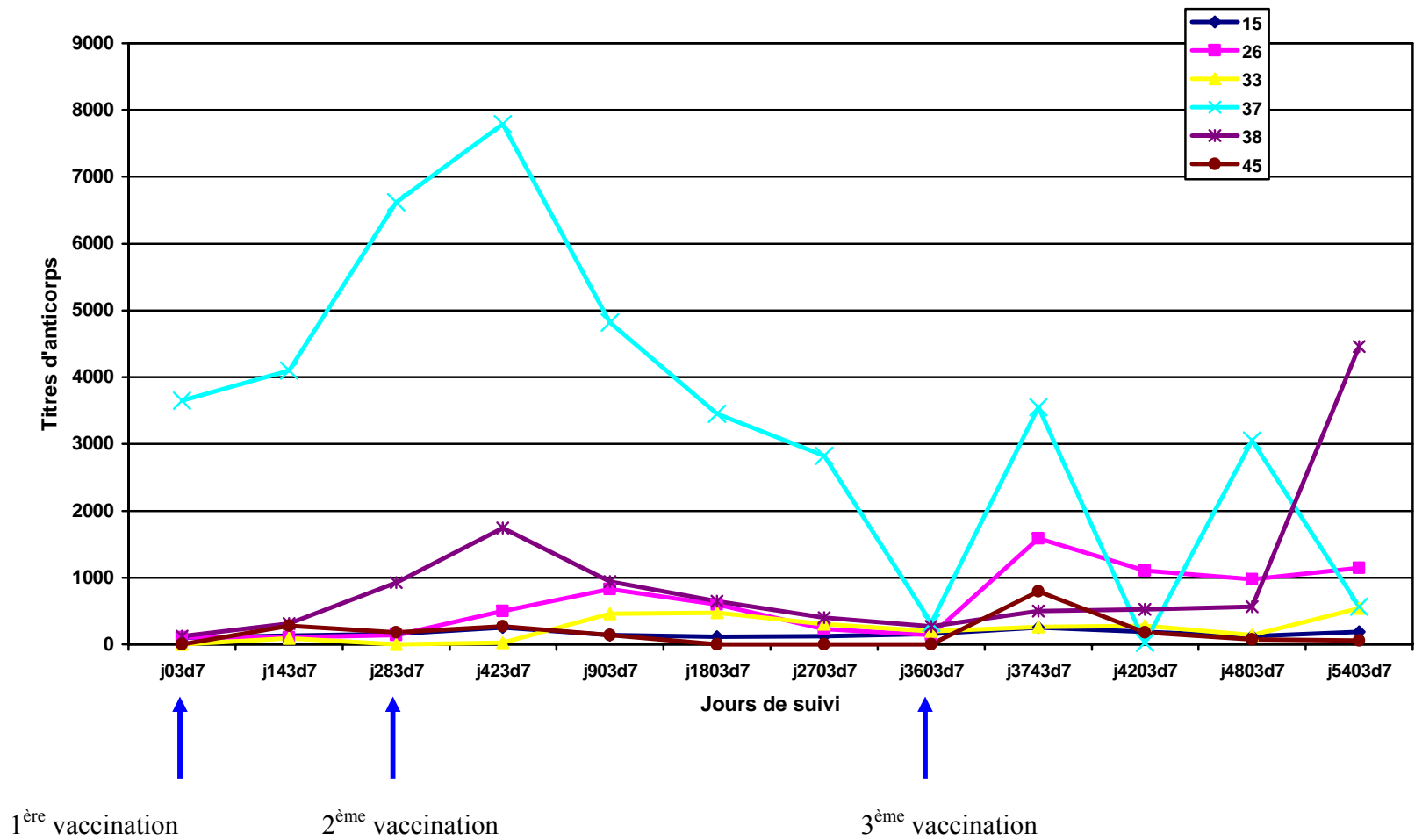


Figure 19: Evolution du niveau des anticorps chez les mauvais répondeurs après les doses de vaccins AMA1-C1 3D7 selon la cohorte d'étude.

3.6. Corrélation des anticorps anti-AMA1 Fvo et anti-AMA1 3D7

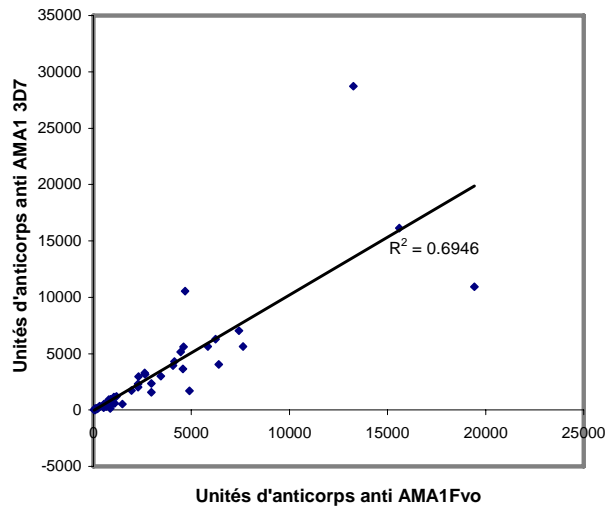


Figure 20 : Réponse humorale spécifique de souche de *P. falciparum* selon la période de Mai-Juin (J0)

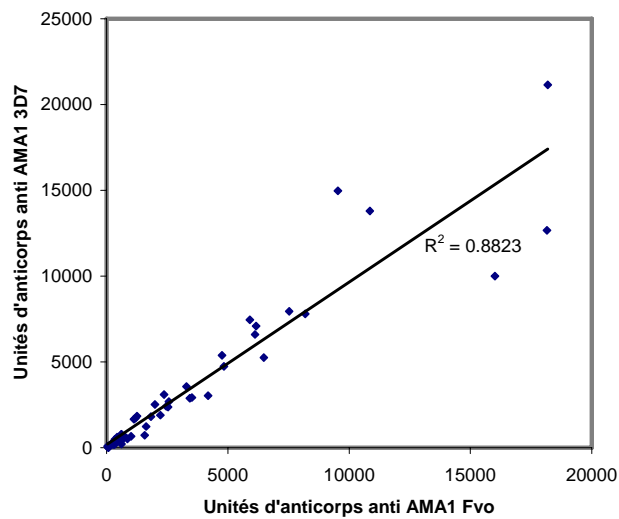


Figure 21: Réponse humorale spécifique de souche de *P. falciparum* selon la période de Juillet – Août (J42)

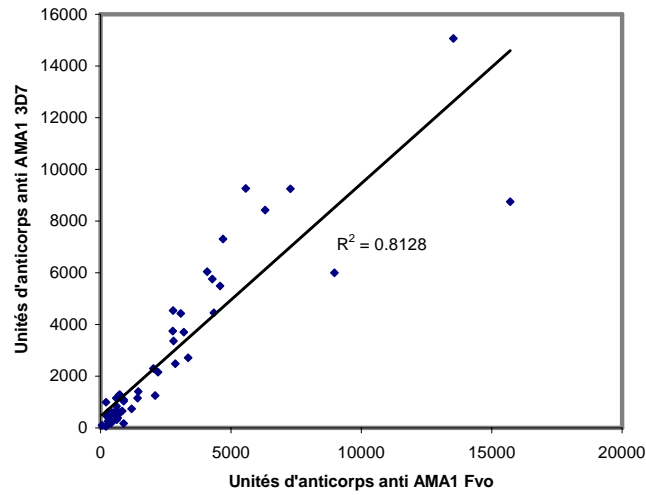


Figure 22: Réponse humorale spécifique de souche de *P. falciparum* selon la période de Octobre – Novembre (J540)

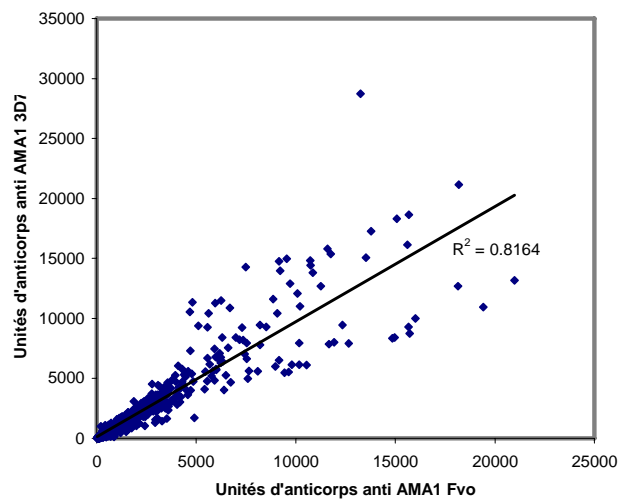


Figure 23: Réponse humorale spécifique de souche de *P. falciparum* selon la période (J0 – J540)

Les figures 20, 21, 22 et 23 montrent qu'il existe une bonne corrélation entre les souches Fvo et 3D7 dans respectivement 69%, 88%, 81% et 82% des cas.



COMMENTAIRES

DISCUSSIONS

VI. DISCUSSION

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

- depuis 1993 ce village a été le site des études entomologiques et épidémiologiques sur le paludisme, depuis 1998 ce village abrite des études de préparation de site pour la conduite d'essais cliniques de vaccins antipaludiques ;

- il existe de très bons rapports de confiance mutuelle entre la population de ce village et l'équipe du DEAP.

Le développement de tout produit pharmaceutique en l'occurrence les vaccins passent par une série de phases bien codifiées. En effet après la fabrication, le produit fait l'objet d'un développement préclinique qui mettra en évidence la tolérance et l'efficacité du produit chez les modèles animaux dont les résultats constitueront les pré-réquis pour le développement clinique.

Le développement clinique comporte quatre phases :

La Phase 1 : Administration du produit chez l'homme pour la première fois, cette phase utilise généralement un petit nombre de volontaires pour évaluer la tolérance du produit et avoir une première idée d'immunogénicité chez l'homme. Cette phase peut être subdivisée en: une phase Ia menée sur des volontaires adultes sains naïfs et une phase Ib menée sur des volontaires adultes sains vivant dans des zones d'endémie.

La Phase 2 : phase d'immunogénicité et d'efficacité, en plus de la détermination de la dose à administrer cette phase évalue la tolérance du produit chez un plus grand nombre de volontaires constitués de sujets cibles

La Phase 3 : phase d'efficacité chez un nombre considérable de volontaire et le dépôt d'AMM (Autorisation de Mise sur le Marché).

La Phase 4 : phase de pharmacovigilance.

Dans le cadre des essais précliniques, l'antigène de la membrane apicale (AMA1) de *P. falciparum* a été l'objet d'étude dans le modèle animal :

- Une étude a montré qu'une immunisation avec un fragment recombinant de l'ectodomaine de la protéine AMA1 de *Plasmodium chabaudi adami* entraîne une forte protection chez la souris. Cette protection dépendait de la réponse humorale et un transfert passif de ces anticorps monoclonaux spécifiques a induit une protection chez le lapin [2].
- Une immunisation passive utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques de la protéine AMA1 de *Plasmodium yoelii* a été très efficace contre une infection à cette espèce chez la souris [45].
- Une immunisation des singes par un fragment recombinant AMA1 produit sur *Pichia pastoris* a induit une protection significative contre l'infection à *P. falciparum* [3].

Ces différents résultats encourageants ont permis de poursuivre la recherche vaccinale chez l'homme pour tester la tolérance clinique et l'immunogénicité de cet antigène. Le premier essai en phase Ia a été mené chez des adultes américains en bonne santé vivant dans une zone indemne de paludisme. Les résultats obtenus par Elissa M. Malkin, *et al.* 2005, ont montré que toutes les doses de vaccin ont été bien tolérées. Au dernier jour de la vaccination, jour 360, les niveaux d'anticorps avaient décliné. En ce moment 7/10 de 5µg, 8/9 de 20µg et 5/5 de 80µg des individus vaccinés avaient toujours un niveau d'anticorps détectable avec une bonne tolérance et une bonne immunogénicité. De même des résultats similaires ont été obtenus par Saul *et al* avec une bonne tolérance et une bonne immunogénicité.

Vue l'immunogénicité de l'antigène au cours de cet essai [39, 59], il a été envisagé de réaliser le prochain essai dans une zone d'endémie palustre en phase Ib. Ainsi le DEAP en collaboration avec le MVDB du NIAID/NIH ont entrepris un essai de phase Ib au Mali dans le village de Donéguébougou, où la transmission du paludisme est saisonnière et hyperendémique. Il s'agit d'un essai clinique randomisé en double aveugle sur la tolérance clinique et l'immunogénicité du vaccin antipalustre AMA1-C1 /

Alhydrogel®. Dans le cadre de ce présent travail, nous nous sommes uniquement intéressés sur l'immunogénicité de ce candidat vaccin.

L'Alhydrogel a été choisi comme adjuvant pour les raisons suivantes :

- la préparation standard pour la recherche immunologique sur le gel de l'hydroxyde d'aluminium ;
- il est l'adjuvant autorisé et qui ne présente pas de danger pour l'homme;
- il est largement utilisé dans les vaccins humains autorisés.

Un essai clinique randomisé en double aveugle avec un groupe témoin a été effectué. Le recours à un groupe témoin est utile en zone d'endémie dans une étude de Phase I, car l'immunité acquise suite à l'exposition naturelle à la transmission du paludisme peut biaiser l'interprétation des données de l'immunogénicité conféré par le vaccin. Une augmentation du titre des anticorps peut être attribuée à tort au vaccin en cours d'essai alors cela pourrait être dû à la stimulation naturelle, l'effet du candidat vaccin étant méconnu. La randomisation et le double aveugle garantissent l'objectivité des observations. Le placebo serait un témoin idéal. Cependant, un vaccin témoin qui apporterait une protection contre une maladie existante dans la zone serait meilleur, car les participants tireront un bénéfice de cette immunisation. Les données disponibles suggèrent que la plupart des adultes qui habitent en milieu rural au Mali n'ont pas reçu les premières séries d'immunisation pour l'hépatite B et la morbidité liée à cette affection est élevée. Par conséquent, une vaccination contre l'hépatite B est bénéfique pour cette population adulte du Mali. Pour ces multiples raisons nous avons choisi le vaccin anti hépatique Recombivax HB®. Son schéma de vaccination recommandé est 0, 1 et 6 mois. Mais des études réalisées par Jilg *et al* 1989 ont montré que le calendrier vaccinal de 0, 1 et 12 mois donne d'excellents résultats.

Le protocole a été appliqué en utilisant un échantillon représentatif de volontaires répondant aux critères d'inclusion de Phase Ia. Ce protocole a permis de suivre les titres d'anticorps. L'étude a été menée sur 54 volontaires sains qui ont été repartis en 3 cohortes de 18 patients chacun, 53 sur les 54 volontaires (98,1%) ont reçu les 3 doses de vaccins. Elissa M. Malkin et collaborateurs et Allan Saul et collaborateurs ont adopté une méthodologie similaire avec un nombre de volontaires plus restreint respectivement 30 volontaires repartis en 3 cohortes de 10 patients chacun dont 3 du groupe témoin, et 35 volontaires repartis en 3 cohortes de 12, 12 et 11 patients dont 2 du groupe témoin.

Les moyennes d'âge étaient comparables entre le groupe des cas et les témoins au sein des différentes cohortes; cela a permis de minimiser le biais d'interprétation lié à la différence du taux d'anticorps selon l'âge (tableau I). En effet, des travaux antérieurs effectués toujours en zone d'endémie palustre au Mali ont montré une variation de la réponse humorale antipalustre selon les groupes d'âge [61 ; 18]. Le groupe ethnique bambara était majoritaire dans chacune des cohortes et la répartition selon les groupes ethniques était comparable dans les différentes cohortes (tableau II). Nous avons noté seulement une faible participation des femmes (tableau III).

Le premier objectif de ce travail consistait à valider les résultats des tests réalisés au MRTC en prenant comme référence les résultats générés au MVDB. Ainsi les résultats des 5 premières visites avaient une excellente concordance (Tableau I, figure7). Ce qui nous a permis d'effectuer l'analyse de toutes les données à partir des tests réalisés au Mali.

Evaluation de l'immunogénicité

L'immunogénicité est la capacité d'induire une réponse humorale et/ou une réponse cellulaire. Tous les antigènes ne sont pas immunogènes cependant tous les immunogènes sont antigéniques. L'antigénicité est la capacité d'un antigène de se fixer spécifiquement à un anticorps.

Nous avons observé à l'inclusion que le niveau d'anticorps était comparable dans le groupe des cas et dans le groupe des témoins dans les 3 cohortes d'étude ; ce qui indique que le niveau d'exposition à l'infection était similaire dans les deux groupes. Mais nous avons observé une tendance d'élévation du titre d'anticorps dans le groupe de 31-45 ans au cours du suivi mais cette élévation n'était pas significative (figure 8 et 9).

Dans la cohorte 1 de la souche Fvo nous avons observé une décroissance dans les deux groupes après la première vaccination et une croissance importante de taux sériques d'anticorps anti-AMA1 dans le groupe qui a reçu le candidat vaccin antipaludique avec un pic à J360. A ce jour le taux dans ce groupe était 1,5 fois supérieur à celui du groupe témoin. Paradoxalement, au jour 540 le taux sérique dans le groupe témoin était 2 fois supérieures à celui du groupe qui a reçu le candidat vaccin antipaludique (figure 10, tableau V).

Dans la cohorte 2 de la souche Fvo, globalement nous n'avions pas eu une bonne réponse au candidat vaccin antipaludique par rapport au groupe témoin durant toute l'étude, sauf qu'après la deuxième vaccination le taux sérique dans le groupe qui a reçu le candidat vaccin antipaludique avait augmenté de moitié par rapport au groupe témoin (figure 11, tableau VI).

Dans la cohorte 3 (dose de 80µg) de la souche Fvo, les deux courbes étaient comparables avant l'administration des doses de vaccins. Cependant nous avons observé une croissance importante et progressive dans le groupe qui a reçu le candidat vaccin antipaludique après la première et deuxième vaccination. Ensuite une décroissance jusqu'à J360 et un « boosting » après la troisième vaccination administrée au jour 360. Les taux sériques d'anticorps anti-AMA1 dans le groupe qui a reçu le candidat vaccin antipaludique après la première dose, ont évolué constamment et étaient supérieurs aux

taux du groupe témoin durant toute l'étude. A J42 le taux sérique d'anticorps dans le groupe qui a reçu le candidat vaccin antipaludique était 3,5 fois supérieur à celui du groupe témoin et à J374 ce taux était 4fois supérieur à celui du groupe témoin. Cependant le « boosting » observé après la troisième dose était plus faible qu'attendu, car le titre d'anticorps était plus bas qu'après la deuxième dose (figure12, tableau VII).

La cohorte 1 et la cohorte 3 de la souche 3D7 ont une évolution comparable à celle de la souche Fvo (figure 13 et15, tableau VIII et X). Dans la cohorte 2, à J0, avant la première vaccination le taux sérique dans le groupe qui a reçu le candidat vaccin antipaludique était inférieur à celui du groupe témoin, ensuite nous avons observé une croissance assez importante et toujours au dessus de la courbe du groupe témoin jusqu'au jour 480 (figure 14, Tableau IX).

Dans les 3 cohortes (dose de 80µg), nous n'avons pas trouvé de différence significative des niveaux des anticorps entre les cas et les témoins. Cela pourrait s'expliquer par la faiblesse de la taille de l'échantillon. Nous avons observé une nette tendance de titre élevé des anticorps anti-AMA1 (Fvo et 3D7) dans le groupe ayant reçu l'AMA1-C1 surtout dans la cohorte 3. Nous avons observé aussi que la dose de AMA1-C1 qui génère la concentration la plus élevée d'anticorps dans les deux souches, est la dose de 80 µg et deux semaines après la deuxième vaccination. Ce qui nous amènons à suggérer l'utilisation de cette dose dans les études ultérieures (figure16 et 17).

Nous avons enregistré 2 cas de mauvais répondeurs dans la cohorte 2 (20 µg) et 2 cas dans la cohorte 3 (80 µg) ; soit 2/12 (16,7%) dans chacune des cohortes (Figure 18 et 19). Ce phénomène a été observé au cours des essais vaccinaux à base de AMA1 aux USA chez des sujets non immuns [39].

Un autre essai a été mené au Mali avec le candidat vaccin à base de MSP1 (FMP1) en collaboration avec l'Institut de recherche en santé de l'Armée Américaine à la même période. L'adjuvant utilisé était le ASO2A. La moyenne géométrique des anticorps

anti-FMP1 a progressivement augmenté après chaque immunisation. Cette moyenne géométrique des titres d'anticorps anti-FMP1 était plus élevée que celle obtenue par notre étude [46]. Cela pourrait s'expliquer par la différence d'antigène utilisé et la technique ELISA appliquée.

Des réponses d'anticorps à AMA1- Fvo et à AMA1- 3D7 ont été testées séparément pour étudier la contribution de chaque allèle à la réponse globale d'anticorps. Les unités d'anticorps testés de AMA-13D7 sont en parfaite corrélation avec ceux de AMA-1 Fvo deux semaines après la deuxième vaccination (avec $r^2=0,88$), à J540 (avec $r^2=0,81$) et de J0 à J540 (avec $r^2=0,82$) (figure 20, 21, 22 et 23). Ce qui indique que la reconnaissance des deux variants alléliques par les répondeurs est comparable. Ce résultat est comparable à celui obtenu par Elissa M. Malkin, *et al.* 2005 avec une parfaite corrélation des titres d'anticorps de AMA-13D7 et de AMA-1 Fvo deux semaines après la deuxième et troisième vaccination. Dans la même localité (Donéguébougou) Dolo *et al* (2003) ont observé une bonne corrélation entre AMA1-Fvo et AMA1-3D7 ($r^2=0,87$) au cours de la phase de préparation de terrain pour les essais vaccinaux.

Le présent travail a permis de valider les tests ELISA réalisés au MRTC. L'analyse des données indique une assez bonne immunogénicité surtout pour la dose de 80 µg. Les niveaux d'anticorps entre les groupes cas et les groupes témoins étaient comparables. Cela est sûrement imputable à la taille de l'échantillon. Nous estimons qu'il serait préférable d'utiliser d'emblée la dose de 80 µg dans les essais futurs chez les adultes.



**CONCLUSION -
RECOMMENDATIONS**

VII. CONCLUSION

Au terme de cette étude nous pouvons conclure que :

- les résultats des tests ELISA réalisés au Mali ont une excellente concordance par rapport à ceux du MVDB du NIH ;
- La dose de AMA1-C1 qui génère la concentration la plus élevée d'anticorps était 80µg et cela, deux semaines après la deuxième vaccination (J42) ;
- Les titres sériques d'anticorps anti-AMA1-C1 varient peu selon les groupes d'âge à l'inclusion ;
- Les titres sériques d'anticorps anti-AMA1 dans le groupe qui a reçu le vaccin AMA1-C1 étaient globalement supérieurs à ceux du groupe ayant reçu le vaccin Recombivax ®, surtout ceux de la cohorte 3 étaient largement supérieurs. La différence observée n'était pas significative compte tenue de la taille réduite de l'échantillon ;
- Il existait une bonne corrélation entre les deux souches Fvo et 3D7 de AMA1-C1 de *P. falciparum* ;

Notre candidat vaccin a été un bon inducteur des anticorps anti AMA1 dans cette étude

Le candidat Vaccin AMA1-C1/ Alhydrogel a conféré une assez bonne immunogénicité dans cette étude.

VIII. RECOMMANDATIONS

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

- préconiser l'utilisation de la dose de 80 µg de AMA1-C1 au cours des futurs essais chez les adultes ;

- poursuivre les essais chez les enfants en phase II sur un échantillon plus grand ;

- renforcer les capacités du laboratoire d'immunologie du MRTC/DEAP par le dosage des sous types d'immunoglobulines G et l'introduction de la technique de GIA (Growth Inhibition Assay).

- renforcer la collaboration entre les équipes du Nord et celles du Sud en vue du transfert de technologie.

BIBLIOGRAPHIE

IX. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **AIDOO M., LALVANI A., GILBERT S. C., HU J. T., DAUBERSIES P., HURT N., WHITTLE H. C., DRUIHLE P. and HILL A. V.** Cytotoxic T-lymphocyte epitopes for HLA-B53 and other HLA types in the malaria vaccine candidate liver-stage antigen 3. *Infection and Immunity* 2000 Jan; **68** (1) p: 227-232.

2. **ANDERS R. F., CREWETHER P. E., EDWARDS S., MARGETTS M., MATTHEW M. L., POLLOCK B., and PYE D.**, Immunization with recombinant AMA-1 protects mice against infection with *Plasmodium chabaudi*. *Vaccine* 1998; 16 p:240-247.

3. **ANTHONY W. STOWERS, MICHAEL C. KENNEDY, BRIAN P. KEEGAN, ALLAN SAUL, CAROLE A. LONG, AND LOUIS H MILLER.** Vaccination of Monkeys with Recombinant Plasmodium falciparum Apical Membrane Antigen 1 confers protection against blood-stage Malaria. *Infection and Immunity*, Dec. 2002, p: 6961- 6967

4. **ARAMA C.**, Facteurs immunitaires et parasitaires impliqués dans la susceptibilité au paludisme dans deux groupes ethniques vivant en sympatrie au Mali. *Thèse de Pharmacie*, FMPOS 2002, N°45.

5. **AUCAN C., TRAORE Y., TALL F., NACRO B., TRAORE-LEROUX T., FUMOUX F. and RIHET P.** High Immunoglobulin G2(IgG2) and low IgG4 levels are associated with human resistance to *Plasmodium falciparum* malaria. *Infection and Immunity* 2000; 68 p:1252-1258.

6. BAIRD J. K., JONES T. R., DANUDIRGO E. W., ANINIS B. A., BANGS M. J., BASRI H., et al. Age-dependent acquired protection against *Plasmodium falciparum* in people having two years exposure to hyperendemic malaria.

Am. J. Trop. Med. Hyg 1991; **45** p: 65-76.

7. BALLOU W. R., HOFFMAN S. L., SHERWOOD J. A., HOLLINGDALE M. R., NOVA F. A., HOCKMEYER W T, et al. Safety and efficacy of a recombinant DNA *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine.

Lancet 1987; **1** p: 1277-1281.

8. BASCO L. K., RUGGERIC et LE BRAS J. Molécules antipaludiques. Mécanismes d'action, Mécanismes de résistance, relations structure-activité des schizonticides sanguins.

Éditions MASSON, Paris - Milan - Barcelone 1994, 364 p.

9. BOJANK K. A., MILLIGAN P. J., PINDER M., VIGNERON L., ALLOUECHE A., KESTER K. E., et al. Efficacy of RTS,S/AS02 malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* infection in semi-immune adult men in Gambia: a randomized trial.

Lancet 2001; **358** p:1927-1934.

10. CARSON D. A., RAZ E. Oligonucleotide adjuvant For T helper 1(Th1)-specific vaccination.

J. Exp. Med. 1997; **186** p: 1621-1622.

11. CLARK I. A. Cell-mediated immunity in protection and pathology of malaria.

Parasitol. Today 1987; **3** (10) p: 300-305.

12. COLLINS W. E., CONTACOS P. G. Immunization of monkeys against *Plasmodium cynomolgi* by x-irradiated sporozoites.

Nature New biology 1972; **236** p: 176-177.

13. COULIBALY M., Réponse humorale anti-AMA1 et anti-MSP1 de deux groupes ethniques vivant en sympatrie dans la région de Mopti au Mali.

Thèse de Pharmacie, FMPOS 2004, N°66.

14. CREWETHER P. E., CULVENOR J. G., SILVA A., COOPER J. A. and ANDERS, R. F. *Plasmodium falciparum*: two antigens of similar size are located in different compartments of the rhoptry.

Exp. Parasitologia 1990; **70** p:193-206.

15. DALPKE A., ZIMMERMANN S., HEEG K. Immuno-pharmacology of CpG DNA.

Biol. Chem. 2002 ; **383** p : 1491-1500.

16. DAOU M., Susceptibilité au paludisme dans des groupes ethniques vivant en sympatrie au Mali : épidémiologie, immunité humorale et types d'hémoglobine.

Thèse Pharmacie, FMPOS 2001 ; N° 47.

17. DOLO A., POUDIOUGO B., MODIANO D., CAMARA F., KOURIBA B., DIALLO M., BOSMAN A., CRISANTI A., ROBSON K. ET DOUMBO O. Epidemiology of Malaria in a Village of Sudanese Savannah in Mali (Bancoumana). Anti-Trap and anti-CS humoral immunity response.

Bull Soc Pathol Exot. 2003 Nov; **96**(4):287-90.

18. DOLO A., THERA M. A., BABY M., et Al., Strain-specific antibody responses to potential malaria vaccine antigens in Mali.

Am. J. Trop. Med. Hyg. 2003; **69** (3) Suppl.: 495.

19. DUFFY P. E., KASLOW D. C., A novel malaria protein, Pfs28, and Pfs25 are genetically linked and synergistic as *falciparum malaria* transmission-blocking vaccines.

Infection and Immunity. 1997 Mars ; **65** (3) p:1109-1113.

20. ELIVIER S.A. S., MERCEREAU PUIJALON O., Vaccins contre le paludisme un long chemin semé d'embûche.

Editions scientifiques et médicales 2002.

21. ESCALENT A. A., et Al., polymorphism in the gene encoding the apical membrane antigen (AMA-1) of *Plasmodium falciparum*. X. Asembo Bay Cohort project.

Mol. Biochem. Parasitol. 2001; **113** p: 279-287.

22. GRUN J. L., MAURER P. H., Different T helper cell subsets elicited in mice utilizing two different adjuvants vehicles : the role of endogenous interleukin 1 in proliferative responses.

Cell. Immunol. 1989; **121** p: 134-145.

23. GUPTA, R. K-ERAL., Adjuvants –A balance between toxicity and adjuvanticity.

Vaccine 1993; **11** p: 293-306.

24. HADLER, S.C. ET MARGOLIS, H.S. Hepatitis B immunization: Vaccine types, efficacy, and indications for immunization.

Curr Clin Top Infect Dis. 12,282-308 (1992)

25. HALPERN M. D., KURLANDER M. J., PISETSKY D. S. Bacterial DNA induces murine Interferon-gamma production by stimulation of interleukin -12 and tumor necrosis factor-alpha .

Cell. Immunol. 1996; **67** p: 72-78.

26. HERRINGTON D. A., CLYDE D. F., LOSONSKY G., CORTESIA M., MURPHY J. R., DAVIS J., et al., Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* sporozoites.

Nature 1987; **328** p: 257-259.

27. HODDER A. N., CREWETHER P. E. and ANDERS R. F. Specificity of the protective antibody response to apical membrane antigen 1.

Infection and Immunity. 2001; **69** p: 3286-3294.

28. HOFFMAN S. L., ISENBARGER D., LONG G. W., SEDEGAH M., SZARFMAN A., WATERS L., HOLLINGDALE M. R., VAN DER MEIDE P. H., FINBLOOM D. S., BALLOU W. R. Sporozoite vaccine induces genetically restricted T cell elimination of malaria from hepatocytes.

Science 1989 Jun. 2; **244** (4908) p:1078-1081.

29. HORZINEK M. C., SCHIJNS V. E. C. J., DENIS M., DESMETTRE P., BABIUK L. A. Adjuvants and vehicles. In: Pastoret P.P., Blancou J., Vannier P., Verschueren C. (Eds) *Veterinary Vaccinology*. Elsevier: Amsterdam 1997, p;140-148.

30. HOWELL S. A., WITHERS-MARTINEZ C., KOCKEN C. H., THOMAS A. W., BLACKMAN M. J., Proteolytic processing and primary structure of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen-1.

J Biol Chem. 2001 Aug. 17; **276** (33) p: 31311-31320

31. JILG, W., SCHMIDT, M., ET DEINHARDT, F. Vaccination against Hepatitis B: Comparaison of three Different Vaccination Schedules.

J Infect Dis. 1989 ; 160 p : 766-769.

32. KAMATE B., Effets du niveau de transmission et de l'âge sur l'incidence du paludisme simple à Sotuba et Donéguébougou.

Thèse de Médecine, FMPOS 2002, N°143.

33. KEITA M. N., Etude de quelques paramètres hématologiques et biochimiques à Donéguébougou : expérience d'introduction des bonnes pratiques de laboratoire au MRTC/DEAP/FMPOS.

Thèse de Pharmacie, FMPOS 2003, N°53.

34. KEITEL W. A., KESTER K. E., ATMAR R. L., et al. Phase 1 trial of two recombinant vaccines containing the 19KDa carboxy terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite protein-1 (msp1(19)) and T helper epitopes of tetanus toxoid. *Vaccine* 1999; **18** p: 531-539.

35. KUMAR S., COLLINS W., EGAN A., YADAVA A., GARRAUD O., BLACKMAN M. J. et al. Immunogenicity and efficacy aotus monkeys of for recombinant *Plasmodium falciparum* vaccines in multiple adjuvant formulations base on the 19KDa C terminus of merozoite surface protein. *Infection and Immunity* 2000; **68** p: 2215-2223.

36. LALVANI A., MORIS P., VOSS G., PATHAN A. A., KESTER K. E., BROOKES R., et al. Potent induction of focused Th1-type cellular and humoral immune responses by RTS,S/SBAS2, a recombinant *Plasmodium falciparum* malaria vaccine. *Journal of infectious diseases* 1999; **180** p:1656-64.

37. LINDBLAD, E. B. Aluminum adjuvants, in : The Theory and Practical Application of Adjuvants. *Stewart-Tull, ed. Wiley and Sons, New York* 1995.

38. MALIK A., EGAN J. E., HOUGHTEN RA, SADOFF J. C., HOFFMAN S. L. Human cytotoxic T lymphocytes against the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1991 Apr. 15; **88** (8) p: 3300-3304.

39. MALKIN E. M., DIERMERT D. J., MCARTHUR J. H., PERREAULT J. R., MILES A. P., GIERSING B. K., MULLEN G. E., ORCUTT A., MURATOVA O., AWKAL M., ZHOU H., WANG J., STOWERS A., LONG C. A., MAHANTY S., MILLER L. H., SAUL A., DURBIN A. P. Phase 1 clinical trial of apical membrane antigen 1: an asexual blood-stage vaccine for *Plasmodium falciparum* malaria.

Infection and Immunity. 2005 Jun.; **73** (6) p: 3677-3685.

40. MENDIS K. N., PETER H. DAVID P. H., CARTER R. Antigenic polymorphism in malaria: is it an important mechanism for immune evasion?

Immunol Today. 1991 Mar.; **12** (3) p: 34-37.

41. MICHAEL C. KENNEDY, JIN WANG, YANLING ZHANG, AARON P. MILES, FARIDEH CHITSAZ, ALLAN SAUL, CAROLE A. LONG, LOUIS H MILLER AND ANTHONY W. STOWERS. In Vitro Studies with Recombinant *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1(AMA1): Production and Activity of an AMA1Vaccine and Generation of a Multiallelic Response.

Infection and Immunity, Dec. 2002, p: 6948-6960

42. MIGOT F., CHOUGNET C., HENZEL D., DUBOIS B., JAMBOU R., FIEVET N., DELERON P. Anti-malaria antibody-producing B cell frequencies in adults after a *Plasmodium falciparum* outbreak Madagascar.

Clin Exp Immunol. 1995 Dec; **2** (3) p: 529-534.

43. MOINGEON P., HAENSLER J., LINDBERG A. Towards the rational design of Th1 adjuvants.

Vaccine 2001, **19** p: 4363-4372.

44. MULLER H. M., RECKMANN I., HOLLINGDALE M. R., BUJARD H., ROBSON K. J., CRISANTI A. Thrombospondin related anonymous protein (TRAP) of *Plasmodium falciparum* binds specifically to sulfated glycoconjugates and to HepG2 hepatoma cells suggesting a role for this molecule in sporozoite invasion of hepatocytes. *EMBO J.* 1993 Jul.; **12** (7) p: 2881-2889.

45. NARUM, D. L., OGUN, S. A., THOMAS, A. W. and HOLDER, A. A. Immunization with parasite-derived apical membrane antigen 1 or passive immunization with a specific monoclonal antibody protects BALB/c mice against lethal *plasmodium yoelii yoelii* YM blood-stage infection. *Infect. Immun.* 2000; **68** p: 2899-2906.

46. NIANGALY A.B. Evaluation de la tolérance et de l'immunogénicité d'un candidat vaccin antipaludique dérivé de la MSP1 (FMP1) associé à l'adjuvant ASO2A dans une population adulte semi-immune à Bandiagara, Mali. *Thèse de Pharmacie, FMPOS 2006, N°30.*

47. NICKLAS W. Aluminium salts. *Res. Immunol.* 1992; **143** p: 489-494.

48. NOAH NORMAN D. Transmissible agents. In : Oxford textbook of public health edited by Walter w. Holland, Roger Detels and George Knox. *Oxford university press* 1991, second edition, volume 2 p: 417-434.

49. NUSSENZWEIG R. S., VANDERBERG J., MOST H., ORTON C. Protective immunity produce by the injection of x-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature* 1967; **216** p: 160-162.

50. OMS, Quelles perspectives pour faire reculer le paludisme. *Bulletin de l'OMS, Recueil d'article N°4, 2001* p: 1133

51. OMS , Lutte antipaludique 3 mai 2005

52. PERLMANN P., BJORKMAN A. Malaria research : host-parasite interactions and developments in chemotherapy, immunology and vaccinology.

Infectious Diseases 2000 ; **13** p: 431-443.

53. PERLMANN P., PERLMANN H., LOOAREESUWAN S., KRUDSOOD S., KANO S., MATSUMOTO Y., BRITTENHAM G., TROYE-BLOMBERG M., AIKAWA M. Contrasting functions of Ig G and Ig E antimalarial antibodies in uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria.

Am. J. Trop. Med. Hyg. 2000 ; **62** (3) p: 373-377.

54. PERLMANN P., TROYE-BLOMBERG M., Malaria blood-stage infection and its control the immune system.

Folia Biologica (Praha) 2000 ; **46** p: 210-218.

55. PETERSON M. G. , COPPEL R. L., MOLONEY M. B., KEMP D. J. Third form of the precursor to the major merozoite surface antigen of *P. falciparum*.

Mol. Cel. Biol. 1988 p: 2662-2667.

56. PLAYFAIR J. H. L., TAVERNE J., BATE C. A.W., SOUZA JB. The malaria vaccine: anti-parasite or anti-disease ?

Immunol.Today, 1990, **11** p: 25-27.

57. RIEKMANN A. H., BAEUDOIN R. L., CASSELLS J. S., SELL K. W. Use of attenuated sporozoites in the immunization of human volunteers against falciparum malaria.

Bulletin of World Health Organization 1979; 57 suppl. 1 p: 261-265.

58. SABCHAREON A., BURNUF T., OUATTARA D., ATTANATH P., BOUHAROUN-TAYOUN H., CHNTAVANICH P., et al. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria.

Am. J. Trop. Med. Hyg 1991; **45** p: 65-76.

59. SAUL A., LAWRENCE G., ALLWORTH A., ELLIOTT S., ANDERSON K., RZEPczyk C., MARTIN L. B., TAYLOR D., EISEN D. P., IRVING D. O., PYE D., CREWThER P. E., HODDER A. N., MURPHY V. J., ANDERS R. F. A human phase 1 vaccine clinical trial of the *Plasmodium falciparum* malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1 in Montanide ISA720 adjuvant.

Vaccine.2005 Apr 27; **23** (23) p: 3076-3083.

60. SAUL A., MILLER L. H. A robust neutralization test for *Plasmodium falciparum* malaria.

The Journal of Experimental Medicine 2001 ; **193** p: 51-54.

61. SCARSEILL E, TOLLE R, KOITA O, DIALLO M, MULLE HM, et al Analysis of the human antibody responses to thrombospondin related anonymous protein of *Plasmodium falciparum*.

Infect Immun, 1993, 61 p: 3490-3496.

62. SHI Y. P., UDHAYAKUMAR V., OLOO A. J., NAHLEN B., LAL A. A. Differential effect and inreaction of monocytes, hyperimmune sera, and immunoglobulin G on the growth of asexual stage *Plasmodium falciparum* parasites.

Am. J. trop. Med. Hyg. 1999; **60** p: 135-141.

63. SILVIE O., FRANETICH J. F., CHARRIN S., MUELLER M. S., SIAU A., BODESCOT M., RUBINSTEIN E., HANNOUN L., CHAROENVIT Y., KOCKEN C. H., THOMAS A. W., VAN GEMERT G. J., SAUERWEIN R. W., BLACKMAN M. J., ANDERS R. F., PLUSCHKE G., MAZIER D. A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites.

J Biol Chem. 2004 Mar. 5; **279** (10) p: 9490-9496.

64. SNOW RW, GUERRA CA, NOOR AM, MYINT HY, HAY SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria.

Nature 2005 Mar 10; 434(7030) p:214-217

65. STOUTE J. A., SLAOUI M, HEPPNER D. G., MOMIN P., KESTER K. E., DESMONS P., et al. A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium malariae*. RTS,S Malaria Vaccine Evaluation Group.

New England Journal of Medicines 1997; **336** p: 86-91.

66. THOMAS A. W., TRAPE J. F., ROGIER C., GONCLAVES A., ROSARIO V. E., and NARUM D. L. High prevalence of natural antibodies against *Plasmodium falciparum* 83-kilodalton apical membrane antigen (PF83/AMA-1) as detected by capture-enzyme linked-immunosorbent assay using full-length baculovirus recombinant PF83/AMA-1.

Am. J. Trop. Med. Hyg 1994, **51**: 730-740.

67. LOPERA T. M., RESTEPO M., BLAIR S., GARCIA H. I. Humoral Immune Response to the anti-malaria vaccine SPf66 in the Colombian Atroto River Region.

Memorias do Instituto Oswaldo Gruz Vol. 93(4)- Jul/Aug.1998.

68. TROYE-BLOMBERG M., PERLMANN P., NILSON M. L, PERLMANN H. Immune regulation of protection and pathogenesis in *Plasmodium falciparum* malaria.

Parassitologia 1999 ; **41** p: 131-138.

69. WATERS, A. P. et al. A mérozoite receptor protein from *plasmodium knowlesi* is highly conserved and distributed throughout *plasmodium*.

J. Biol. Chem. 265, 1990.

70. WORLD HEALTH ORGANIZATION, Malaria a global crisis Geneva:

WHO 2000.

71. WORLD MALARIA REPORT, Charge Mondiale du paludisme :

WMR 2005



RESUME

Fiche signalétique

Nom: **GUINDO**

Prénom: **Merepen dite Agnès**

Nationalité: Malienne

Date de soutenance: 2006

Ville de soutenance: Bamako

Titre: Validation d'une technique ELISA pour l'évaluation de l'immunogénicité en phase 1b du candidat vaccin AMA1-C1 /Alhydrogel contre le *Plasmodium falcifarum* au Mali.

Lieu de dépôt: Bibliothèque de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie.

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

Résumé

Ce travail avait pour but d'évaluer l'immunogénicité du candidat vaccin antipaludique AMA1-C1 associé à l'adjuvant Alhydrogel® en essai clinique de phase I. Notre étude s'est déroulée de 2003 à 2004.

Pour atteindre ce but nous avons effectué un essai clinique randomisé avec groupe témoin (vaccin de l'Hépatite B Recombivax®) et un suivi longitudinal sérologique chez 54 volontaires âgés de 18 à 45 ans tous sexes confondus. L'étude a porté sur trois cohortes d'étude : cohorte 1 (12 volontaires ayant reçu 5 µg d'AMA1-C1 et 6 témoins), cohorte 2 (12 volontaires ayant reçu 20µg d'AMA1-C1 et 6 témoins), cohorte 3 (12 volontaires ayant reçu 80 µg d'AMA1-C1 et 6 témoins)

Le schéma de vaccination a été de trois doses administrées dans le muscle deltoïde avec un intervalle de 28 jours entre la première et la deuxième doses et 332 jours entre la deuxième et la troisième doses.

Les prélèvements de sang veineux ont été effectués tous les 14 jours jusqu'à J90, tous les 3 mois jusqu'à J360 et tous les 2 mois après J374 pour le dosage des anticorps anti-AMA1 (J0, J14, J28, J42, J90, J180, J270, J360, J374, J420, J480 et J540).

Le dosage des anticorps anti-AMA1 a été effectué par la technique d'ELISA et nos résultats ont été préalablement validés par un contrôle de qualité en prenant comme

référence les résultats des tests du NIH sur les mêmes échantillons. L'analyse des données a montré que :

- la dose de AMA1-C1 qui génère la concentration la plus élevée d'anticorps est 80µg et deux semaines après la deuxième vaccination ;
- les titres sériques d'anticorps anti-AMA1 dans le groupe qui a reçu le vaccin AMA1-C1 étaient en général supérieurs à ceux du groupe ayant reçu le vaccin Recombivax ®, surtout ceux de la cohorte 3 étaient nettement supérieurs. La différence observée n'était pas significative compte tenu de la taille réduite de l'échantillon ;
- Il existe une bonne corrélation de réponse aux deux souches Fvo et 3D7 de AMA1-C1 de *P. falciparum* ;

Il ressort dans cette étude que le candidat vaccin antipaludique AMA1-C1/Alhydrogel possède une assez bonne immunogénicité. La poursuite du développement clinique de ce candidat vaccin réserve un grand espoir dans la recherche de vaccin antipaludique.

Mots clés : AMA1-C1/Alhydrogel, Immunogénicité, *P. falciparum*, Mali

Last Name: **GUINDO**

First Name: **Merepen dite Agnès**

Nationality: **Malian**

Defense City: Bamako

Defense Date: 2006

Title: Validation of ELISA tests for evaluation of immunogenicity in phase 1b of a candidate vaccine AMA1-C1/Alhydrogel® against *Plasmodium falciparum* in Mali.

Storage place: library of the Faculty of medicine, Pharmacy and Dentistry

Interest Areas: Clinical Trial, Parasitology, Public Health and Immunology.

SUMMURY

The goal of this study was to assess the immunogenicity of the anti-malarial candidate vaccine AMA1-C1 adjuvanted with Alhydrogel in a Phase I clinical trial, from May 2004 to December 2005 in Mali.

In order to achieve this goal, we carried out a randomized controlled clinical trial with a control group (Hepatitis B vaccine Recombivax®) and serological longitudinal surveillance in 54 volunteers aged 18 to 45 years old. The study was carried out on three cohorts: cohort1 (12 volunteers received 5ug AMA1-C1 and 6 controls), cohort 2 (12 volunteers received 20ug AMA1-C1 and 6 controls), cohort3 (12 volunteers received 80ug AMA1-C1 and 6 controls).

All the volunteers received three immunizations in the deltoid muscle, on study days 0, 28 and 360.

Venipunctures were performed every 14 days through D90, and every three months until D360 and every two months after D374 for anti AMA-1 antibody titers (D0, D14, D28, D42, D90, D180, D270, D360, D374, D420, D480 and D540)

The anti-AMA1 antibody titer was measured by ELISA and our results were validated by quality control by taking as reference NIH's results on the same samples. The analysis of the data showed that:

- AMA1-C1 dose which generates the highest concentration of antibody is 80ug and this, two weeks after the second administration

- sera anti-AMA1 antibody titers in the group which received AMA1-C1 were higher than those of the group received Recombivax®, especially in cohort 3. This difference was not statistically significant because of the small sample size.

- there was a good response correlation to both strain Fvo and 3D7 of *P. falciparum*.

This study shows that anti malarial candidate vaccine AMA1-C1/Alhydrogel has a good immunogenicity. The continuation of the clinical development of this candidate vaccine holds a great hope in the anti malarial vaccine research.

Keywords: AMA1-C1/Alhydrogel, Immunogenicity, *P. falciparum*, Mali



ANNEXE

ELISA plate V7.0.3

Date	041006
Study #	vaccindone
Operator	AG

	Plate 1	Plate 2	Plate 3
Std Sera	ACO8/17/05	ACO8/17/05	ACO8/17/05
Sec Ab	40658	40658	40658
Sec Ab Dil	5000	5000	5000

Plate 1 coating Ag: AMA1FVO dilution: 2500 Bleed;

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	39J0	39J14	39J28	39J42	39J90	39J180	39J270	39J360	39J374
B									
C									
D	40J0	40J14	40J28	40J42	40J90	40J180	40J270	40J360	40J374
E									
F									
G	20	10	5	2.5	1.3	0.63	0.31	0.16	0.08
H									

Plate 2 coating Ag: AMA13D7 dilution: 2500 Bleed;

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	39J0	39J14	39J28	39J42	39J90	39J180	39J270	39J360	39J374
B									
C									
D	40J0	40J14	40J28	40J42	40J90	40J180	40J270	40J360	40J374
E									
F									
G	20	10	5	2.5	1.3	0.63	0.31	0.16	0.08
H									

ELISA Vaccin Data		MVDB		MVDB		MVDB		MVDB		MVDB	
STDN	J0-FVO	J0-FVO	J0-3D7	J0-3D7	J14-FVO	J14-FVO	J14-3D7	J14-3D7	J28-FVO	J28-FVO	
1	6232	3,485	6291	3,045	3020	2,518	3412	3,124	2730	2,773	
2	776	425	927	433	313	324	414	462	362	350	
3	2946	1,958	1555	985	1759	1,858	865	1,091	1994	2,000	
4	13254	10,603	28723	15,512	11582	11,744	15818	17,934	9711	10,164	
5	1038	651	1141	596	463	469	547	638	708	482	
6	1187	817	1212	757	678	848	846	1,009	941	709	
7	1477	821	536	318	854	738	281	267	740	670	
8	652	357	298	232	565	287	282	204	298	356	
9	321	163	326	228	240	92	249	138	189	97	
10	7430	4,003	7029	3,804	4292	3,172	4706	3,066	4243	3,751	
11	1008	585	619	401	707	468	390	390	709	502	
12	4134	2,631	4292	3,157	2455	2,052	2779	2,288	2483	2,571	
13	7638	5,477	5636	3,121	3794	4,451	3153	3,262	4710	4,903	
14	477	330	323	224	340	267	249	215	337	284	
15	210	91	99	45	219	103	134	76	233	99	
16	248	87	210	84	130	57	124	66	306	115	
17	2300	1,815	2957	2,216	1445	1,639	1944	2,460	2426	1,342	
18	677	460	592	458	442	515	529	610	393	366	
19	535	537	339	452	463	587	359	463	345	337	
20	2278	2,087	2022	1,756	2080	2,282	2113	1,895	2651	2,113	
21	545	410	519	511	413	333	559	476	374	409	
22	523	731	215	483	438	444	235	402	419	577	
23	2643	2,798	3161	3,494	2006	2,170	2633	2,342	2054	1,926	
24	654	620	469	660	618	331	479	369	669	443	
25	97	96	5	28	62	50	1	23	153	76	
26	120	52	106	32	79	77	110	79	219	78	
27	4457	5,394	5136	5,346	3308	5,351	4081	5,062	3969	4,506	
28	5832	3,412	5622	3,478	3464	3,709	4035	4,168	4151	3,220	
29	4059	2,671	3955	2,496	2279	2,556	2443	2,828	2396	2,084	
30	295	138	258	134	169	130	208	213	239	109	
31	4901	3,091	1707	2,232	3236	3,137	2512	2,140	5422	3,624	
32	2962	2,264	2342	2,071	2871	2,565	2350	2,413	2998	2,954	
33	46	19	1	10	106	32	91	15	38	13	
34	15600	8,527	16141	8,823	10208	7,081	11018	6,099	11263	6,373	
35	857	711	128	139	2142	1,258	1242	708	1261	1,168	
36	1088	1,034	587	804	851	828	544	520	1043	846	
37	4569	6,915	3649	3,927	4458	5,968	4099	4,011	7526	7,366	
38	82	62	120	52	223	242	313	297	661	456	
39	144	110	138	116	97	80	123	91	86	77	
40	2285	2,251	2322	1,700	5456	4,400	5551	3,347	6220	4,898	
41	499	611	322	498	1207	1,137	1020	1,085	1782	1,499	
42	3440	3,380	2994	2,684	3594	3,474	2352	3,254	2940	2,638	
43	178	47	94	53	74	112	32	42	260	88	
44	971	981	800	640	1415	1,229	1370	827	1598	1,304	
45	76	107	1	86	317	209	277	176	215	194	

46	4595	5,261	5600	6,572	3375	3,916	4250	5,029	5569	3,859
47	134	37	67	68	97	12	28	18	43	52
48	480	580	346	485	507	487	334	354	436	668
49	875	695	936	791	976	675	1100	820	916	811
50	1941	1,494	1729	1,559	2376	2,979	2446	2,916	6312	4,570
51	19422	12,563	10945	12,118	12340	11,491	9440	10,455	20982	11,215
52	6394	4,700	4032	4,614	11920	8,874	8020	7,993	12656	10,326
53	4681	4,254	10559	6,168	9205	10,618	13956	11,918	9154	9,966
54	2621	3,413	3303	3313	2516	3,842	3010	4484	3083	4,052