

**Contribution à l'étude des anticorps
naturels anti P190: antigène majeur de
la surface du merozoïte de
Plasmodium falciparum (Welch 1897)**

THESE

Présentée et soutenue publiquement le 4 Juin 1990 devant
l'Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie du Mali

Par **Maïmouna N'DIAYE**

pour obtenir le grade de docteur en pharmacie
(Diplôme d'Etat)

Examineurs

Professeur

Boubacar CISSE

Président

Docteur

Abderhamane Sidèye MAIGA

Membres

Docteur

Anatole TOUNKARA

Docteur

Ogobara DOUMBO

Directeur de thèse

ECOLE NATIONALE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DU MALI
ANNEE UNIVERSITAIRE 1989 - 1990.-

Professeur Sambou SOUMARE
Professeur Moussa TRAORE
Docteur Hubert BALIQUE
Monsieur Bakary M. CISSE
Monsieur Hama B. TRAORE

Directeur Général
Directeur Général Adjoint
Conseiller Technique
Secrétaire Général
Econome

D.E.R. DE CHIRURGIE ET SPECIALITES CHIRURGICALES

1. PROFESSEURS AGREGES

1. Professeur Mamadou Lamine TRAORE	Chef de D.E.R. Chirurgie
2. Professeur Aliou BA	Ophthalmologie
3. Professeur Bocar SALL	Orthop. Traumat. Secourisme
4. Professeur Mamadou DEMBELE	Chirurgie Générale
5. Professeur Sambou SOUMARE	Chirurgie Générale
6. Professeur Abdel Karim KOUMARE	Chirurgie Générale
7. Professeur Abdoul Alassane TOURE	Chirurgie Générale

2. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

1. Docteur Bénitiéni FOFANA	Gynécologie-Obstétrique
2. Docteur Mme. SY Aïda SOW	Gynécologie-Obstétrique
3. Docteur Amadou Ingré DOLO	Gynécologie-Obstétrique
4. Docteur Salif DIAKITE	Gynécologie-Obstétrique
5. Docteur Massaoulé SAMAKE	Gynécologie-Obstétrique
6. Docteur Mme. Fanta Sambou DIAKITE	Gynécologie-Obstétrique
7. Docteur Kalikou OUATTARA	Urologie
8. Docteur Mamadou Lamine DIOMBANA	Odonto-Stomatologie
9. Docteur Djibril SANGARE	Chir.Générale Soins Infirmiers
10. Docteur Abdoulaye DIALLO	Ophthalmologie
11. Docteur Alhousseïni Ag MOHAMED	O.R.L.
12. Docteur Abdoulaye DIALLO	Anesthésie-Réanimation
13. Docteur Sidi Yaya TOURE	Anesthésie-Réanimation.

D.E.R. DE SCIENCES FONDAMENTALES

1. PROFESSEURS AGREGES

1. Professeur Bréhima KOUMARE	Chef de D.E.R. Microbiologie
2. Professeur Siné BAYO	Anatomie Pathologie - Histologie-Embryologie.
3. Professeur Abdel Karim KOUMARE	Anatomie
4. Professeur Gaoussou KANOUTE	Chimie Analytique.

2. DOCTEURS D'ETAT

- | | |
|----------------------------------|---------------------|
| 1. Professeur Yéyi Tiémoko TOURE | Biologie |
| 2. Professeur Amadou DIALLO | Biologie-Génétique. |

3. DOCTEURS 3ème CYCLE

- | | |
|---------------------------------------|---------------------------|
| 1. Professeur Moussa HARAMA | Chimie Organique Minérale |
| 2. Professeur Yénimégué Aïber DEMBELE | Chimie Organique |
| 3. Professeur Massa SANOGO | Chimie Analytique |
| 4. Professeur Mme. THIAM Aïssata SOW | Biophysique |
| 5. Professeur Bakary M. CISSE | Biochimie |
| 6. Professeur Mamadou KONE | Anatomie Phys Humaines. |

4. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

- | | |
|-------------------------------------|----------------|
| 1. Docteur Ogobara DOUMBO | Parasitologie |
| 2. Docteur Abderhamane Sidèye MAIGA | Parasitologie. |

5. MAITRES - ASSISTANTS

- | | |
|-------------------------|--------------------|
| 1. Docteur Hama CISSE | Chimie Générale |
| 2. Docteur Amadou TOURE | Histo-Embryologie. |

D.E.R. DE MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES

1. PROFESSEUR AGREGES

- | | |
|---------------------------------------|----------------------------------------|
| 1. Professeur Souleymane SANGARE | Chef de D.E.R.
Pneumo-Phtisiologie. |
| 2. Professeur Abdoulaye Ag. RHALY | Médecine Interne |
| 3. Professeur Eric PICAHRD | Médecine Interne |
| 4. Professeur Ali Nouhoum DIALLO | Médecine Interne |
| 5. Professeur Aly GUINDO | Gastro-Entérologie |
| 6. Professeur Mamadou Kouréïssi TOURE | Cardiologie |
| 7. Professeur Baba KOUMARE | Psychiatrie |
| 8. Professeur Mahamane MAIGA | Néphrologie |
| 9. Professeur Moussa TRAORE | Neurologie |
| 10. Professeur Issa TRAORE | Radiologie |
| 11. Professeur Mamadou Marouf KEITA | Pédiatrie. |

2. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

- | | |
|----------------------------|------------------------------|
| 1. Docteur Balla COULIBALY | Pédiatrie |
| 2. Docteur Toumani SIDIBE | Pédiatrie |
| 3. Docteur Boubacar DIALLO | Cardiologie |
| 4. Docteur Dapa Ali DIALLO | Hématologie-Médecine Interne |
| 5. Docteur Somita M. KEITA | Dermatologie-Léprologie. |

D.E.R. DE SCIENCES PHARMACEUTIQUES

1. PROFESSEURS AGREGES

- | | |
|------------------------------|----------------------------|
| 1. Professeur Boubacar CISSE | Chef de D.E.R. Toxicologie |
|------------------------------|----------------------------|

2. MAITRES ASSISTANTS

- | | |
|--------------------------------|-------------------------|
| 1. Docteur Boulkassoum HAIDARA | Législ. Gest. Pharmacie |
| 2. Docteur Elimane MARIKO | Pharmacodynamie |
| 3. Docteur Arouna KEITA | Matière Médicale |
| 4. Docteur Ousmane DOUMBIA | Pharmacie Chimique. |

3. DOCTEUR 3ème CYCLE

- | | |
|----------------------------------|----------------------|
| Docteur Mme. CISSE Aminata GAKOU | Pharmacie Galénique. |
|----------------------------------|----------------------|

D.E.R. DE SANTE PUBLIQUE

1. PROFESSEURS AGREGES

- | | |
|--------------------------------|--------------------------------------------|
| 1. Professeur Sidi Yaya SIMAGA | Chef de D.E.R. Santé Publique |
| 2. Docteur Hubert BALIQUE | Maître de Conférence
en Santé Publique. |

2. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

- | | |
|-------------------------------|-----------------|
| 1. Docteur Sory Ibrahima KABA | Epidémiologie |
| 2. Docteur Sanoussi KONATE | Santé Publique |
| 3. Docteur Moussa MAIGA | Santé Publique |
| 4. Docteur SOULA | Santé Publique |
| 5. Docteur Bocar Garba TOURE | Santé Publique. |

3. DOCTEURS 3ème CYCLE

1. Professeur Bouba DIARRA	Microbiologie
2. Professeur Niamanto DIARRA	Mathématiques
3. Professeur N'Golo DIARRA	Botanique
4. Professeur Souleymane TRAORE	Physiologie Générale
5. Professeur Salikou SANOGO	Physique
6. Professeur Daouda DIALLO	Chimie Minérale
7. Professeur Bakary SACKO	Biochimie.

4. CHARGES DE COURS

1. Docteur Boubacar KANTE	Pharmacie Galénique
2. Docteur Alou KEITA	Pharmacie Galénique
3. Docteur Mme. CISSE Aminata GAKOU	Pharmacie Galénique
4. Docteur Souleymane GUINDO	Gestion
5. Monsieur Modibo DIARRA	Diététique-Nutrition
6. Mme. Cheick Tidiani TANDIA (Ingénieur Sanitaire).	Hygiène du Milieu
7. Mme. MAIGA Fatoumata SOKONA (Ingénieur Sanitaire).	Hygiène du Milieu

5. ASSISTANTS ET C.E.S.

1. Docteur Bah KEITA	Pneumo-Phtisiologie
2. Docteur Sékou SIDIBE	Orthopédie-Traumatologie
3. Docteur Moussa I. MAIGA	Gastro-Entérologie
4. Docteur Flabou BOUGOUDOGO	Microbiologie
5. Docteur Mamadou A. CISSE	Urologie
6. Docteur Mme. KONARE Habibatou DIAWARA	Dermatologie-Léprologie
7. Docteur Drissa DIALLO	Matière Médicale
8. Docteur Kader TRAORE	Médecine Interne
9. Docteur Hamar Alassane TRAORE	Médecine Interne
10. Docteur Abdoul Kader TRAORE dit DIOP	Chirurgie Générale
11. Docteur Daba SOGODOGO	Chirurgie Générale
12. Docteur Filifing SISSOKO	Chirurgie Générale.

JE DEDIE CETTE THESE

- À mon Père

Qui n'a ménagé aucun effort pour notre éducation et notre bien-être.

- À mes Mères

Qui nous a toujours entourés de tendres affections et nous a prodigué toutes les leçons de sagesse.

Trouvez ici un faible témoignage de ma reconnaissance et mon amour filial.

- À mes Frères et Sœurs

Tendres affections.

**- À la Mémoire de ma Sœur Chère et de
mon Frère unique Grand Frère OUSMANE SARRÉ**

Reposez en paix.

- À mes Grands Parents

Tendresses infinies.

- À mes Cousins et Cousines

Toutes mes sympathies.

- À tous mes Amis

Trouvez ici l'expression de mon attachement profond pour une amitié durable.

**- À mes Oncles et Tantes
À mes Familles Amies**

. DIALLO Cheick Oumar

. SYLLA Bréhima

. BAH Hamidou

. BASSE Boubakar

Toute ma reconnaissance et mon profond attachement.

- À tous mes Collègues de Promotion 1983-1989.

- À mes cadets

- Abdoulaye TOURE

- Faoussoubi CAMARA

- Ousmane DOUCOURE

Courage.

Tous mes Remerciements

- *Au Chef Poste Médical de SAFO, à son Aide-soignant*
et à toute la Communauté Villageoise pour leur étroite collaboration
à l'exécution de ce travail.

- *A tout le Personnel de D.E.A.P.*

- . Section Immunologie
- . Section Parasitologie
- . Section Malacologie
- . Section Entomologie

Sans oublier Mme. Assa D. COULIBALY
Mr. COULIBALY Danzélé
Mr. COULIBALY Bâ Karim

Je reste particulièrement sensible à votre grande disponibilité,
et votre gentillesse à mon égard tant sur le terrain qu'au Laboratoire.
Veuillez agréer à tous mes remerciements et mon profond respect.

- *A Mlle. Kadiatou KANTE*

Qui s'est montrée très patiente et disponible durant
la Dactylographie de cette Thèse.
Tous mes sincères remerciements.

- *A notre Maître de Thèse*
Docteur Ogobara DOUMBO

- . Assistant Chef de clinique
- . Médecin-Chef du département d'Epidémiologie
et des Affections Parasitaires à l'Ecole Nationale de Médecine
et de Pharmacie du Mali (E.N.M.P.).
- . Directeur du Cours Supérieur d'Epidémiologie.
- . Professeur de Parasitologie à l'Ecole Nationale de Médecine et de
Pharmacie du Mali (E.N.M.P.).

Nous vous remercions de la confiance que vous nous avez faites en nous
proposant ce travail.

Votre simplicité, votre sens élevé du devoir, votre disponibilité,
votre esprit compréhensif sont d'autant de qualités que nous avons
beaucoup appréciées en vous.

Pédagogue et homme de terrain, vos judicieux conseils, votre patience et votre rigueur scientifique ont fait naître en nous le goût de la recherche.

Trouvez ici dans ce travail tout mon profond respect et ma grande admiration.

- A notre Maître et Président du Jury
Professeur Boubakar S. Cisse

- . Chef de D.E.R. des Sciences Pharmaceutiques
- . Chef de Service de la Section Toxicologie de l'I.N.R.S.P.
- . Professeur chargé des cours de toxicologie à l'Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie du Mali (E.N.M.P.).

Votre présence à ce Jury nous honore.

Permettez-nous aujourd'hui de vous témoigner toutes nos reconnaissances pour l'enseignement de qualité dont vous nous avez fait bénéficier.

- A notre Maître et Membre du Jury
Docteur Abderhamane Sidèye MAIGA

- . Professeur de Parasitologie à l'Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie du Mali (E.N.M.P.).

Vous avez toujours su donner le meilleur de vous même au cours et dans votre service où votre grande disponibilité à la pratique.

- A notre Maître et Membre du Jury
Docteur Anatole TOUNKARA

- . Assistant Chef de clinique.
- Chargé de cours d'Immunologie à l'Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie du Mali (E.N.M.P.).

Qu'il nous soit permis de vous exprimer mes sincères remerciements pour avoir accepté de juger ce travail.-

SOMMAIRE

1.	Introduction	1
2.	Mise au point bibliographique sur les vaccins antiparasitaires	4
3.	Données bibliographiques sur les vaccins antiplasmodiaux	8
	2.1 Place du Parasite dans le règne animal	
	2.2 Classification des Parasites et Point d'Impact des vaccins.	
	2.3 Vaccins antimétaboliques	
	2.4 Vaccins antiprotozoaires (Plasmodium exclu)	
4.	La protéine majeure de la surface des merozoïtes (P 190)	19
	3.1 Cycle biologique du plasmodium et Point d'Impact des vaccins	
	3.2 Mécanisme d'invasion de l'Hématie par le merozoïte	
	3.3 Relation plasmodium - Homme : Problèmes immunologiques.	
	3.4 Différents vaccins antiplasmodiaux.	
5.	Méthodologie	23
	4.1 Historique	
	4.2 Mode de production	
	4.3 Intérêt immunologique.	
	5.1 Lieu d'étude	
	5.2 Période d'étude	
	5.3 Echantillonnage	
	5.4 Variables mesurées	
	5.5 Techniques de recherche	
	5.6 Personnel d'enquête	
	5.7 Analyse des données.	

6.	Résultats	46
6.1	Résultats globaux	
6.2	Résultats entomologiques	
6.3	Résultats cliniques	
6.4	Résultats parasitologiques	
6.5	Résultats immunologiques	
6.6	Corrélation entre résultats parasitologiques et immunologiques.	
6.7	Transfert des techniques et technologies	
7.	Discussion et Commentaires	61
8.	Conclusion - Recommandations et Perspective d'avenir	67
	- Liste Bibliographique	
	- Annexe	
	- Résumé.	

INTRODUCTION

Le Paludisme peut se définir comme une érythrocytopathie, fébrile et hémolysante due à un protozoaire (Hémosporidie). Le développement et la multiplication intraérythrocytaire de cet apicomplexa (genre plasmodium) chez l'homme traduit la maladie.

Il est transmis à l'homme par la piqûre infestante d'un moustique de la sous famille des anophelinae et de genre anophèles (Meigen 1818).

Quatre espèces plasmodiales sont inféodées à l'homme : Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Plasmodium ovale et Plasmodium malariae.

Plasmodium falciparum (Welch 1897) est l'espèce la plus dangereuse.

Ses incidences pernicieuses dramatiques font de lui la cause principale de mortalité et de morbidité. Au Mali, les statistiques sanitaires montrent que le Paludisme représente la première cause de morbidité (15,6%) et de mortalité (13%) DOUMBO O. et coll 1989 (19).

En Gambie, Greenwood et coll (26) ont estimé à 20% le taux de mortalité infanto juvénile en 1989.

Bâh, M.D. et coll 1981 (4) ont montré une prévalence élevée chez les femmes enceintes en zones rurales d'endémie palustre. L'impact de cette parasitose à

P. falciparum sur l'évolution des grossesses est largement démontré dans les zones d'endémie : Bryskier. A. et coll 1988 (9). Toutes ces repercussions freinent l'essor socio-économique des zones d'endémie palustre.

La découverte du rôle vecteur des anophèles dans la transmission du paludisme par Sir Ronald Ross en 1948, et l'identification du parasite par Laverans en 1880 (Ambroise. T. et coll 1984 (1) ont permis de réaliser d'importants progrès dans le domaine de l'épidémiologie du Paludisme.

L'apparition de nouveaux produits antimalariques de synthèse et d'insecticides à effet remanent contribuèrent beaucoup au lancement du programme mondial d'éradication du paludisme par O.M.S. en 1955 (1).

Des résultats spectaculaires ont été obtenus dans les pays tempérés et dans les régions insulaires. Mais, dans les régions inter-tropicales les progrès ont été timides voir même insignifiants. Environ 2,5 Milliards d'individus sont exposés à l'infestation palustre (9). En Afrique 1/2 Millions d'enfants meurent par an (26).

Le Paludisme, dans ces régions dites " de ceinture de pauvreté ", demeure un problème médical et un problème majeur de Santé Publique.

A l'heure actuelle, la menace croissante de la résistance aux antipaludéens de synthèse des souches plasmodiales en général et de la chloroquino-résistance de Plasmodium falciparum (53) en particulier pose de sérieux problèmes aux cliniciens et aux épidémiologistes. Quant aux chercheurs, ils cheminent vers l'immunoprophylaxie pour l'élaboration d'un vaccin face à une situation allant en s'aggravant. La mise au point de la culture continue plasmodiale par Jensen et Trager en 1976 (32) a beaucoup apporté dans le domaine de la biologie du parasite : Des mécanismes d'interaction entre l'hôte et le parasite ont été élucidés.

L'espoir que suscite le vaccin antiparasitaire de Nussenzweig 1982-1986 amplifié par les médias n'a pas abouti à la sortie d'un vaccin efficace.

Les recherches s'orientent actuellement vers d'autres protéines plus immunogènes de stade : formes asexuées et sexuées érythrocytaires.

Parmi ces protéines immunogènes la protéine 190 (P 190) de Plasmodium falciparum de la surface du merozoïte est en très bonne position.

De nombreuses équipes travaillent sur cette protéine. Il s'agit de :

- Wasim A. Siddiqui et coll de l'Université d'Hawaii à Honolulu aux U.S.A.
- John G. Scaife et coll Département de biologie moléculaire de l'Université d'Edinburg (Royaume-Unis).
- Hermann Bujard Centre de biologie moléculaire Heidelberg (Allemagne Fédérale).
- Manuel E. Patarroyo et coll de l'Université de Colombie.

L'évaluation clinique en phase IIa du vaccin contenant la P190 est imminente.

Dans le cadre d'une collaboration institutionnelle entre le laboratoire de biologie moléculaire du Professeur Docteur H. Bujard (Heidelberg) et le Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires (D.E.A.P.), nous nous proposons :

- De participer à la mise au point des techniques séro-immunologiques de diagnostic et de surveillance épidémiologique du Paludisme dans notre pays ;
- De promouvoir un transfert des techniques d'immuno-diagnostic Nord-Sud ;

- De caractériser le facies épidémiologique du paludisme dans une zone de savane malienne en utilisant les nouveaux indicateurs malarionométriques ;
- D'évaluer la dynamique naturelle des anticorps anti-P. 190 dans une zone d'endémie palustre de savane malienne chez des adultes et enfants;
- De préparer le terrain dans une zone d'endémie de savane pour un éventuel essai vaccinal : acceptabilité et participation communautaire pour un suivi longitudinal.

2. MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES VACCINS
ANTI-PARASITAIRES.

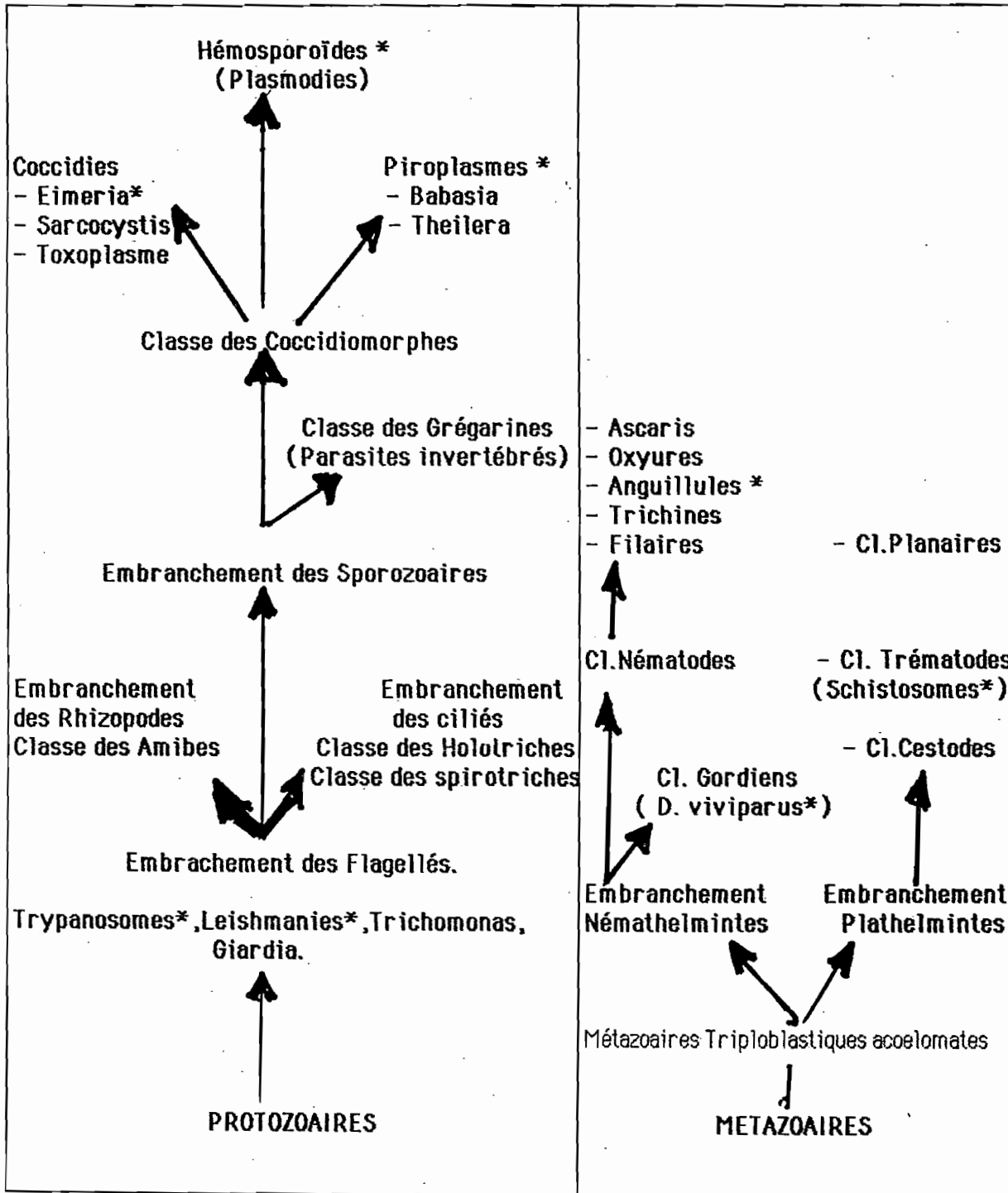
2.1 Place des parasites dans le règne animal

Les parasites animaux sont des êtres vivants. Ils vivent aux dépens d'un individu d'une autre espèce linéenne appelée hôte ; dont ils peuvent ou pas altérer la santé. Le parasitisme est un état de relation hétérosécifique entre deux espèces linéennes. cette relation se tisse par un mécanisme d'adaptation phylogénique. Cette adaptation oblige le parasite à des modifications éthologiques, biologiques et immunologiques. Le parasite use de tous les moyens pour se faire accepter et tolérer par son hôte, ce qui complique d'avantage l'obtention d'un vaccin antiparasitaire. Mc. Laren. J. D. et Terry. R.G. 1989 (40) dans leur article "Antiparasites vaccines" font le bilan des vaccins antiparasitaires existants et, ou, en cours d'évaluation.

PRESENTATION DU REGNE ANIMAL
(les divers embranchements)

Unicellulaires				PROTOZOAIRES	
Pluricellulaires (Métazoaires)	Diploblastiques			MYXOZOAIRES SPONGIAIRES CNIDAIRES CTÉNAIRES	
	Triploblastiques	Acoelomates		PLATHELMINTHES NĒMATHELMINTHES NĒMERTIENS ROTIFĒRES	
		Coelomates	Protostomiens	Hyponeuriens	ANNĒLIDES MOLLUSQUES LOPHOPHORIENS PARA-ARTHROPODES ARTHROPODES
			Coelomates	Deutérostomiens	Epithélineuriens
		Epineuriens			UROCORDĒS CĒPHALOCORDĒS VERTĒBRĒS

CLASSIFICATION DES PARASITES : POINT D'IMPACT DES VACCINS *



2.3 Vaccins antimétozoaires

Les vaccins antimétozoaires existants ou, en cours d'études sont tous élaborés contre les nématodes et trématodes d'animaux.

Le premier vaccin antiparasitaire commercialisé depuis 1959 a été élaboré contre la bronchite pulmonaire du bétail. Il est composé de larves irradiées de Dictyocaulus viviparus (Nématode). Ce vaccin induit dans 95% des cas une immunité protectrice.

Un second vaccin antinématode a été mis au point contre l'ankylostomiase du chien : Ankylostoma caninum. Ce vaccin préviendrait les manifestations morbides graves sans "blanchir" complètement le chien.

Un troisième vaccin constitué de larves irradiées de Schistosoma bovis (Trématode) a été testé contre la schistosomiase bovine. L'administration de larves atténuées par irradiation au bétail donne des résultats très prometteurs. La prévention contre l'infection ne semble pas totale. Ce niveau de protection incomplète limite son essai à l'homme. Il existe une parenté antigénique entre les schistosomes humains et ceux des animaux.

Actuellement grâce au génie génétique, nombreuses sont les protéines immunogènes candidates pour un vaccin.

Pour le vaccin antischistosomiase bovine, les protéines les plus prometteuses sont les enzymes : le glutathion S. Transferase (P. 28), la glycoprotéine GP. 38 et la GP. 18 (antigène de surface du parasite). Les résultats sont peu encourageants, même quand elles sont utilisées en "côctail".

Pour le vaccin antiankylostomiase canine, les enzymes protéases d'Ankylostoma caninum restent de sérieuses candidates pour le vaccin.

Quant aux schistosomiasis humaines, les recherches sont en cours pour l'identification de meilleures protéines immunogéniques. L'obtention d'un vaccin dans l'immédiat ne semble pas évident.

2.4 Vaccins antiprotozoaires (plasmodium exclu)

Le vaccin antileishmaniose (parasite vivant atténué) est le premier vaccin antiparasitaire testé sur l'homme. Il induirait une bonne immunité. L'expérimentation au Brésil sur l'homme d'un vaccin antileishmaniose constitué de parasite mort a donné des résultats plus prometteurs.

Le vaccin constitué de sporozoïte de Theileria parva (piroplasma) responsable de la fièvre du bétail sur la côte Est Africaine a été testé. Ce vaccin confère une immunité protectrice si l'immunisation s'effectue avec la souche homologue.

La Thelecine, vaccin élaboré contre l'infection à Theileria annulata est commercialisé en URSS. Ce vaccin utilisé pour immuniser les bovins est similaire à celui utilisé en Israël. Ce vaccin est constitué de lignées cellulaires parasitées par la forme atténuée de Theileria annulata. Parallèlement il existe un vaccin antipiroplasme (Babesia bovis) utilisé en Australie pour immuniser les bovins. Ce vaccin confère une immunité non stérilisante de courte durée, et nécessite des stimulations répétées.

Actuellement beaucoup de vaccins antiparasitaires sont en cours d'élaboration. Il s'agit notamment de :

- La glycoprotéine GP 63 candidate pour un nouvel vaccin antileishmaniose. Il semblerait que cette GP 63 joue un rôle de ligand entre le macrophage et le parasite. Mais, le phénomène d'immuno-pathologique (réaction d'hypersensibilité retardée de type inflammatoire) qu'il induit pose un problème majeur quant à son utilisation comme immunogène chez l'homme ;
- Pour les vaccins antipiroplasmes (Theileria et Babesia), les recherches s'orientent vers l'identification d'antigènes protecteurs. Le polymorphisme antigénique rencontré chez ces deux parasites posent de sérieux problèmes pour l'évaluation d'un vaccin efficace ;
- Des antigènes produits par génie génétique sont candidats pour l'élaboration d'un vaccin contre la coccidiose à Eimeria. Un antigène d'Eimeria tenella a été mis au point. Il semble procurer quelque degré de protection ;
- Quant au vaccin antitrypanosomiase, d'importants progrès ont été réalisés par la biologie moléculaire. Mais, la complexité des variations antigéniques, et la capacité du parasite à modifier la synthèse de ses antigènes de surface rendent délicat l'élaboration d'un vaccin. Cependant l'utilisation d'un médicament altérant ses capacités de modification de la synthèse des antigènes de surface, rendrait le trypanosome accessible aux mécanismes de défense immunitaire.

En conclusion, seuls deux vaccins antiparasitaires d'intérêt vétérinaire sont disponibles : le vaccin contre la dictyocaulose pulmonaire bovine qui confère une immunité protectrice à 95% et le vaccin contre la thelecine à Theileria annulata commercialisé en URSS.

Il existe donc très peu de vaccins antiparasitaires efficaces. Cependant grâce au génie génétique, l'orientation vers la recherche de protéines plus immunogènes et d'adjuvants de qualité permettra l'élaboration de nombreux vaccins antiparasitaires efficaces.

3. LES DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES SUR LES VACCINS ANTIPLASMODIAUX.

D'importants progrès ont été réalisés dans le domaine de l'immunologie et de la biologie moléculaire pour la mise au point d'un vaccin antimalarique. depuis l'idée lancée par Celli (Italie) et les frères Sargent (Algérie) (7) il y a 75 ans.

Trois dates sont à retenir dans cette "course au vaccin" (52) :

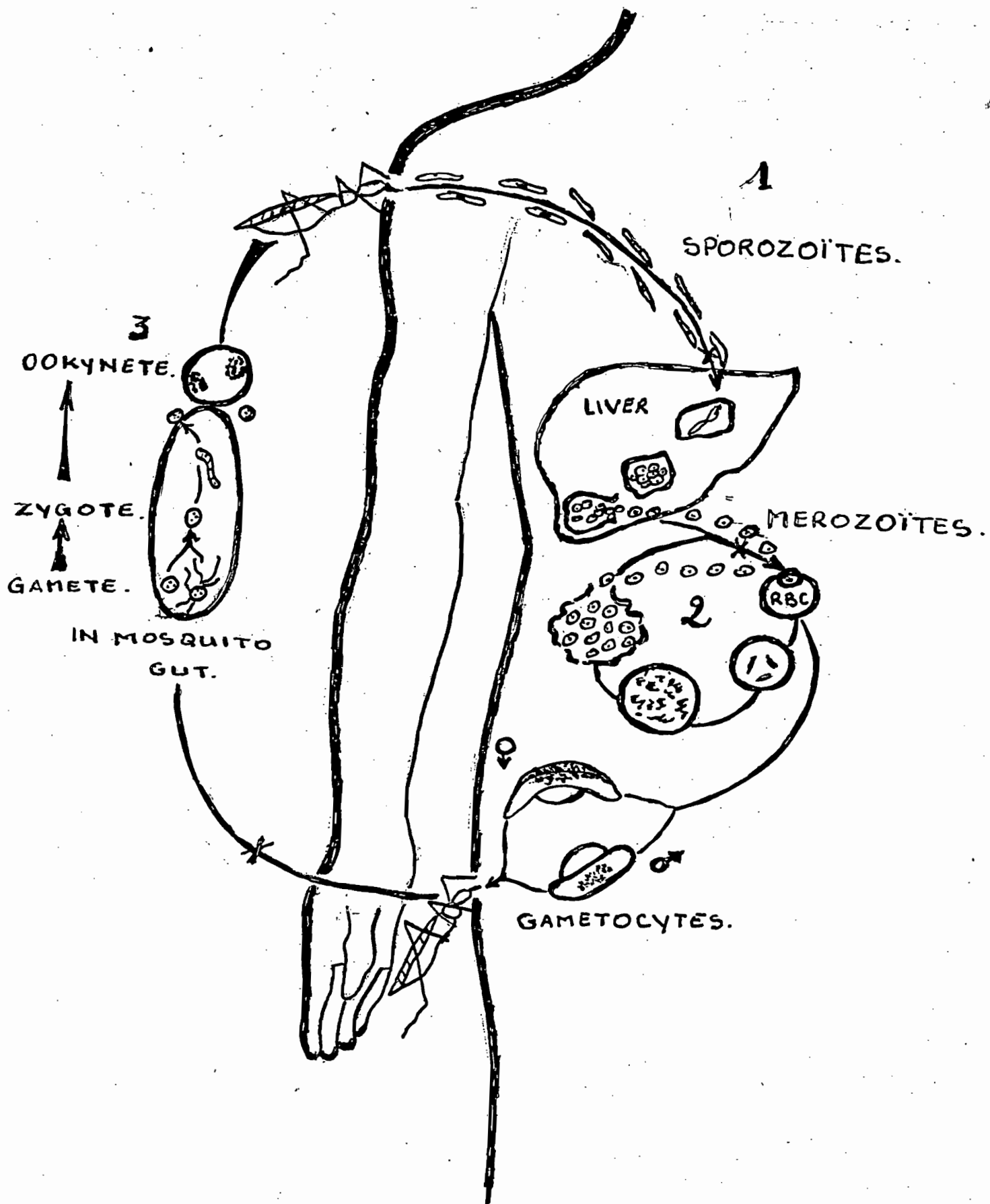
- 1975 : l'obtention d'hybridomes débouchant sur la production d'anticorps monoclonaux et permettant la purification et la détection d'antigènes.
- 1976 : culture de P. falciparum in vitro établissant une source continue de parasite.
- 1984 : clonage d'un gène de P. falciparum ouvrant l'ère du génie génétique en parasitologie.

Il s'agit de sous unité de vaccin, puisque la cible potentielle n'est plus le parasite entier, mais des protéines de surface synthétiques ou recombinantes.

D'après Bruce-Chwatt (7) ces protéines immunogènes proviennent des trois stades de développement du plasmodium. Il s'agit de :

- Le sporozoïte infectant : c'est la forme inoculée dans l'hôte humain par une anophèles infectée. Sa pénétration dans l'hépatocyte survient environ 30 minutes après son inoculation. Un vaccin à visée protectrice sur les formes hépatocytaires ou pré érythrocytaires doit être efficace à 100%. Il empêcherait le développement de cette forme en schizonte dans le foie et leur invasion sanguine.
- Les formes erythrocytaires asexuées : elles sont responsables des manifestations cliniques de la maladie. Ces manifestations sont associées aux cycles répétés de la multiplication du parasite dans les hématies. Un vaccin contre les formes erythrocytaires (ou mérozoïte) devrait stopper ou limiter leur pénétration et replication dans l'erythrocyte. L'immunité induite doit réduire les manifestations morbides dues à la maladies.
- Les formes sexuées : il s'agit des gametocytes, gametes et oocystes. Ce troisième type de vaccin devrait empêcher la fertilisation des gametes femelles du parasite par les mâles, ou interférer sur la croissance des oocytes dans l'intestin du moustique, si les anticorps spécifiques sont ingérés par l'anophèles. Ce type de vaccin devrait bloquer la transmission du Paludisme dans une communauté.

3.1 Cycle biologique du Plasmodium et les points d'impact des vaccins ((41).x



3.2 Mécanisme d'invasion de l'hématie par le mérozoïte

Perkins.M.E, et coll 1989 (48) montrent que l'invasion du mérozoïte dans l'hématie nécessite deux structures fondamentales. Il s'agit :

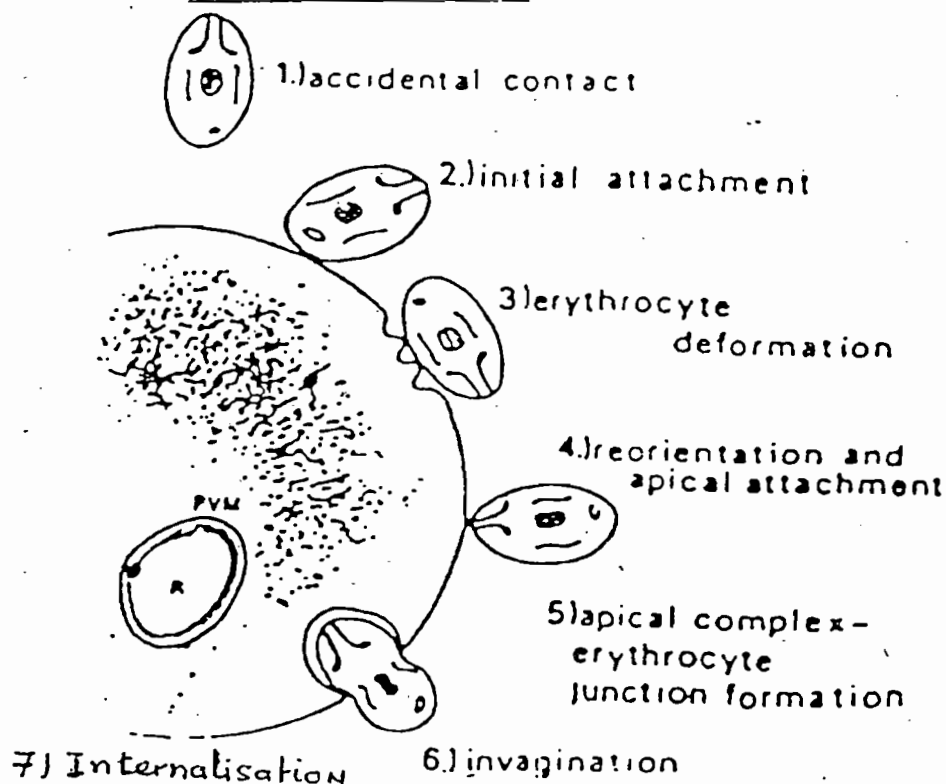
- Des structures propres à l'hématie : récepteurs membranaires spécifiques d'espèces plasmodiales ;
- Des structures propres au mérozoïte : RBP ou protéines spécifiques du mérozoïte qui se lient aux récepteurs membranaires de l'hématie.

Des études réalisées au microscope électronique avec les modèles aviaire (*Plasmodium gallinaceum*), simien (*Plasmodium knowlesi*), et humain, (*Plasmodium vivax* et *Plasmodium falciparum*) ont montré que les plasmodies ne pénètrent pas l'hématie par effraction membranaire.

Le mécanisme de l'invasion est un processus d'invagination membranaire de l'hématie avec formation d'une vacuole parasitophore : endocytose (OMS 1987) (44).

La séquence des événements est très précise. Hermentin et coll 1984 in TOUNKARA A. 1987 (61) résument en sept (7) étapes successives le mécanisme d'invasion de l'hématie par le mérozoïte (voir schéma N°2).

Schéma 2 - Processus d'invasion de l'érythrocyte humain par *Plasmodium falciparum* selon HERMENTIN et al., 1984.



1. Le contact accidentel du mérozoïte à la surface de l'hématie ;
2. L'attachement du mérozoïte à l'hématie. Cet attachement peut s'effectuer au niveau de toute structure morphologique du mérozoïte ;
3. Une déformation rapide et étendue de l'hématie en un temps très court 9 à 15 secondes ;
4. La réorientation du mérozoïte avec attachement de sa zone apicale à l'hématie ;
5. La formation d'une jonction mobile à l'interface du mérozoïte et de la membrane de l'hématie. La membrane de l'hématie subit une vague déformation pour engendrer une dépression concave autour de l'apex du mérozoïte ;
6. Invagination de la membrane erythrocytaire en un temps très bref une (1) minute, est secondaire aux sécrétions libérées par les structures apicales du mérozoïte ;
7. Internationalisation du mérozoïte avec formation d'une vacuole parasitophore.

3.3 Relation Plasmodium - Homme : problèmes Immunologiques

Le plasmodium parasite hétéroxène doit passer dans différents hôtes pour assurer son propre développement. Sa diversité antigénique à tous les stades de son cycle biologique lui valent le terme de "Mosaïque antigénique" (Druilhe P. et coll 1979 (20). Il suscite chez son hôte vertébré une réponse immunitaire à tous les stades de son développement. Pour la pérérité de son espèce, le plasmodium dejoue le système immunitaire par des mécanismes d'évitement et d'adaptation. Il traverse deux périodes difficiles hors de la cellule sanguine à l'état du sporozoïte et de mérozoïte.

Le mécanisme exact d'échappement des sporozoïtes aux cellules phagocytaires(foie et sang) n'est pas clairement élucidé. Il semble que la configuration plissée du circumsporozoïte protéine (protéine de surface du sporozoïte) détourne la réponse immunitaire vers une cible moins immunogène et empêche le décèlement des autres.

On connaît très mal le mécanisme d'invasion hépatocytaire du sporozoïte. Les ligands à la surface de l'hépatocyte ne sont pas totalement identifiés. Les mérozoïtes de première génération résultant de la schizogonie tissulaire ne réinfectent plus l'hépatocyte comme l'on a toujours pensé, mais régagnent surtout le secteur vasculaire. Des données récentes concluent à un tropisme erythrocytaire de ce stade parasitaire.

Il a été mis en évidence des formes dormantes ou hypnozoïtes dans l'hépatocyte avec le Plasmodium vivax et Plasmodium ovale.

Les raisons de la persistance dans l'organisme humain des espèces : P. malariae pendant 30 à 60 ans, de P. ovale et de P. vivax durant 2 à 5 ans sans être rejetés par le système de défense de l'organisme demeurent inconnues.

L'occupation de deux niches écologiques (hépatocyte et erythrocyte) par le plasmodium dans un même biotope (organisme humain) pour une même fonction de reproduction asexuée (schizogonie) reste énigmatique.

Cette extraordinaire adaptation biologique et éthologique du plasmodium fait de ce parasite un véritable spécialiste. Elle se traduit par un équilibre dynamique entre l'immunité " protectrice " de l'hôte humain et le plasmodium parasite (3). Cette immunité protectrice et non stérilisante du type 1 (3) a été définie par les frères Sargent en 1963 d'où le terme " Immunité Sargent " (1). Elle s'acquiert en zone d'endémie au prix d'une mortalité infantile élevée et d'une morbidité importante. Elle est spécifique d'espèce (72), de souche (38) (59) et même de stade parasitaire (6). Médée par les facteurs humoraux cellulaires et solubles, l'immunité est d'autant précaire que l'individu est jeune (15). Elle se développe avec l'âge (27), (29).

D'autre part, l'homme (*Homo sapiens*) présente une résistance innée vis-à-vis des espèces plasmodiales non inféodées à lui, exemple : Plasmodium berghei, Plasmodium gallinaceum, Plasmodium cynomolgi etc...

Il se réalise donc une extraordinaire adaptation hôte parasite avec une notion de spécificité : l'homme n'est sensible qu'aux plasmodium humains.

On note cependant quelques exceptions d'états refractaires et des avantages sélectifs :

- Le nouveau-né à cause de son l'hémoglobine foetale et son alimentation lactée ;
- Les enzymopathies du globule rouge : déficit en glucose 6 phosphate déshydrogénase (G6 Pd.) ;
- Les sujets Duffy (a- b-) et Plasmodium vivax ;
- Erythrocytopathies de structure : hémoglobinoses S, E, C etc...
- Erythrocytopathie de synthèse : alpha et beta thalassemie (36) ;

Claudio, D. R. et coll 1989 (11) montrent que l'activation polyclonale de B. lymphocytes est un phénomène caractéristique de l'immunopathologie liée au Paludisme. Mc. Gregor 1981 (39) explique que les immuns complexes avec la participation du complément peuvent aggraver la pathologie paludique. Ces immuns complexes provoqueraient la destruction des érythrocytes non parasités et le déclenchement de nouveaux stades de la maladie tel que glomerulonephrite et syndrome splénomégalique tropical.

Toutes ces nouvelles données sur les problèmes immunologiques liés à l'impaludation permettent une meilleure compréhension des relations hôte parasites. L'immunopathologie de cette protozoose et surtout le développement du vaccin de stades sont les premiers bénéficiaires de cet apport.

3.4 Différents vaccins antiplasmodiaux

3.4.1 Vaccin antisorozoïte

Nussenzweig et coll. ont mis en évidence dans les années 1980, les vertues immunogènes des sporozoïtes irradiés (in 27). Ils utilisèrent le modèle animal de Plasmodium berghei de souris.

L'immunité protectrice acquise est médiée par des anticorps chez l'homme, Nussenzweig R.S. 1982 (in 8) retrouve la présence d'anticorps protecteurs antisorozoïte de P. vivax et de P. falciparum. Cette immunité acquise antisorozoïte retrouvée dans le modèle animal et chez l'homme est médiée en grande partie par des anticorps (Perrin LH - 1981) (43). Ces anticorps spécifiques réagissent avec l'épitope répétitif contenu dans la zone centrale immunodominante du circumsporozoïte protéine. Ce motif répétitif est conservé dans toutes les souches de P. falciparum avec toutefois des différences concernant le nombre de répétition (52).

La circumsporozoïte protéine (Csp) est la protéine majeure de la surface du sporozoïte. La Csp est présente chez tous les sporozoïtes et la structure est identique à l'exception de la séquence en acides aminés (8). Elle réagit spécifiquement avec l'hépatocyte ; et constitue la cible du vaccin antisorozoïte en cours de réévaluation.

Le gène qui code pour la Csp a été isolé par Dame et coll en 1984 in Bryskier 1988 (8). La Csp a un poids moléculaire de 44 kilo Dalton (KD). Elle est composée de 412 acides aminés répartis schématiquement en trois régions : deux régions périphériques et une région centrale. 40% de cette chaîne d'acides aminés contient les 41 tetrapeptides répétitifs : 37 (Asparagine Alanine - Asparagine Proline NANP) et 4 (Asparagine Valine - Acide aspartine Proline NVDP) se situent dans la zone centrale immunodominante.

Deux équipes travaillent sur ces sous-unités de vaccins dérivés de la Csp. Il s'agit de :

- l'équipe de Nussenzweig sur la protéine synthétique : le NYI (NANP)3 couplé avec la toxine tétanique.
- l'équipe de la Walter Red Army Institut of Research : WRAIR - NIH sur la protéine recombinante : R 32 tet 32.
 Cette protéine est constituée du (NANP) 15 et (NVDP) 2 couplé aux 32 premiers aminoacides qui codent la résistance plasmédique des tétracyclines.

Ces deux protéines immunogènes de Plasmodium falciparum ont été testées sur des volontaires en phase I et II de l'étape clinique. Seulement deux sur neuf individus " vaccinés " ont été efficacement protégés.

L'échec de l'essai vaccinal antiparasitaire malgré une réponse humorale très élevée, confirme les résultats d'importants travaux effectués par Hoffman et coll 1987 (27). Ces auteurs ont mis en évidence la protection incomplète des anticorps anticircumsporozoïtes. Les anticorps antiCsp auraient selon Webster H.K. et coll 1987 (70) une brève durée de vie inférieure à un mois. Il est important de noter qu'in vitro aucune corrélation n'existe entre la prolifération des T lymphocytes et le taux d'anticorps antiCsp (O.M.S., 1986) (43).

Ces différents résultats permettent de conclure que la réponse humorale seule est insuffisante pour conférer une protection antiparasitaire efficace.

La réponse cellulaire serait d'un appoint très important ; à savoir l'intervention des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) reconnaissant d'autres épitopes sur la Csp.

Des résultats expérimentaux de nombreux travaux récents soutiennent cette hypothèse.

Egan et coll. 1988 (21) montrent que le transfert passif des cellules T lymphocytes et non des serums à des souris immunisées avec des sporozoïtes entiers, confère à ces dernières une immunité protectrice.

Sadoff et coll 1988 (58), provoquent l'induction d'une immunité partielle en absence d'anticorps avec la protéine recombinante chez des souris infectées avec sporozoïtes.

Weiss et coll en 1988 (73) montrent le rôle des cellules T lymphocytes (CD 8 +) spécifiques responsables de l'induction d'immunité protectrice. Les travaux effectués sur le modèle animal déduisent que les T lymphocytes CD 8 + peuvent lyser directement les hépatocytes parasités ou, peuvent produire des substances solubles (O.M.S., 1986) (43). l'interferon gamma s'est montré capable d'inhiber le développement des formes préérythrocytaires dans l'hépatocyte chez le modèle rongeur (Plasmodium berghei), et chez le modèle simien (Plasmodium cynomolgi).

Romero et coll. 1989 (55) démontrent sur le modèle animal (P. berghei et P. yoelli) et humain (P. falciparum) que les épitopes activant les cellules T lymphocytes sont rares (voir unique) et polymorphiques entre les souches plasmodiales.

Good et coll. 1988 (25) mettent en évidence sur le modèle animal et sur celui humain la restriction de la réponse immune liée aux gènes du complexe majeur d'histocompatibilité. Ceci explique la variabilité individuelle de la réponse cellulaire aux protéines Csp dans les zones d'hyperendémicité palustre.

Tous ces travaux démontrent la faible immunogénicité de la Csp, non seulement de l'épitope répétitif de la zone centrale B immunodominante, mais aussi de l'épitope des T lymphocytes.

Actuellement les recherches s'orientent vers d'autres protéines immunogènes exprimées ailleurs que sur la Csp.

La culture invitro des formes préerythrocytaires de P. falciparum est en partie réalisable sur le modèle humain (37). Ceci permettra de mieux comprendre le mécanisme d'invasion de l'hépatocyte et la recherche des antigène de surface de l'hépatocyte infecté.

A l'heure actuelle, un seul antigène spécifique de l'étape hépatique le LSA1 (Antigène of liver stage) est à l'épreuve. Son gène a été cloné, mais sa signification fonctionnelle reste encore inconnue.

3.4.2 Vaccins antiformes erythrocytaires asexuées

Dans ce stade parasitaire ; plusieurs protéines immunogènes sont en cours d'évaluation comme candidates potentielles pour un vaccin.

1) La glycoprotéine de surface du mérozoïte.

Elle a divers noms :

- Le P.M.M.S.A : antigène polymorphique majeure de la surface du mérozoïte.
- La P 190 : protéine de poids moléculaire 190 Kilo Dalton.
- La GP 185 : glycoprotéine 185.
- La P. 185 : protéine de poids moléculaire 185 Kilo Dalto
- La M.S.P.P : protéine polymorphique de la surface du mérozoïte.
- La M.S.A : antigène de la surface du mérozoïte.

L'intérêt de cette protéine 190 repose sur un certain nombre de constats. Il s'agit de :

- La localisation sur la surface du mérozoïte et son rôle comme protéine binding erythrocyte RBP dans le processus d'invasion erythrocytaire (49).
- Une protection complète induite aux singes Aotus trivirgatus griseimembra (61).
- Un peptide synthétique de l'extrémité N terminal de la P. 185 constitue un composant du vaccin " cocktail " élaboré par M. Patarroyo 1987 (47). Premier vaccin synthétique antiforme sanguine asexuée testé sur humain, il induirait quelque degré de protection.

2) La Pf. 155 : Antigène de surface des erythrocytes infectés (RESA)

Le gène qui code pour cette protéine a été cloné. La protéine montre deux régions peptidiques immunodominantes à épitopes répétitifs. Il ne semble pas exister de variabilité en fonction de souches plasmodiales de P. falciparum. Son intérêt comme antigène vaccinal résulte des constatations suivantes :

- L'action inhibitrice in vitro par les anticorps monoclonaux anti Pf. 155 de l'invasion erythrocytaire par le mérozoïte.
- Sa localisation sur la surface des erythrocytes infectés par les formes en anneau (ring form).

Siddiqui W. A. et coll 1987 (61) mettent en évidence par des tests d'immunisation sur singes Aotus que la Pf. 155 est faiblement immunogène. D'autres travaux montrent que la Pf. 155 n'est pas reproductible par culture in vitro des erythrocytes. (Anonyme, TDR meeting 1989) (2).

Tous ces facteurs posent de sérieux problèmes pour l'élaboration d'un vaccin avec l'antigène Pf. 155.

Deux autres protéines de surface des erythrocytes se sont montrées très immunogènes quant à l'induction de protection partielle chez le singe Aotus, mais aussi chez les humains avec le vaccin multivalent synthétique de M. Patarroyo en Colombie (47).

La localisation exacte de ces protéines à la surface des erythrocytes n'est pas totalement élucidée.

Une protéine de surface (PfEMP1) de l'erythrocyte infecté a été mis en évidence par marquage et repérée par immunoprécipitation (Anonyme TDR meeting (1989) (2). Cette protéine candidate pour le vaccin semble jouer un rôle dans le phénomène de cytoadhérence de l'erythrocyte infecté. De récents travaux (Anonyme TDR meeting 1989) (2) ont mis en évidence le rôle protecteur des anticorps anti PfEMP1 chez des humains des zones d'endemicité palustre. Cependant le gène codant pour cette protéine n'a pas encore été cloné.

3) Le MAS 2 : Antigène de surface du mérozoïte

Sa localisation à la surface du mérozoïte et l'inhibition in vitro de l'invasion erythrocytaire par les anticorps monoclonaux antiMAS 2 montrent l'intérêt immunologique de cette protéine candidate au vaccin.

Mais, le polymorphisme observé chez cette protéine en fonction des différentes souches plasmodiales rend délicat l'élaboration d'un vaccin dans l'immédiat.

4) Les antigènes de Rhoptry des mérozoïtes ont été étudiés comme candidats au vaccin. Perkins M. 1989 (49) montre le rôle des antigènes de rhoptry dans le processus d'invasion erythrocytaires. L'action inhibitrice in vitro de l'invasion erythrocytaire des anticorps monoclonaux spécifiques a été démontrée (Anonyme TDR meeting 1989) (2). Des tests d'immunisation avec les antigènes de rhoptry sur le modèle animal sont très prometteurs.

Tous ces résultats contribuent à l'élaboration du vaccin composé de ces antigènes.

De ce chapitre, il ressort que, plusieurs protéines sont candidates pour l'élaboration du vaccin antiforme erythrocytaire asexuée. Seulement un petit nombre d'entre elles sont potentiellement prometteuses. L'espoir se fonde aujourd'hui sur la protéine 190 du Plasmodium falciparum.

Les techniques de biologie moléculaire ont permis à Mackay et coll. (35) de faire le "mapping" des séquences du gène qui code pour la protéine P. 190. Il semble établi qu'il existe actuellement un polymorphisme de la P 190, ce qui traduit une variabilité de cette protéine en fonction des différentes souches locales de Plasmodium falciparum.

Tanabé et coll 1987 (62) montrent que cette variabilité est très limitée entre les souches plasmodiales. Ce qui permis de regrouper toutes les souches plasmodiales en deux sérotypes : K1 ou MAD 20.

L'existence de ces deux sérotypes permet d'espérer à la mise au point d'un vaccin composite couvrant toutes les souches plasmodiales.

3.4.3 Vaccins antigamétocytes

Les travaux de Gwatz 1976 sur le modèle aviaire (P. gallinaceum), 1978 sur le modèle simien (P. Knowlesi) et ceux de Mendis sur le modèle des rongeurs (P. yoelli) révèlent que l'immunité antigamète pourrait réussir à bloquer la transmission (71).

La culture synchronisée in vitro du Plasmodium falciparum permet une production importante des gamétocytes. Ceci a été une étape importante pour les recherches d'élaboration d'un vaccin bloquant la transmission.

Les antigènes qui confèrent l'immunité sont localisés à la surface des gamètes et zygotes.

Plusieurs protéines immunogènes de Plasmodium falciparum ont été identifiées. Il s'agit :

- La Protéine 230 et le doublet 48/45 des gamètes de P. falciparum.
- La Pf. 25 dans les zygotes de P. falciparum.
- Certaines protéines de P. vivax.

Le gène codant pour la Pf. 25 a été cloné, Meuwissen et coll. 1986 (in 71) montrent que les anticorps produits par les vertébrés immunisés réagissent contre les gamètes extracellulaires dans le moustique. La sporogonie dans l'anophèle serait interrompue. Ceci contribuera à rompre l'un des maillons de la chaîne épidémiologique du Paludisme.

Perrin LH 1981 (50) montre que l'immunité bloquant la transmission est en grande partie médiée par les anticorps. Harte et coll 1986 (in 71) démontrent sur le modèle animal (P. yoelli nigeriensis), le rôle des T lymphocytes dans l'induction d'immunité bloquant la transmission.

Carter et coll en 1989 (69) mettent en évidence sur le modèle humain la restriction de la réponse immune liée aux gènes du complexe majeur d'histocompatibilité. Il existe une variabilité individuelle de la réponse immunitaire aux antigènes des zones palustres holoendémiques.

Pour les essais vaccinaux, des résultats prometteurs sont obtenus sur le modèle des rongeurs. L'immunité conférée bloquerait la transmission.

L'antigène cible est une protéine de 48 Kilo Dalton des gamètes de P. falciparum, mais le gène codant n'a pas été cloné et aucun essai vaccinal sur homme et animaux n'a été effectué.

La revue de la littérature sur les vaccins anti plasmodium montre que les recherches pour l'élaboration des vaccins contre le Paludisme ont fait l'incontestables progrès.

Plusieurs mécanismes immunitaires ont été élucidés, en l'occurrence la médiation de T CD8+ lymphocytes dans l'immunité protectrice contre les sporozoïtes.

Actuellement le vaccin antiparasitaire est en cours de réévaluation. Quant au vaccin bloquant la transmission, seul le gène codant pour la protéine immunogène Pf. 25 de *P. falciparum* a été cloné. Aucun essai vaccinal expérimental sur humain avec antigène n'a été effectué.

Pour la mise au point d'un vaccin antipaludique, l'espoir est basé sur le vaccin antiforme erythrocytaire asexuée en cours d'élaboration. Ce vaccin a pour cible la protéine polymorphique de surface du mérozoïte (P 190).

L'élaboration d'un vaccin passe obligatoirement par la compréhension de la nature de la réponse immune protectrice naturelle en zone d'endémie.

Tous ces résultats incitent à l'intensification et à la continuation des recherches sur les " vaccins antiplasmodiaux."

Nous arrivons à un niveau de recherche où tous les résultats de laboratoire doivent être testés sur le terrain.

Une fructueuse collaboration entre biologistes moléculaires et chercheurs sur le terrain en zone d'endémie permettra d'atteindre les objectifs de recherche sur la compréhension de l'immunité antiplasmodiale.

4. LA PROTEINE MAJEURE DE LA SURFACE DU MEROZOITE (P 190)

4.1 Historique : les différents travaux

La P.190, protéine précurseur des antigènes majeurs de la surface du mérozoïte est une glycoprotéine de poids moléculaire variant de 185 à 200 Kilo Dalton en fonction des souches plasmodiales (O.M.S, 1986) (43).

La fonction de cette protéine n'est pas encore connue bien que Perkins M.E. et Rocco L.J. en 1988 (48) suggèrent son rôle comme RBP, participant au processus de l'invasion erythrocytaire par le mérozoïte.

Elle est synthétisée durant la schizogonie intra erythrocytaire puis, transportée à la surface du parasite intra cellulaire (O.M.S, 1986) (43). Plus tard à la fin de cette schizogonie, au moment de l'éclatement de l'hématie, la protéine semble se morceler en plusieurs fragments spécifiques de poids moléculaires variables. Il s'agit des protéines de : 83 KD ; 42 KD ; 28 KD ; 30 KD ; 19 KD ; (43).

Holder et coll. 1984 (28) montrent que les fragments de 83 KD, 42 KD, et 19 KD sont les principales protéines immunogènes de la surface du mérozoïte. Ceci suppose que beaucoup de protéines se perdent pendant le rejet des mérozoïtes dans le sang. Ces mêmes travaux indiquent que le fragment de 83 KD est localisé à la surface externe de la P.190 du mérozoïte et que les fragments de 42 et 19 KD à la surface interne de celle-ci.

Le fragment de 83 KD représente l'extrémité N terminal de la protéine tandis que les fragments 42 et 19 KD sont ceux de la partie C terminal.

La protéine P190 porte diverses dénominations :

- La glycoprotéine 185 (GP 185)
- Le PSA : antigène polymorphique de surface.
- Le MSA : antigène de surface du mérozoïte.
- La MSPP : protéine polymorphique de la surface du mérozoïte.

Les différents noms ont été choisis à la lumière des travaux effectués par Mc Bride et coll. 1985 (37). Les réactions immunologiques ont été effectuées en utilisant 13 anticorps monoclonaux spécifiques de l'antigène de schizonte de P. falciparum, avec 4 populations clonées de la souche plasmodiale T 9 originaire de Thaïlande. Ces réactions ont montré l'hétérogénéité structurale et pondérale de l'antigène de schizonte de Plasmodium falciparum. Les deux tests séro-immunologiques (immunofluorescence indirecte et immunoprécipitation) concluent au polymorphisme de cette protéine : présence de régions variables, et de régions conservées.

Mackay et coll. 1985 (35) définissent la base génétique du polymorphisme de la protéine de P. falciparum. Le "mapping" du gène codant pour la P.190 de la souche plasmodiale Thaïlandaise, comparé à ceux de plusieurs autres souches montre qu'il existe des séquences de gène qui codent pour des régions variables, conservées, et sémi-conservées (peu susceptibles aux variations (voir figure n°3).

Tanabé John G. Scaife et coll en 1987 (62) ont effectué une étude comparative de la séquence nucléotidique du gène codant pour la P190 de la souche MAD 20 (Nouvelle Guinée Papouasi) avec celle d'autres P190 de souches plasmodiales diverses :

- Souche Wellcome (Afrique de l'Ouest) : Halder et coll 1985
- Souche Camp (Malaisie) : Weber et coll 1986
- Souche Uganda Palo Alto (FUP) (Amérique du Sud) : Chang S et coll 1987. In OMS 1988.
- Souche K1 (Thaïlande) : Thaïthong et Beale 1981.

Cette étude au niveau nucléotide du gène montre que les régions variables de la P190 ne contiennent pas obligatoirement le tripeptide répétitif (Serine - X - X). Il existe des zones variables sans motif répétitif apparent. La même étude montre que les zones variables des diverses souches ne sont pas largement polymorphiques, mais présentent plutôt une variabilité limitée entre les différentes souches plasmodiales. Ceci a permis de regrouper toutes les souches plasmodiales en deux types MAD 20 et K1. Chaque type étant représentatif d'un groupe donné.

Chang S.P. et coll. in O.M.S. 1988 (45) regroupe les souches FUP, Camp et MAD 20 dans le type MAD 20 et les souches K1 et Wellcome dans le type K1. Früh et coll. révèlent en 1990 par l'analyse des séquences du gène codant pour la P 190 de nombreuses souches 3 degré de variabilité :

- Des séquences du gène codant pour des régions fortement conservées ;
- De séquences du gène codant pour des régions dimorphiques ;
- Des séquences du gène codant pour des régions d'acide aminé spécifiques de l'isolat (24).

4.2 Mode de production de la protéine 190

La synthèse de la P.190 est produite actuellement par deux moyens :

- 1) Par synthèse chimique
- 2) Par génie génétique dans Escherichia coli par la technique d'ADN recombinée de Müller et coll 1989 (42).

4.2.1 Principe de la synthèse de la P190 par génie génétique.

Par des enzymes de restriction l'ADN chromosomique (gène) codant pour la protéine 190 est isolé. Puis, le gène est introduit dans une bactérie : Escherichia coli, au niveau de l'élément génétique constitué d'ADN autonome : le Plasmide dont la répllication permet l'obtention d'une quantité importante de protéine. Ce transfert nécessite un vecteur.

4.2.2 Mode opératoire pour la production de la P190 par génie génétique.

L'ADN génomique qui code pour la P190 des souches K1 et MAD 20 de Plasmodium falciparum a été coupé par des enzymes de restriction en des séquences de gène codant pour 150 à 300 acides aminés.

Les fragments d'ADN du gène sont fusionnés à leur extrémité 5' avec le BAMH1 et à leur extrémité 3' avec le HIND II.

Le BAMH1 et le HIND II sont deux enzymes ayant leur site au sein du PUHE 32-1 un plasmide dans lequel ils sont insérés. Sous l'action d'un catalyseur, les protéines insérées fusionnées au Chloramphénicol acetyl transférase (C.A.T) pour la souche K1 et au dihydrofolate reductase déshydrogénase de souris (D.H.F.R) pour la souche MAD 20 se produisent.

Les protéines fusionnées de la P.190 ont été exprimées dans E.coli sous l'induction d'une milli mole isopropyl Beta D. Thiogalactopyranoside à la longueur d'onde de 600 nm durant 3 heures.

4.3 Intérêt immunologique de la P 190

Cohen et coll. 1979 in Tenabé et coll. 1987 (62) expliquent que les mérozoïtes durant leur bref séjour dans le sang sont vulnérables à l'attaque du système immunitaire de l'hôte.

Perrin et coll. et Hall et coll 1984 (in O.M.S, 1986) (43) démontrent par des tests d'immunisation sur les singes qu'il existe une immunité protectrice médiée par les anticorps avec la GP 195 native, purifiée et couplée avec l'adjuvant complet de Freund (C.F.A). La protection est complète si l'immunisation et l'infestation s'effectuent avec la souche homologe. Le degré d'immunogénéicité de la P 195 équivaut à celui des mérozoïtes et schizontes entiers.

Perrin H.L. et Hall 1984 (in O.M.S, 1986) (43) montrent que les anticorps des singes immunisés avec le peptide de 83 KD de l'extrémité N terminal réagissent spécifiquement avec la P 190.

Siddiqui et coll 1987 (61) montrent que la P195 induit une immunité protectrice aux singes Aotus trivirgatus griseimembra immunisés avec la souche homologe.

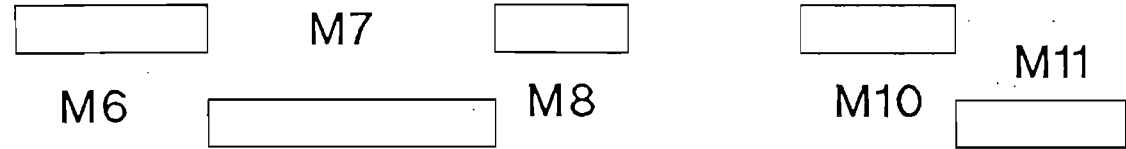
Ces travaux constituent les données de base de l'immunogénéicité de la P190, supportée par la partie N terminal : P.83 KD (28) et l'importance de la spécificité de souche pour l'induction d'immunité protectrice (60).




L'intérêt de la P 190 dans l'immunologie du Paludisme est très considérable. Un peptide synthétique de l'extrémité N terminal de la P190 est un des composants du vaccin multivalent synthétique élaboré par M. Patarroyo 87 en Colombie (47). Ce premier vaccin antiforme erythrocytaire asexuée testé sur homme est prometteur. Il induirait une réponse humorale importante mais, l'immunité protectrice induite est fortement controversée.

Actuellement une technique Elisa a été mise au point par Klaus Früh et coll. 1989 (22). Elle utilise la protéine recombinante P.190 pour le sérodiagnostic du Paludisme aigu de la primo infection à Plasmodium falciparum.

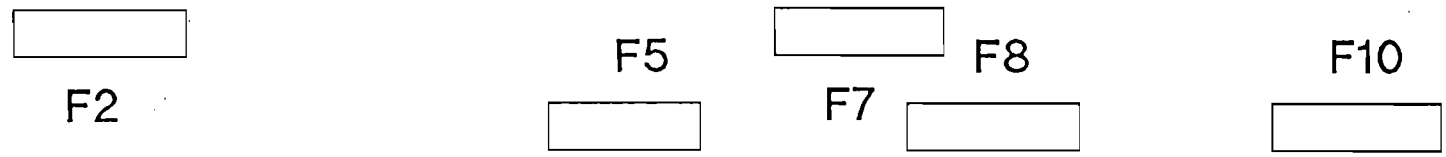
Indresh K.S. et coll. 1989 (31) envisagent la mise au point d'une technique Elisa. L'antigène se compose en partie de la P190 (partie conservée). Cette technique devrait servir pour les enquêtes épidémiologiques et le titre d'anticorps servant d'indicateur malarométrique.

MAD20



 >70% conserved
 >59% conserved
 variable

K1



5. METHODOLOGIE

5.1 Lieu d'Etude

Notre travail a été effectué à Safo, une zone rurale située à 25 km au Nord-Est de la Capitale (BAMAKO). Le village de Safo constitue un secteur de développement de l'Arrondissement de Kalabancoro, cercle de Kati et constitue le chef-lieu de secteur de base de 18 villages (voir carte).

- Historique :

Le village de Safo est issu de l'extension du Royaume Bambara de Ségou. Originaires de Safé : Arrondissement de Ouéléssébougou qu'ils ont dû quitter pour des raisons de survie, que fut créé Safo il y a aujourd'hui environ 2 siècles. Le premier site communautaire fut Dontan, situé à 2 km du site actuel. Les Coulibaly sont les premiers fondateurs suivis par les Traoré ou nonkas.

- Biogéographie :

Le village de Safo est situé sur les prolongements du plateau manding. Il est limité par le village de Somabougou à l'Est, au Nord-Est par Tasse, au Nord par Torodo ; à l'Ouest par le village Zokoro et au Sud par Falaya.

- Le sol :

Est de constitution meuble et renfermant des gravillons ferrugineux. Ceci contribue beaucoup à la formation de véritables gîtes larvaires de Culicidae durant la saison pluvieuse (59).

- La végétation :

Est de type savane arborée avec un tapis herbacé. Mais, l'exploitation abusive des coupes de bois, l'élevage intensif des caprins, mulets, volailles et ovins dégradent cette végétation qui est en voie de désertification.

- La faune :

Jadis riche se limite aujourd'hui à quelques perdrix, pintades sauvages et lièvres.

- Le climat :

Est de type soudanien. Il est caractérisé par une alternance de deux saisons.

- La saison sèche : Fraîche de Novembre à Janvier avec une température minimum au mois de Janvier (Voir Tableau n°1).
Sèche : de Février à Mai avec une température maximum observée au mois de Mai (Voir Tableau n°1).

- Réseau hydrographique :

Le village de Safo est arrosé par trois cours d'eau non permanents qui sont grossis pendant la saison pluvieuse par les eaux de ruissellement des collines.

- . Le trôno : qui prend sa source sur le Dienfa Koulou s'étire sur 3 km entre Safo et Falaya.

- . Le Niamadoko : long de 4 km, il se dirige vers Moribabougou.

- . N'Golonogoni : Cours d'eau temporaire coulant d'Ouest-Est et est situé au Nord du village.

- Antécédents d'étude :

Depuis 1985, le village de Safo est en étroite collaboration avec le D.E.A.P. Il a été le lieu d'étude de beaucoup de travaux.

- . Test de la phase III.b. de l'efficacité du chlorhydrate d'halofantrine en 2 prises journalières (18).

- . Le contrôle de l'efficacité schizonticide du chlorhydrate d'halofantrine par rapport à un groupe témoin recevant de la chloroquine (17).

- . Le contrôle de l'efficacité gamétocytocide et la tolérance du chlorhydrate d'halofantrine (14).

- Infrastructures :

Le village de Safo dispose comme :

a) Infrastructure scolaire : Une école fondamentale de 6 classes créée depuis 1960. Trois enseignants par un système d'enseignement à double vacation dirigent ces classes de 178 élèves. L'âge de scolarisation se situe entre 7 à 8 ans. Le taux de scolarisation est de 20%. L'école de Safo constitue l'école du secteur de base des 18 villages.

A noter que parallèlement sont dirigés par un autochtone du village des cours d'alphabétisation en langue Bambara. 14% de la population masculine âgée de 14 - 20 ans est alphabétisée.

b) Infrastructures sanitaires : Le village de Safo est doté :

. D'un Centre de Santé (Dispensaire) crée le 1er Janvier 1967. Il constitue le chef poste médical des 18 villages environnants. Le Centre est dirigé par un Infirmier du premier cycle assisté d'un Aide-soignant.

. D'une Maternité créée en 1977 constitue le chef poste médical des 18 villages. Depuis sa création, elle est dirigée par une matrone.

- Situation sanitaire :

Après vérification du cahier de consultation du responsable du Centre de Santé . Il s'avère que les pathologies les plus rencontrées sont :

- . Le Paludisme
- . La Schistosomiase urinaire
- . La Dracunculose
- . L'Onchocercose
- . Les Epilepsies (7 cas déclarés)
- . La Lèpre (58 cas déclarés).

- Stock et Mode d'usage courant des médicaments antipaludiques :

Actuellement à Safo, il y a trois points de vente de produits antipaludiques. Il s'agit :

1. Du dépôt ou pharmacie villageoise créée en 1984 à l'initiative du D.E.A.P. Il est géré par un autochtone du village. Son ravitaillement s'effectue à la pharmacie de Banconi situé à 15 km du village suivant un bon de commande établi par le responsable du Dispensaire. Son bon de commande en produits antipaludiques est dressé suivant un schéma identique durant toute l'année.
 - . 10 ampoules de quinimax injectable 0,40 vendu à 150 F.CFA l'ampoule.
 - . 10 ampoules de quinimax injectable 0,20 vendu à 120 F.CFA l'ampoule.
 - . 100 comprimés de chloroquine qu'il vend à 10 F.CFA le comprimé et 25 F.CFA les deux comprimés.

2. Un étalagiste sédentaire : installé sur la place du marché. Son ravitaillage est effectué à Banconi et son bon de commande est le même durant toute l'année.

1.750 F.C.F.A soit 200 comprimés de chloroquine vendu à 2 comprimés pour 25 F.C.F.A.

3. Un étalagiste ambulancier présent sur la place du marché tous les Vendredi, jour officiel du marché à Sato. Son bon de commande varie en fonction des périodes de transmission du Paludisme. Avant la saison pluvieuse, il vend 50 comprimés de chloroquine tous les Vendredi. Durant la saison de transmission, il vend 100 comprimés de chloroquine en un jour.

Par manque de preuves concrètes (Bon de commandes, reçus d'achat) au niveau du dépôt, il nous est impossible d'évaluer la fréquence des commandes servant de base à l'estimation de la consommation médicalemente d'antipaludiques à Sato. Mais suivant le témoignage du premier étalagiste sédentaire, il écoulerait son stock de 200 comprimés en quinze jours durant la période de transmission et en un mois durant la saison sèche.

A noter que sauf pour les comprimés délivrés sur ordonnance au dépôt ou chez le premier étalagiste, la consommation individuelle ne dépasse pas 2 comprimés de chloroquine en prise unique par jour, quelque soit la pathologie évoquée.

- Données socio-démographiques :

Le village de Sato compte actuellement 1.222 Habitants répartis entre quatre localités : Sidoni, Koko, Bougoudacourani, Bougoukoro et un petit secteur libre des enseignants.

Peuple en majorité par les Bambaras autochtones 90%, le village de Sato compte aussi des Malinkés 6% et une minorité de Peulhs et de Sarakolés.

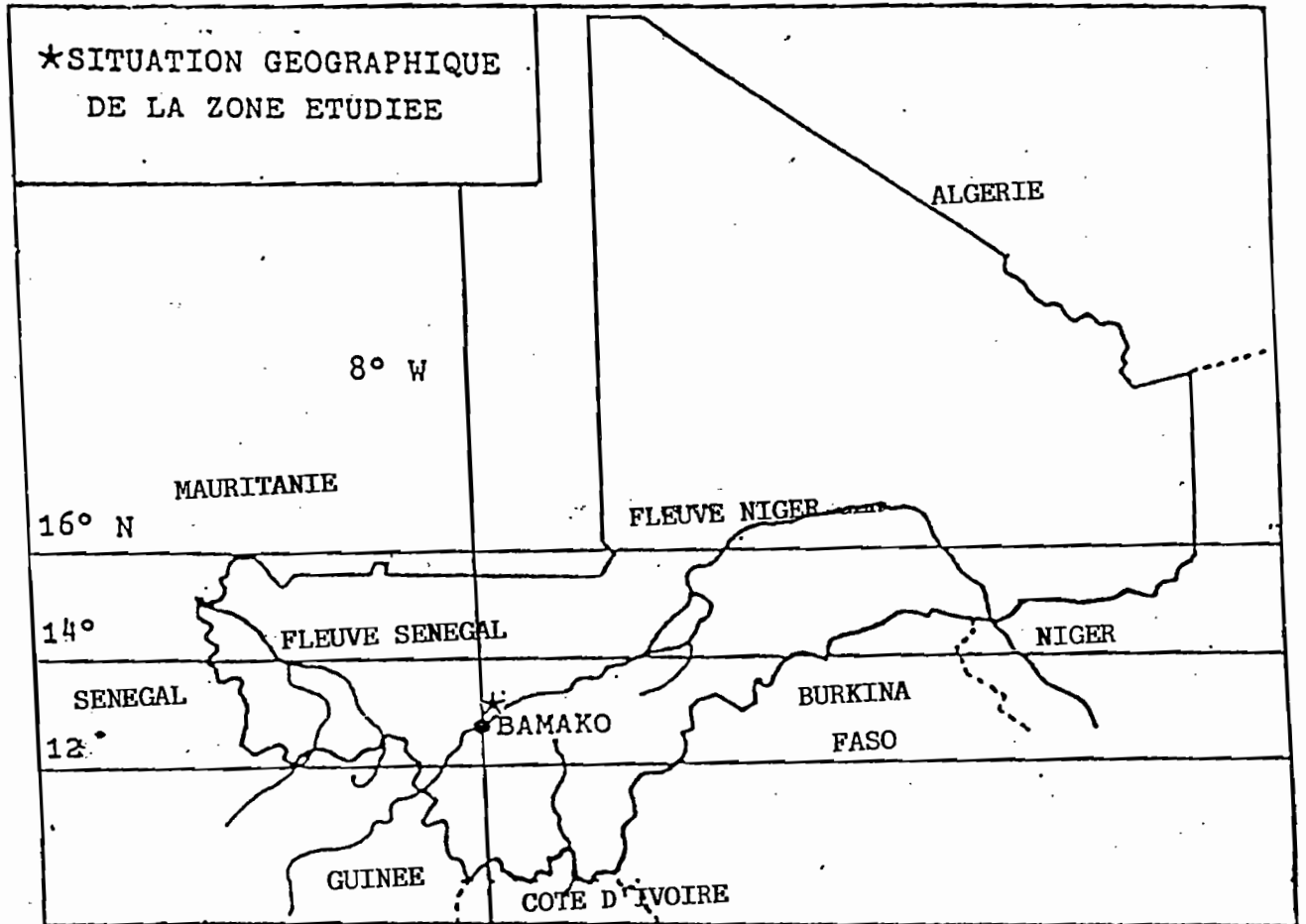
La langue Bambara est la langue courante.

La population de Sato est en majorité animiste, mais il existe des familles chrétiennes et une minorité de familles musulmanes.

La population est rurale à 100%, l'économie repose sur l'agriculture et la vente du charbon. Comme cultures, ils pratiquent :

- cultures vivrières : riz, mil, fonio, arachides.
- cultures maraichères : aubergine, tomate, gombo, concombre, destinées à la vente sur Bamako.
- cultures fruitières : Papayes, goyaves, mangues.

FIGURE N° 1



5.2 Période d'étude :

Notre étude s'est déroulée du mois de Juillet 1988 au mois de Mai 1989 dans le village de Safo suivant le calendrier :

- 24 - 30 Juillet 1988
- 24 - 30 Novembre 1988
- 23 - 26 Mai 1989.

5.3 Echantillonnage :

Après sensibilisation de la population, le responsable du poste médical de Safo et nous avons débattu avec les chefs de famille des problèmes liés au Paludisme au cours d'une réunion. Nous avons exposé les modalités pratiques du protocole, ses avantages (traitement du paludisme, suivi médical, prise en charge même en cas d'hospitalisation à Bamako) et les inconvénients (piqûre digitale et prélèvement au pli du coude).

27 familles de 298 individus ont adhéré volontairement au protocole d'étude.

En fonction des besoins de nos collaborateurs d'Heidelberg et notre objectif principal : évaluation des anticorps anti P190, nous avons choisi 97 unités statistiques suivant une technique d'échantillonnage raisonnée.

Seuls ont été exclus les enfants âgés de moins de 2 ans et les femmes enceintes.

5.4 Variables mesurées :

Sur chaque unité statistique ont été mesurées :

- Variables socio-démographiques :

1. L'Âge : Le calendrier traditionnel et historique ont servi de repère pour la détermination précise de l'âge de chaque unité statistique (Voir annexe).
2. Le Sexe :
3. Le Numéro d'Identification : Il s'exprime en quatre chiffres, les deux premiers chiffres représentant le numéro de la famille et les deux derniers celui de l'unité statistique.

- Variable clinique :

Appréciation et stade de la rate suivant la classification de Hackett (in Thèse KOITA O.) (33).

- Variable biologique :

- . La parasitémie
- . Le stade parasitaire
- . L'espèce plasmodiale.

- Variables séro-immunologiques :

Les anticorps anti P190 par deux techniques complémentaires l'Elisa (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) et le Western Blot.

5.5 Techniques de Recherche :

5.5.1 Types d'enquête :

Les enquêtes parasitologiques, immunologiques et cliniques ont été menées longitudinalement en 3 passages transversaux en fonction des fluctuations saisonnières de transmission.

Le premier passage a eu lieu en Juillet 1988 (durant la saison des pluies). Le deuxième passage au mois de Novembre 1988 (début saison sèche). Le troisième passage a eu lieu en Mai 1989 (début saison des pluies).

L'enquête entomologique s'est déroulée en un seul passage au mois d'Octobre 1988 (période d'intense transmission).

5.5.2 Support des données :

A chaque passage, les variables mesurées sur chaque unité statistique étaient enregistrées dans un cahier.

5.5.3 Description des techniques effectuées :

Nous avons personnellement réalisé au Laboratoire d'Epidémiologie des Affections Parasitaires (D.E.A.P.) :

- La coloration des lames de gouttes épaisses confectionnées sur le terrain.
- Les dosages des anticorps anti P190 à l'Elisa.

- La détermination de l'antigène sporozoïte dans la portion tête-thorax des moustiques à l'Elisa.
- La culture plasmodiale de P. falciparum sous cloche
- La caractérisation du sérotype de la souche locale à l'immunofluorescence directe (I.F.D.).
- L'évaluation qualitative des anticorps anti P190 au Western Blot.

Les captures de moustiques par spray cath (spray insecticide) et sur appât humain ont été effectuées sur le terrain, de même que l'évaluation de l'indice splénique.

5.5.3.1 La Goutte épaisse :

Pour l'enquête parasitologique, nous avons confectionné sur chaque unité statistique du protocole une goutte épaisse.

- Confection de la goutte épaisse :

Matériel :

Alcool à 90°
 Coton
 Lames dégraissées à l'acide chlorhydrique dilué au 1/10. avec l'alcool Ethylique.
 Vaccinostyles stériles
 Boîtes O.M.S.
 Bacs de coloration pour 100 lames
 Eprouvettes graduées en polyéthylène de 100 cc, 500 cc et 1 litre.
 Colorant Giemsa marque (Diagnostica Merck)
 Une minuterie
 Ratelier
 Papier pH (Indicateurs de pH 5-10 Merck)
 Huile d'immersion
 Comprimés tampons (Buffer Tabletten pH 7,2 merck) : 1 comprimé pour 1 litre d'eau distillée.
 Pipettes
 Crayon à mine diamant.

Prélèvement :

Le troisième doigt de la main la moins kératinisée, préalablement aseptisée avec l'alcool est ponctionné à l'aide d'un vaccinnostyle stérile. Avec du coton sec, la première goutte de sang est écartée, une seconde plus volumineuse (20 microlitres) est déposée au beau milieu de la lame dégraissée portant le numéro d'identification de l'unité statistique. Avec le bord anguleux d'une seconde lame, la goutte de sang est uniformément étalée en une zone circulaire de 1 cm,5 de diamètre jusqu'à la défibrinisation mécanique totale.

Les lames sont ensuite placées à sécher à l'abri des mouches et de la poussière dans la boîte O.M.S.

Coloration :

Les lames de goutte épaisse ont été colorées au giemsa 3% pendant 45 minutes : technique de coloration adoptée par notre Laboratoire (D.E.A.P.).

Pour un litre de solution de Giemsa à 3% :

- 30 cc de Giemsa
- 970 cc d'eau tamponnée à pH 7,2.

Cette solution assurant une déshémoglobinasation totale de la goutte de sang avant la coloration des éléments parasitaires.

- 1) Déposer les lames dans le bac de coloration dos contre ventre pour éviter toute éventuelle contamination.
- 2) Verser soigneusement la solution de Giemsa 3% jusqu'à immersion complète des lames. Attendre 45 minutes.
- 3) Rincer soigneusement les lames à l'eau tamponnée et déposer les lames sur le Ratelier pour le séchage à la température du Laboratoire à l'abri des mouches et de la poussière.
- 4) Emballer les lames séchées par groupe de 50 dans du papier blanc et scotcher le paquet d'emballage avant lecture.

- Lecture :

Les lames colorées sont lues au microscope optique avec l'objectif 100 à immersion. La parasitémie est évaluée suivant la méthode leucocytaire quantitative sur goutte épaisse : La lecture microscopique s'effectue sur 300 leucocytes, puis le résultat est rapporté à 7.500 leucocytes considérées comme la leucocytose moyenne (O.M.S.)

5.5.3.2 Evaluation de l'indice splénique chez les enfants âgés de 2 - 9 ans

L'hypertrophie de la rate est appréciée par la palpation. Elle est classée en cinq stades selon Hackett (in 33). L'enfant est couché en position de décubitus dorsale.

- . Rate 0 : Rate normale non palpable même en inspiration profonde.
- . Rate 1 : Rate palpable seulement lors d'une inspiration profonde ou tout au moins plus accusée que normale.
- . Rate 2 : Rate palpable sur la ligne mammelonnaire gauche en inspiration normale, mais ne dépassant pas une ligne horizontale.
- . Rate 3 : Rate descendant au dessous de cette ligne, mais ne dépassant pas une ligne horizontale.
- . Rate 4 : Rate descendant au dessous de l'ombilic, mais ne dépassant pas une ligne passant à égale distance entre l'ombilic et la symphyse pubienne.
- . Rate 5 : Rate descendant au-delà de la limite précédente.

5.5.3.3 La Culture continue de P. falciparum in vitro :

La culture continue dont le but principal est l'obtention des schizontes pour la caractérisation du sérotype se base sur la description de Trager et Jensen 1976 (32).

- Prélèvement :

Sur le terrain, 10 cc de sang était prélevé sur chaque unité statistique. le sang est récupéré dans un tube vacutainer hépariné.

- Matériel et Réactifs :

- . Hôte à flux laminaire
- . Tube vacutainer hépariné
- . Aiguilles stériles
- . Tubes falcon 15 cc
- . Tubes falcon 50 cc
- . Pipettes stériles de 5 à 10 cc
- . Micropipettes et emboues

- . Petites boîtes de pétri stérile ou disques
- . Lames bien dégraissées
- . Lampe à flamme
- . Crayons diamants
- . Portoirs
- . Incubateur (37°)
- . Alcool à 70°
- . Colorant Giemsa
- . Solution PBS : Phosphate Buffer Saline à pH : 7,2
- . Milieux de culture : RPMI 1640 + 10% serum AB+
- . RPMI 1640 : - Solution de lavage
- . Acétone
- . Verres à pieds
- . Cloche à bougies
- . Papier hygiénique
- . Boîte de collection
- . Bougies, allumettes
- . Lames IFI (8 à 6 plots)
- . Poire.

- Mode Opératoire :

N.B. : 1) La culture du sang s'effectue le jour même du prélèvement

2) Une parasitémie de 0,1% soit 5 000 hématies parasitées sur frottis par des trophozoïtes est une condition nécessaire pour entamer la culture.

Au Laboratoire :

1. Prélever 2 cc de sang hépariné bien homogénéisé, et déposer avec 5 cc de RPMI dans un tube falcon.
2. Agiter et centrifuger à 1.500 tours pendant 10 mn.
3. Rejetter le surnageant

Remarque : Après centrifugation on obtient 1 cc de culot qui sera repris avec 9 cc de RPMI 10% serum AB+ pour obtenir 10% d'hématocrit.

4. Ajouter 9 cc de RPMI 10% serum AB+ au 1 cc de culot.
5. Bien mélanger et déposer 4 cc du mélange dans la boîte de pétri.
6. Ranger la boîte de pétri dans la cloche à bougie en anaérobiose (allumer la bougie qui se consume en 1 - 2 minutes due au CO₂).

7. Incuber à 37° durant 24 heures

8. Contrôler le stade parasitaire.

N.B. : Toutes les conditions de stérilité doivent être réunies pour la culture :

- . Travailler sous hotte à flux laminaire
- . Manipuler à proximité de la flamme à alcool
- . Porter une bavette pour éviter toutes contaminations extérieures.
- . Ne jamais toucher du bout des doigts les pipettes.
- . Se munir toujours d'une poire pour prélever avec les pipettes.

- Contrôle de la Culture :

Les boîtes de pétri sont enlevées sous la cloche, près de la flamme. A l'aide d'une pipette munie de la poire, tout le surnageant est rejeté. Puis le culot est repris et bien homogénéisé avec 5 cc de RPMI 10% serum AB+, et on verse 0,5 cc du liquide homogène dans une aliquot eppendorf marquée au préalable du numéro de l'individu. Après centrifugation à 1.500 tours/pendant 10 minutes de l'aliquot eppendorf 20 Microlitres du culot sont récupérés pour confectionner un frottis :

. Confection du frottis :

- Déposer à l'une des extrémités de la lame porte objet propre et dégraissée une goutte de sang prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur de la suspension de globules rouges bien homogénéisée
- Etaler la goutte par un mouvement régulier et rapide vers l'extrémité libre de la lame porte objet à l'aide d'une autre lame inclinée à 45° au contact de la goutte .
- Laisser sécher la lame à l'abri des mouches à la température du Laboratoire.
- Fixer les lames séchées avec du méthanol. Puis les lames sont colorées comme les lames de gouttes épaisses (Voir 5.5.3.1).

. Lecture des Lames de frottis et résultats :

La lecture s'effectue avec l'objectif 100 à l'immersion pour apprécier le stade parasitaire. Si, les trophozoïtes sont devenus des schizontes, la culture est stoppée. Dans le cas contraire la boîte de pétri est remise sous cloche pour un nouveau contrôle le lendemain 24 heures après.

5.5.3.4 Immunofluorescence directe I.F.D :

La technique I.F.D. permet de caractériser le sérotype de la souche plasmodiale locale à l'aide d'anticorps monoclonaux :

- 1) Les anticorps monoclonaux 7,5 - 9,8 - 12,8 spécifiques des zones conservées.
- 2) Les anticorps monoclonaux 6,1- 7,3 - 7,6 spécifiques des zones variées du type K1.
- 3) Les anticorps monoclonaux 9,2 - 9,7 - 10,3 spécifiques des zones variées du type MAD 20.

- Préparation des lames :

1. Centrifuger à 1.500 tours / 10 minutes le milieu de culture renfermant les schizontes dans les tubes falcon.
2. Rejeter le surnageant, puis ajouter 10 cc de P.B.S.
3. Centrifuger à 1.500 tours/10 minutes.
4. Rejeter le surnageant.
5. Reprendre 100 microlitres du culot érythrocytaire avec 100 cc P.B.S. pour obtenir une solution d'hématocrite à 1%.

N.B. : Ceci permet une meilleure visualisation des schizontes.

6. Bien ajouter le mélange et déposer :

- 25 Microlitres du mélange dans chaque plot pour les lames à 6 plots.

- 20 Microlitres du mélange à chaque plot pour les lames à 8 plots.

N.B. : Les numéros d'identification de l'unité statistique est écrit sur la lame à l'aide du crayon diamant.

7. Laisser sécher les lames à la température ambiante du laboratoire à l'abri des mouches et de la poussière.

8. Fixer ensuite les lames à l'acétone pendant 1 minute.

9. Envelopper les lames séchées dans du papier aluminium suivant le modèle décrit : 1 tour de papier d'aluminium sur la première lame, puis déposer la seconde lame et ainsi de suite.

10. Ecrire le numéro de l'unité statistique sur la lame emballée, ainsi que la date. Ensuite les lames sont mises à conserver au congélateur à la température de (- 20°) dans des bouteilles en verre transparent contenant du Silicagel.

- Etape d'immunofluorescence directe :

Les lames de culture séchées et fixées à l'acétone ont été testées en paire avec les 9 anticorps monoclonaux suivant la technique I.F.D. décrite par Mc. Bride et coll. 1985. (38).

Résultat : La lecture des lames se fait au microscope à fluorescence.

Les lames positives montrent une fluorescence verte au sein des noyaux de schizontes.

5.5.3.5 Elisa à la phosphatase alcaline :

Pour l'évaluation quantitative du taux d'anticorps anti P.190, nous avons dosé le taux d'anticorps anti P190 dans le sérum de chaque unité statistique prélevé lors des trois passages respectifs.

- Réactifs :

. Antigènes : HM6 et HM7 : fragments recombinés de la protéine 190 sérotype MAD 20.

. Les Anti-immunoglobulines humaines conjugués à la phosphatase alcaline.

. Le coating Buffer : 0,1 M NaHCO₃ -- 8,4g/litre d'eau distillée.

. Le blocking Buffer (1 litre) :

0,1 M NaHCO ₃	-- 8,4g/litre d'eau distillée.
1% Serum Albumine Bovine (B.S.A.)	-- 10g
0,1% de NaN ₂ .	-- 1g.

. Phosphate Buffer Saline (P.B.S. 1 litre) :

1,4 M NaCl	-- 8g.
KCL	-- 0,2g
1,5 millim KH ₂ PO ₄	-- 0,2g
80 millim Na ₂ HPO ₄ ; 2H ₂ O	-- 1,42g

Tampon Buffer (1 litre) :	$\frac{1}{10}$ Volume PBS 10 cc	-- 100 ml
	$\frac{9}{10}$ Volume ED	-- 997 ml
	0,3% Tween 20	-- 3 ml.
Diluant Anticorps (1litre) :	$\frac{1}{10}$ Volume 10 xPBS	-- 100 ml PBS
	$\frac{9}{10}$ Volume ED	-- 890 ml
	1% B.S.A.	-- 10g
	1% Tween 20	-- 10 ml
	0,1% NaN ₂	-- 1g
	MgCL ₂	-- 1MMgCL ₂ : 20,3g
Tampon Diethanolamine (500 ml) :		
	Eau distillée	-- 400 ml
	Diéthanolamine à 10%	-- 48 ml
	0,25 millim MgCL ₂ à pH 9,8.	-- 25 mg ou 110 microlitre de MgCL ₂ M.

N.B. Pour ajuster le pH de la solution de 0,25 Millim MgCL₂, on additionne 30 à 45 ml d'une solution HCL à 25%.

- Matériel de manipulation technique :

- . Tubes secs vaccutainer (Becton Dickinson)
- . Aiguilles stériles
- . Coton
- . Alcool à 90°
- . Garrot
- . Centrifugeuse
- . Aliquots eppendorf
- . Pipettes : - micropipette unique Eppendorf
- multichannel-Titertek
- . Matériel de lavage : Pompe, NUNC Immuno Washing
- . Balance : pour les pesées (Sartorius)
- . Papier buvard

- . Agitateur électrique.
- . Chambres humides
- . Chronomètre
- . Plaques de microtitration en polystylène avec 96 puits de marque NUNC.
- . Lecteur de plaque Titertek Multiskan R plus.

- Le Prélèvement :

Nous avons effectué sur chaque unité statistique une ponction veineuse au pli de coude. Le sang veineux est recueilli dans le tube sec vacutainer portant le numéro d'identification de l'individu et celui du passage. Au Laboratoire, le serum récupéré après centrifugation à 1.500 tours/10 minutes était réparti comme suite :

- . 200 Microlitres dans l'aliqot eppendorf pour le test du Western Blot.
- . 200 Microlitres dans l'aliqot eppendorf pour l'Elisa.
- . 500 Microlitres dans l'aliqot eppendorf à congeler.
- . Le reste du serum est conservé dans des tubes en plastique au congélateur.

N.B. : Tous les tubes contiennent au préalable 20 Microlitres de sodium azide (NaN₂). Un bactéricide permettant d'éviter toute contamination de serum.

- Mode Opérateur :

- 1) Diluer l'antigène (HM6, HM7) respectivement au $\frac{1}{25}$ et $\frac{1}{100}$ avec le coating Buffer.
- 2) Sensibiliser les plaques en déposant 50 Microlitres de l'antigène dilué dans chaque puits. Laisser incuber pendant une nuit à la température du Laboratoire.
- 3) Ajouter au contenu de chaque puits 150 Microlitres de la solution de Blocking Buffer. Laisser incuber pendant une nuit à la température du laboratoire.
- 4) Laver 5 fois avec la solution de Washing Buffer.
- 5) Déposer dans chaque puits 50 Microlitres de serum dilué au $\frac{1}{250}$ avec le diluant anticorps, en réservant les premières colonnes pour le blanc (50 Microlitres de diluant tampon). Laisser incuber durant 2 heures.
- 6) Laver 5 fois en deux temps les plaques avec la solution de Washing Buffer.
- 7) Mettre dans chaque puits 50 Microlitres du second anticorps dilué au $\frac{1}{7.500}$ avec le diluant pour anticorps. Laisser incuber pendant 1 heure.

- 8) Laver soigneusement avec la solution de lavage 5 fois en deux temps.
- 9) Mettre dans chaque puits 50 Microlitres de substrat révélateur : ortho nitro phenyl phosphate dilué dans la solution de diethanolamine à la concentration C : 1 mg/ml.
- 10) Lire 15 minutes après dans un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 405 nm.

Le contrôle positif : serum d'individu malade de Paludisme.

Le contrôle négatif : serum d'individu qui a fait d'autres infections autre que le Paludisme.

- Résultats :

La réaction positive se caractérise par une coloration rouge orangée. Le serum de chaque unité statistique était testé en paire. Toute moyenne de DO supérieur à 0,1 était considérée comme test positif.

5.5.3.6 Le Western Blot :

Test séro-immunologique permettant l'évaluation qualitative de la réponse humorale aux différentes protéines recombinantes des deux souches MAD 20 et K1.

- Réactifs :

Le diluant anticorps et blocking Buffer : T.B.S.T. 1% B.S.A.

Le Washing Buffer : T.B.S.T. -- 150 millim NaCl
 -- 10 millim Tris-HCL pH 8.
 -- 0,05% Tween 20
 -- 0,1% NaN₂.

Solution de stoppage : -- 20 millim Tris-HCL pH 8.
 -- 5 millim E.D.T.A.

Solution du substrat révélateur :

· Eau distillée -- 90 cc
 · Phosphatase alcaline -- 10 cc
 · Nitrobromotetrazoline -- 660 ml (diluée dans le DMSO)
 · BromochloroIndolphosphate -- 330 ml (diluée dans DMSO).

- Matériel :

- . Les plateaux rectangulaires avec couvercles en plastique dur.
- . Agitateur électrique
- . Pincettes porte filtre
- . Gants pour les mains.

- Prélèvement du serum : (Voir technique Elisa 5.5.3.5).

- Mode Opérateur :

1. Déposer dans chaque boîte une bande de nitrocellulose sur laquelle sont transférés les différents fragments de protéines fusionnées.

N.B. : Prendre soin de marquer le numéro du serum et une croix sur les bandes pour repérer le sens de migration des protéines.

2. Humidifier avec le T.B.S.T. (tampon de lavage) pendant une dizaine de minutes les bandes de nitrocellulose.
3. Verser la solution de lavage ;
4. Bloquer avec 20 cc de T.B.S.T. 1% B.S.A tous les sites de liaison des protéines aspécifiques sur la bande de nitrocellulose pendant 2 heures.
5. Récupérez 10 cc de la solution de tampon bloquant et ajouter 10cc de serum dilué au préalable au 1/50 avec T.B.S.T. 1% B.S.A. ce qui donne une solution finale au 1/100 du serum ;
Laisser incuber pendant 2 heures sous agitation.
6. Récupérez ensuite la solution du serum et laver :
 - 2 fois avec le T.B.S.T. sans agitation .
 - 5 fois sous agitation toutes les 10 minutes soit 50 minutes le temps de lavage.
7. Mettre 20 cc de la solution du second anticorps (anticorps de Chèvre antihumain) diluée au 1/7.500 avec le T.B.S.T. 1% B.S.A. dans chaque boîte.

Laisser incuber sous agitation pendant 1 heure.

8. Récupérer la solution et laver :
 - 2 fois sans agiter
 - 3 fois sous agitation toutes les 10 minutes

9. Ajouter 5 cc de la solution du substrat révélateur. Agiter et rincer les bandes à l'eau distillée.
10. Stopper la réaction avec l'E.D.T.A.. Puis rincer les bandes à l'eau distillée.
11. Sècher les bandes puis interpréter.

N.B. : Pour éviter les réactions croisées avec les fragments d'Escherichia coli. Il est nécessaire de procéder au préalable à une réduction du back ground.

- 1) Agiter pendant une nuit les filtres de E.coli immergés dans le serum dilué au $\frac{1}{50}$ avec le T.B.S.T. 1% B.S.A.
- 2) Renouveler la même étape la nuit suivante mais en changeant de filtre. Ainsi le serum est prêt pour le test (Western Blot).

Remarque : Le manipulateur doit porter des gants.

5.5.3.7 L'Elisa à la peroxydase pour la recherche d'antigène sporozoite dans la moustique.

- Matériel et Réactifs :

. Plaques dures à fond conique de microtitration en polystyrène de marque Greimer : pour l'écrasement de la portion tête-thorax du moustique.

. Plaque flexible à fond conique marque Titerteck pour l'essai.

. Blocking Buffer : P.B.S. + 0,2% de caseine de lait.
+ 0,02% de NaN₂

. Tampon de Broyage : P.B.S. + (0,0025% de leupeptine
(0,0025% d'antipain
(170 UI d'aprotinin
(0,05% de Nonidet 40
(0,02% de NaN₂.

. Washing Buffer : P.B.S. + 0,05% de Tween 20

. Anticorps monoclonal 2A10.

. Anticorps monoclonal 2A10. conjugué à la peroxydase.

- . Serum humain
- . Solution de substrat : A.B.T.S. (solution A - solution B.)
- . Parafilm
- . Lecteur de plaque Elisa : Titerteck Multiskan R+.

- Mode Opérateur :

1. Bloquer les plaques dures avec la solution de blocking Buffer. Déposer les portions tête-thorax individuelles dans chaque puits en laissant la première colonne vide.
 2. Ajouter à chaque puits 30 microlitres du tampon de broyage.
 3. Congéler et décongeler une fois les plaques.
 4. Laver une nouvelle plaque flexible avec du P.B.S. Puis mettre dans chaque puits 30 microlitres d'anticorps monoclonal non conjugué à la concentration de 10 microgrammes/ml dans le P.B.S. + 0,02% de NaN₂. Incuber pendant une nuit à la température du laboratoire.
 5. Ecraser les portions tête-thorax après décongélation, puis ajouter 120 microlitres par puits de la solution de Blocking Buffer.
 6. Aspirer les plaques sensibilisées la solution d'anticorps monoclonal. Laver les plaques 4 fois avec le Washing Buffer. Puis bloquer les plaques avec le Blocking Buffer.
 7. Mettre 40 Microlitres de l'extrait de moustique dans les plaques sensibilisées à l'anticorps monoclonal. Les tests sont effectués en paire. Laisser incuber pendant 90 minutes à la température du laboratoire.
 8. Aspirer des plaques l'extrait des moustiques et laver 4 fois avec le Washing Buffer.
 9. Mettre dans chaque puits 40 Microlitres de second anticorps monoclonal 2A10 marqué à la peroxydase à la concentration de 1 microgramme/ml dans la solution du Washing Buffer + 10% du serum humain.
- Laisser incuber pendant 1 heure à la température du laboratoire.

10. Laver 6 fois avec le Washing Buffer.
11. Mettre dans chaque puits 100 Microlitres de la solution du substrat A.B.T.S. : mélange équimolaire de la solution A et solution B. ou la solution de O.P.D. : orthophénylène diamine dans le méthanol.

Incuber les plaques à l'obscurité.

30 minutes après stopper la réaction avec H₂SO₄ 3N si le substrat révélateur est l'O.P.D. Faire la lecture à la longueur d'onde de 492 nm. si le substrat est l'A.B.T.S. la réaction n'est pas stoppée et la lecture s'effectue à 405 nm.

12. La première colonne ayant servi de contrôle : les 6 premiers puits pour le contrôle négatif, et les deux derniers pour le contrôle positif.

- Interprétation des Résultats :

La première colonne contient le contrôle négatif (6 puits) et le contrôle positif (2 puits). Ces derniers sont colorés en vert.

Le seuil de positivité est déterminé par la formule :

$$S.P. = \text{Moyenne des négatifs} \times 2.$$

Toutes les D.O. inférieures au seuil de positivité sont considérées comme négatives.

5.5.3.8 Techniques entomologiques de capture :

Deux techniques de capture ont été utilisées :

- 1) Les capturés nocturnes sur appats humains. Elles s'effectuent sur l'Homme à l'intérieur et à l'extérieur des habitations à l'aide d'un aspirateur à bouche du type Coluzzi-Petrarca.
- 2) Les captures diurnes ou spray-catch. Elles s'effectuent dans les habitations, après aspersion d'insecticide.

- Capture sur appats humains :

Les séances de capture se déroulaient de 18 heures du soir à 6 heures du matin avec un captureur à l'intérieur et un à l'extérieur de la case.

Le captureur s'assoit sur un tabouret, jambes nues, muni d'un lot de gobelet, d'un aspirateur et d'une torche.

Le moustique piqueur, repéré sous l'éclairage indirect de la torche est capturé à l'aide de l'aspirateur. Les gobelets dans lesquels sont conservés les moustiques sont ramassés toutes les deux heures.

Les moustiques récoltés sont gorgés après sur des poulets et conservés jusqu'au lendemain à 16 heures dans un endroit humide et obscur. Ils sont ensuite conditionnés pour les travaux ultérieurs du laboratoire.

Ces captures ont pour but d'évaluer :

- Les espèces anophéliennes anthropophiles ;
- Le rythme d'agressivité selon la période de la nuit et le lieu ;
- Le nombre de piqûres reçues par homme et par nuit ;
- Les proportions des taxa du complexe Anophèles gambiae
- L'indice sporozoite.
- Captures diurnes ou Spray Catch : ou capture après aspersion d'insecticide :

Elles ont été effectuées à l'aide de bombe insecticide Timor : qui est un pyrethrenoïde de synthèse. Sa composition est la suivante :

. Deltamethrine	--	0,102%
. Esbiothrine	--	2,688%
. Piperonyl butoxide	--	9,88%
. Butane	--	62%o.

- Les séances se déroulaient de 15 heures à 16 heures 30. Elles consistent à bien ranger l'intérieur des cases. Puis un drap blanc recouvrant toute la surface du sol est étalé. Les trous d'aération et toutes autres issues sont bouchés. La chambre est ensuite pulvérisée avec le Timor.

Après 10 minutes, les moustiques inanimés sont ramassés en prenant soin de les classer par espèce et par stade de réplétion.

Après récolte, les espèces d'A. gambiae s.l. sémi-gravides sont découpées en 2 parties.

La partie abdomen servira pour les études cytotoxonomiques.

La portion tête-thorax pour déterminer l'indice d'antigène sporozoite au test Elisa.

Ces captures ont pour but d'évaluer :

- . Le nombre de moustique par case
- . La composition de la faune anophélienne en fonction de l'état physiologique.
- . Le nombre de moustique par dormeur et par case.
- . La composition des Taxa du complexe d'A. gambiae s.l.
- . L'indice d'antigène sporozoïte.

5.6 Personnel d'Enquête

- Pour l'enquête parasitologique immunologique et clinique, l'équipe de terrain était composée de :

- . 1 Biologiste moléculaire
- . 1 Médecin paludologue
- . 1 Pharmacien assistant en parasitologie
- . Thésards
- . 1 chauffeur.

L'infirmier et l'aide-soignant du Centre médical du village de Safo se joignaient à l'équipe.

La répartition des tâches sur le terrain était structurée en quatre postes :

- . Poste I : s'occupait de l'enregistrement. Chaque unité statistique recevait un ticket portant son numéro d'identification, son nom et le numéro du passage.
- . Poste II : s'occupait des prélèvements sanguins et de la confection des gouttes épaisses.
- . Poste III : s'occupait de la palpation des rates.
- . Poste IV : s'occupait de l'administration des soins.

- L'équipe entomologique se composait de :

- . 4 entomologistes
- . 4 Thésards en Biologie
- . 8 Captureurs autochtones recrutés dans le village
- . 1 chauffeur.

5.7 L'Analyse des Données :

L'analyse des données a été effectuée sur BULL Micral IBM compatible de la Cellule micro-informatique de l'E.N.M.P. : " Logiciel EPIDEMIO " du Professeur B. DUFFLO.

Tableau n°1 : TEMPERATURE MENSUELLE (°C) (SAFO)

ANNEES	1988		1989	
	Maximum	Minimum	Maximum	Minimum
MOIS				
Janvier	32,6	16,6	33,6	15,5
Février	36,9	21,4	35,4	18,5
Mars	40,4	24,7	38,6	21,7
Avril	41,8	26,2	40,8	24,7
Mai	42,2	26,1	41	25,6
Juin	35,8	23,4	36,3	22,9
Juillet	32,3	21,3	32,7	22,3
Août	31,7	21,5	31,2	22,3
Septembre	32,8	20,8	33,3	22,1
Octobre	35,7	19,8	34,5	20,7
Novembre	35,8	16,8	36,3	18,9
Décembre	32,2	14,8	33,7	17,9
Moyennes Annuelles	35,1	21,1	35,7	21,09

SOURCE : Service National de Météorologie - BAMAKO .

Tableau n°2 : PLUVIOMETRIE MENSUELLE (SAFO)

ANNEES MOIS	1988		1989	
	Millimètre d'eau	Nombre de Jours.	Millimètres d'eau	Nombre de Jours.
Janvier	-	-	-	-
Février	-	-	-	-
Mars	-	-	-	-
Avril	8,3	1	-	-
Mai	28,6	5	10,2	3
Juin	152,6	12	133,4	12
Juillet	314,1	18	172,1	20
Août	419,8	20	379,5	20
Septembre	249,7	15	62,5	12
Octobre	39,8	5	114	6
Novembre	3,5	1	-	-
Décembre	-	-	-	-
TOTAL	1216,4 nm	77 jours	871,7 nm	73 jours

SOURCE : Service National de Météorologie - BAMAKO .

Tableau n°3 : HUMIDITE RELATIVE EN POURCENTAGE MENSUELLE (SAFO)

ANNEES	1988		1989	
	Maximum	Minimum	Maximum	Minimum
MOIS				
Janvier	40	18	51	15
Février	34	13	47	22
Mars	37	16	47	19
Avril	56	31	53	18
Mai	66	25	67	25
Juin	90	68	90	41
Juillet	97	66	97	56
Août	99	72	98	62
Septembre	99	65	98	54
Octobre	95	50	95	43
Novembre	78	30	82	24
Décembre	57	29	60	20
Moyennes Annuelles	71	40	74	33

SOURCE : Service National de Météorologie - BAMAKO .

6. RESULTATS

6.1 Résultats globaux :

- Démographiques :

Parmi les 298 individus constituant les 27 familles, 97 individus ont été retenus par choix raisonné pour les prélèvements répétés.

Nous avons respecté un certain nombre de quotas en fonction des besoins de nos collaborateurs d'Heidelberg et de nos objectifs.

C'est ainsi que nous obtenions une répartition de 60 enfants âgés de 2 à 15 ans et de 37 adultes âgés de 16 à 70 ans.

Tableau n°4 : Répartition de la population en fonction de l'âge et du sexe.

Tranche d'Age (ans)	2-15	16-70	TOTAL
Sexe			
Masculin	32	15	47
Féminin	28	22	50
TOTAL	60	37	97

Dans notre échantillon le tableau n°4 montre que 47 sujets sont de sexe masculin et 50 de sexe féminin.

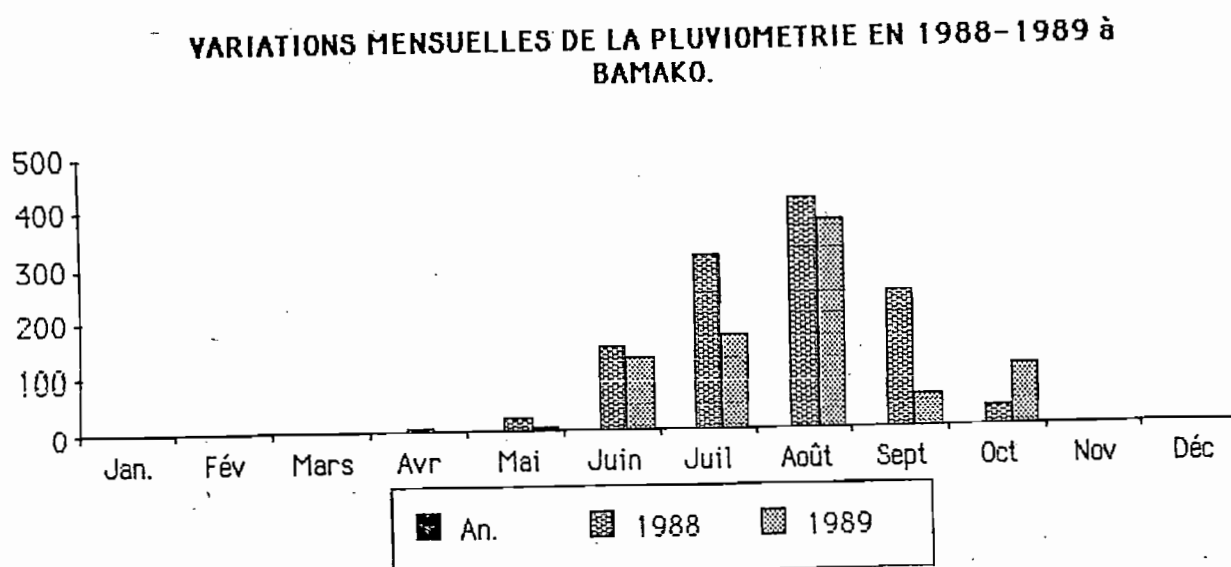
L'analyse statistique montre qu'il n'existe pas de différence significative entre l'âge et le sexe ($p = 0,30$).

Cette répartition comparable par âge et sexe était hautement souhaitable pour l'évaluation de la dynamique des différents paramètres paludométriques.

- Résultats Bio-climatiques :

Notre étude longitudinale a été menée en 3 passages transversaux. Ceci, en tenant compte du caractère fortement saisonnier de la transmission liée aux variations saisonnières de la pluviométrie.

Figure n°4 : Histogramme de Variations Mensuelles de la pluviométrie en 1988-1989 dans la zone de Safo (BAMAKO).



Source : Service Nationale de Météorologie de BAMAKO.

Nous constatons que les pluies ont débuté au mois d'Avril en 1988 et en Mai en 1989. Les pics de pluies se situent toujours au mois d'Août. Mais globalement la pluviométrie est plus faible en 1989.

6.2 Résultats Entomologiques :

L'enquête entomologique a été réalisée au mois d'Octobre 1988 à Safo. Les données climatiques à cette période sont :

- . la température moyenne journalière de 27,7° tableau n°1
- . l'humidité relative 72,5% tableau n°3
- . la hauteur moyenne de pluies : 39,4 tableau n°2

Tableau n°5 : La fréquence des différentes espèces anophéliennes rencontrées à Safo en Octobre 1988.

Espèces rencontrées	Effectif	Fréquence Relative
An. gambiae s.l.	971	96,81%
An. pharoensis	28	2,79%
An. paludis	3	0,3%
An. rufipes ingrami	1	0,10%
TOTAL	1.003	100%

Nous constatons dans ce tableau que le complexe An. gambiae s.l. est l'espèce anophélienne dominante à Safo en cette période.

Nous remarquons que d'autres espèces anophéliennes de moindre importance vectorielle ont été rencontrées (An. pharoensis, An. paludis, An. rufipes ingrami).

L'étude des différents paramètres entomologiques de transmission à Safo en Octobre 1988 a estimé à :

- 17,50 anophèles/case la densité vectorielle d'Anophèles gambiae s.l. par rapport à l'homme capturées au Spray-catch ;
- 3,01 et à 11,48 le nombre de piqûres par homme et par nuit d'An. gambiae s.l. respectivement au Spray-catch et par capture nocturne sur appât humain ;
- 17,6% (121 moustiques positifs sur 688 testés à Elisa), l'indice d'antigène sporozoïte global d'An. gambiae s.l. ;

- Entre 0,52 et 2,01 le taux d'innoculation entomologique d'An. gambiae s.l. respectivement au Spray-catch et à la capture sur appât humain.

Les paramètres montrent qu'à Safo en cette période de l'année, An. gambiae s.l. est l'espèce anophélienne vectrice par excellence.

Les études cytogénétiques ont permis de décrire au sein de ce complexe An. arabiensis, et deux formes chromosomiques d'An. gambiae s.s. Mopti et Savane (59).

6.3 Résultats Cliniques :

Tableau n°6 : Variation de l'indice splénique (Is) de la tranche d'âge 2 - 9 ans entre le 1er et le 2ème passage.

Classe d'âge (ans).	1er Passage			2ème Passage		
	R+	T	Is1	R+	T	Is2
2 - 9	2	40	5%	16	42	38,09%

Ce tableau montre que l'indice splénique le plus important s'observe au mois de Novembre 1988.

L'analyse statistique indique une différence hautement significative entre les indices spléniques du mois de Juillet 1988 et Novembre 1988. ($p = 0,0003$).

6.4 Résultats Parasitologiques :

Tableau n°7 : Variations de charges parasitaires moyennes à Plasmodium falciparum suivant les passages.

Passages	Moyenne parasitaire	Effectif	Intervalles de confiance
P 1	18 066,8	34	2140 à 38 273,5
P 2	1141	42	493 à 1789,2
P 3	351,4	19	280 à 682

Ce tableau montre que la densité parasitaire subit les poussées de la variation saisonnière. La charge Parasitaire est importante durant la saison pluvieuse, décroît en fin de saison des pluies, et est faible en début de saison des pluies.

Tableau n°8 : Formules parasitaires (F.P.) et taux d'infection (T.i.)
par espèces suivant les passages.

Passages	Espèces plasmodiales.	Plasmodium falciparum	Plasmodium malariae	Plasmodium ovalé	Pf + Pm	Pf + Po
I. Passage	G.E. +	33			1	
	Total	79			79	
	T.i	41,70%			1,26%	
	F.P.	33/34 97%*			3%	
II. Passage	G.E. +	38			2	2
	Total	94			94	94
	T.i	40,42%			2,10%	2,10%
	F.P.	38/42 90,51%*			4,80%	4,80%
III. Passage	G.E. +	14	2	1		2
	Total	91	91	91	91	
	T.i	15,4%	2,19%	1,1%	2,2%	
	F.P.	14/19 73,7%*	2/19 10,5%*	1/19 5,3%*	2/19 10,5%	

Ce tableau montre que *P. falciparum* est l'espèce plasmodiale prédominante, suivi de *P. malariae* et *P. ovale* qui est faiblement représenté.

Tableau n°9 : Indice plasmodique à *Plasmodium falciparum* (I.P.) suivant les 3 passages.

Passages	Gouttes épaisses	G.E.(-)	G.E. (+)	TOTAL	I.P.
P 1		45	34	79	43%
P 2		52	42	94	44,7%
P 3		75	16	91	17,6%

L'analyse de ce tableau montre que l'indice plasmodique varie significativement suivant les 3 passages ($p = 0,00011$).

Au sein de la population, le nombre d'individus parasités ne diffèrent pas significativement entre Juillet et Novembre 1988 ($p = 0,6$) tandis qu'une baisse significative de l'indice plasmodique a été observée de Novembre 1988 à Mai 1989 ($p = 0,007$).

Tableau n°10 : Indices plasmodiques à la *Plasmodium falciparum* en fonction des tranches d'âge et suivant les passages.

Tranche d'âge (ans).	Gouttes épaisses			1er Passage			2ème Passage			3ème Passage		
	G.E.(+)	T	I.P	G.E.(+)	T	I.P	G.E.(+)	T	I.P	G.E.(+)	T	I.P
2 - 15	25	44	57%	33	60	55%	13	58	22,4%			
16 - 70	9	35	26%	9	34	26,5%	9	33	9,1%			

Nous observons sur ce tableau qu'à chaque passage le nombre d'enfants parasités est supérieur à celui des adultes.

L'analyse statistique montre que ces différences sont statistiquement significatives au mois de Juillet et Novembre ($p = 0,01$) mais non au mois de Mai ($p = 0,18$).

Tableau n° 11 : Comparaison des charges parasitaires à *P. falciparum* en fonction des tranches d'âge suivant les passages.

Tranche d'Age (ans)	1er Passage		2ème Passage		3ème Passage	
	2-15	16-70	2-15	16-70	2-15	16-70
Classe Parasitaire.						
Négatif	19 43,10%	26 74,31%	27 45%	25 73,5%	45 75,7%	30 90,9%
1 - 1000	11 25%	9 25,7%	19 31,7%	8 24%	8 13,79%	3 9,1%
- 5. 000	6 13,5%	0	7 11,6%	1 3%	3 5,17%	0
- 10.000	2 4,5%	0	4 6,7%	0	0	0
> 10.000	6 13,6%	0	3 5%	0	2 3,4%	0
TOTAL	44	35	60	34	58	33

Ce Tableau montre que les adultes sont moins parasités que les enfants.

L'analyse montre que les charges parasitaires des enfants étaient significativement supérieures à celles des adultes au 1er et second passages ($p = 0,04$). Mais au mois de Mai 1989 les charges parasitaires des deux classes d'âge ne diffèrent pas significativement ($p > 0,05$). Au sein de la population, la répartition de la charge parasitaire ne diffère pas statistiquement entre Juillet et Novembre 1988 ($p = 0,31$). Mais une chute significative de la charge a été observée de Novembre 1988 à Mai 1989 ($p = 0,04$).

Tableau n°12 : Indice plasmodique à toutes les espèces plasmodiales confondues et suivant les passages en fonction de la tranche d'âge : 2 - 9 ans.

Tranche d'âge (ans).	Gouttes épaisses	1er Passage			2ème Passage			3ème Passage		
		G.E.(+)	T	I.P	G.E.(+)	T	I.P	G.E.(+)	T	I.P
2 - 9 ans	25	42	59,5%	32	58	55,2%	16	56	28,6%	

L'analyse statistique de ce tableau montre qu'il n'existe pas de différence significative entre les indices plasmodiques des mois de Juillet et Novembre 1988 $p = 0,98$, alors que l'indice plasmodique au second passage est significativement supérieur à celui du 3ème passage $p < 0,001$.

Tableau n°13 : Indice plasmodique global à toutes espèces plasmodiales confondues suivant les passages.

Passages.	Gouttes épaisses	G.E.(+)	G.E.(-)	TOTAL	I.P.
P.1		45	34	79	43%
P.2		52	42	94	44,7%
P.3		72	19	91	20,91%

L'analyse statistique de ce tableau montre que les indices plasmodiques varient significativement suivant les 3 passages $p = 0,0001$.

L'indice plasmodique est plus élevé au mois de Novembre 1988 (44,7%) ensuite viennent ceux du mois de Juillet 1988 (43%), puis celui du mois de Mai 1989 (20,9%).

Tableau n°14 : Indice gamétocytaire à Plasmodium falciparum en fonction de l'âge suivant les 3 passages.

Gouttes épaissies	1er Passage			2ème Passage.			3ème Passage		
	G.E.(+)	T	I.G	G.E.(+)	T	I.G	G.E.(+)	T	I.G
Tranche d'âge (ans).	:	:	:	:	:	:	:	:	:
2 - 15	0	:44	:0	3	:60	:5%	0	:58	:0
16 - 70	0	:35	:0	0	:34	:0	0	:3	:0

Le tableau montre que seuls les enfants sont porteurs de gamétocytes en fin de saison des pluies seulement.

6.5 Résultats Immunologiques :

6.5.1 Caractérisation du sérotype de la souche locale du Plasmodium falciparum à Safo.

Dix (10) ponctions veineuses ont été effectuées sur enfants fortement parasités pour la culture continue dans notre laboratoire. Nous avons obtenu 8 cultures continues positives soit un taux de 80%. Nous avons préparé nous-même nos lames d'antigènes. L'utilisation d'anticorps monoclonaux (AmK) spécifiques : des zones conservées et des zones dimorphiques nous a permis par la réaction d'immunofluorescence directe (I.F.D.) de caractériser le sérotype de P. falciparum. à Safo.

Tableau n°15 : Résultats de la réaction I.F.D.
sur nos 8 cultures de *P. falciparum*.

AmK .spécifiques	Zones conservées			Zones dimorphiques type K1			Zones dimorphiques type MAD 20		
	7,5	9,8	12,8	6,1	7,3	7,6	9,2	9,7	10,3
N° Identificat° des lames de culture.									
0228.	?	+++	+++	0	0	0	+++	+++	+++
0802.	+++	+++	+++	0	0	0	+++	+++	+++
2009	?	?	+++	0	?	(+)	+++	+++	+++
2302	+++	+++	+++	?	0	0	+	+	+
2603	0	+	+	0	0	0	+++	+++	+++
2705	+++	+++	+++	0	(+)	+	+++	+++	+++
2716	+++	+++	+++	0	+	+	+++	+++	+++
2717	+++	+++	+++	0	0	0	+++	+++	+++

Remarque :

Chaque lame réagit au moins avec un anticorps monoclonal spécifique des zones conservées

Pas de réaction avec le monoclonal spécifique de type K1.

Réaction positive homogène avec le type MAD 20.

Parasite isolats	conserved			K1 like					MAD20 like				block 2		block 4			gp16					
	7.5	12.8	9.8	6.1	13.1	17.1	7.3	34-5	1-1C	7B11	9.2	7F1	10.3	9.7	12.2	3D3	10.2B	13.2	9.5	12.1	80cl8	11L4	OX9
K1																							
MAD20																							
1																							
2																							
3																							
4																							
5																							
6																							
7																							
8																							

Le tableau n°15 et la figure 5 montrent qu'à Safo en Novembre 1988 le sérotype MAD 20 est dominant.

6.5.2 Tests sérologiques : Western Blot

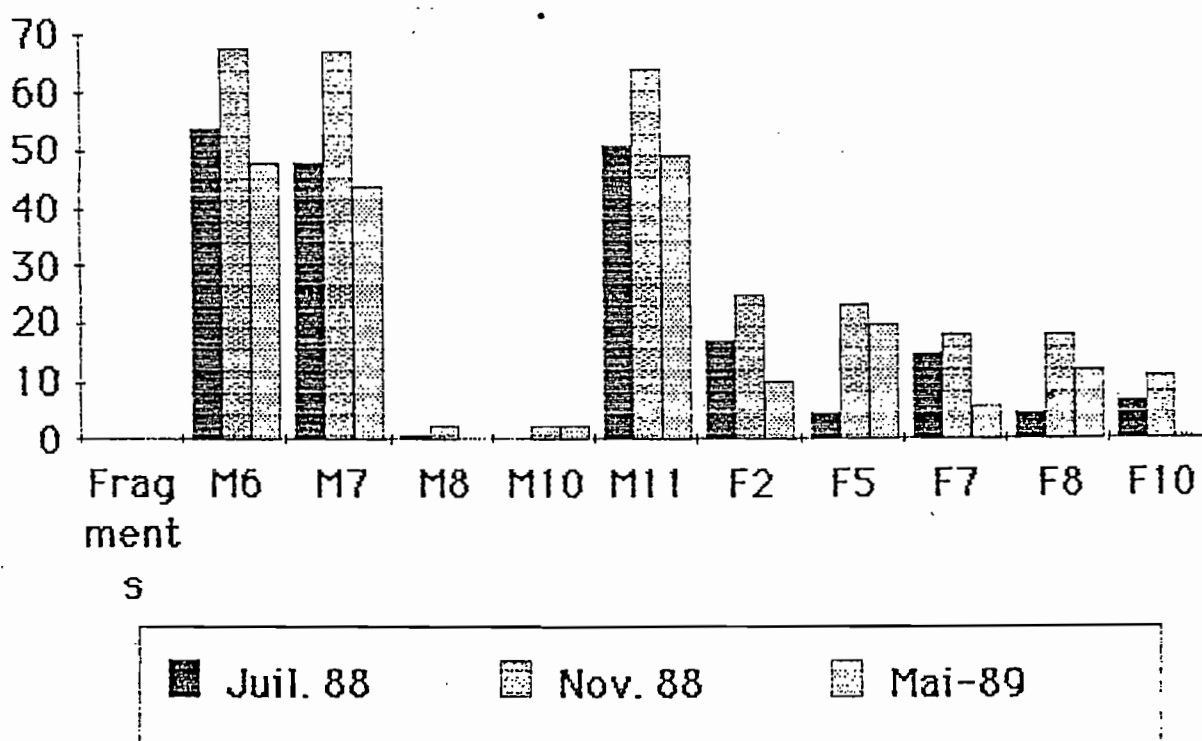
Les échantillons de serum de 37 adultes et de 60 enfants ont été testés au Western Blot contre 2 groupes de protéines recombinantes fusionnées dérivées de la G.P .190 (souche MAD 20 et K1) transférés sur bande de nitrocellulose.

Le 1er groupe est constitué de 5 protéines recombinantes fusionnées des zones dimorphiques de la souche MAD 20 : M6, M7, M8, M10, M11.

Le second groupe est constitué des protéines recombinantes fusionnées des zones conservées (F.2) sémi-conservées (F.8, F.10, F.7) et dimorphiques de la souche K1.

Tableau n°16 : Intensité de la réaction positive des serums au Western Blot en fonction des passages.

Passages	Différents fragments Degré de réaction en croix.	M1	M6	M8	M10	M11	F2	F5	F7	F8	F10	TOTAL
		x	26	16	1	0	13	11	5	14	5	6
1er Passage	x x	18 18,5%	24* 24,74%	0	0	24* 24,74%	3	0		1	0	1
	x x x	4 14,4%	14*	0	0	14* 14,43%	3	0	0		0	
2ème Passage	x	13	18	1	3	12	12	18* 18,55%	16	12	8	97
	x x	30	17	1	0	17	7	2	1	2	2	
	x x x	24* 24,74%	33* 34%	1		0	32* 33%	6	3	1	4	1
3ème Passage	x	20	20	0	3	25	7	13	5	9	1	96
	x x	16	16	0	0	19	3	5	1	2	0	
	x x x	8* 8,33%	12* 12,37%	0	0	5	0	2	0	1	0	



Nous remarquons sur ce tableau et sur la figure 6 que les 3 fragments M6, M7 et M11 des régions démorphiques de la souche MAD 20 sont fortement reconnus durant les 3 passages avec une prédominance du fragment M6.

Tableau n°17 : Comparaison des Réactions positives aux 10 fragments entre enfants et adultes suivant les passages.

Différents fragments											Pas-sages	TOTAL
	M.6	M.7	M.11	M.8	M.10	F.2	F.8	F.5	F.7	F.10		
Tranche d'Age (ans)												
2 - 15	48,3%	45%	41,7%	1,6%	0	11,7%	6,7%	8,33%	2%	8,3%	I.	60
16 - 70	67,5%	56,8%	70,2%	0	0	27%	2,7%	0	8%	2,7%		37
p	0,0076	0,71	0,044									
2 - 15	65%	60%	61,7%	3,3%	3,3%	23,3%	20%	18,3%	18,3%	5%	II.	60
16 - 70	78,30%	83,4%	73%	2,7%	2,7%	29,7%	16,2%	32,4%	18,9%	21,6%		37
p	0,11	0,08	0,59									
2 - 15	35,6%	32,2%	39%	0	1,7%	6,8%	11,86%	11,86%	5,08%	0	III.	59
16 - 70	73,3%	67,6%	70,3%	0	5,40%	16,2%	13,5%	35,1%	8,1%	2,7%		37
p	0,0005	0,0013	0,0002					0,02				

M.B. : Les valeurs significatives sont en caractère aéré.-

Le tableau n°17 montre que les 3 fragments dérivés de la souche MAD 20 : M11, M7, M6 ont été reconnus avec une haute fréquence à la fois par les adultes et les enfants, tandis que une proportion limitée de serums a été positive avec les fragments conservés et dimorphiques de la souche K1.

L'analyse statistique montre qu'une différence quantitative existe entre les réponses des adultes et enfants aux fragments reconnus :

Au premier passage (Juillet 1988), la fréquence de réaction positive des adultes est significativement supérieure à celle des enfants avec M6 ($p = 0,0076$) et M11 ($p = 0,0044$) mais pas avec M7 ($p = 0,71$).

En fin de saison des pluies (Novembre 1988), la fréquence de réaction positive des adultes ne diffèrent pas significativement de celle des enfants aux 3 fragments M6 ($p = 0,11$), M7 ($p = 0,08$), M11 ($p = 0,59$).

Par contre au mois de Mai 1989 (début saison des pluies), la fréquence de réaction positive des adultes est significativement supérieure à celle des enfants aux 3 fragments : M6 : $p = 0,00048$; M7 : $p = 0,0013$; M11 : $p = 0,0023$.

Une réponse au fragment F5 du K1 est observé avec une grande fréquence au second passage (Novembre 1988) à la fois chez les adultes et enfants. L'analyse statistique montre qu'elle est significativement supérieure chez les adultes en Mai 1989 ($p = 0,02$).

6.5.3 Tests sérologiques : Elisa

Pour quantifier la réponse humorale, les 290 serums ont été testés avec les 2 protéines recombinantes fusionnées purifiées HM6 et HM7 servant antigène au test Elisa.

Chaque serum a été testé en double pour éliminer toute fausse interprétation.

La lecture au spectrophotomètre des réactions colorimétriques (jaune, orangée) s'est effectuée à la longueur d'onde de 405 nm.

Tableau n° 18 : Fréquence de réactivité positive en D.O. aux fragments recombinés HM6 - HM7 en fonction des passages.

Différents passages	I.		II.		III.		TOTAL
	N	%	N	%	N	%	
Différents Fragments	:	:	:	:	:	:	:
HM6	11	11,34	28	28,9	12	12,37	97
HM7	16	16,5	38	39,1	13	13,40	97

Ce tableau montre que la réponse au fragment HM7 prédomine.

L'analyse de ce tableau montre que les plus hautes fréquences de réponse aux deux fragments sont observées au mois de Novembre 1988, et sont significativement supérieures à celles du mois de Juillet 1988 ($p = 0,0004$) et à celles du mois de Mai 1989 ($p = 0,0016$). Par contre, celles du 1er passage ne diffèrent pas significativement de celles du 3ème passage ($p = 0,8$).

Tableau n°19 : Fréquence de réactivité positive aux fragments recombinés HM6, HM7 en fonction de l'âge et suivant les passages.

Différents Passages		I.		II.		III.		TOTAL
Différents Fragments.	Tranche d'âge (ans)	N	%	N	%	N	%	
		HM6	2 - 15	6	10	10	16,7	3
16 - 70	5		13,51	18	48,6	9	24,3	37
HM7	2 - 15	7	11,7	19	31,66	5	8,3	60
	16 - 70	9	24,3	19	51,4	8	21,6	37

Il apparaît sur ce tableau que le pourcentage de réponse positive aux deux fragments HM6 et HM7 est plus important chez les adultes que chez les enfants à chaque passage.

L'analyse statistique montre que durant la saison pluvieuse, les fréquences de réponse sont identiques entre adultes et enfants aux deux fragments HM6 ($p = 0,84$) et HM7 ($p = 0,17$). En fin de saison pluvieuse (Novembre 1988), les pourcentages de réponse est significativement supérieurs chez les adultes que chez les enfants avec le fragment HM6 ($p = 0,0016$) mais pas avec le fragment HM7 ($p = 0,086$). Par contre en début de saison des pluies (Mai 1989) le pourcentage de réponse est significativement supérieur chez les adultes avec le fragment M6 ($p = 0,012$) mais pas avec le fragment HM7 ($p = 0,12$).

6.6 Corrélation entre indices parasitologiques et anticorps anti P190.

Au test de corrélation de Spearman, une liaison significative a été trouvée entre la parasitémie et le taux d'anticorps HM6, HM7 à l'Elisa durant la saison pluvieuse (Juillet 1988) : HM6 ($p = 0,00002$), M7 ($p = 0,00003$) et en fin saison sèche (Mai 1989) : HM6 ($p = 0,00000$), HM7 ($p = 0,00000$). Aucune corrélation n'a été observée entre la parasitémie et le taux d'anticorps à la fin de la saison des pluies (Novembre 1988) : HM6 ($p = 0,35026$), HM7 ($p = 0,41849$).

6.7 Transfert des techniques et technologies

Au terme de cette étude, nous avons acquis en routine dans notre laboratoire les techniques suivantes :

- La culture continue de P. falciparum sous cloche utilisant du milieu R.P.M.I. 1640 10% serum AB +
- Sérotypage de souche de P. falciparum par la technique d'I.F.D.
- Dosage des anticorps anti P. falciparum par la technique Elisa.
- La révélation immunoenzymatique des complexes immuns par l'immunoblot.

Quant à nos collègues d'Heidelberg, ils ont bénéficié des techniques de la coloration en un temps de gouttes épaisses et de quantification de la parasitémie que notre laboratoire réalise depuis des années.

7. DISCUSSION ET COMMENTAIRES

Sur le Plan Méthodologique : Nous n'avons pas choisi un échantillon aléatoire. Nous avons effectué un choix raisonné de 97 sujets composés de 2/3 d'enfants et 1/3 d'adultes. Nous nous sommes ici conformés aux vœux de nos collaborateurs d'Heidelberg du nombre d'analyses à effectuer sur chaque prélèvement et la contrainte du suivi longitudinal. C'est donc une première étude préliminaire permettant d'atteindre nos objectifs préalablement fixés. Nous avons obtenu une bonne régularité aux différents passages de la communauté à cause de la permanence et de la continuité de nos activités de recherche dans ce village. En effet, l'équipe du D.E.A.P. travaille dans ce village depuis 1985 (14),(17), (18).

Les résultats parasitologiques confirment le facies épidémiologique de transmission saisonnière longue d'une zone de savane soudanienne. La variation de l'indice plasmodique dans la tranche d'âge de 2 - 9 ans est de 59,5% au mois de Juillet 1988, 55,2% au mois de Novembre 1988 et 26,6% au mois de Mai 1989. Cette dynamique de l'indice plasmodique de l'échantillon global est de 43% en Juillet 1988, 44,7% au mois de Novembre 1988 et 20,9% au mois de Mai 1988. Bien que notre échantillon soit constitué que de 97 sujets nos résultats sont voisins de ceux des précédentes études dans le village : indice plasmodique des enfants de 2 - 9 ans est de 67% en Juillet 1985 (18). Mais, il est intéressant de constater une légère différence de l'indice plasmodique entre 1985 et 1988. L'hypothèse de l'influence de la pluviométrie et des autres facteurs climatiques (désertification de la zone par une surexploitation des ligneux) sur l'endémie palustre peut être émise. Cette évolution en baisse de l'indice plasmodique en fonction des années est constatée dans la zone voisine de Banambani : indice plasmodique des enfants de 2 - 9 ans est de 82,8% en 1979 (64) contre 70% en 1988 (68) et en Mai 1989, il est de 65% (Thèse de DEMBELE M. en préparation). L'espèce plasmodiale prédominante est P. falciparum : 97% au mois de Juillet 1988, 90,5% en Novembre 1988, 73,7% en Mai 1989, elle est suivie par P. malariae (10,5%) et de P. ovale (5,3%). Nous avons mis en évidence des associations parasitaires : P. falciparum + P. malariae ; P. falciparum + P. ovale. Ces résultats sont similaires aux études de TOURE. Y. en 1979 (64) dans une zone de savane soudanienne à Banambani. Ces auteurs avaient trouvé 93,16% de P. falciparum en association avec les autres espèces plasmodiales et 75,07% d'une manière isolée.

D'autre part KONE. Z. (34) dans 15 villages de l'enquête Kita-Kéniéba-Bafoulabé (K.B.K.) en 1982 avait trouvé dans la formule parasitaire 89,6% de P. falciparum suivi de 9% de P. malariae et de 0,4% de P. ovale. Plus au Sud dans la zone du barrage de Sélingué

DEMBELE. M. (16) a décrit une prédominance de P. falciparum avec 84,4% secondé par P. malariae 6,7% et P. ovale 0,2% en dernière position.

En Afrique Occidentale, dans le même écosystème au Burkina Faso Sabatinelli.

G. et coll. en 1986 (57) trouvent une prédominance de P. falciparum dans la formule parasitaire avec 98%.

Les résultats du tableau n°8 montrent que P. malariae et P. ovale apparaissent isolement en fin de saison sèche. Des études menées en zone de savane malienne par KONE. Z. en Mai 1982 (34) et par DEMBELE. M. en Mars 1981 (16) confirment nos observations. Ce qui nous permet d'évoquer l'hypothèse d'un occultisme parasitaire de ces 2 espèces plasmodiales par une forte charge parasitaire de P. falciparum en période d'intense transmission.

D'après Black en 1968 (in 34) la présence d'infestation plasmodiale associée est en faveur d'un haut degré de transmission paludéenne dans la zone. Nous n'avons pas mis en évidence dans notre échantillon, d'individus porteurs des 3 espèces plasmodiales en même temps. Par contre, TOURE.Y. en 1979 (64) avait mis en évidence à Banambani la présence simultanée chez le même individu de P. falciparum + P. malariae + P. ovale (0,3%).

L'analyse du tableau n°12 montre que chez la tranche d'âge d'enfants réceptifs l'indice plasmodique varie très peu de Juillet 1988 (59%) à Novembre 1988 (55,2%). Ce qui est signe d'une endémicité majeure durable suivant un mode hyperendémique (classification Gentilini. M.) (in 19).

L'indice gamétocytaire varie de 0% en début de saison de transmission à 5% en pleine saison de transmission. Nous pensons que l'indice gamétocytaire est bas comparé donc à ceux attendus en zone hyperendémique : 12,98% (64), 11,6% (68). Nos charges parasitaires sont plus élevées chez les enfants que chez les adultes (tableau n°11). Ceci n'a rien d'étonnant vu que les adultes ont un état d'immunité Sergent en zone d'endémie. Une amplification de ce état immunitaire (effet booster) à saison de transmission limite la schizogonie érythrocytaire chez les adultes. (12), (27).

Les études entomologiques que nous avons menées à Safo en complément de la parasitologie nous permettent de mieux caractériser le facies épidémiologique à Safo. Cette enquête est la première du genre menée dans ce village. Les espèces vectrices retrouvées appartiennent au complexe Anophèles gambiae s.l. Il s'agit essentiellement d'An. gambiae s.s. forme chromosomique (Mopti et Savane) et d'An. arabiensis. Ce sont de très bons vecteurs décrits par TOURE.Y. en 1985 (66) et par Vincent R. et coll. (71) en Afrique au Sud du Sahara.

Nous n'avons pas trouvé dans la faune anophélienne en cette période d'Octobre à Safo d'An. funestus. Cette espèce était l'un des principaux vecteurs décrits par TOURE.Y. en 1979 (64) dans la zone de Banambani en fin de saison des pluies. Sa disparition a été constatée par TRAORE. S.F. en 1988 (69) dans la même zone. Par contre Vincent.R. la retrouve en 1985 (70) à cette même période en zone de savane au Burkina Faso. Cette disparition d'An. funestus pourrait s'expliquer par les modifications écologiques (debroussaillage, désertification, mauvaises pluviométries) en zone de savane malienne préjudiciables au biotope spécifique de cette espèce.

La densité anophélienne par case est de 17,5% au spray-catch en cette période. L'indice d'antigène sporozotique mesuré à l'Elisa est de 17,6%. Le taux d'inoculation entomologique varie de 0,52 à 2,01.

L'indice d'antigène sporozoïte est très élevé à Safo par rapport à celui de Banambani qui est 0,020 déterminé à la microscopie (69). Il est également plus élevé que celui de Coosmans. M. (13) qui varie entre 5 et 8%. Ce fort taux de l'indice sporozoïte dans notre étude pourrait s'expliquer par :

- l'augmentation de la longévité des anophèles capturés à cette période favorisant la sporogonie ;
- la technique Elisa de dosage de l'antigène sporozoïte plus sensible que la microscopie ;

La droite de régression de l'indice d'antigène sporozoïte entre l'Elisa et la microscopie ne devient linéaire qu'à partir d'une charge sporozoïte de 100 à 200 sporozoïtes par glande salivaire et par moustique (67). Il y a donc une surévaluation du taux d'inoculation entomologique avec cette technique. Nous signalons que c'est la première fois que cette technique immuno enzymatique a été utilisée dans notre laboratoire. Elle se pratique systématiquement avec la microscopie actuellement.

La petite taille de notre échantillon ne nous permet pas d'évaluer avec certitude les indicateurs cliniques à savoir l'indice clinique (5% au mois de Juillet 1988 et 38,09% au mois de Novembre 1988 chez les enfants de (2 - 9 ans). La fréquence des accès palustres à Safo d'Août 1988 à Décembre 1989 est de 270 cas et celle des accès pernicioseux est de 5 cas chez des enfants d'âgés de moins de 2 ans avec une prévalence du mois d'Août au mois de Septembre 1989. DOUMBO.O. en 1985 (18) avait noté au mois de Juillet que toutes les rates hypertrophiées chez les enfants de 2 - 9 ans étaient de stade 1 et 2, alors que nous avons trouvé des rates 1, 2 et 3 mais pas de stade 4. TOURE. et coll. trouvent en 1979 (64) en période de haute transmission un indice splénique global de 44,37%. Comparé à notre indice splénique qui est de 38% il se dégage une tendance à la baisse au fil des ans. Ce qui est en concordance avec les résultats de l'indice plasmodique, mais la prudence est de règle à cause de la taille de notre échantillon.

L'évaluation de la dynamique des anticorps naturels anti P190 est la première réalisée dans cette zone au Mali. Nous avons jusqu'à présent travaillé : sur les anticorps fluorescents : KONE.Z. (34), DEMBELE.M.(16), Delmont J. 1976 (enquête sérologique sur une population urbaine à Bamako), et sur les anticorps anti circumsporozoïte protéine (33) pour les indicateurs séro-épidémiologiques. Le dosage de l'haptoglobine (56) et des anticorps anti P190 semblent être les meilleurs indicateurs de la schizogonie intra erythrocytaire (donc de l'hémolyse) dans une zone d'endémie palustre.

Nous avons travaillé sur deux techniques complémentaires l'immuno Blot et l'Elisa. Ces deux techniques de sérodiagnostics du paludisme testées pour la première fois dans notre laboratoire, ne nous permet pas de préciser exactement leur spécificité et leur sensibilité.

Le sérotypage réalisé sur 8 cultures positives in vitro (tableau n°16) montre qu'à Sato en Novembre 1988 le type MAD 20 prédomine. L'anticorps anti-sérotype K1 n'a pas donné de réponse spécifique sur nos antigènes de culture. L'analyse du tableau n°16 montre que seuls les fragments M6, M11, M7 de la souche MAD 20 sont fortement reconnus par les individus de notre échantillon (enfants adultes). Ce résultat diffère significativement de ceux obtenus par Müller et coll. (42) au Burkina Faso ou les sérums testés reconnaissaient spécifiquement les fragments de la souche K1. Les sérums des adultes testés au Burkina Faso ont reconnu le fragment M6 de la souche MAD 20. L'analyse de la dynamique de réponse sérologique observée dans notre série montre une reconnaissance par nos individus du fragment F5 de la souche K1 au mois de Novembre 1988 et Mai 1989. Ces différentes observations nous donnent des résultats extrêmement importants sur le plan immunologique du paludisme et l'identification de l'"antigène vaccinal" :

- l'existence de souches de *F. talciperum* différentes entre deux régions d'une écologie peu différente (polymorphisme de la P190) ;

- Une variation intrasaisonnière de souche locale.

Ces différents résultats devraient être pris en compte pour la composition de vaccin antiforme érythrocytaire.

Cette diversité antigénique entre deux zones géographiquement différentes d'endémie palustre a été décrite par Mc. Bride et coll. (38) en 1985. Le dimorphisme allélique du gène codant pour la P190 (K1 au Burkina Faso et MAD 20 à Sato) est l'oeuvre de Tanabé et coll. (62).

Früh Klaus thèse en préparation rapporte les résultats de Forsyth. décrivant une différence longitudinale et géographique de surface polymorphiques des érythrocytes infectés (R.E.S.A.). Ceci confirme les résultats de l'évolution des anticorps anti P190 à Sato.

L'hypothèse de la coexistence des deux allèles dans la même population parasitaire et retrouvée chez les mêmes individus pendant la même saison de transmission peut être émise. Cette hypothèse a été testée et retenue par les études Thaïlandaises (62) et par celles de Müller et coll. (42).

Le tableau n°17 montre que le nombre d'adultes séropositifs est supérieur à celui des enfants pour chaque passage. Cette différence est largement significative avec les fragments M6, M7 et M11 en début des saisons de pluies. Bien que la parasitémie soit une valeur fugace et discontinue et que le taux d'anticorps soit une valeur continue et dynamique, une corrélation positive entre le taux d'anticorps à l'E1isa et la charge parasitaire a été mise en évidence au premier et au 3ème passage seulement. Müller et coll. (42) ont démontré que les gens qui ne sont pas porteurs de parasites en période sèche voient leur taux

d'anticorps anti P190 disparaître. Nos observations abordent dans ce sens qu'individuellement il existe une liaison positive entre la réponse humorale et la parasitémie en début de transmission.

Du tableau n° 18 il se dégage une nette association entre le taux de séropositivité et les périodes de transmission. Les taux les plus élevés s'observent en période de haute transmission (Novembre 1988). Les taux les plus faibles, s'observent en période sèche chaude (Mai 1989).

L'analyse du tableau n°19 montre qu'avec le fragment HM6 le nombre d'adultes séropositifs est supérieur à celle des enfants en période d'intense transmission ($p = 0,0016$) et en début de saison des pluies ($p = 0,012$). Ce qui confirme nos résultats du Western Blot, qu'il semble exister un "boosting" immunologique chez les adultes.

L'évolution longitudinale des anticorps anti P190 montre :

1. une durée de vie brève des anticorps anti P190 en fonction de la schizogonie erythrocytaire. Ces anticorps présentent un pic sous l'induction d'un stimulus antigénique en période de transmission maximum. Leur niveau baisse progressivement avec la disparition de la parasitémie et persiste à un niveau détectable en période de transmission faible. Pour étayer cette constatation, nous avons programmé un suivi longitudinal de 200 personnes choisies au hasard tous les 15 jours pendant un an à Safo.

Cette durée de vie brève des anticorps antiformes erythrocytaires a été décrite par Webster et coll. 1987 (72) après traitement schizonticide. Ces auteurs émettent la même année l'hypothèse explicative d'une immunosuppression transitoire de la réponse humorale protectrice suite à une activation polyclonale de B. lymphocyte. Marsh. K. O. et coll. 1989 (36) dans une étude en Gambie ont conclu à un effet néfaste de la chimioprophylaxie sur l'évolution des anticorps antiformes erythrocytaires chez des sujets non immuns. D'après Chizzolini. C. (10) cette variabilité de la dynamique des anticorps est fonction du degré d'endémicité de la zone d'étude.

Par contre, Vand Waa et coll. en 1984 in thèse früh klaus en préparation montre dans une étude au Soudan qu'il n'y a pas de variabilité saisonnière des anticorps antiformes erythrocytaires mesurés à l'immofluorescence indirecte.(I.F.I). De même que Rougemont et coll. 1974 Wiramus (1973), Borges D.A. Silva 1976 in thèse KONE.Z. (34) ont montré que l'évolution des titres d'anticorps à I.F.I. n'accusaient pas de modification significative chez une population adulte soumise à une chimioprophylaxie à la chloroquine. Ces contradictions évidentes entre différents résultats et le nôtre semble liées aux techniques immunologiques utilisant des fractions de protéines antigéniques différentes.

2. Qu'il ne semble pas exister un bénéfice protecteur saisonnier. Malgré leur taux d'anticorps comparable à ceux des adultes les enfants présentent une charge parasitaire élevée.

3. L'hypothèse d'une variation intraspécifique et intrasaisonnière peut être émise. Ce qui complique d'avantage la possibilité d'identification d'une protéine immunogène "protectrice".

Tout semble se passer comme si les souches plasmodiales se dotent d'une possibilité de variation extrêmement importante. Ce qui entraîne une réponse immunitaire conséquente quantitative mais non protectrice.

Il se pourrait qu'une petite fraction non encore identifiée contenant les épitopes B et T soit à l'origine d'une réponse qualitative protectrice.

8. CONCLUSION – RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVE D'AVENIR.

De notre étude à composante clinique, parasitologique, immunologique et entomologique, il ressort que :

- la zone de Safo reste encore une zone d'hyperendémie palustre à transmission saisonnière d'au moins 4 mois (I.P variant de 59% à 55,2%).
- Plasmodium falciparum est l'espèce plasmodiale prédominante.
- Anophèle gambiae s.s. forme chromosomique Mopti et Savane avec An. arabiensis sont les principaux vecteurs avec un indice d'antigène sporozoïte de 17,6% (Elisa).
Nous notons une disparition d'Anopheles funestus dans la zone.
- Le sérotype dominant à Safo au mois de Novembre 1988 de la souche P. falciparum est MAD 20.
On note cependant l'apparition de quelques isolats du sérotype K1 en fin de transmission.
- Les fragments les mieux reconnus spécifiquement sont : M7, M6 et M11 avec une forte réaction au fragment M6. Aux mois de Novembre 1988 et Mai 1989 des réponses immunitaires sont observées, et sont beaucoup plus importantes dans la population adulte.
- Il existe une très grande variation du niveau d'anticorps anti P.190 en fonction des saisons. Le pourcentage de séropositivité est plus élevé en période de forte transmission.
- Il ne semble pas exister d'effets protecteurs des antigènes identifiés et mesurés. Les anticorps ont une durée de vie brève.

Au vue de ces résultats, nous formulons quelques recommandations :

- La poursuite de cette évaluation longitudinale par le choix d'un échantillon plus représentatif et un suivi plus rapproché (tous les 15 jours).
- D'augmenter le nombre de souches cultivées pour mieux apprécier les différents sérotypes existants à Safo.
- D'appliquer sur des confettis du sang capillaire récolté tous les 15 jours la technique de Polymerase Chain Reaction (P.C.R) : technique d'amplification de gène afin d'apprécier cette variabilité intraspécifique.

- De réaliser des cultures de lymphocytes T et B pour identifier les epitopes T et B indispensables pour la composition du futur vaccin.

Pour l'avenir nous espérons que les millions d'enfants et des femmes enceintes qui payent un lourd tribut à cette hémosporeidie que les essais d'immunogénicité en cours sur les singes Aotus en Amérique Latine à partir des fragments identifiés aboutiront à la sortie d'un prochain vaccin antiforme erythrocytaire. Lequel vaccin serait tout à fait indiqué pour abaisser la mortalité et morbidité palustre et non la transmission.

LISTE BIBLIOGRAPHIQUE

1. **Ambroise T.P., Carneyale. P., Felix. H., Mouchet.J.**
Le Paludisme, Encyclopedie Medico Chirurgicale (PARIS) 8089 A10 - 9,
1984.
2. **Anonyme :**
State of the Art Malaria Immunology and Molecular biology
Presented at the first Rockefeller Foundation T.D.R. meeting, Bangalore
India 2.5 December (1989).
3. **Bach. J.F. (Capron A. et Dessaint. J.P.)**
Immunité naturelle spécificité parasitaire pp. 640 642.
3ème Edition Flammarion Médecine Science 4, Rue Casimir Delavigne
PARIS VIè.
4. **BAH. M.D., DIALLO.S., Correa. P., Victorius.A.**
Prévalence de l'association Paludisme et grossesse et ses variations en
milieu urbain à DAKAR.
Afrique Méd. (1981). 20. 194 (483-490).
5. **Bouix G.**
Organisation et biologie des invertébrés
Licence de Sciences Naturelles. Certificat de biologie animale.
Université de Sciences et Techniques du Languedoc.
6. **Brown. E. A., Webster. H.K., Pavanand. K., Permpnich. B.,
Sookto. P., Sattabonjkot. J., Gingrich. J.B.,**
Comparaison of antibody responses to the circumsporozoite repeat
region and to intact sporozoite during acute plasmodium Malaria.
Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene (1989)
83, 154 - 157.
7. **Bruce Chwatt. L. J.**
The challenge of Malaria vaccine : trials and tribulations.
The lancet, February 14, (1987).
8. **Bryskier. A., Labro. M. T.,**
Relation hôte parasite
Paludisme et Médicaments Arnette (1988).
9. **Bryskier. A., Labro. M.T.,**
Problème Thérapeutique pp. 256 - 272
Paludisme et Médicaments Arnette (1988).

- 10. Chizzolini. C. ; Delaporte E. ; Kaufmann. M.H. ; Akue. J.P. ; Verdini. A.S. ; Pessi. A. ; Guidice. del. G. ;**
Age related prevalence of antibody response against three different, defined Plasmodium falciparum antigens in children from the Haut Ogooué province in Gabon.
Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene (1989) 83, 147 - 151.
- 11. Claudio D. R., Joseli de. D.F., Dalma. M.B., Bernado. G.C.**
Can Malaria associated polyclonal B. lymphocyte activation interfere with the development of antisporezoite specific immunity.
Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene (1989). 83, 289. 292.
- 12. Cohen. S., Mac Gregor. L.A., et Corrington. S.P.**
Gamma globuline and acquired immunity to human malaria.
Nature (LONDON) (1961), 192, 733, 737.
- 13. Coosmans. M.**
Bioécologie des vecteurs du Paludisme en Afrique au Sud du Sahara en relation avec la transmission.
Institut de Médecine Tropicale, Nationalestraat 155, B. 2000 Antwerpen Belgique.
- 14. Daou. R.**
Etude de la tolérance et de l'efficacité gamétocytocide d'un nouvel antipaludique : l'halofentine.
Thèse de Doctorat en Pharmacie BAMAKO, (1985).
- 15. Delmont. J.**
Diagnostic immunologique du Paludisme par I.F.I.
Modalités techniques et épidémiologiques dépistables des porteurs asymptomatiques en pratique transfusionnelle.
Thèse de Doctorat en Médecine MARSEILLE. (1976).
- 16. DEMBELE M.**
Evaluation épidémiologique du Paludisme avant la mise en oeuvre du barrage de Sélingué
Thèse de Doctorat en Médecine E.N.M.P., (1981).
- 17. DOLO. A.**
Efficacité schizonticide d'un nouvel antipaludique : chlorhydrate d'halofantrine.
Thèse de Doctorat en Pharmacie. E.N.M.P., (1985).

18. **DOUMBO O.**
Etude de l'activité schizonticide d'un phenanthrène methand (chlorhydrate d'halofantrine)sur les plasmodium humains au Mali
(Résultats préliminaires).
Mémoire en parasitologie générale. Faculté de Médecine de MARSEILLE. (1985).

19. **DOUMBO O., SANGARE O., TOURE. Y.T.**
Le Paludisme dans le sahel : l'exemple du Mali.
Maladies Tropicales transmissibles. Edition Aupelf. U.R.E.F., John Libbly Eurotext. PARIS (1989) pp. 11.32

20. **Druilhe. P. Lenoble. R., Gentilini. M.**
Immunologie parasitaire Encyclo. Med. Chirur. PARIS 8078 A10. 5 (1979).

21. **Egan.J.E., Weber. W. Ballou. R., Hollingdale. M.R., Majarian. W.R., Gordon. D.M., Maloy. W.L., Hoffman. S.L., Wirtz. R.A., Schneider.L., Woollett. G.R., Young. J.F. and Hockmeyer. W.P., (1987).**
Efficacy of murine malaria sporozoite vaccins. Implication for human vaccine development.
Science 236 : 454 - 456.

22. **Früh. K., Müller. M., Bujard. H. et Crisanti. A. (1989)**
A new tod for the serodiagnosis of acute Plasmodium falciparum malaria in individuals with primary infection.
Journal of Immunological Methods 100, (1989), JIM : 05256.

23. **In. Früh K. : - Vande Waa, Akood M.A.S. Bayoumi. R. (1984). Inf. Imm. 45 505 510.**
- Forsyth.

24. **Früh. K. ; Müller. M. ; Crisanti. A. ; Doumbo. O. ; Lyon. J. ; Mc Bride. J. ; Bujard. H.**
Specificity and protectivity of the human immune response to the polymorphic major merozoite surface antigen.
Abstract for BSP meeting 8 th - 9 th, Feb 90 Session.1.

25. **Good. M.F., Ponibo. D., Quakyi. I.A., Reley E.M., Horghen. R.A., Menon. A., Alling. D.W., Berzofsky. J.A., and Miller. L.H. (1988)**
Human T. cell recognition of the circumsporozoite proteine of Plasmodium falciparum. Immunodominant T.cell domaine map to the polymorphic regions of the molecule.
Proc Natl Acad. Sci. USA. 85 - 1129 - 1203.

26. **Greenwood. M.**
Malaria Killer of African children
TDR. News (1989) - 29,8.
27. **Hoffman. S.L., Oster. N.C., Plowc. V.C., Woollett. G.R., John. C. B., Chulay. D.J., Wietz. A.R., Hollingdale. R.M., Mugambi. M.**
Naturally Acquired Antibodies to sporozoite : Do not Prevent Malaria.
Vaccine Development Implication. (1987). Science, 237, 639 - 642.
28. **Holder. A.A., et Freeman.R.R.**
The free major antigens on the surface of Plasmodium falciparum merozoite are derived from a single high molecular weight precursor.
J.Exp., Med.(c). de Rockefeller University Press 0022 Vol. 160. (1984).
29. **Hollingdale. R.M., Hogg.B., Petersen. E., Wirtz. A.K., Bjorkmann.**
Age dependent occurrence of protective antiplasmodium falciparum sporozoite antibodies in holoendemic area in Liberia.
Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene (1989), 83, 322 - 324.
30. **Houba.V.,**
Immune complexes in malaria and their immunopathologic significance
O.M.S./ MAL/ 81 - 963.
31. **Indresh.K.S., Takacs. B., Patrick. C. Serta. H. Mc. Gregor.I.A., Scaife.J., Perin. H.L.**
Recombinant polypeptide for Serology of Malaria.
Transaction of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene (1989) 83, 317 - 321.
32. **Jensen.A., Trager. (1976)**
Human malaria parasites in continuous culture.
Science 193 : 673 - 675.
33. **KOITA O.**
Contribution à l'étude Epidémiologique du Paludisme le long du tronçon de la route Transsaharienne du Mali Août/Septembre (1988).
Thèse de Doctorat en Pharmacie E.N.M.P. (1989) BAMAKO.
34. **KONE. Z.**
Enquête paludométrique dans 15 villages de Cercles de Kéniéba, Bafoulabé et Kita.
Thèse de Doctorat en Médecine E.N.M.P. (1982). BAMAKO.
35. **Mackay G.M., Bone. N., Hyde. J. E., Scaife.J., Stunnenberg. H., Bujard. H.**
Polymorphisme of the precursor for the major surface Antigens of Plasmodium falciparum merozoites : Studies at the genetic level.
the EMBO. Journal vol. 4, N°13B. pp. 3823 - 3829, (1985).

36. **Marsh. K., Otoo. L., Hayes. J.R., Carson. C.D. and Greenwood.M;B.**
Antibodies to blood stage antigenes of Plasmodium falciparum in Rural Gambians and their relation to protection against infection.
Transaction of the Royal Society of Tropical Medecine and Hygiene (1989) 83, 293 - 303.
37. **Mazier. D., Beaudoin. R.L., Mellou R.S., Druilh. P., Texier. B., Trosper. J., Paul. G., Miltgen. F., Landau. I., Brandicourt. O., Guguen., Guillouzo. C., Langlois. P.**
Complete development of hepatic stages of Plasmodium falciparum in vitro.
Science (1985) ; 277, 440.
38. **Mc. Bride. S.J., Newbold I.C., Anand. R.,**
Polymorphism of a high molecular weight schizont antigen of the human malaria parasite Plasmodium falciparum.
J. Exp. Med. vol 161. January (1985) 160 - 180.
39. **Mc. Gregor I.A.**
Immune phenomena in Naturally acquired human Malaria
O.M.S./MAL/81, 966
40. **Mc. Laren. J.D., Terry. R.J.**
Antiparasite vaccines
Transaction of the Royal Society of Tropical Medecine and Hygiene (1989) 83, 145 - 146 - 178.
41. **Miller. H.L., Howard. J.R., Carter. R., Good. F.M., Nussenzweig. V., Nussenzweig. S.R.**
Life cycle of the Malaria parasite.
Articles (1986). - Science 234.
42. **Müller. H.M., Früh K., Brunn. A., Exposito.F., Lombardi.S., Grisanti. A., Bujard. h.,**
Development of the human immune response against the Major Surface Proteine (G.P. 190) of Plasmodium falciparum.
Infection and immunity Dec. (1989) pp. 3765 - 3769 vol. 57 N°12.
43. **O.M.S. 1986 - (Perrin.L.H. 1984)./ TRD/IMMAL/SWG(9)/86.3 GENEVA 13.15/10/86**
. 195 K. glycoproteine of Plasmodium falciparum pp. 10- 13.
. Sporozoite vaccin Devepment pp. 3.-7
. Exoerythrocytic protective immunity pp. 8 -9
Sporozoite vaccin Devepment and Research towond Devepment of Asexual Blood stage vaccines.
Report of the minth Meeting of the scientific working group on the immunology of Malaria.

44. **O.M.S. 1987**
 Invasion of erythrocyte by Malaria merozoite pp. 55 - 57
 The biology of Malaria parasites technical report series 743.
 Report of the WHO scientific groupe. Technical. report Series 743.
45. **O.M.S. 1988/ TRD/IMMAL/SWG(10)/88.3 GENEVA 13-15
 April 1988.**
 Major merozoite surface antigen Plasmodium falciparum 195 pp. 28 - 30.
 Exoerythrocyte and Asexual Blood stage antigen of human Malaria
 parasites report of the tenth Meeting of the scientific working group on
 the immunology of Malaria.
46. **Otool. N.L., Snow.R., Menon. A., Bryan.P., Greenwood. M.B.**
 Immunity to Malaria in young Gambian children after a two years periode
 of chemoprophylaxis.
 Transaction and Royal Society of Tropical Medecine and Hygiene
 (1988) 52, 59, 65.
47. **Patarroyo.E.M., Amador.R., Clowiyo.P., Moreno, Gurman.F.,
 Romeo. P., Tascan.R., Franco Antorio., Murilla. L.A., Ponton.
 G. Truzillo. G.**
 A Synthetic vaccine protects humans against challenge with Asexual
 blood stages of Plasmodium falciparum malaria. Nature vol 332 pp.
 156 - 161.
48. **Perkins. M.E., and Rocco. L.J. 1988**
 Scialic acide dependent binding of Plasmodium falciparum merozoite
 surface antigene P. falciparum to humain erythrocytes.
 The journal of immunology 141, 3190 - 3196.
49. **Perkins.M.E. 1989**
 Erythrocyte invasion by the Malaria merozoite recent advances.
 Experimental parasitology 69, 94 - 99.
50. **Perrin. H.L.**
 Functional characterisations of antimalarial antibodies
 O.M.S./MAL/81 - 964.
51. **Perrin. L.H., Dayal. R., 1982**
 Immunity to asexual erythrocytic stages of Plasmodium falciparum
 Role of defined antigens in the humocal response Immund. 61 : 245 - 260.
52. **Peyron.F. ; Oury.B. ; Ambroise. T.P.**
 La vaccination antipaludique
 où en est on ?
 Médecine Tropicale, volume 50, n°1 Janvier - Mars 1990.

53. **Rey. D., Christmann Scorch. D.**
Paludisme à Plasmodium falciparum chloroquino resistant, contracte dans l'île de Malabo (GUINNEE EQUATORIALE) : Une observation
Médecine Maladie infectieuse (1988) 2 - 1990.
54. **Riley. E.,**
Preerythrocytic stage : Malaria Vaccine Development, Current status and futur prospects.
Bethesda.M.D., USA April 1989.
Parasitology today vol 5, N° 7, 1989.
55. **Romero.P., Maryanski.J.L., Corradin.G., Nussenzweig. R.S., Nussenzweig. V. and Zavala.F. 1989.**
Cloned cytotoxic T.cells recognize an epitope in the circumsporozoite proteine and protect against malaria.
Nature 341 - 973 - 976.
56. **Rougemont. A.; Doumbo.O ; Bouvier.M.; Soula.G. ; Perrin.L. ; Tamboura.B., Yerly.S ; Dolo.A. ; Brenner.E. ; Kodio.B ; Srivastava.I. ; Ranque.P.**
Hypohaptoglobinaemia as an epidemiological and clinical indicator for malaria : Results of two studies in an hyperendemic region in west Africa.
The lancet September 24, 1988.
57. **Sabatinelli.G., Bosman.A., Lamizana.L., Rossi.P.**
Prévalence du Paludisme à Ouagadougou et dans le milieu limitrophe en période de transmission maximale.
Parasitologie 28 : 17 31, 1986.
58. **Sadoff.J.C., Ballow.W.R., Baron.L.S., Majarian.W.R., Brey. R.N., Hockmeyer. W.T., Young.J.F., Gryz.S.J., Lowel.G.H. and Chulay. J.D. (1988)**
Oral Salmonella typhimurium vaccine expressing circumsporozoite proteine protects against malaria.
Science 240 : 336 - 338.
59. **SANGARE.D.**
Etude de l'agressivité de la lame culicidienne à Safo. Arrondissement de Kalabancoro Cercle de Kati.
Incidence sur la transmission du Paludisme
Mémoire de biologie E.N.S.U.P. 1989.
60. **Siddiqui. A.W., Tam.Q.L. 1986**
Strain specificity and antigene polymorphic pp. 40 - 41.
Current status of Asexual blood stage candidate vaccines of Plasmodium falciparum.
Proceedings of the conference on Malaria in Africa
Practical consideration on Malaria Vaccines and clinical trials.
Washington D.C.USA, 1986.

61. **Siddigui.D.W., Tam. Q.L. 1987**
Merozoite surface coat precursor proteine completely protects Aotus monkeys against Plasmodium falciparum malaria.
Proc. Natl. Acad. Science. USA vol. 84 pp. 3014 - 3018 May 1987.
62. **Tanabé. K., Mackay.M., Goman. M., Scaife J.G., 1987**
Allelic Dimorphism in a surface antigen Gene of the Malaria Parasite Plasmodium falciparum.
J. Mol. Biol. 1987 - 195, 273 - 287.
63. **TOUNKARA A. 1987**
Contribution à l'étude de récepteur erythrocytaire du Plasmodium falciparum.
Thèse de Doctorat 3ème Cycle. Université PARIS VII.
64. **TOURE.T.Y.,** Bioécologie des Anopheles (Diptera Culicidae) dans une zone rurale de savane soudanienne au Mali :Village de Banambani, Arrondissement de Kati.
Thèse de 3ème Cycle C.P.S. BAMAKO, 1979.
65. **TOURE Y.T., Petrarca.V., Coluzzi. M., 1984**
Bioécologie et importance vectorielle des taxa du complexe Anopheles gambiae au Mali.
4ème Congrès sur la protection de la Santé humaine et de culture en milieu tropical.
66. **TOURE. Y.T., 1985**
Génétique écologie et capacité vectorielle des membres du complexe : An. gambiae au Mali.
Thèse de Doctorat d'Etat es Sciences naturelles. Faculté St. Jerome des sciences et techniques Aix MARSEILLE III.
67. **TOURE. Y.T., Doumbo. O., TRAORE. S.F.**
Relation des taux d'innoculation entomologique avec l'acquisition de l'immunité contre le Paludisme.
BOBO-DIOULASSO 11, 12, 13 Avril 1988
Session USAID sur l'épidémiologie du Paludisme et le vaccin.
68. **TRAORE. M.Y.S.**
Caractéristique entomologique et parasitologique de l'épidémiologie du Paludisme à Banambani.
Mémoire du D.E.A. en biologie animal ISFRA BAMAKO, 1988.
69. **TRAORE. S.F.**
Etude de comportement et de la contribution à la transmission du Paludisme des membres du complexe d'An. gambiae à Banambani.
Doct. 3ème Cycle, ISFRA, BAMAKO 1990.

70. **Vincent. R., Gazin.P., Boudin. C., Molel. J.F., Ouedrago.V., Carnevale .P.**
La transmission du Paludisme en zone de savane arborée et en zone rizicole des environs de BOBO-DIOULASSO (Burkina Faso). 1985
Ann. Soc. Belge Méd. Trop. 1985, 65, Suppl. - 2, 201 - 214.
71. **Vincent.R., 1989**
Transmission du Paludisme humain : zone de savane d'Afrique de l'Ouest.
Thèse 3ème Cycle PARIS VI.
72. **Webster.R.H., Boudreau F.E., Pang. L.W., Permpnich.B., Sookto. P., Wirtz. D.K.**
Development of Immunity in Natural Plasmodium falciparum - Malaria : Antibodies to the falciparum sporozoite Vaccine 1 . Antigene (R 32 et 32).
Journal of clinical Microbiology, June 1987, Vol. 25, N° 6, p.1002-1008.
73. **Weiss.W.R., Sedegash.H., Braudon.R.L., Miller.L.H., and Good.M.F., 1989**
CD 8+ T. cells (Cytotoxic/Suppressor) are required for protection in mice immunized with malaria sporozoite.
Proc. Natl. Acad. Science USA pp. 673 - 676.

ANNEXE

QUESTIONNAIRE

Il comprenait le fichier :

a) Fiche de ménage sur laquelle les renseignements relevés devaient indiquer pour chaque membre le nom, le sexe, date de naissance, état matrimoniale (avec éventuellement la date de mariage, de divorce ou de veuvage), lien de parenté avec le chef de ménage.

b) Fiche individuelle pour chaque homme ayant déjà contracté un mariage, sur laquelle ont été notés les noms successifs de ses épouses.

La date et le mode (héritier ou épouser) du mariage, la date et la cause (divorce - veuvage) de séparation.

c) Une fiche individuelle pour chaque femme ayant déjà contracté un mariage. Les renseignements étaient de 2 ordres : mutialité et maternité.

Dans la partie maternité, les évènements obstétricaux (avortements mort-nés - naissances vivantes) ont été notés dans l'ordre de succession avec la date de survenu et le rang de chaque évènement. En cas d'avortement ou de mort-né, l'âge de grossesse auquel l'évènement s'est produit a été précisé.

Pour les naissances vivantes ont été notés : le nom de l'enfant, son numéro sur la fiche de ménage et son devenir (vivant ou décédé). En cas de décès la date, la cause et l'âge au moment du décès ont complété les renseignements.

Dans la partie muptialité ont été recensés dans l'ordre de succession les noms des éventuels maris de la femme. Pour chacun de ces maris ont été indiqué la date et le mode (héritée ou épousée) de mariage ; la date et la cause (décès ou divorce) de séparation.

d) Une fiche de décès sur laquelle ont été notés tous les décès survenus dans le ménage depuis un an c'est-à-dire d'Août 1980 à Août 1981. Les renseignements ont porté sur le nom du défunt, son sexe, sa date de naissance, sa date de décès, son âge au moment du décès et la cause de son décès.

Dans l'ensemble tous ces événements ont pu être situés grâce à un calendrier historique pré-établi dont les références d'avant l'indépendance sont les suivantes :

- 1914 - 1918 Première guerre mondiale
- 1939 - 1945 Deuxième guerre mondiale
- 1947 Début des rivalités politiques entre le PSP* et le RDA**
- 1949 La grande épidémie ayant fait ravage dans la zone.
- 1956 Décès du Président Mamadou KONATE
- Janvier 1960 Arrestation des responsables soudanais à DAKAR dont Modibo KEITA.

Pour les références de l'indépendance à nos jours les dates retenues sont les suivantes :

- 22 Septembre 1960 Indépendance de la République du Mali
- 1962 Remplacement du franc CFA par le franc Malien.
- 1965 Visite de Modibo KEITA à Yanfolila.
- Août 1967 Révolution (écartement du premier Ministre Jean Marie KONE).
- 19 Novembre 1968 Coup d'Etat.
- 1971 Grande épidémie de choléra à Bamako.
- 1977 Pose de la première pierre du barrage de Sélingué.
- 1978 Epuration dans les rangs du CMLN ***
Arrestation de Tiécoro, Kissima et Karim).
- 1980 Grande enquête polyvalente de l'Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie du Mali.

Des réajustements ont été faits en posant les questions de type suivant :

L'évènement dont la date est à déterminer est survenu combien de temps avant ou après la date du calendrier historique dont il se rapproche le plus.

-
- * PSP Parti Progressiste Soudanais
 - ** RDA Rassemblement Démocratique Africain
 - *** CMLN Comité Militaire de Libération Nationale.

L'évènement X dont la date est à déterminer est-il plus âgé ou moins âgé et de combien de temps qu'un évènement Y dont la date est connue avec précision (Acte de naissance - Acte de mariage) ou dont la date a été fixée avec certitude à partir du calendrier historique. par exemple Naissance du premier enfant par rapport au mariage de la mère.

En outre un calendrier des activités paysannes nous a aidé à situer tel ou tel évènement dans l'année. Ce calendrier se présente comme suit :

Mars - Avril,	cueillette de Néré
Mai - Juin - Juillet,	cueillette de Zaban
Mai - Juin - Juillet - Août,	cueillette Karité
Juin,	Sémi de maïs
Juin - Juillet,	Sémi d'arachide
Fin Août - Septembre,	Récolte de maïs
Octobre - Novembre,	Récolte d'arachide
Novembre - mi-Décembre,	Récolte de mil
Janvier,	Transport de mil.-

RESUME

Nous avons mené de Juillet 1988 à Mai 1989 une enquête longitudinale en 3 passages transversaux dans une zone de savane soudanienne malienne (Safo situé à 25 Km au Nord-Est de Bamako).

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer la dynamique des anticorps naturels anti P 190.

Nous avons effectué un échantillonnage raisonné de 97 sujets (60 enfants et 37 adultes). Des prélèvements sanguins ont été effectués sur cette cohorte avec un suivi clinique en Juillet 1988, Novembre 1988 et en Mai 1989.

Les techniques d'Elisa, de Western Blot, d'IFD et de culture continue de Plasmodium falciparum ont été utilisées pour traitement du matériel biologique.

Les résultats obtenus confirment le niveau d'hyperendémicité palustre de la zone (IP = 59,5%). Anophèles gambiae s.l. est la principale espèce vectrice avec un indice d'antigène sporozoitique de 17,6%. Le sérotype dominant est le MAD 20 avec une apparition du K 1 en fin de saison de pluies. Une corrélation positive entre le niveau d'anticorps et la parasitémie est mise en évidence au début et en fin de transmission.

En conclusion il existe des anticorps anti P 190 naturels de courte durée dans la population infantile et adulte en zone d'endémie. Cette constatation doit être prise en compte pour la recherche vaccinale afin, d'améliorer la réponse immunitaire " protectrice".

Mots clés : Anticorps anti P190, Plasmodium falciparum, Paludisme.

Summary

We have conducted from July 1988 to May 1989 a longitudinal survey with 3 transversal passages in a zone of sudanian savanna of Mali at Safo (25 kilometers North-eastern Bamako).

The main objective of the study is to evaluate the dynamism of natural antibodies anti P190

We have carried out a reasonable sampling of 97 subjects (60 children and 37 adults). Blood samples were taken from these people for test with clinical follow-up done in July 1988, November 1988, and May 1989.

The techniques of Elisa, Western Blot, I.F.D, and continued cultivation of Plasmodium falciparum malaria were realized for treatment of biological material.

The results confirm the level of paludal hyperendemicity of the studied area IP(59,5%). Anopheles gambiae s.l is the main vector species having a sporozoite mark of 17,6%. The dominant type is MAD20 with an appearance of K1 by the end of rainy season. A positive correlation between the antibodies level and the parasitemy was evidenced at the beginning and the end of transmission

In conclusion, there are some natural antibodies anti P190 of short lives in the infantile and adult population of endemic area. This establishment must be taken into account in vaccine research in order to improve the "protective" immune response.

Words key : Antibodies anti P190, Plasmodium falciparum, Malaria.

S E R M E N T D E G A L I E N

Je jure en présence des maîtres de la Faculté
des conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes
condisciples :

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

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

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes
devoirs envers le malade et sa dignité humaine, en aucun
cas, je ne consentirai à utiliser ma connaissance et mon
état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes
criminels.

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

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes
confrères si j'y manque.