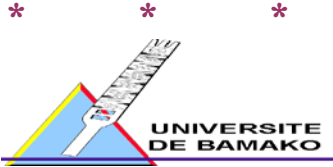


Ministère de l'Enseignement,  
Supérieur et de la Recherche Scientifique

République du Mali

UN PEUPLE-UN BUT-UNE FOI



Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-stomatologie



# Thèse de Médecine

Année universitaire 2009 -2010

N° :.....

Impact de l'administration répétée de  
trois combinaisons thérapeutiques à  
base d'artémisinine sur les réponses  
immunitaires naturelles anti-

Présentée et soutenue publiquement le 31 /07 /2010 devant le jury de la  
Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie du Mali

Par *Mr NOUHOUM DIALLO*

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

**JURY**

**Président du jury: Professeur Dapa A DIALLO**

**Membre du jury: Docteur Bourema KOURIBA**

**Co- directeur de thèse: Docteur Abdoulaye DJIMDE**

**Directeur de thèse: Professeur Ogobara K DOUMBO**

# DEDICACES

Louange à **ALLAH, DIEU** tout **Puissant**, le **Miséricordieux**.

Ce travail est dédié à tous les membres de ma famille en particulier à mon père Abdoulaye DIALLO et à ma mère Amy DIALLO ainsi qu'à toutes mes familles d'accueil pour tous les sacrifices consentis.

# REMERCIEMENTS

Nos remerciements vont à l'endroit de tous ceux qui ont contribué à la réussite de ce travail.

A la **Ligue des élèves et étudiants du Mali**, à la grande famille des **Rassembleurs Secouristes et Réformateurs**, au **Club Alioune Blondin Beye** pour la recherche de la paix, avec vous ; nous n'avons cessé d'apprendre.

**A toute la population de Bougoula- Hameau**, grand merci.

**Au corps professoral de la FMPOS**, pour la qualité de l'enseignement que nous avons reçu.

**Au personnel du MRTC/DEAP**, pour votre disponibilité et votre franche collaboration.

**A nos maîtres du MRTC/DEAP**, pour votre engagement et votre souci constant pour notre formation.

**A l'équipe de l'unité de chimiorésistance du MRTC/DEAP**: Particulièrement aux Docteurs ; **Abdoulaye DJIMDE, Abdoul Habib BEAVOGUI, Mamadou WELE, Mamadou TEKETE, Bakary FOFANA, Hama MAIGA, Bakary SIDIBE, Oumar SANGARE, Ina OUOLOGUEM, Oumou MAIGA, Souleymane DAMA, Amadou NIANGALY, Oumar YATTARA, Oumar Bila TRAORE, Antoine DARA, Hamidou NIANGALY, Amadou TOGO, Aly KODIO et à M<sup>lle</sup> Aminatou KONE, Mrs. Demba DEMBELE, Sekou TOURE, Zoumana Isaac TRAORE, Kassim SANOGO, Amadou BAMADIO, Baba TEME** ; pour m'avoir initié à la biologie moléculaire et à la méthodologie de recherche avec patience et assiduité. Le soutien dont vous avez fait preuve tout le long de mon apprentissage est le fruit de ce travail. Il est le vôtre.

**A mes amis:**

**Abdoulaye COULIBALY, Abdoulaye TAPILY, Abdoulaye DAMA, Aboudramane BATHILY, Aminata SOUMARE, Assey M KALOGA, Boubacar CISSE, Diaroukou DIALLO, Drissa BOUGOUDOGO, Hamza MAIGA, Hawa KEITA, Zeinabou MAIGA, Ibrahim FOBA, Kalil DICKO, Mohamed COULIBALY, Moulaye HAIDARA, Moussa NIANGALY, Ousmane DIANE, Rubin SAGARA, Seydou TOURE, Sidiki DIARRA.** Nous avons partagé les bons et mauvais moments tout au long de ce cycle. Vos encouragements et vos conseils ne m'ont jamais fait défaut. Restons unis et solidaires pour toujours.

**Aux familles KONTA et KARABENTA:**

Pour votre accueil, soutien, confiance, et pour le bel esprit de famille que vous dégagez.

### **Aux familles KOUSSOUBE et DJIMDE:**

Pour votre gentillesse, votre hospitalité légendaire, pour la qualité de l'éducation reçue. Sans votre accueil, je n'aurais pas emménagé dans la ville de Koro afin de poursuivre mes études.

### **A mes Grands-mères:**

**Khadidja DIARRASSOUBA** et **Mariam KONE** pour les bons moments passés en votre compagnie. Qu'ALLAH vous garde longtemps parmi nous.

### **A mes Oncles et leurs épouses:**

**Tonton Adama, Ibrahim et Drissa DIALLO** pour votre engagement constant à notre éducation.

### **A mes Tantes:**

**Tantes Mariam, Awa, Fatoumata, Aminata et Bintou DIALLO** pour la qualité de vos conseils.

### **A mes frères et sœurs:**

**Aboudramane, Issiaka, Mamadou, Adama, Youssouf, Moussa, Abdoulaye, Alassane et Fousseiny, Ibrahim, Adjara, Mariam, Khadidja, Awa, Fatoumata, Barakissa, Rokia, Nana, Zeinabou, Mamichou,** que DIEU renforce nos liens de fraternité.

### **A ma mère et à ma sœur:**

**Feue Aminata DIARRASSOUBA** et **feue Bintou DIALLO**; arrachées à l'affection de tous, nous ne cessons de prier pour le repos de votre âme, puisse ALLAH le Miséricordieux vous accorde son paradis.

### **A mon père:**

**Abdoulaye DIALLO** pour nous avoir assistés et bercés de bénédictions. Puisse DIEU, le tout Puissant, vous donner une longue vie.

### **A ma mère:**

**Amy DIALLO** pour avoir guidé nos premiers pas. Eloignée géographiquement mais toujours présente dans nos cœurs, que DIEU le Clément t'accorde santé, longévité et bonheur.

# **HOMMAGE AUX MEMBRES DU JURY**

**A notre maître et président du jury**

**Professeur Dapa A DIALLO**

**Professeur titulaire d'hématologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie ;**

**Chef du service d'hématologie-Oncologie au Centre Hospitalier Universitaire du Point-G ;**

**Chef du Laboratoire de Biologie Clinique à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie ;**

**Président de la société Malienne d'hématologie ;**

**Directeur général du Centre de Recherche et de lutte contre la drépanocytose ;**

**Membre correspondant de l'Académie Nationale de Médecine de France.**

Cher maître, nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider le jury de ce travail.

Nous avons admiré vos qualités scientifiques et pédagogiques.

Votre souci du travail bien fait, votre simplicité et votre lutte pour le bien-être de nos populations, font de vous un grand maître digne d'admiration.

C'est immense honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury.

Soyez assuré de notre profonde reconnaissance.

**A notre maître et juge**

**Docteur Bourema KOURIBA**

**Maître Assistant d'Immunologie à la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie ;**

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

**Responsable Assurance qualité du centre National de Transfusion Sanguine du Mali.**

C'est un honneur pour nous d'avoir travaillé à vos côtés, de bénéficier de votre rigueur scientifique, de la valeur de vos connaissances.

Au-delà de votre compétence, votre disponibilité et votre engagement pour un travail bien fait, forcent l'admiration et le respect.

Permettez nous, de vous exprimer notre gratitude et nos remerciements les plus sincères.

**A notre maître et Co- directeur de thèse**

**Docteur Abdoulaye DJIMDE**

**PhD en microbiologie et immunologie ;**

**Chef de l'Unité de Chimiorésistance du Malaria Research and Training Center au DEAP de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie ;**

**Lauréat du prix de la pharmacie francophone;**

**Chevalier de l'ordre national.**

Permettez- nous de vous remercier cher maître de la confiance que vous nous avez faite en nous proposant cette thèse.

Nous avons admiré vos immenses qualités humaines, sociales et scientifiques tout au long de ce travail.

Votre disponibilité constante, simplicité, rigueur, dynamisme et votre compétence élargie font de vous un maître apprécié de tous.

Trouver ici, cher maître l'expression de notre profonde gratitude et de notre indéfectible attachement.

**A notre maître et Directeur de thèse**

**Professeur Ogobara K DOUMBO**

**Professeur Titulaire de Parasitologie- Mycologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto- stomatologie ;**

**Directeur du pôle d'Excellence de Recherche sur le paludisme du Malaria Research and Training Center (MRTC) ;**

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

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

**Chevalier de l'ordre national.**

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

Votre rigueur scientifique, persévérance, patriotisme et votre dévouement constant pour la santé publique font de vous une icône de la recherche.

C'est un honneur pour nous d'être cité parmi vos élèves.

Veillez accepter le témoignage de notre sincère et profonde gratitude.



# TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION	1
II. OBJECTIFS	4
1. Objectif général	4
2. Objectifs spécifiques	4
III. GÉNÉRALITÉS	5
1. Historique du paludisme, apparition de la chimiorésistance	5
2. Epidémiologie et clinique du paludisme	7
2.1. Mode de transmission du paludisme	7
2.2. Cycle biologique du Plasmodium	8
2.3. Physiopathologie	10
2.3.1. Accès palustre simple	10
2.3.2. Neuropaludisme	11
2.4. Manifestations cliniques	12
2.4.1. Primo- infection	12
2.4.2. Accès de reviviscence	13
2.4.3. Paludisme viscéral évolutif	13
2.4.4. La fièvre bilieuse hémoglobinurique	14
2.4.5. Le neuropaludisme et les autres formes graves et compliquées	14
3. Réponses immunitaires contre le paludisme	15
3.1. L'immunité innée ou naturelle	16
3.2. L'immunité acquise	17
3.2.1. Immunité contre les stades sanguins	20
3.2.2. Le rôle des Immunoglobulines G(IgG).	23
3.2.3. Le réseau des cytokines	29
4. Vaccins antipaludiques: pléthore de candidats, petit nombre d'antigènes	33
4.1. Vaccins contre les stades pré-érythrocytaires	34
4.2. Vaccins contre les stades sanguins asexués	36
IV. Méthodologie	39
1. Lieu d'étude	39
1.1. Climat, végétation, faune et sol	41
1.1.1. Le climat	41
1.1.2. La végétation	42
1.1.3. La flore	43
1.1.4. La faune	43
1.1.5. Le sol	44
1.1.6. Relief et hydrographie	44
1.2. Démographie	44
1.3. Habitat	45
1.4. Activités économiques	45
1.5. Organisation administrative	46

1.6. Infrastructures _____	46
2. Type et Période d'étude _____	46
3. Population d'étude _____	47
4. Echantillonnage _____	48
5. Variables mesurées _____	50
6. Matériels et techniques utilisés _____	50
6.1. Prélèvement veineux et séparation du plasma	51
6.2. Dosage des anticorps plasmatiques	52
6.3. Dosage des différentes cytokines	60
7. Analyse des données _____	69
8. Considérations éthiques _____	69
V. RESULTATS _____	70
1. Résultats sociodémographiques _____	70
2. Résultats biologiques _____	73
VI. DISCUSSION _____	86
1. Méthodologie _____	86
1.1. Caractéristiques sociodémographiques de la sous-population. _____	87
1.1.1. Le sexe _____	87
1.1.2. L'âge _____	87
1.2. Caractéristiques parasitologiques et biologiques de la sous-population. _____	88
1.2.1. Caractéristiques parasitologiques _____	88
1.2.2. Les caractéristiques biologiques _____	88
2. Impact du bras de traitement sur les réponses immunitaires _____	89
2.1. Les réponses humorales (protection d'anticorps) _____	89
2.2. Les réponses cellulaires (cytokines Th1/Th2) _____	90
3. Réponses immunitaires naturelles et résistance clinique. _____	90
3.1. Les titres plasmatiques médians d'IgG totaux _____	90
3.2. Les IgG1, IgG2, IgG3 et l'isotype IgM _____	91
3.3. Les cytokines Th1/ Th2 _____	93
VII. CONCLUSION _____	94
VIII. RECOMMANDATION _____	95
BIBLIOGRAPHIE _____	96

# LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

## 1. FIGURES

Figure 1: Cycle du développement de Plasmodium falciparum .....	10
Figure 2: Les points d'impact de l'immunité dans le cycle de développement du paludisme.....	19
Figure 3: Ultrastructure d'un mérozoïte (Cowman 2006) .....	20
Figure 4: Processus d'invasion d'un globule rouge par un mérozoïte .....	22
Figure 5: Schéma de l'Inhibition cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCI).....	28
Figure 6: Carte du Mali montrant le cercle de Sikasso et notre site d'étude.....	40
Figure 7: Relevé pluviométrique du cercle de Sikasso de 2005, 2006 et 2007 .....	42
Figure 8: Représentation schématique de l'échantillonnage.....	49
Figure 9: différentes étapes de l'ELISA.....	56
Figure 10: Exemple de courbe de conversion des densités optiques en concentrations par quatre paramètres logistiques. ....	59
Figure 11: Schéma de base illustrant le principe de la méthode CBA.....	61
Figure 12: Exemple d'histogramme.....	66
Figure 13: Exemple de Courbe Standard (cas du TNF).....	67
Figure 14: Exemple de courbe avec droite de régression (cas du TNF) .....	68

## 2. TABLEAUX

Tableau I: Distribution de la population d'étude par sexe et par bras de traitement.....	70
Tableau II: Distribution de la population d'étude par classe d'âge et par bras de traitement. ....	71
Tableau III: Distribution de la population d'étude par classe d'âge et par groupe étudié.....	72
Tableau IV: Moyenne de la densité parasitaire par bras de traitement au cours du premier épisode. 73	
Tableau V: Distribution de la densité parasitaire à l'inclusion par groupe étudié. ....	74
Tableau VI: Comparaison du nombre médian des globules blancs et du taux médian d'hémoglobine par bras de traitement au cours du premier épisode de paludisme. ....	75
Tableau VII: Comparaison du nombre médian de GB et du taux médian d'hémoglobine par groupe étudié au cours du premier épisode de paludisme.....	76
Tableau VIII: Comparaison des titres d'IgG totaux spécifiques des différents antigènes entre les bras de traitement. ....	77
Tableau IX: Comparaison des médianes des titres d'IgM et d'IgG1, IgG2, IgG3 spécifiques des différents antigènes entre les bras de traitement. ....	78
Tableau X: Comparaison des taux plasmatiques médians des cytokines Th1/Th2 entre les bras de traitement. ....	80
Tableau XI: Comparaison des titres médians d'IgG totaux spécifiques des différents antigènes entre les groupes étudiés.....	81
Tableau XII: Comparaison des titres médians d'IgM, d'IgG1, d'IgG2 et d'IgG3 spécifiques des différents antigènes entre les groupes des sujets étudiés. ....	82
Tableau XIII: Comparaison des taux plasmatiques médians des cytokines Th1/Th2 entre les sujets protégés et les susceptibles. ....	85

# LISTE DES ABREVIATIONS

## A

**Ac:** Anticorp

**ADAMSEL:** Auditable Data Analysis and Management System for ELISA

**ADCC:** Antibody Dependant Cell mediated Cytotoxicity

**ADCI:** Antibody Dependant Cellular Inhibition

**Ag:** Antigène

**AMA-1:** Apical Membrane Protein 1

**An:** Anopheles

**AQ:** Amodiaquine

**AR:** Artemether

**AS:** Artesunate

## C

**CBA:** Cytometric Beads Array

**CD:** Cluster of Differentiation

**CED:** Centre d'Education pour le Développement

**CSA:** Chondroïtine Sulfate A

**CSP:** Circum Sporozoïte Protein

**CTA:** Combinaison Thérapeutique à base d'artémisinine

## D

**DDT:** Dichloro-diphényl-trichloréthane

**DEAP:** Département d'Epidemiologie des Affections Parasitaires

**DNA:** Acide désoxyribonucleïque

## E

**EDTA:** Ethylène Diamine Tétra Acétique

**ELISA:** Enzyme Linked Immunosorbent Assay

**EXP-1:** Exported antigen

## F

**FITC:** Fluoroisothiocyanate

**FPL:** Four Parameter Logistic

**FcyR:** Récepteur du fragment cristallisable de l'immunoglobuline G

## G

**GB:** Globules Blancs

**G6PD:** Glucose 6 Phosphate Déshydrogénase

**GIA:** Growth inhibition Assay

**GLURP:** Glutamate Rich Protein

**GR:** Globule Rouge

## I

**ICAM-1:** Intercellular Adhesion Molecule-1

**Ig:** Immunoglobulin

**IL:** Interleukine

**IL-10:** Interleukine-10

**IL-5:** Interleukine-5

**INF- $\gamma$ :** Interferon- gamma

**IPP:** Institut PasteurParis

## L

**LB:** Lymphocyte B

**LSA-5:** Liver Stage Antigen-5

**LT:** Lymphocyte T

## M

**MRTC:** Malaria Research and Training Center

**MSP:** Merozoite Surface Protein

## N

**NK:** Natural Killer

**NO:** Oxyde nitrique

## O

**OMS:** Organisation Mondiale de la Santé

## P

**P:** Plasmodium

**PerCP:** Peridinin Chlorophyll A Protein

**PfEMP1:** Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1

**PE:** Phycoerythrine

**PNLP:** Programme National de Lutte contre le Paludisme

## S

**SALSA:** Sporozoite and liver stage antigen

**SERP:** Serine Rich protein

**SOP:** Procédure Opératoire Standardisée

**SP:** Sulfadoxine- Pyriméthamine

**s. /:** sens large

**s. s:** sens strict

**STARP:** Sporozoite threonine and asparagine rich protein

## T

**TCGF:** T Cell Growth Factor

**Th1:** T helper 1

**Th2:** T helper 2

**TNF- $\alpha$ :** Tumor Necrosis Factor- alpha

**TRAP:** Thrombospondin-related adhesive protein



# INTRODUCTION

Le Paludisme ou Malaria est une érythrocytopathie fébrile hémolysante, causée par le développement et la multiplication d'abord dans le foie puis dans les globules rouges d'un hématozoaire du genre *Plasmodium*, transmis à l'Homme par la piqûre infectante d'un moustique femelle du genre *Anopheles*. Cependant il existe d'autres voies de contamination telles que la voie sanguine (transfusion sanguine) et placentaire[19,29].

Quatre espèces sont inféodées à l'Homme: *Plasmodium falciparum* (Pf), *P. malariae* (Pm), *P. ovale* (Po), *P. vivax* (Pv). Cependant une espèce simienne *P. knowlesi* (Pk) a été récemment décrite comme pouvant infecter l'homme[17]. *P. falciparum* est l'espèce la plus redoutable et la plus intensément implantée en Afrique au Sud du Sahara[18].

En ce XXI<sup>ème</sup> siècle, le paludisme reste la maladie parasitaire la plus répandue dans le monde et constitue un problème majeur de santé publique dans les pays d'endémie. Approximativement 3,3 milliards de personnes sont affectées par *Plasmodium falciparum* dans 109 pays endémiques dont 45 en Afrique, avec 247 millions de cas cliniques dans le monde dont 212 millions soit 86% de cas en Afrique au Sud du Sahara. La mortalité liée à la maladie était de 881 000 personnes par an dont 91% en Afrique et 85% sont survenus chez les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes[106]. L'Afrique est le continent le plus touché, avec 30% des admissions hospitalières en pédiatrie et 40%

des consultations au dispensaire ont pour cause le paludisme[79].

Au Mali le paludisme est la première cause de mortalité (13%) et de morbidité (15%). Elle est la deuxième cause de maladie fébrile en milieu hospitalier et la première cause de convulsion fébrile (49,07%) en pédiatrie (PNLP 2006).

L'apparition et la propagation des souches plasmodiales résistantes aux antipaludiques existants ont fortement handicapé le contrôle de la maladie en Afrique. Ceci a eu comme conséquence un changement de traitement du paludisme par l'utilisation des combinaisons thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTAs) dans les pays d'endémie.

Les enfants de moins de cinq ans constituent la population la plus vulnérable car ne possédant pas de prémunition. Les dérivés de l'artémisinine associés à une autre molécule qui a une longue demi-vie produisent un effet prophylactique à long terme qui pourrait influencer l'immunité de l'hôte vis-à-vis du paludisme[26]. En effet dans le model animal il a été démontré que les dérivés de l'artémisinine améliorent les réponses immunitaires à médiation lymphocytaires T chez les souris normales et accélèrent l'immunoreconstitution chez les souris ayant bénéficié d'une greffe de moelle osseuse syngénique[108]. Le rôle protecteur des anticorps spécifiques d'antigènes du stade sanguin contre le paludisme a été démontré par le transfert *in vivo* des anticorps d'adultes africains protégés à des individus non-immuns infectés par *P. falciparum*[15,25]. Plusieurs décennies après ces expériences pilotes, les marqueurs qui corrélient avec la résistance contre le paludisme sont toujours mal connus.



Les combinaisons AS- AQ et AR- L sont retenues par le Programme National de lutte contre le Paludisme(PNLP) dans la prise en charge du paludisme au Mali. Une étude a montré qu'un enfant en zone d'endémie au Mali fait en moyenne deux à trois épisodes de paludisme par saison. Certains enfants font jusqu'à six épisodes par année[97]. L'impact de l'administration répétée des CTAs du programme sur la réponse immune naturelle n'est pas connu.

Nous avons entrepris cette étude dans le but de déterminer l'impact des CTAs du PNLP sur l'immunité naturelle anti-palustre.

# I. OBJECTIFS

## 1. Objectif général

Déterminer l'impact de l'administration répétée de trois combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine sur les réponses immunitaires naturelles anti-palustres dans une population âgée de plus de six mois, vivant en zone d'endémie à Bougoula-Hameau, Mali.

## 2. Objectifs spécifiques

- Mesurer l'impact de trois CTAs sur les titres d'anticorps spécifiques d'antigènes du *Plasmodium* et les taux plasmatiques des cytokines de type Th1/Th2.
- Comparer les titres plasmatiques d'IgG totaux, IgM et des IgG1, IgG2, IgG3 spécifiques d'antigènes du *Plasmodium* entre les sujets protégés et ceux susceptibles.
- Evaluer les taux plasmatiques des cytokines Th1/Th2 chez les sujets susceptibles et ceux protégés.

## II. GÉNÉRALITÉS

### 1. Historique du paludisme, apparition de la chimiorésistance

Historiquement, le paludisme est une maladie très ancienne. En 3000 avant JC, les Egyptiens en souffraient et en mourraient déjà. Cette certitude est issue de la découverte de Plasmodies dans des momies[74]. A peu près à la même époque, soit à partir de 2700 avant JC, des cas d'accès palustres sont décrits en Chine. Cette maladie étant déjà à l'époque un mal familial, le paludisme a sa place dans la mythologie chinoise. Il y est représenté sous la forme de trois démons armés respectivement de marteau, brasero et marmite d'eau froide, illustrant les céphalées, fièvres et frissons[30].

Cependant, bien que les hommes souffrent du paludisme depuis si longtemps, il faudra attendre l'année 1630 pour voir apparaître le premier traitement à base d'écorce de Quinquina découvert par Don Francisco Lopez. Deux siècles seront encore nécessaires pour que les pharmaciens J. Pelletier et J.B. Caventou parviennent à isoler le principe actif: la quinine. A partir de cette époque, les recherches s'accélérent et l'agent pathogène est découvert par Alphonse Laveran en 1880[63]. En 1897, les moustiques *Anopheles* sont reconnus comme étant les vecteurs de la maladie et en 1922, les quatre *Plasmodiums* (*P*) infectant l'Homme sont enfin tous décrits. Il faudra alors près de 60

ans pour comprendre entièrement le cycle parasitaire et ses caractéristiques. La chloroquine et l'amodiaquine, deux antipaludiques de synthèse très utilisés, font leur apparition en 1944. Malheureusement, dès 1960, des souches de *P. falciparum* résistantes à la chloroquine sont découvertes sur deux continents (Asie et Amérique du Sud). Ces chimiorésistances apparaissent simultanément avec des résistances des anophèles à l'usage du DDT (Dichlorodiphényl-trichloréthane), utilisé depuis 1948.

L'ère des chimiorésistances du vecteur et du parasite venait de débiter. Elle ne cessera de s'étendre, au point de rendre la lutte contre le paludisme de plus en plus difficile, les traitements perdant leur efficacité. L'extension rapide de la chimiorésistance s'explique, entre autre, par une forte capacité de mutation génétique du parasite, propriété intrinsèque de *P. falciparum*[72]. Mais également par des traitements mal administrés. Ceux-ci sont bien souvent trop courts; arrêtés par le patient pour diverses raisons ; ou sous dosés ; mauvaise prescription ou médicaments contrefaits[104].

En 1976, la science progresse grâce à W. Trager et J.B. Jensen qui mettent au point la culture in vitro de *P. falciparum*[99]. Cette importante avancée ouvre la voie aux approches moléculaires et immunologiques. Elle permet ainsi de faciliter l'étude de nouvelles molécules antipaludiques et d'avancer vers la mise au point d'un vaccin.

L'apparition sur le marché des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine a apporté un regain d'espoir dans le cadre de la chimiothérapie antipaludique.

Actuellement, un volet important dans la lutte antipaludique est l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides. Elles permettent de réduire le taux d'inoculation, donc l'incidence des fièvres, et diminuent ainsi la mortalité et la morbidité[70].

Enfin, des études cliniques au Sénégal montrent l'intérêt d'un traitement intermittent préventif chez les jeunes enfants pendant la saison de transmission[23]. Au Mali, la même stratégie a permis de réduire le taux d'incidence annuel du paludisme clinique de 42,5% dans une région de transmission intense. Cette stratégie est probablement l'une des plus efficaces dans la réduction du poids de la malaria dans certaines régions[31].

## **2. Epidémiologie et clinique du paludisme**

### **2.1. Mode de transmission du paludisme**

Le paludisme est une parasitose due à des hématozoaires du genre *Plasmodium* transmis par la piqûre des moustiques femelles du genre *Anopheles* (An).

Sur les 400 espèces et sous espèces d'Anophèles recensées, 35 sont considérées comme des vecteurs potentiels du paludisme humain, dont notamment *An. gambiae s.l.* et *An. funestus* qui sont les plus couramment rencontrées au Mali. *An. gambiae s.l.* est composé d'*An. Arabiensis* et trois formes chromosomiques d'*An. gambiae s.s* dénommées «Bamako», «Mopti» et «Savanna»[98] et deux formes moléculaires (M et S)[38]. Pour ce qui est des *Plasmodium*, 123 espèces ont été répertoriées. Elles ont toutes une grande spécificité

d'hôte et des cycles biologiques similaires bien que non identiques. Sur les quatre espèces spécifiques de l'Homme, certains africains ne possédant pas l'antigène Duffy sont généralement résistants à l'infection par *P. vivax*[73]. Aussi, ce parasite n'est que très peu, voire pas, observé en Afrique au Sud du Sahara. L'espèce la plus meurtrière *P.falciparum* est la plus représentée au Mali et dans de nombreuses parties du globe.

## **2.2. Cycle biologique du Plasmodium**

Dans la nature le *Plasmodium* a deux hôtes : Le moustique femelle du genre *Anopheles* chez lequel se déroule le cycle sexué sporogonique et l'hôte vertébré chez qui se déroule le cycle asexué schizogonique. Le cycle de vie du parasite comporte plusieurs étapes au cours desquelles différents antigènes sont exprimés et entraînent une réponse immunitaire spécifique de stade[55].

Le cycle peut ainsi être résumé en trois étapes:

### **➤ Le cycle pré-érythrocytaire**

Le sporozoïte, forme infectante du parasite est injecté à l'homme avec la salive du moustique lors de son repas sanguin. A travers la circulation sanguine, les sporozoïtes gagnent rapidement le foie, pénètrent les hépatocytes. Dans ces cellules, chaque sporozoïte se développe et donne un schizonte. A maturité le schizonte appelé corps bleu éclate et libère environ 20.000 à 30.000 mérozoïtes dans la circulation sanguine[28] (figure1).

### ➤ **Le cycle érythrocytaire**

Une fois dans la circulation sanguine les mérozoïtes pénètrent activement dans les érythrocytes, où ils se transforment en trophozoïtes. La réplication de l'ADN et la multiplication des noyaux dont chacun s'entoure d'une plage cytoplasmique donnera naissance à un schizonte ou corps en rosace[66]. A maturité le schizonte éclate et libère les mérozoïtes qui vont suivre immédiatement un cycle d'invasion des érythrocytes (figure1).

### ➤ **Le cycle sexué**

Après plusieurs cycles asexués schizogoniques, certains mérozoïtes érythrocytaires se différencient en élément à potentiel sexuel, les gamétocytes mâles et femelles. En prenant son repas sanguin sur un sujet infesté, le moustique absorbe les différents stades du parasite. Les éléments asexués sont digérés. Les gamétocytes femelles se transforment en macrogamètes. La microgametogenèse transforme le gamétocyte mâle en microgamète par exflagellation et division nucléaire[28]. La fécondation donne naissance à un zygote puis l'ookinète, œuf mobile qui traverse la paroi de l'estomac, formant à l'extérieur de la surface externe, l'oocyste dans lequel s'individualisent les sporozoïtes libérés par l'éclatement de l'oocyste mur. Les sporozoïtes gagneront avec prédilection les glandes salivaires de l'anophèle, qui les injecte à l'homme à l'occasion d'un repas sanguin (figure1).

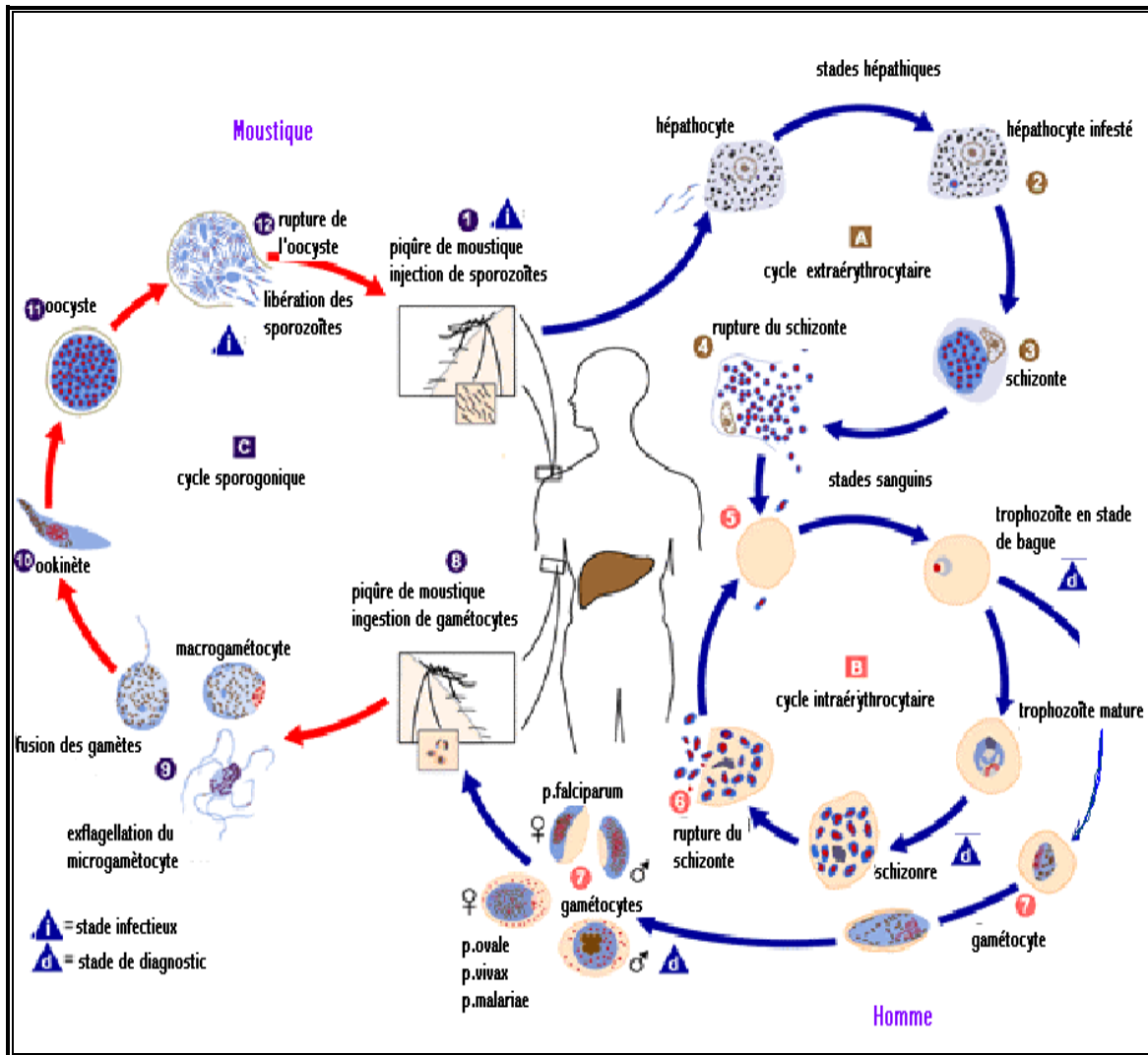


Figure 1: Cycle du développement de *Plasmodium falciparum* (Source: [http:// www.dpd.cdc.gov/dpdx](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx)).

## 2.3. Physiopathologie

### 2.3.1. Accès palustre simple:[69]

Lors de l'éclatement des hématies parasitées, les pigments malariques appelés hémozoïnes sont libérés. Ils agissent sur le centre bulbaire de la thermorégulation provoquant



ainsi la fièvre quand la densité parasitaire atteint un certain seuil. Lorsque chez le malade le cycle endoérythrocytaire de *P.falciparum* se synchronise progressivement, la libération des pigments malariques est régulièrement répétée, ce phénomène confère ainsi à l'accès palustre sa périodicité. L'hépatomégalie et la splénomégalie surviennent suite à une hyperactivité du système des phagocytes mononuclés chargés de débarrasser l'organisme des pigments malariques et des débris érythrocytaires. L'hémolyse de ces érythrocytes parasités est l'une des causes de l'anémie palustre.

### **2.3.2. Neuropaludisme**

La séquestration des formes matures de *P.falciparum* au niveau du cerveau et d'autres organes tels que le cœur, les poumons, les reins, la rate et le placenta[64], explique en partie la gravité du paludisme. Ce phénomène est du à la cytoadhérence des globules rouges parasités. Cette séquestration implique les ligands parasitaires dont le plus caractérisé est le PfEMP1 (*Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein1). Cette protéine exprimée à la membrane du globule rouge infecté est un antigène variant. Les gènes qui codent pour cette protéine sont responsables de la variation antigénique de PfEMP1. Il existe de nombreux récepteurs tissulaires pour ce ligand dont la thrombospondine (TSP), le CD36, l'ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) mais aussi la CSA (Chondroïtine sulfate A) au niveau du placenta. L'expression de ces récepteurs est amplifiée par certaines cytokines dont le TNF- $\alpha$  et l'INF- $\gamma$ , contribuant ainsi à

augmenter la séquestration des globules rouges parasités. Cependant d'autres hypothèses ont été évoquées:

- La formation de rosettes qui consiste en l'adhésion de plusieurs globules rouges sains autour d'un globule rouge parasité.
- L'augmentation de la perméabilité de la barrière méningée entraînant une fuite du liquide céphalorachidien et un œdème cérébral.
- La coagulation intra vasculaire disséminée.
- Les phénomènes immunopathologiques avec dépôt de complexes immuns.

Quelque soit le mécanisme, le ralentissement du flux capillaire intracérébral ou l'obstruction des capillaires provoque l'anoxie, voire tardivement une ischémie, responsable d'une hémorragie péri-vasculaire et des lésions de la substance blanche qui ne sont pas sans séquelles.

## **2.4. Manifestations cliniques:[69]**

Elles sont la résultante de l'interaction hôte parasite. On distingue cinq formes cliniques.

### **2.4.1. Primo- infection**

La symptomatologie correspond à une fièvre d'allure isolée. La fièvre débute brutalement, souvent élevée mais de degré variable, avec frissons, sueurs, céphalées et courbatures, associés souvent à de petits troubles digestifs à type « d'embarras gastrique » (nausée, vomissement et/ou de

diarrhée). Les signes traduisant l'hémolyse apparaissent souvent de façon différée : pâleur, sub-ictère, hépatosplénomégalie.

#### **2.4.2. Accès de reviviscence**

Il s'observe avec l'acquisition d'un certain degré d'immunité et correspond aux crises schizogoniques toutes les 48 heures (*P. falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax*) 72 heures (*P. malariae*). Caractérisés par : un grand frisson inaugural, une fièvre à 40°C durant quelques heures puis de sueurs profuses ; les crises se succèdent toutes les 48 heures (fièvre tierce) ou 72 heures (fièvre quarte) selon l'espèce en cause. La périodicité manque souvent en raison d'un poly parasitisme. Seule la fièvre tierce à *Plasmodium falciparum* est susceptible d'évoluer vers un paludisme cérébral.

#### **2.4.3. Paludisme viscéral évolutif**

Ce paludisme concerne plutôt les enfants qui peinent, au cours des années, à acquérir leurs prémunitions. La splénomégalie en est le signe majeur associée à une hépatomégalie. Les signes généraux (fébricule intermittente, asthénie, amaigrissement) et d'hémolyse (pâleur, ictère) sont très variables, allant d'une forme pauci symptomatique à une forme qui pourrait se confondre avec une leucémie.

#### **2.4.4. La fièvre bilieuse hémoglobinurique**

Le début est brutal avec une hémolyse intra vasculaire chez le patient précédemment soumis à une chimioprophylaxie aux sels de quinine. La symptomatologie est essentiellement rénale et algique. La douleur est très intense en barre autour de la ceinture pelvienne. Les rares urines émises sont particulièrement rouges et foncées. Cette forme nécessite une réanimation.

#### **2.4.5. Le neuropaludisme et les autres formes graves et compliquées**

C'est le paludisme des sujets non immun (nourrisson, femme enceinte, enfant, les migrants venant d'une zone non impaludée). Ces formes sont l'apanage de Plasmodium falciparum et sans traitement ils peuvent conduire à la mort dans 72 heures.

L'OMS a établi des critères qui, isolés ou associés, font poser le diagnostic de paludisme sévère et permettent une meilleure prise en charge

- Neuropaludisme: Score de Blantyre  $\leq 2$  ou score de Glasgow  $\leq 9$
- Troubles de la conscience : Score de Blantyre  $< 5$  et  $> 2$  ou score de Glasgow  $< 15$  ou  $> 9$
- Convulsions répétées  $>1$  /24 heures
- Prostration : extrême faiblesse (incapacité de se tenir droit)
- Vomissements itératifs

- Syndrome de détresse respiratoire
- Ictère clinique
- Acidose métabolique: bicarbonates plasmatiques <15 mmol/L
- Lactatémie  $\geq 5$  mmol/L
- Anémie grave (Hb < 5g/dl, Ht <15%)
- Hyperparasitémie  $\geq 4\%$  chez le sujet non immun, ou  $\geq 20\%$  chez le sujet immun
- Hypoglycémie (glycémie < 2,2 mmol/L)
- Hémoglobinurie macroscopique
- Insuffisance rénale: diurèse < 400 ml/ 24h ou créatinémie > 265 $\mu$ M chez l'adulte ; diurèse < 12 ml/ kg/ 24h ou créatinémie élevée pour l'âge chez l'enfant
- Collapsus circulatoire: Tension Artérielle Systolique < 50 mmHg avant 5 ans, TAS < 80 mmHg après 5 ans.
- Hémorragie anormale
- Œdème pulmonaire (radiologique)

### **3. Réponses immunitaires contre le paludisme**

L'infection palustre, engendre des réponses immunitaires de l'hôte. Ces réponses immunes comportent une composante innée ou non spécifique et une composante acquise ou spécifique. Ces deux types d'immunité agissent de façon complémentaire. L'immunité innée est activée dès le début de l'infection et oriente le développement de l'immunité « acquise » qui est opérationnelle dans les jours qui suivent l'infection. L'immunité acquise, est spécifique des stades de développement du parasite et d'espèces

parasitaires. Cette immunité antipalustre est en générale partiellement protectrice.

### **3.1. L'immunité innée ou naturelle**

L'immunité innée est la première ligne de défense de l'organisme. Elle se traduit chez l'homme par un état réfractaire au parasite dès le premier contact. Les mécanismes qui déterminent cette résistance sont variés. Cependant les plus étudiés sont ceux qui peuvent affecter la capacité du parasite à envahir les érythrocytes ou inhiber son développement intra-érythrocytaire. Cette résistance peut résulter soit de la présence chez l'homme d'une substance non propice au développement du parasite (hémoglobine anormale, déficit en G6PD, soit de l'absence de récepteurs impliqués dans la pénétration du parasite dans la cellule hôte (ex: Antigène Duffy pour *P. vivax*)[38]. L'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes nécessite leur adhérence par l'intermédiaire des récepteurs ou des antigènes spécifiques. La déformation des globules rouge lors de la pénétration du mérozoïte est un facteur important de résistance innée. Les principaux facteurs intra érythrocytaires de résistance innée chez l'homme sont d'origine génétique et concernent les déficits enzymatiques, notamment le déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), des modifications structurales de l'hémoglobine (hémoglobine S, C, E) ou des déficits quantitatifs dans la synthèse des chaînes de l'hémoglobine (thalassémies)[3,41,75,103]. Les études cas témoins réalisées en Gambie et au Kenya ont montré que le polymorphisme G6PD-A était associé à une réduction d'environ 50% du risque de développer un paludisme sévère

chez les femmes hétérozygotes et les hommes hémizygotés[83]. Une autre étude conduite au Mali trouvait que le polymorphisme G6PD-A était sous forte sélection naturelle en Afrique et qu'il procurait une protection préférentielle contre le paludisme grave aux hommes hémizygotés mais non aux femmes hétérozygotes[47].

Une étude a confirmé l'effet protecteur de l' $\alpha^+$  thalassémie à l'état homozygote chez des enfants vivant en Papouasie Nouvelle Guinée, une région où cette hémoglobinose touche 90 % de la population[2]. L'hémoglobine S est faiblement représentée chez certaines populations, notamment les Mandingues de Guinée et du Mali où l'hémoglobine C est dominante [89]. Une étude suggère que les deux HbC et HbS pourraient promouvoir le développement précoce de l'immunité naturellement acquise contre le paludisme[39]. Dans une autre étude l'HbC était associée à une protection, uniquement contre les formes graves, chez les dogons du Mali[8].

### **3.2. L'immunité acquise**

En zone d'endémie l'immunité contre le paludisme se développe avec l'âge et l'exposition. Cette immunité dite de prémunition est protectrice contre les accès mais elle est non stérilisante. Dans les régions de transmission intense du paludisme, cette immunité se développe plus rapidement. Cette «prémunition», définie en 1924 est lente à s'acquérir et dépend d'une pression constante du parasite[85]. Elle permet une protection clinique contre le développement des formes graves de la maladie et maintient

la parasitémie à un faible niveau permettant le portage asymptomatique[71]. Une étude parue en 1999 indique que dans les zones de fortes endémies, l'immunité protectrice contre les accès graves non cérébraux apparaît dès la première ou deuxième infection[48]. Celle-ci s'instaure donc rapidement contre les formes graves mais plus lentement contre les accès simples. En plus de son acquisition lente, son maintien nécessite des piqûres infectantes régulières[36]. A cela s'ajoute une spécificité d'espèce; il n'existe pas d'immunité croisée entre les différentes espèces plasmodiales, ni une spécificité de stade (figure 2).



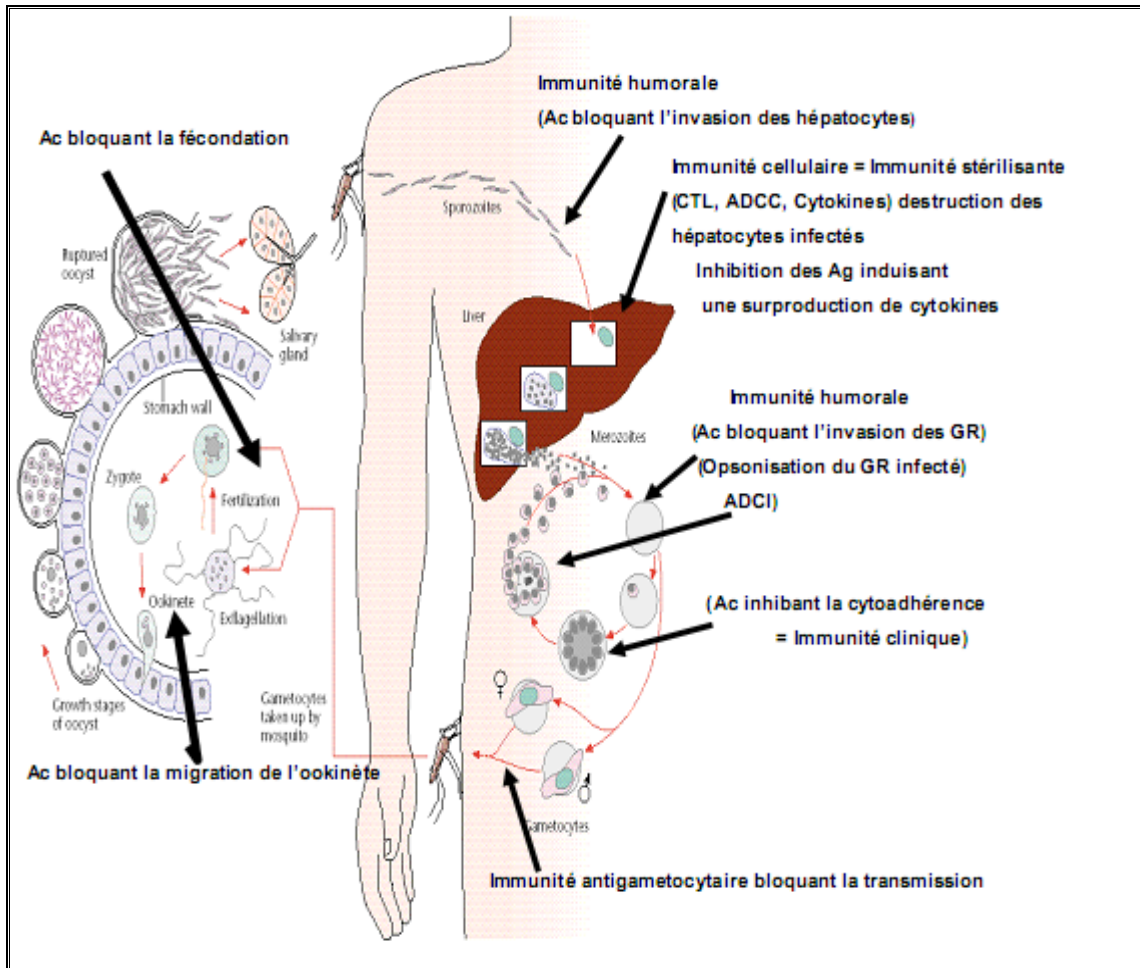


Figure 2: Les points d'impact de l'immunité dans le cycle de développement du paludisme.

Ac: Anticorps; Ag: Antigène; CTL: Cytotoxic T Lymphocyte; ADCC: Antibody Dependant Cell mediated Cytotoxicity; ADCI: Antibody Dependant Cellular Inhibition; GR: Globule Rouge).

Source: (Adapté de Sherman I W, Encyclopedia of life science © 2001 Nature Publishing Group.

### 3.2.1. Immunité contre les stades sanguins

L'immunité contre les stades sanguins est complexe car régie par de multiples mécanismes complémentaires. Leurs cibles sont le mérozoïte et les différents stades intraérythrocytaires. Le mérozoïte est la forme libre du parasite et infectant le globule rouge. C'est une petite cellule polarisée de forme ovoïde de 1,5  $\mu\text{m}$  de long et 1  $\mu\text{m}$  de large. Malgré sa petite taille, c'est une cellule très complexe (figure3) qui contient de nombreux organites apicaux impliqués dans le phénomène d'invasion : ce sont les rhoptries, les micronèmes et les granules denses.

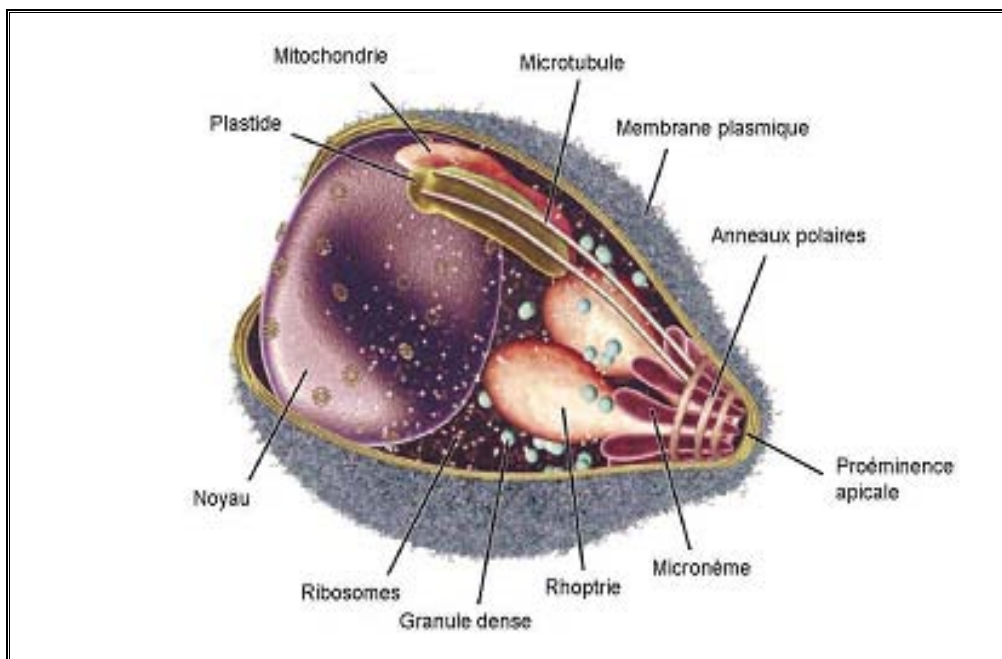
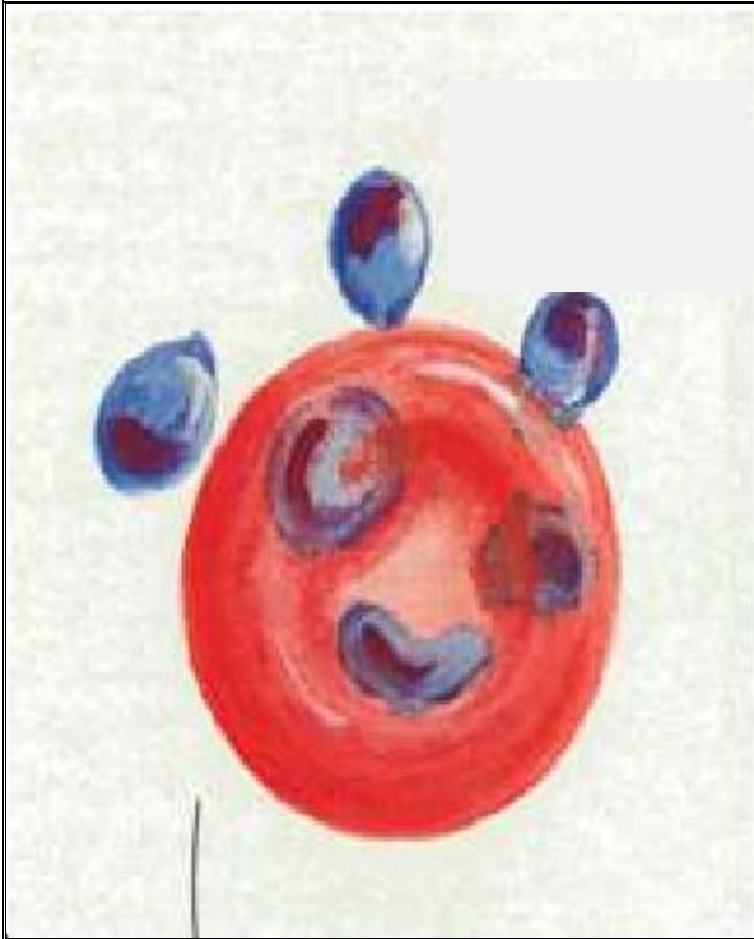


Figure 3: Ultrastructure d'un mérozoïte (Cowman 2006)

Le contact initial entre le mérozoïte et le GR est une étape cruciale, réversible et de faible affinité. Le parasite pourrait ainsi « choisir » le GR le plus apte à l'accueillir. Ses critères de sélection sont à l'heure actuelle encore mal définis mais il semblerait que le *Plasmodium* soit sensible : i) à l'âge des GR, ii) à l'état de phosphorylation du squelette érythrocytaire, iii) au taux d'ATP intra-érythrocytaire, indispensable à l'invasion, iv) à un facteur cytosolique de nature protéique[45]. Dans cette étape de contact initial, le mérozoïte peut se fixer au GR à partir de n'importe quel point de sa surface. Par la suite, il est capable de se redresser afin que sa proéminence apicale soit en contact avec le GR. Ce contact est indispensable à l'invasion et permet une meilleure accroche : la « jonction serrée ». Le parasite est alors partiellement internalisé et le contenu des rhoptries est libéré pour former la vacuole parasitophore. Cette dernière procurera un environnement favorable au développement du parasite. Les granules denses sont ensuite libérées dans la vacuole et le mérozoïte s'internalise totalement[27]. Ce processus d'invasion schématisé à la figure4, dure moins d'une trentaine de secondes.



**Figure 4: Processus d'invasion d'un globule rouge par un mérozoïte**

L'internalisation du mérozoïte implique donc un processus complexe : reconnaissance, réorientation, formation de la jonction serrée et de la vacuole parasitophore. Toutes ces étapes impliquent de nombreuses protéines parasitaires. Elles ont été et sont encore beaucoup étudiées afin de

sélectionner les plus importantes pour réaliser des candidats vaccins.

### **3.2.2. Le rôle des Immunoglobulines G(IgG).**

Depuis les premiers travaux de transfert d'immunité passive réalisés chez le singe par Coggeshall et Kumm, le rôle des immunoglobulines dans l'immunité antipalustre a fait l'objet de nombreuses études chez l'homme, comme dans les modèles animaux[24]. Ces études soulignent l'importance des IgG *in vivo* dans la protection contre les *Plasmodium*, et proposent différents mécanismes impliquant les IgG *in vitro* dans l'élimination du parasite, ou l'inhibition de sa croissance. Ces observations incitent donc à étudier le rôle des sous-classes d'IgG, dont les différentes propriétés fonctionnelles peuvent avoir une influence sur le contrôle de l'infection et de la maladie.

#### **➤ Le rôle des IgG *in vivo***

Les expériences de transfert passif d'immunité réalisées chez l'homme soulignent le rôle central des immunoglobulines, et en particulier celui des IgG, dans les mécanismes de protection contre l'infection par les *Plasmodium*. L'injection d'IgG purifiés d'individus Africains vivant en zone endémique, à des enfants Thaïlandais souffrant d'accès palustre, entraîne une diminution de la charge parasitaire sanguine, et une amélioration de leur état clinique, en provoquant la disparition de la fièvre[15,25]. La protection induite par

les IgG est donc efficace, non seulement contre les souches africaines, mais aussi contre les souches d'origines asiatiques, et cela malgré la diversité antigénique généralement observée entre des souches de parasites éloignées géographiquement. Ces résultats suggèrent que les cibles des IgG protecteurs soient des épitopes conservés entre les souches africaines et les souches asiatiques, et probablement entre toutes les souches de *P. falciparum*.

Cette protection semble néanmoins restreinte à une protection contre l'infection et contre les accès palustres simples. En effet, l'injection d'IgG d'individus immuns, à des enfants atteints de neuropaludisme, n'a pas permis de mettre en évidence un rôle protecteur des IgG contre les formes sévères de paludisme[93]. L'échec de cette immunothérapie peut être lié à l'injection trop tardive d'IgG, à des enfants chez qui les processus physiopathologiques du neuropaludisme étaient déjà déclenchés (cytoadhérence, production de TNF- $\alpha$ ). Les IgG préviendraient alors le risque d'accès palustres en participant au contrôle de la charge parasitaire sanguine, et en neutralisant les toxines libérées lors de la rupture des globules rouges.

*In vivo*, les mécanismes protecteurs impliquant les IgG dans le contrôle de la parasitémie sont encore mal connus car difficiles à étudier. Les études *in vitro* sont ici d'une aide précieuse, et ont permis de décrire différents mécanismes capables d'éliminer ou d'inhiber la croissance intra-érythrocytaire du parasite mesurée par l'essai GIA (Growth Inhibition Assay) dépendant uniquement des IgG[32].

### ➤ **Le rôle des IgG *in vitro***

Les IgG agissent sur les stades érythrocytaires en inhibant l'invasion des globules rouges par les mérozoïtes, la croissance des mérozoïtes, la lyse complément dépendante des globules rouges infectés[61] et en facilitant leur phagocytose[68]. Cette capacité des IgG vis à vis des globules rouges infectés a été associée à la protection clinique en zone d'endémie[67].

Outre leurs activités antiparasitaires, les IgG semblent impliquées dans les mécanismes de protection clinique en neutralisant *in vitro* les toxines produites par le *Plasmodium*, en inhibant l'adhésion des globules rouges infectés aux cellules endothéliales et aux leucocytes (monocytes, lignée monocyttaire)[43]. De même, les IgG inhibent la formation de rosettes par les globules rouges infectés[46], et cette capacité d'inhiber la formation des rosettes *in vitro* est associée à la protection clinique *in vivo*. Enfin, les IgG agissent sur la gamétocytogénèse en induisant l'agglutination et la lyse des gamétocytes par le complément et en inhibant la transmission des gamétocytes aux Anophèles[49].

### ➤ **Le rôle des sous-classes d'IgG *in vitro***

Les sous-classes d'IgG, bien qu'apparentées, sont en effet très hétérogènes de part leurs concentrations, leurs structures, mais aussi et surtout de part leurs fonctions ; et certaines études *in vitro* ont démontré l'importance des sous-classes d'IgG cytophiles dans les mécanismes dirigés contre les *Plasmodium*. Chez l'Homme, les IgG1 et les IgG3 sont capables d'induire l'opsonisation des globules rouges

infectés. De plus, ces sous-classes sont prépondérantes dans les préparations d'IgG capables d'induire l'ADCI et la protection *in vivo* par injection passive. Inversement, les IgG2 et les IgG4 ont un effet inhibiteur sur l'opsonisation ou sont prépondérants dans les préparations d'IgG inhibant l'ADCI. Ainsi, les observations *in vitro* suggèrent que les IgG cytophiles seraient associées aux mécanismes de protection contre les *Plasmodium*, ces mécanismes dépendant d'une étroite coopération entre ces IgG cytophiles et les cellules effectrices, par l'intermédiaire des récepteurs Fc $\alpha$ R. A l'inverse, les IgG non-cytophiles auraient un effet inhibiteur et seraient donc associées à la susceptibilité accrue vis-à-vis de l'infection et de la maladie [16,67].

➤ **Le rôle des sous-classes d'IgG dans la protection contre Plasmodium**

En zone d'endémie, les études immuno-épidémiologiques ont rapporté des résultats qui, pour la plupart, sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle les IgG1 et les IgG3 seraient protectrices contre le paludisme et qu'au contraire les IgG2 et les IgG4 auraient un effet bloquant sur les mécanismes de protection. L'un des arguments majeurs en faveur de l'importance des isotypes cytophiles dans la protection contre le paludisme a été apporté par une série d'expériences réalisées par Druilhe et collaborateurs.

Ces auteurs ont en effet démontré que l'injection d'IgG d'individus «protégés», à des enfants atteints d'accès de paludisme, entraînait une diminution de la parasitémie et une amélioration des signes cliniques[15]. De plus, ces IgG purifiées induisent l'ADCI *in vitro*, et sont majoritairement constituées d'IgG1 et d'IgG3[46].



➤ **Mécanisme de protection dépendant des IgG et des cellules effectrices**

De nombreuses études réalisées *in vitro* ont démontré que des cellules effectrices comme les monocytes/macrophages ou les neutrophiles, étaient capables, en association avec les IgG spécifiques, d'éliminer les stades sanguins du parasite ou d'inhiber leur prolifération.

En effet, les monocytes d'humains sont capables de phagocyter et d'éliminer les mérozoïtes et les globules rouges infectés, en présence de sérums d'individus immuns ou d'IgG purifiées à partir de ces sérums[59]. Une étude similaire réalisée sur des cultures de *P. falciparum in vitro*, a mis en évidence un mécanisme original faisant intervenir les monocytes et les IgG spécifiques[15]. Ce mécanisme nommé ADCI (*Antibody Dependant Cellular Inhibition*) par analogie avec l'ADCC (*Antibody Dependant Cell Cytotoxicity*) se distingue par le fait qu'il n'induit pas uniquement la lyse des globules rouges parasités, mais aussi une inhibition de la croissance du parasite, partiellement réversible lorsque ceux-ci sont remis en culture sans monocyte ni IgG (figure 5).

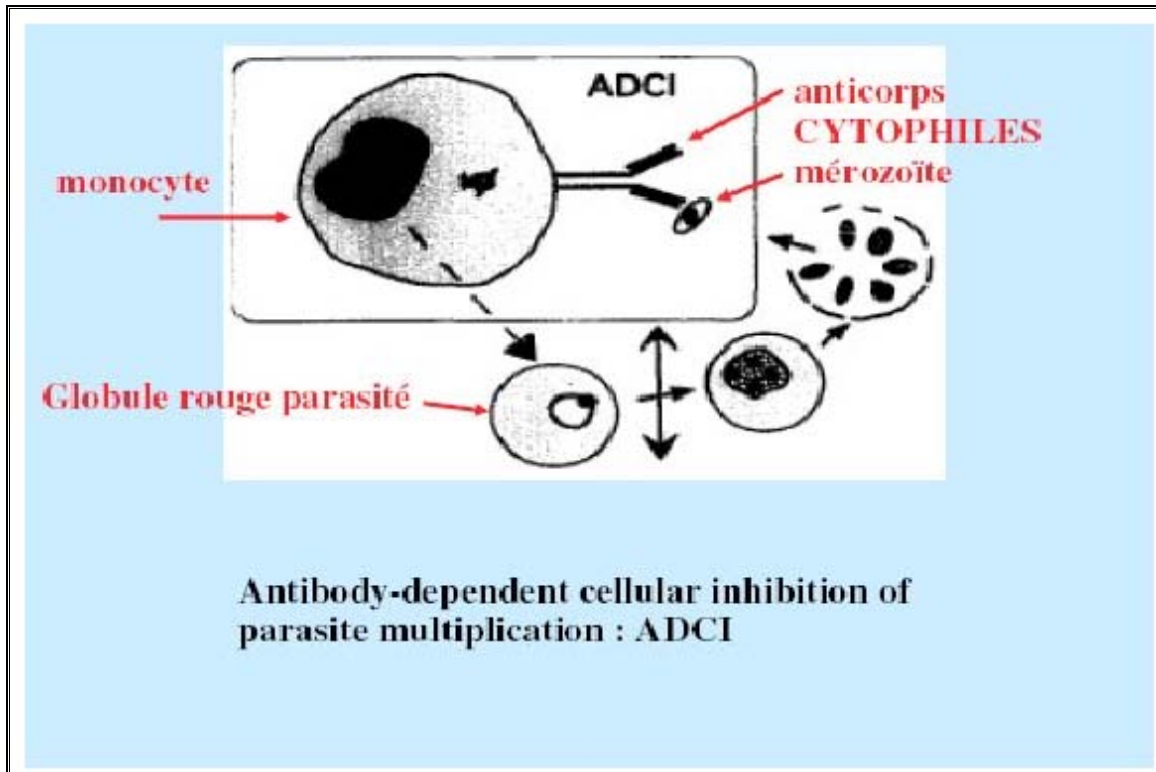


Figure 5: Schéma de l'Inhibition cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCI)

Source: Jean-Louis Pérignon, Unité de Parasitologie Biomédicale, Pierre Druilhe, Institut Pasteur, Paris ReMeD Paris, 3 novembre 2008.

Par la suite, d'autres études ont démontré que l'ADCI avait pour cible principale des antigènes des mérozoïtes comme MSP-3[80], ou GLURP[94], et qu'elle était médiée par des facteurs solubles comme le  $TNF-\alpha$ , l' $IFN-\gamma$  ou l'oxyde nitrique(NO) sécrétés par les monocytes activés[16].

### 3.2.3. Le réseau des cytokines

L'immunité protectrice anti-paludisme est mise en œuvre par les activités cellulaires telles que la production des anticorps, la phagocytose, la cytotoxicité cellulaire et l'inhibition des parasites exercée par les lymphocytes, les neutrophiles et les phagocytes mononucléaires. Toutefois, certaines de ces activités cellulaires peuvent aussi endommager des tissus, et le cours de l'infection est hautement dépendant de la balance entre les cytokines secrétées par diverses cellules activées[101].

#### ➤ Interleukine 1

Décrite pour la première fois par Gery et Waskman en 1971, l'IL-1 est surtout produite par les macrophages mais aussi par d'autres cellules : LB, LT et cellules endothéliales. On distingue dans la famille de l'IL-1 : IL-1 $\beta$ , l'IL-1 $\alpha$  et l'IL-1ra (antagoniste du récepteur de l'IL-1)[11]. Ces trois protéines sont codées par des gènes très proches les uns des autres situés sur le chromosome 2. L'IL-1 est une cytokine pro-inflammatoire et ses effets sont assez semblables à ceux du TNF. Elle favorise la production d'autres facteurs hématopoïétiques, notamment l'IL-6[78]. Elle est impliquée dans la différenciation et la croissance des lymphocytes T et B et joue ainsi un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire spécifique.

#### ➤ Interleukine 2

Initialement appelée '*Facteur de croissance des lymphocytes T*' (TCGF), elle est l'une des premières interleukines à avoir été caractérisée. Elle appartient à

la grande famille des hématopoïétines incluant l'IL-4 et l'IL-10. Le gène codant pour l'IL-2, situé sur le chromosome 4 (q26-q27), contient 4 exons qui codent pour 153 acides aminés[96]. Le rôle principal de l'IL-2 sur les LT est d'accroître l'activité des CD4 et des CD8 Elle exerce une action autocrine sur les Th1 et paracrine sur les Th2. L'IL-2 n'a aucune influence sur la balance Th1/Th2. IL-2 est une cytokine pléïtrophe avec une action pro-inflammatoire sur le système immunitaire à médiation cellulaire (NK, monocytes) et humorale (LB et LT).

#### ➤ **Interleukine 4**

Le gène de l'IL-4 est situé sur le chromosome 5 et code pour une protéine de 153 acides aminés. L'IL-4 est essentiellement produite par les LT du type CD4 et joue un grand rôle dans la réponse cellulaire à médiation humorale. Elle augmente la croissance et la différenciation des LB préalablement activés. Elle favorise ainsi la sécrétion d'immunoglobulines (IgE, IgG1) et la mobilisation des éosinophiles[82].

#### ➤ **Interleukine 5 (eosinophil colony stimulating factor)**

L'IL-5 est sécrétée par les LT CD4+ et certains mastocytes. Elle stimule la croissance, la différenciation et l'activité des éosinophiles qui jouent un rôle important dans la lutte contre les infections parasitaires. Elle induit la prolifération des lymphocytes B et active les lymphocytes T cytotoxiques[78].

### ➤ **Interleukine 10**

Le gène de l'IL-10 est localisé sur le chromosome 1; Il est composé de 4 exons qui couvrent plus de 5,1 kb du génome. L'IL-10, cytokine anti-inflammatoire, est produite par plusieurs types de cellules : LT activés, monocytes, LB Kératinocytes, carcinome du colon, cellules du mélanome[54]. Comme plusieurs cytokines, l'IL-10 exerce une action pléïtrophe[77]. Une interaction directe entre l'IL-10 et son récepteur situé sur le lymphocyte T, entraîne une suppression de la transcription du gène IL-2 et donc une suppression de la prolifération des LT. En plus de ces effets sur les Th1, IL-10 inhibe la synthèse de l'IFN- $\gamma$  par les CD8 sans pour autant affecter leur cytotoxicité[40].

Les différentes études expérimentales ont montré que les macrophages et les monocytes sont les premières cibles de l'IL-10. Elle a un effet proéminent sur leur morphologie, leur phénotype et aptitude à produire les cytokines. En effet, par la suppression de la production de l'IL-12 par les monocytes, elle inhibe la production de l'IFN- $\gamma$  par les NK[20,102].

### ➤ **Tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ )**

Le TNF- $\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire non glycosylée de 17 kilodaltons qui dérive d'une molécule transmembranaire par clivage protéolytique. Durant l'infection, les macrophages synthétisent de grandes quantités de TNF- $\alpha$ . Celui ci est également produit par les LT, LB, NK et les mastocytes. L'ensemble formé par le TNF- $\alpha$  et son récepteur membranaire conduit à l'apoptose, à la prolifération et à l'expression d'un large spectre de gène.

L'expression de ces gènes assure la production de cytokine, de facteurs de prolifération, de molécules d'adhésion cellulaire et de protéines du complexe majeur d'histocompatibilité. Ce complexe renforce non seulement la phagocytose, mais sert de médiateur dans la production de radicaux oxygénés et nitriques. Il existe de nombreux indices pour penser que le TNF- $\alpha$  joue un rôle décisif dans la pathogenèse de l'accès pernicieux. Son rôle bénéfique ou délétère sur l'évolution d'un accès palustre est fonction de sa concentration[58,62]. Au cours de l'accès palustre, l'activité de la multiplication du parasite entraîne la production de cette cytokine par les macrophages activés. De faible taux du TNF- $\alpha$  sécrété confère une protection relative, tandis que des taux élevés peuvent être un facteur de mauvais pronostic au cours du neuropaludisme. Des études ont également permis d'établir une association entre des taux sériques élevés de TNF- $\alpha$  et plusieurs critères de gravité du paludisme (hypoglycémie, fièvre et hyperparasitémie)[57,76]. Cette cytokine joue un rôle dans la production des lésions vasculaires et des nécroses hémorragiques.

#### ➤ Interféron $\gamma$

Cette cytokine a été décrite pour la première fois en 1965 par Wheelock et est essentiellement produite par les cellules lymphoïdes. Les NK, LB, LT peuvent synthétiser l'IFN- $\gamma$  après une stimulation adéquate. Le gène de l'IFN- $\gamma$  est situé sur le chromosome 12. C'est une protéine de 143 acides aminés. IFN- $\gamma$  augmente la reconnaissance et la présentation de l'antigène au LT. Elle a un rôle régulateur

sur la production des immunoglobulines par les LB. La production de l'IFN- $\gamma$  par les CD8 activés par les antigènes des formes pré-érythrocytaires permet la protection de l'hôte contre l'anémie palustre[81]. Des expériences sur le model animal suggèrent que la clairance des parasites au cours de l'affection palustre simple nécessite une production précoce de l'IFN- $\gamma$ [92].

#### **4. Vaccins antipaludiques: pléthore de candidats, petit nombre d'antigènes**

Il existe au moins 94 candidats vaccins antipaludiques. Ils sont dérivés de seulement une vingtaine d'antigènes [105]. Comme il peut être nécessaire d'ajuster la formulation ou le système d'administration de chacune de ces molécules, le nombre d'essais à effectuer est encore supérieur. Même si nombre de ces molécules en développement ont pu donner des résultats encourageants, il n'existe aucune garantie qu'une d'elle ou qu'une de leurs combinaisons permettra d'induire un niveau suffisant d'immunité. Cela continue à justifier l'exploration de nouvelles approches de recherche de vaccins. Les candidats vaccins se distinguent d'abord par les stades parasitaires auxquels les antigènes sont exprimés. De ces stades dépendent l'effet attendu du vaccin et le type de réponse immune susceptible d'être protectrice.

#### 4.1. Vaccins contre les stades pré-érythrocytaires

Les vaccins contre les stades pré-érythrocytaires doivent induire des réponses immunes visant les sporozoïtes, les schizontes hépatiques. Le but est d'empêcher toute libération de mérozoïtes dans le sang. Pour induire une immunité chez des individus non-immuns, l'efficacité de ce type de vaccin doit être de 100 %. Dans le cas contraire, s'il ne réduisait que de 90 % ou moins le nombre de schizontes hépatiques ou mérozoïtes libérés, le vaccin ne pourrait que retarder de quelques heures à quelques jours la survenue de manifestations cliniques[37]. L'efficacité de ce type de vaccin peut être évaluée par des infections expérimentales par anophèles infectés. Des essais peuvent également être menés sur le terrain, en zone endémie, chez des individus semi-immuns. Le vaccin est alors évalué sur sa capacité à diminuer le risque d'infection après une cure radicale ou à diminuer le risque d'accès palustre.

Les vaccins contre les stades pré-érythrocytaires ont d'abord essayé de reproduire l'immunité acquise avec des sporozoïtes irradiés en provoquant une réponse anticorps contre la CSP (circum sporozoite protein ). Cet antigène a été testé chez l'homme par des infections expérimentales et n'a pas donné de résultats satisfaisants[51]. Les travaux sur la CSP ont cependant été poursuivis. Parmi les vaccins CSP en cours de développement, celui qui a donné les résultats les plus encourageant dans des essais de phase IIb est le RTS,S/AS02A[4,5,13]. IL est composé de particules protéiques comprenant 19 copies de la portion répétée centrale de la CSP et d'une partie (épitope T) de sa région carboxy-



terminale fusionnés à l'antigène S du virus de l'hépatite B[44], et d'un adjuvant complexe, l'AS02A[90]. Ce vaccin a permis de protéger 48 % de 63 volontaires infectés expérimentalement[87]. En Gambie, ce vaccin a réduit de 34 % le risque de nouvelle infection d'adultes sur une période de 15 semaines[13]. En fait, la protection était de 71 % pendant les neuf premières semaines et nulle ensuite. Au Mozambique, chez des enfants, ce vaccin a diminué de 45 % le risque de nouvelle infection et de 30 % le risque d'accès palustre simple pendant six mois[4]. Cet effet sur la morbidité a persisté au cours de l'année suivante[5]. Les résultats du même essai suggéraient une réduction de 57 % du risque de paludisme grave au cours des six premiers mois. Une part de l'efficacité de ce vaccin pourrait être liée à un effet non spécifique de son adjuvant, l'AS02A [87]. Ce vaccin développé par le Walter Reed Army Institute of Research aux USA et GlaxoSmithKline Biologicals en Belgique est en phase III des essais cliniques.

D'autres vaccins contre les stades pré-érythrocytaires visent à induire une réponse cellulaire T contre les schizontes hépatiques. Ils incluent un ou plusieurs antigènes comme TRAP (Thrombospondin-related adhesive protein), LSA-1 (Liver stage antigen - 1), LSA - 3, SALSA (Sporozoite and liver stage antigen), STARP (Sporozoite threonine and asparagine rich protein) ou EXP-1 (Exported antigen 1), et sont administrés sous la forme de protéines recombinantes, de polypeptides synthétiques longs, de particules protéiques, de lipopeptides, ou de vecteurs d'expression plasmidiques ou viraux[52].

## 4.2. Vaccins contre les stades sanguins asexués

Un vaccin contre les stades érythrocytaires asexués viserait soit à empêcher l'invasion des hématies et donc à contrôler les densités plasmodiales circulantes, soit à empêcher l'évolution des infections vers les formes cliniques et potentiellement graves de la maladie. La mise au point d'un tel vaccin se heurte à différents obstacles : les difficultés d'évaluation expérimentale chez l'homme, l'absence de modèle animal pertinent et l'absence de corrélat immunologique de la protection. La principale cible de vaccins contre les stades sanguins asexués est le mérozoïte, la forme du parasite qui est libérée par les schizontes hépatocytaires ou érythrocytaires et qui envahit les hématies. En quelques secondes, les mérozoïtes adhèrent aux globules rouges, se réorientent par rapport à la membrane érythrocytaire et modifient les structures membranaires pour envahir les hématies en formant des vacuoles parasitophores. Ils échappent alors aux anticorps. Plusieurs protéines parasitaires sont impliquées dans ce processus complexe (par exemple MSP-1). Elles sont exprimées en surface de la membrane parasitaire et sont donc exposées aux anticorps pendant une très brève période. D'autres antigènes parasitaires pourraient être impliqués dans la physiopathologie du paludisme, dont le neuropaludisme. Parmi ceux-ci, le GPI (glycosyl phosphatidyl inositol) serait impliqué dans la libération de médiateurs pro-inflammatoires au moment de la rupture des schizontes et des antigènes comme PfEMP-1 seraient impliqués dans les phénomènes de cytoadhérence des hématies parasitées à l'endothélium vasculaire. Ces derniers antigènes sont caractérisés par une grande variabilité, un

taux élevé de variation antigénique et par l'existence d'un grand nombre de copies de son gène dans le génome de *P. falciparum* qui compliquent la mise au point de vaccins.

Les principaux antigènes candidats vaccins ayant atteint le stade des essais cliniques sont MSP-1 (Merozoite Surface Protein - 1), MSP-3, AMA-1 (Apical membrane antigen - 1), EBA-175 (Erythrocyte binding antigen) et GLURP (Glutamate rich protein). Il a été montré *in vitro* que des anticorps dirigés contre la région carboxy-terminale de MSP-1[53], et en particulier une portion de 19-kD, pouvaient empêcher l'invasion des hématies par les mérozoïtes. Un essai clinique d'une portion de 42-kD de cette région de MSP-1 par infection expérimentale n'a pas montré d'efficacité vaccinale chez l'homme alors qu'elle est protectrice dans un modèle primate [21].

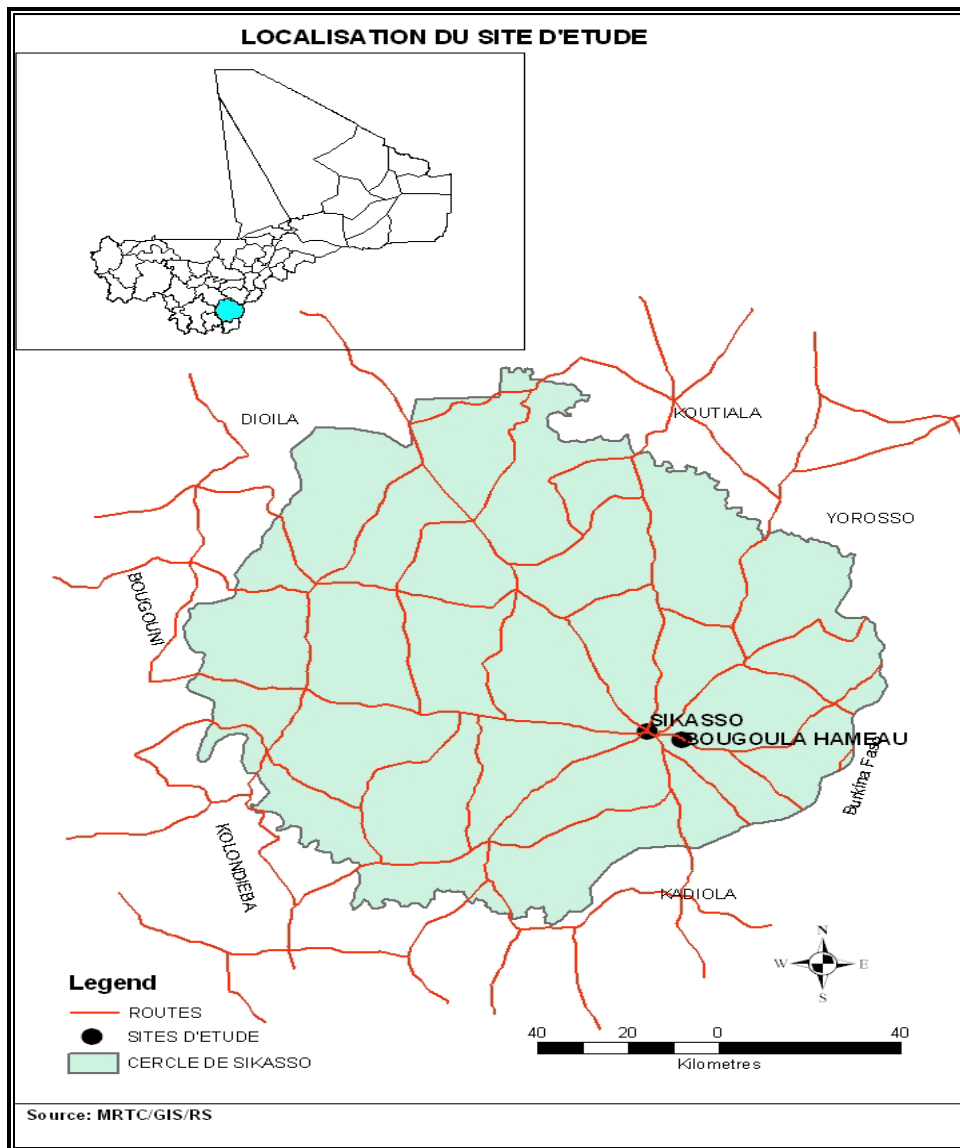
Dans des modèles animaux (murins et primates), il a été montré qu'AMA-1 pouvait induire une réponse immune protectrice contre des infections expérimentales[6,91]. Différents essais de phase I ont été effectués chez l'homme avec des vaccins dérivés de cet antigène[65,84]. Il est possible cependant que le polymorphisme de cet antigène puisse aussi obérer l'efficacité de ce vaccin dans les conditions du terrain[12,50]. Des anticorps induits par un polypeptide long dérivé de MSP-3 chez des volontaires sont capables d'inhiber la croissance parasitaire *in vitro* et *in vivo* par un mécanisme dépendant des monocytes[10,86]. Dans leur ensemble, les résultats obtenus avec ces antigènes suggèrent qu'un certain niveau d'immunité pourrait être acquis par vaccination mais que seuls les essais d'efficacité en zone d'endémie permettront de savoir si ces vaccins contre des stades sanguins asexués sont capables de protéger contre les accès palustres ou les formes graves du

paludisme. L'un des obstacles à la mise au point de ces vaccins est le polymorphisme allélique des antigènes utilisés. Un essai clinique en Papouasie-Nouvelle Guinée a montré qu'un vaccin ne contenant qu'une seule version des allèles naturellement exprimés par les parasites peut n'induire qu'une protection contre les parasites portant cet allèle et sélectionner ceux qui ne le portent pas[42], limitant ainsi l'importance de l'immunité induite.

### **III. METHODOLOGIE**

#### **1. Lieu d'étude**

Cette étude a été menée à Bougoula Hameau, un quartier périurbain de 5000 habitants, situé à 5 Km de Sikasso. Il est limité au Nord par Sabalibougou, au Sud par Momobougou, à l'Ouest par Sikasso et à l'Est par Kaféla. Il est situé à 11°21 latitudes Nord et 5°11 longitudes Ouest (Figure 6). Le paludisme est holo-endémique à Bougoula avec un indice plasmodique (IP) situé entre 40 et 50% en saison sèche (Novembre à Avril) et entre 70 et 85% en saison pluvieuse (Mai à Octobre)[35]. Bougoula-Hameau est un site de plusieurs études du MRTC depuis 1991.



**Figure 6: Carte du Mali montrant le cercle de Sikasso et notre site d'étude.**

## 1.1. Climat, végétation, faune et sol:[7]

### 1.1.1. Le climat

Le climat est de type soudanien. Il est sous l'influence de la zone forestière humide avec une période pluvieuse pouvant atteindre 6 mois environ (Mai à Octobre) par an. Cet avantage climatique donne au quartier une vocation agricole de premier ordre.

Le climat se divise en deux saisons :

\*la saison sèche froide (de Novembre à Février) : C'est la saison pendant laquelle le quartier bénéficie des températures douces. Les minima de température sont enregistrés entre le crépuscule et le levé du soleil. Durant cette période, le quartier se trouve balayé par l'alizé continental qui souffle d'Ouest en Est, vent sec et desséchant que l'organisme humain supporte mal;

\* la saison sèche chaude (de Mars à Avril) : C'est la saison pendant laquelle les maxima de température sont enregistrés. Pendant ces mois, le quartier subit la confrontation de l'alizé marine et de l'alizé continental avec la prédominance de l'alizé continental. Ce vent a une direction nord sud, le début d'hivernage se caractérise par des possibilités d'évapotranspiration très élevée. Cette période correspond à un temps mort pour les travaux;

\* la saison pluvieuse (de Mai à Octobre) : C'est la période pluvieuse pendant laquelle les maxima de pluviométrie sont atteints à Bougoula.

### Situation comparative de la pluviométrie dans le cercle de Sikasso de 2005 à 2007

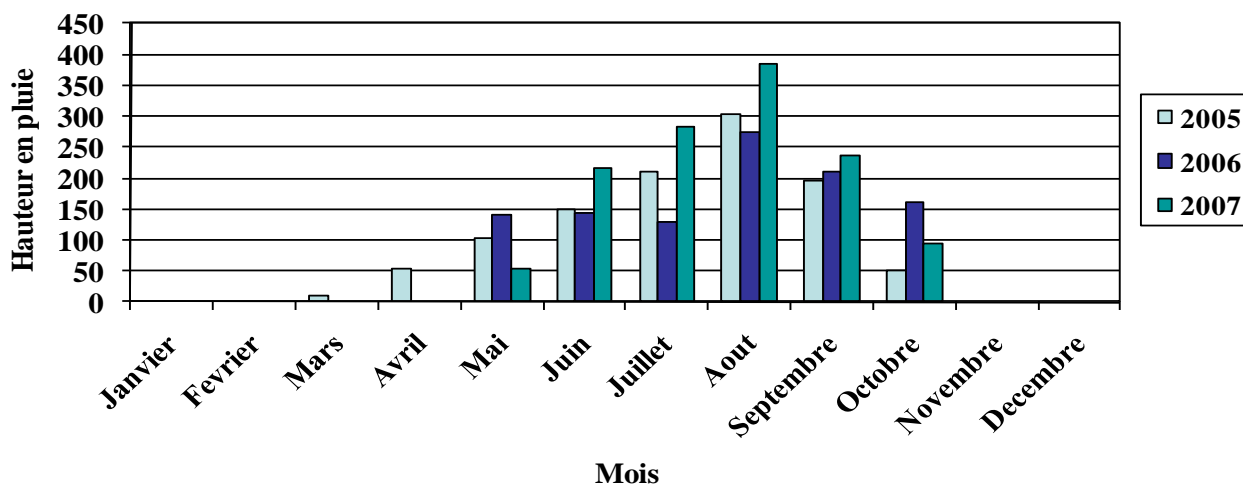


Figure 7: Relevé pluviométrique du cercle de Sikasso de 2005, 2006 et 2007

#### 1.1.2. La végétation

Bougoula se trouve dans la zone soudanienne dominée par une savane boisée avec de hautes herbes parsemées de grands arbres. Tout au long des cours d'eau, la végétation est plus dense et forme la forêt galerie.



### 1.1.3. La flore

Elle est constituée par les espèces suivantes : Le karité (*Butyrospermum parkii*) ; Le néré (*Parkia biglobosa*) ; Le baobab (*Adansonia digitata*) ; Le cailcedrat (*Kaya senegalensis*) ; Le fromager (*Ceiba pentandra*) ; Le koundiè (bambara) (*Guiera senegalensis*) ; Le n'taba (bambara) (*Corla cordifolia*) ; Le tamarinier (*Tamarindus indica*) ; Le kapokier (*Bombax costatum*) ; Les principales herbes sont des graminées vivaces : Le « waga » (bambara) (*Andropogon gayanus*) et le n'goolo (bambara) (*Pennisetum pedicellatum*) qui constituent un tapis verdoyant pendant la saison pluvieuse. La végétation est brûlée chaque année et le tapis herbacé prend la couleur jaune paille.

### 1.1.4. La faune

Parmi les vertébrés on rencontre les reptiles, plusieurs espèces d'oiseaux, et de petits mammifères notamment les lièvres (*Lepus timidus*), les hérissons (*Trinaceus europaeus*) et quelques phacochères (*Phacochoerus aethiopicus*). Les insectes d'importance médicale rencontrés sont : *Anopheles* (*An. gambiae*, *An. funestus*), *Culex* (*C. quinquefasciatus*, *C. fatigans*).

### **1.1.5. Le sol**

Le sol est argilo-siliceux, on y rencontre en abondance des pyrites de fer sur le plateau, du grès sur les pentes et du granit sur les hauteurs. La terre est fertile et favorable à l'agriculture.

### **1.1.6. Relief et hydrographie**

Le relief est composé de plateaux et de collines de basse altitude. Bougoula se trouve entre trois marigots : À l'entrée se trouve le ''Farako'' qui prend sa source à Sirakoro. Le quartier est traversé par le ''N'goroni'' qui prend sa source à Bougoula. À la sortie se trouve le ''Koba'' qui prend sa source à Momobougou au sud du quartier. L'eau du ''Koba'' ne tarissant pas complètement pendant la saison sèche, des gîtes de larve de moustiques peuvent se rencontrer pendant toutes les saisons.

## **1.2. Démographie**

La population de Bougoula s'élève à 5000 habitants repartis en deux blocs (Recensement MRTC Bougoula 2005). En plus des senoufo qui constituent l'ethnie dominante (95%), les Bambara, les Malinké, les Bobo, les Sonrhaï, les Haoussa, les Samo, et les Mossi constituent les 5%. Les religions dominantes sont : l'islam et l'animisme, il existe cependant quelques chrétiens.

### **1.3.Habitat**

Dans le quartier on rencontre trois types d'habitations : Des cases rondes avec toit conique en paille ; des maisons rectangulaires avec toit en tôle, les plus fréquentes ; des maisons rondes ou rectangulaires avec toit en terrasse. Ces habitations constituent le lieu de repos pour les moustiques (*Anopheles*).

### **1.4.Activités économiques**

Les activités économiques sont essentiellement basées sur l'agriculture et on distingue trois cultures : Les cultures vivrières ; mil, maïs, riz, sorgho, haricot, manioc, patate douce, fonio, oseille de Guinée et le coton. Les cultures maraîchères ; pomme de terre, igname, tomate, aubergine, gombo, oignon, laitue, carotte, choux, concombre, piment. Les cultures fruitières ; manguiers, bananiers, orangers, papayers, mandariniers, fromagers (banan), goyaviers. Les produits de cueillette ; les baies de Karité, les fruits de Néré, de Tamarinier, du Zaban. L'élevage, la pêche et l'artisanat constituent une activité secondaire. On y élève des bovins, de caprins, des ovins et de la volaille. La pêche est pratiquée dans les marigots. La forge et la tannerie sont les principales activités de l'artisanat.

### **1.5. Organisation administrative**

Bougoula est dirigé par un chef de quartier et cinq conseillers. La chefferie se fait par consensus des habitants du quartier. Le chef sera annoncé à la mairie qui lui remettra son chapeau de chef. Depuis qu'il est devenu quartier de Sikasso, Bougoula a connu six (6) chefs de quartier qui sont: Ngolo Ouattara, Féry Koné, Lamissa Traoré, Daouda Traoré, Kader Berthé et Sounkalo Koné.

### **1.6. Infrastructures**

Bougoula dispose d'un centre de santé composé d'une maternité et d'un dispensaire dirigé par un infirmier d'état ; d'une école du premier cycle fondamentale de six classes, d'une medersa, d'un CED (Centre d'Education pour le Développement) et de deux mosquées.

## **2. Type et Période d'étude**

Il s'agit d'une étude prospective, longitudinale, comparative qui s'est déroulée de Juillet 2005 à Juin 2007. Les données sur le terrain ont été collectées par l'équipe parasito-clinique basée dans le village de Bougoula Hameau pendant toute la durée de l'étude.

### 3. Population d'étude

Les plasmas des patients utilisés dans cette étude étaient obtenus de juillet 2005 à juin 2007 au cours d'un essai clinique randomisé ouvert comparatif à trois bras de traitement. L'étude s'adressait à l'ensemble de la population ayant un paludisme simple et un âge supérieur ou égal à six mois, résidant à Bougoula-Hameau pour la durée de l'étude. Le nombre de sujets inclus était de 780, répartis équitablement entre les bras de traitement: AS- AQ (Artesunate- Amodiaquine); AS- SP (Artesunate- Sulfadoxine-Pyrimethamine) et AR- L (Artemether- Lumefantrine). Les sujets assignés à un traitement donné par hasard ont reçu le même traitement durant toute la durée de l'étude, suivi de la mention E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, E<sub>3</sub> lors des épisodes successifs de paludisme. Une liste de randomisation était établie par l'équipe de Biostatistique avant le début de l'étude. Un épisode palustre simple était défini par : la présence d'une température axillaire supérieure ou égale à 37,5°c ; une infection à *Plasmodium sp* avec une densité parasitaire comprise entre 2000 et 200000 formes asexuées par millimètre cube de sang ; l'absence de signes cliniques de paludisme grave ou de neuropaludisme[97].

## 4. Echantillonnage

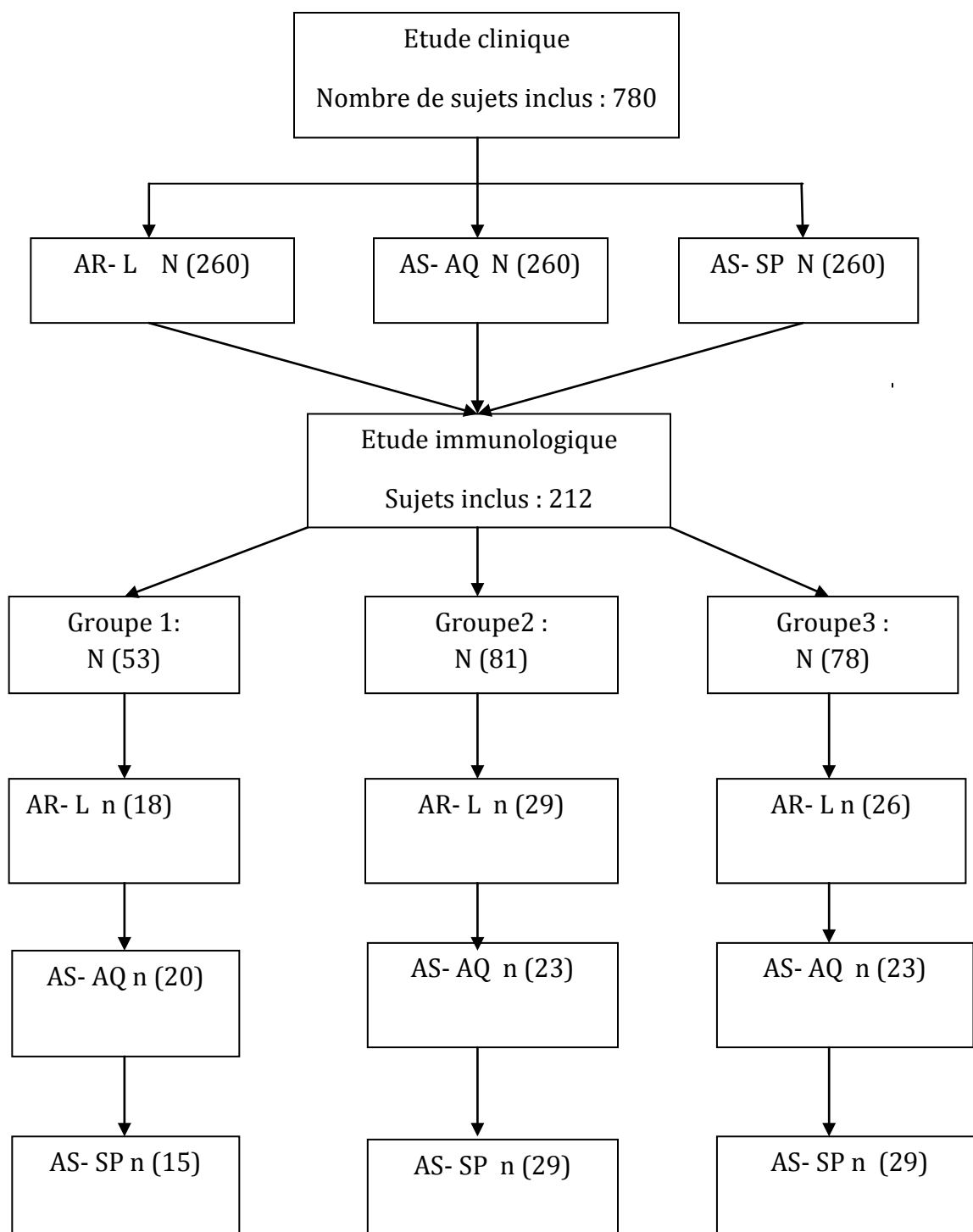
Les sujets sélectionnés pour constituer notre échantillon provenaient d'un essai clinique randomisé ouvert comparatif à trois bras de traitement. Les sujets étaient au nombre de 212 répartis selon un choix raisonné suivant la classification ci-après (figure 8).

➤ La classification en trois groupes:

Groupe 1: composé des sujets ayant fait un seul épisode, appelés «sujets protégés».

Groupe 2: composé des sujets ayant fait trois épisodes, appelés «sujets intermédiaires».

Groupe 3: composé des sujets ayant fait au moins cinq épisodes, appelés «sujets susceptibles».



**Figure 8: Représentation schématique de l'échantillonnage.**  
**N= Effectif du groupe, n= Effectif du bras de traitement**

## 5. Variables mesurées

- Les variables sociodémographiques

L'âge et le sexe.

- Les variables biologiques

La densité parasitaire ; le nombre de globules blancs ; le taux d'hémoglobine ; Les titres des anticorps IgG spécifiques des antigènes AMA-1, MSP-3, GLURP et les titres des anticorps IgM, IgG1, IgG2, IgG3 spécifiques des antigènes AMA-1, MSP-3, GLURP, MSP-6, GBP-130, LSA-5 et SERP. Les titres des cytokines Th1/Th2.

## 6. Matériels et techniques utilisés

Les anticorps ont été dosés dans les plasmas. IgG, IgM, IgG1, IgG2 et IgG3 spécifiques de différents antigènes du *P. falciparum* ont été dosés par l'ELISA. Les antigènes utilisés étaient :

AMA-1 (une protéine recombinante de la souche FVO de *P. falciparum*, comprenant les acides aminés 25-545[60] exprimée par *Pichia pastoris*) ;

MSP-3 (le long peptide synthétique appelé LR55, provient de la souche FC27 constituée des acides aminés 181-276)[10] ;

MSP-6(fourni par l'institut Pasteur de Paris) ;

GLURP (protéine recombinante de la souche F32 contenant la région N-terminale conservée, non répétée des acides aminés 25- 514 appelée R0[95], exprimée par *Escherichia coli*) ;

SERP (fourni par l'institut Pasteur de Paris) ;



GBP-130 (fourni par l'institut Pasteur de Paris) ;  
LSA-5(Liver stage antigène-5, fourni par l'institut pasteur de Paris).

Les cytokines du kit Th1/Th2 : IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, du TNF- $\alpha$  et de l'IFN- $\gamma$  ont été dosées par la technique du Cytometric Beads Array ou analyse multiplexée de perles.

## **6.1 Prélèvement veineux et séparation du plasma**

### **➤ Principe:**

Il consiste à prélever du sang veineux dans un tube avec anticoagulant.

### **➤ Matériels**

Gants stériles, Coton hydrophile, Alcool à 70%, Tube EDTA 5 ml, Seringue 5 ml et 10ml, Aiguilles, Epicrâniens, Portoires, Garrot, Centrifugeuse, Tubes Nunc, Congélateur, Micropipettes, Embouts, Hotte, Boites de cryoconservation.

### **➤ Mode opératoire :**

- ✓ Attacher le garrot au-dessus du lieu de prélèvement ; Désinfecter le lieu de prélèvement avec un tampon d'alcool à 70%;
- ✓ Inscrire le numéro d'identification du patient, la date et l'heure du prélèvement sur le tube de prélèvement;
- ✓ Introduire avec précaution l'aiguille dans la veine et prélever le volume de sang nécessaire;

- ✓ Après le retrait de l'aiguille, déposer un coton sec sur le lieu de prélèvement puis jeter l'aiguille dans la poubelle prévue à cet effet;
- ✓ Placer le prélèvement dans la centrifugeuse;
- ✓ Centrifuger le prélèvement veineux à 800g pendant 10 min;
- ✓ Inscrire sur un tube Nunc le numéro d'identification du patient ainsi que la date et l'heure du prélèvement;
- ✓ Transférer à l'aide d'une micropipette le plasma;
- ✓ Répartir ce plasma dans les tubes Nunc;
- ✓ Placer les tubes Nunc dans une boîte de cryoconservation et conserver à  $-70^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation.

## **6.2 Dosage des anticorps plasmatiques**

Les différents dosages ont été effectués au MRTC/DEAP et à l'Institut Pasteur de Paris. Il s'agissait de déterminer le taux plasmatique de certaines immunoglobulines dans les plasmas de certains volontaires de la cohorte. Ces dosages ont été effectués sur les plasmas prélevés avant le traitement le jour de l'inclusion. Nous avons utilisé la technique de l'ELISA indirect pour déterminer ces taux.

### ➤ Principe

La technique ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*). C'est une technique mettant en jeu deux types de réactions d'une part l'antigène avec l'anticorps et de l'autre l'enzyme avec son substrat. L'Ag fixé sur un support solide (plaque de 96 puits) est lié de façon non covalente par l'anticorps contenu dans le plasma. Puis cette réaction antigène anticorps est révélée par un système d'anticorps couplé à une enzyme qui en présence de son substrat, hydrolyse celui-ci et donne une coloration dont la densité optique peut être reliée à la concentration d'anticorps fixé sur l'antigène par la formule:  $DO$  (densité optique) =  $\epsilon \cdot I \cdot C$  ( $\epsilon$  coefficient d'extinction molaire et  $I$  la largeur de la cuve sont des constantes pour une expérience donnée et  $C$  la concentration molaire variable).

### ➤ Matériels et réactifs

- Micropipettes 1-20  $\mu$ l, 20 -100  $\mu$ l, 40-200  $\mu$ l, 200 -1000 $\mu$ l
- Micropipette multicanaux (8 canaux)
- Agitateur rotatif de plaque ELISA
- Spectrophotomètre
- Ordinateur de bureau
- Logiciel d'analyse des données ADAMSEL Ed Remarque

- Plaques de titration en Maxisorp  
Polystyrène F 96 439454 Nunc / SSI
- Réservoir de réactif en Institution  
plastique
- Erlenmeyer de 500ml, 2l et 5l Institution
- Embout pour les pipettes SSI
- Feuille de plastic adhesive SSI
  
- Réactifs Chimiques: Référence Fournisseur
- Acide sulfurique 10M BBB 133552 Bie & Berntsen
- Tween 20 Merck cat. Merck Eurolab  
no 822184
- 3,3',5,5' Tétraméthylbenzidine  
+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (TMB ONE) 4380 KEMENTEC
- Tampon de phosphate de sodium 18912-014 Gibco  
(PBS)
- Lait écrémé en poudre Matas
- NaCl
  
- IgG de chèvre anti-IgG humain H10007 Caltag  
conjuguées à la peroxydase
- Conjugué anti-IgG humaines de H15007 Caltag  
chèvre couplée à la peroxydase
  
- IgG Poly-clonales humaines The Binding Site BP055 The Binding  
purifiées Site
  
- Plasma témoin positif IPP France
  
- Plasma témoin négatif IPP France

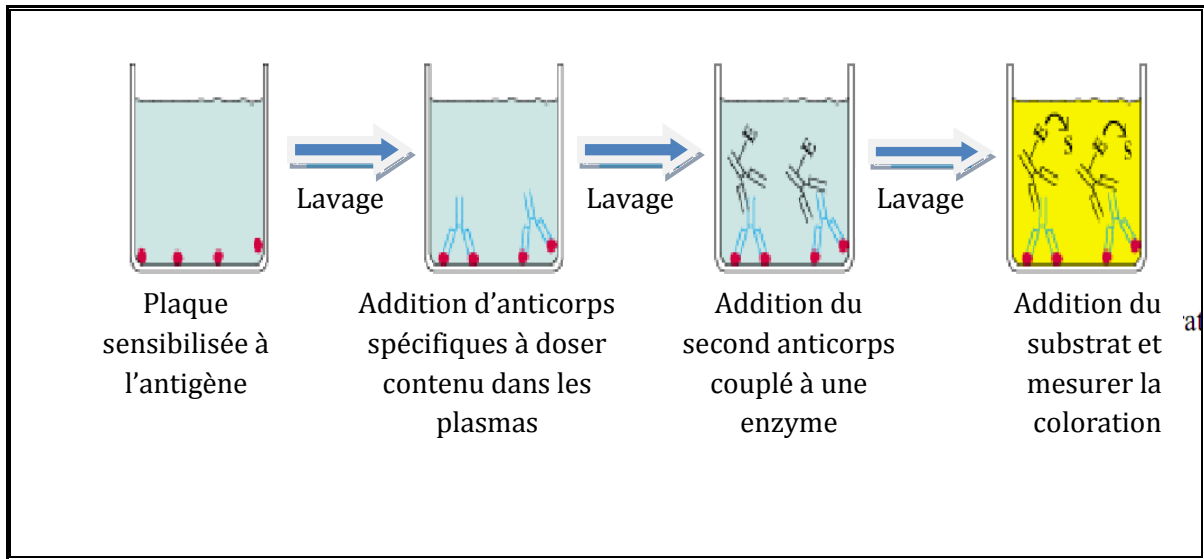
- Antigène MSP-3 LSP<sub>181-276</sub>

IPP France

- Solution de sensibilisation  
(Coating buffer) voir Annexe
- Solution de blocage Voir Annexe
- Solution de dilution de sérum Voir Annexe
- Solution de lavage Voir Annexe
- Tampon de coloration Voir Annexe
- Tampon de dilution Voir Annexe
- Solution d'arrêt 10 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Voir Annexe

➤ **Modes opératoires**

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



**Figure 9: différentes étapes de l'ELISA.**

○ **Sensibilisation des puits de plaque avec l'antigène (Coating)**

- D'abord l'initiale du technicien et la date de réalisation sont inscrites sur la plaque;
- Pour la courbe de référence préparer une solution stock de 500ng/ml d'IgG humaines pures;
- Mettre à l'aide d'une micropipette 100  $\mu$ l de cette dilution dans les puits A1 et A2 de la plaque;
- Effectuer une dilution en série de raison 2 des puits A1, A2 jusqu'aux puits H1 et H2 puis jeter les 100 $\mu$ l en excès des derniers puits;
- Sensibiliser les puits des colonnes 3 à 12 avec 100  $\mu$ l de l'antigène à doser, dilué à 1.0  $\mu$ g/ml;
- Couvrir la plaque avec la feuille de plastique adhésive;

- Incuber la plaque pendant une nuit à 2-8°C (la plaque ainsi sensibilisée peut être conservée pendant 21 jours dans le réfrigérateur à 2 à 8°C).

- o **Blocage des plaques**

- Laver la plaque 4 fois avec le tampon de lavage et essorer en tapant contre un papier absorbant;
- Distribuer 150 µl de la solution de blocage dans tous les puits;
- Incuber pendant 1 heure, la plaque à la température du laboratoire dans une chambre humide et en agitation lente.

- o **Addition du premier anticorps (plasma)**

- Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et essorer;
- Pendant la période d'incubation du blocage, diluer les sérums témoins positifs et négatifs et les plasmas de volontaires au 1:200 dans le tampon de dilution;
- Distribuer 100 µl des sérums et plasmas dilués dans les puits conformément au schéma de plaque;
- Incuber pendant 2heures la plaque à la température du laboratoire dans une chambre humide en agitation lente.

- o **Addition du second anticorps ou conjugué**

- Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et essorer;
- Distribuer dans les puits 100 µl du conjugué anti-IgG humaine de chèvre diluée à 1:3000 dans le tampon de dilution;

- Incuber pendant 1 heure la plaque à la température du laboratoire dans une chambre humide en agitation lente.

- o **Addition de substrat (TMB)**

- Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et bien essorer.
    - Distribuer 100 µl de substrat dans chaque puits.
    - Incuber pendant 30 minutes à l'abri de la lumière.
    - Arrêter la réaction en ajoutant 100 µl d'une solution H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M dans chaque puits.

- o **Lecture et expression des résultats**

- Mesurer les densités optiques des puits à l'aide d'un spectrophotomètre à 450 nm en utilisant le logiciel SOFTmaxPRO 5.0.
    - Analyser les résultats avec le logiciel ADAMSEL (Auditable Data Analysis and Management System for ELISA).
    - ADAMSEL FPL (Four Parameter Logistic) est une application qui convertit les densités optiques obtenues à partir des lecteurs de plaques ELISA en unité arbitraire d'anticorps avec la courbe standard de référence générée pour chaque plaque d'ELISA en utilisant quatre paramètres logistiques (figure 10).



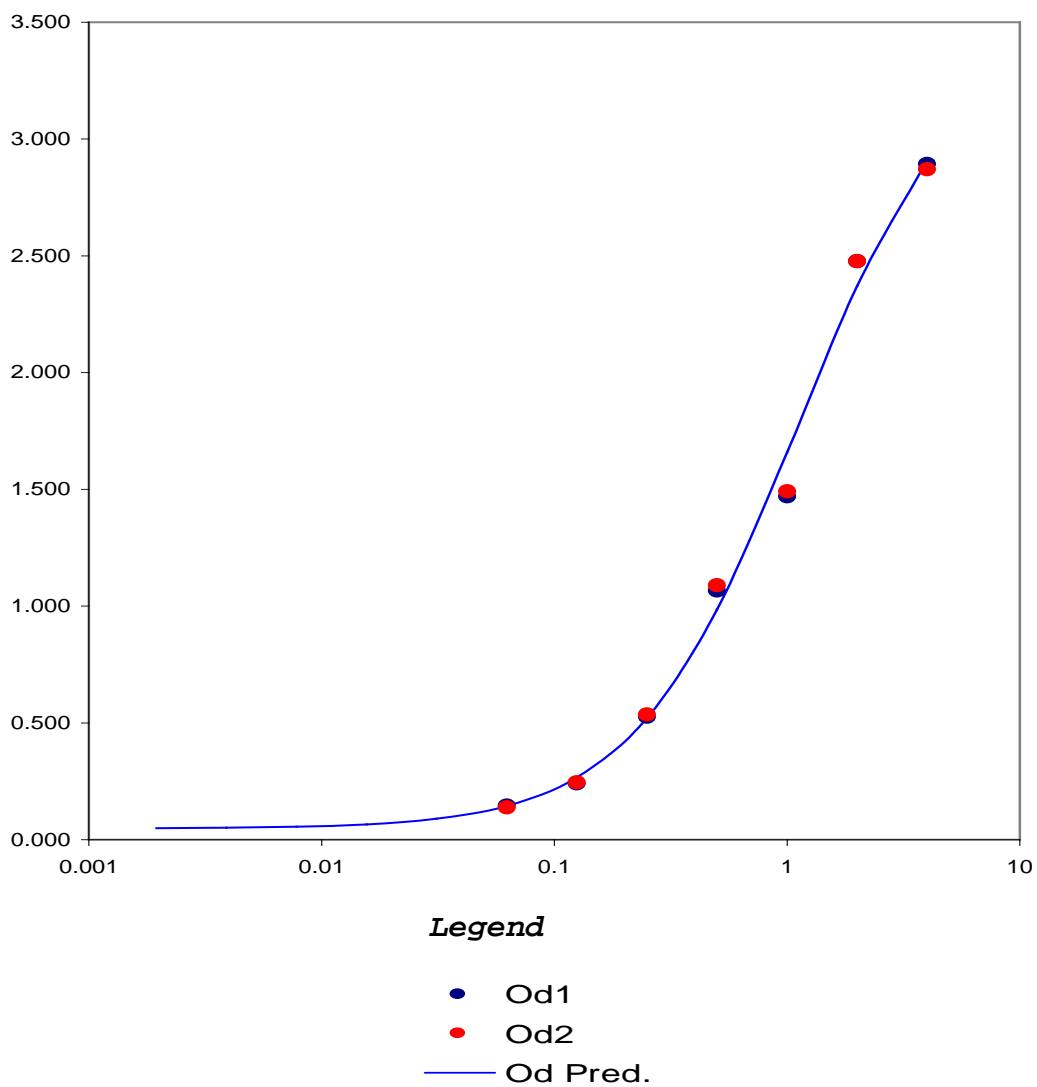


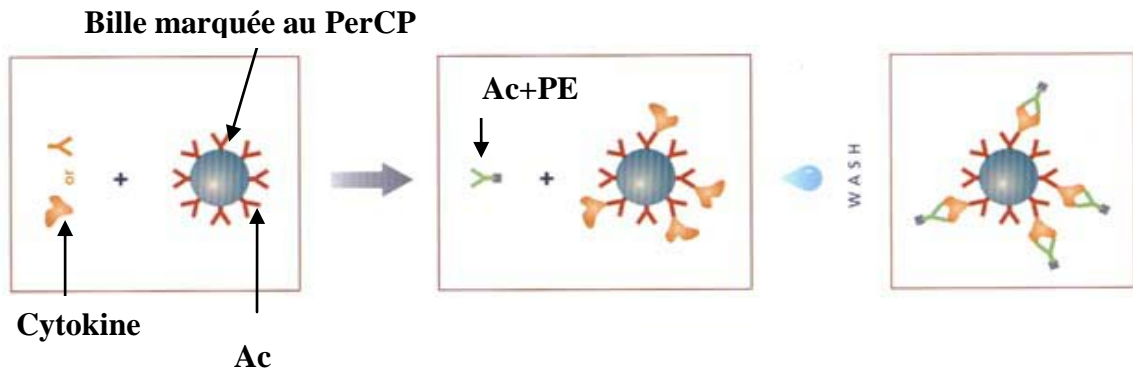
Figure 10: Exemple de courbe de conversion des densités optiques en concentrations par quatre paramètres logistiques. (Source: © EJ Remarque 2007).

### **6.3 Dosage des différentes cytokines**

Les différents dosages ont été effectués au MRTC/DEAP. Il s'agissait de déterminer le taux sérique de certaines cytokines dans les plasmas de certains volontaires de la cohorte. Ces dosages ont concerné les prélèvements effectués avant le traitement le jour de l'inclusion.

#### **➤ Principe**

La cytométrie en flux est une technique d'analyse et de tri de constituants de fonctionnalité cellulaire, dans un système fluide très fin sous pression. La vitesse d'analyse permet l'examen d'un nombre important de cellules. Les particules en suspension sont guidées dans un capillaire fin, jusqu'à l'extrémité d'une buse, où elles vont traverser un faisceau laser qui va exciter le ou les fluorochromes présents. Chacun d'entre eux va émettre une fluorescence qui sera séparée et transformée en signal électrique. L'intensité de la fluorescence est représentée sur des histogrammes prédéfinis qui s'affichent sur l'écran du cytomètre au fur et à mesure de l'acquisition des données. Utilisant la cytométrie en flux, le CBA est un ensemble de sondes fluorescentes composées d'anticorps fluoro-marqués spécifiques à la molécule à doser. Le CBA est basé sur une technique d'analyse en sandwich représentée sur le schéma suivant:



**Figure 11: Schéma de base illustrant le principe de la méthode CBA**

[SourceError! Hyperlink reference not valid.](#)

➤ **Matériels et réactifs**

- Micropipettes 1-20µl, 20-100µl, 40-200µl, 200-1000µl
- Cytomètre à flux ou FACS calibre
- Ordinateur de bureau
- Papier aluminium
- Embouts pour les pipettes
- Tube polystyrène fond rond 5ml 12 \*75 mm style

- Réactifs

- Un tube pour chacune des séries de billes de captures spécifiques BD pharminen
- Un tube de billes pour le calibrage de l'appareil BD pharminen
- Un tube d'anticorps spécifiques fluoromarkés par du PE BD pharminen
- Un tube de contrôle positif de détection du PE BD pharminen
- Un tube de contrôle positif de détection du FITC BD pharminen
- Un tube de standard lyophilisé des cytokines BD pharminen
- Deux tubes de solution tampon pour le lavage BD pharminen
- Deux tubes de solution diluante pour les différentes dilutions BD pharminen

➤ **Mode opératoire**

Le dosage des différentes cytokines par la cytométrie de flux à partir des Kits se fait en plusieurs étapes :

○ **Dilution des standards**

Les standards sous forme de lyophilisat doivent être reconstitués et dilués avant d'ajouter le mélange des 6 billes de capture et du réactif de détection PE.

- ✓ Ajouter 0,2 ml de la solution de dilution pour obtenir un standard à 10X ;
- ✓ Agiter et laisser à la température ambiante pendant 15mn ;
- ✓ Inscrire sur 10 tubes de 12 x 75mm les différentes dilutions et les ranger dans l'ordre suivant : **1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 et témoin négatif.**
- ✓ Ajouter 900ul de la solution diluante dans le premier tube ;
- ✓ Ajouter 300ul du diluant dans chacun des autres tubes ;
- ✓ Transférer 100ul de la solution à 10X dans le premier tube à essai et mélanger ;
- ✓ Commencer la série de dilution en transférant 300 ul du premier tube dans le second tube (1:2) et mélanger. Puis 300 ul du tube 1:2 dans le tube 1:4 et ainsi de suite jusqu'au tube 1:256.
- ✓ Le dernier tube ne contenant que la solution diluante servira de contrôle négatif.

#### o **Mélange des billes de capture**

Les six billes de capture sont conditionnées dans des flacons individuels. Il est indispensable de les additionner avant de les ajouter au réactif de détection PE, aux standards ou aux échantillons ;

- ✓ Déterminer le nombre de tube d'essais (y compris les standards, les deux témoins positifs et le contrôle négatif= 18 tubes) ;

- ✓ Mélanger vigoureusement chacun des flacons contenant les billes de capture ;
- ✓ Prendre 8 ul par billes de capture et par échantillon à analyser ;
- ✓ Mélanger vigoureusement la solution ainsi obtenue;
- ✓ Le mélange de bille de capture prêt pour le transférer dans les différents tubes tests à raison de 40ul / tube.

o **Marquage**

- ✓ Etiqueter les tubes à essai en fonction des échantillons ;
- ✓ Transférer 40ul du mélange des billes de capture dans chacun des tubes à essais ;
- ✓ Ajouter 40ul du standard dilué dans le tube approprié ;
- ✓ Ajouter 40ul de chaque échantillon à doser dans le tube à essai approprié ;
- ✓ Ajouter 40ul du réactif de détection PE dans chaque tube et mélanger ;
- ✓ Laisser incuber à 4 °C pendant 3 jours et à l'abri de la lumière.

o **Lavage**

Les échantillons colorés sont lavés trois jours après l'incubation pour éliminer toutes les substances excédentaires.

- ✓ Ajouter 1ml de solution tampon de lavage dans chacun des tubes et centrifuger à 1500 tours/min pendant 5 min;

- ✓ Verser le surnageant;
- ✓ Ajouter 300ul de la solution tampon de lavage pour resuspendre les billes de capture.

o **Préparation des billes de calibrage**

- ✓ Ajouter 40ul des billes de calibrage dans 3 tubes à essais A, B et C
- ✓ Ajouter 40ul du FITC, contrôle positif de détection, dans le tube B
- ✓ Ajouter 40ul de PE, contrôle positif de détection, dans le tube C
- ✓ Laisser à la température ambiante pendant 30 min à l'abri de la lumière les 3 tubes.
- ✓ Ajouter 400ul de la solution de lavage dans les tubes de contrôle positif B et C
- ✓ Ajouter 450ul de la solution de lavage dans le tube A

Utiliser les tubes A, B et C pour démarrer le dosage cytométrique.

o **Acquisition des données**

Elle se fait en passant les tubes marqués un à un dans le cytomètre. Il s'agit dans un premier temps de passer les tubes de calibrage pour délimiter les régions des histogrammes ou on s'attend à avoir les intensités extrêmes. Ensuite le passage des différentes dilutions des standards permettra de recueillir les données pour le tracé ultérieur de la courbe de référence. Ce n'est qu'après ces étapes que les tubes contenant les échantillons seront passés au cytomètre. Les données de cette acquisition

seront représentées sur les histogrammes de façon à ce que l'intensité en PerCP des différentes séries de billes de capture figure sur l'axe des ordonnées. L'intensité en PE représentée sur l'axe des abscisses correspond à la quantité de cytokine mesurée.

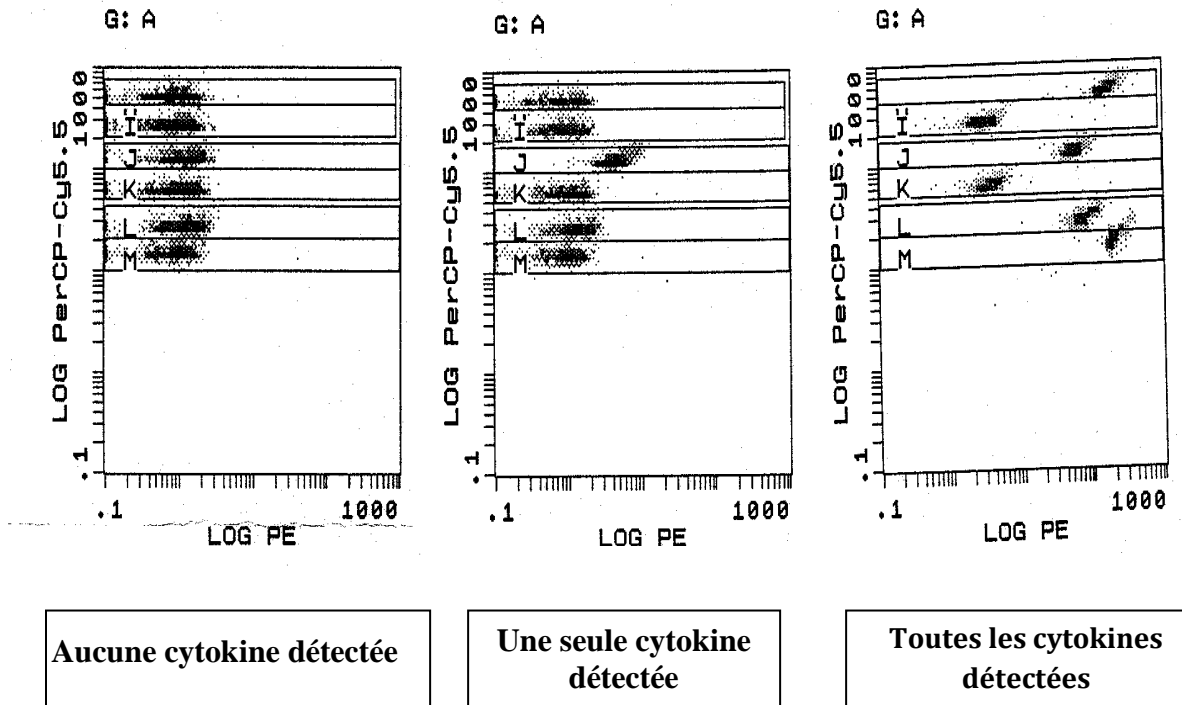


Figure 12: Exemple d'histogramme

#### o Analyse des résultats

Nous l'avons fait sous le logiciel Excel 2000. Les valeurs obtenues en canal de fluorescence lors de l'acquisition des données sur le cytomètre seront converties en pg/ml. La conversion comprend plusieurs étapes :



1. Le tracé de la courbe de référence de chacune des différentes cytokines à partir des fluorescences émises par les standards :

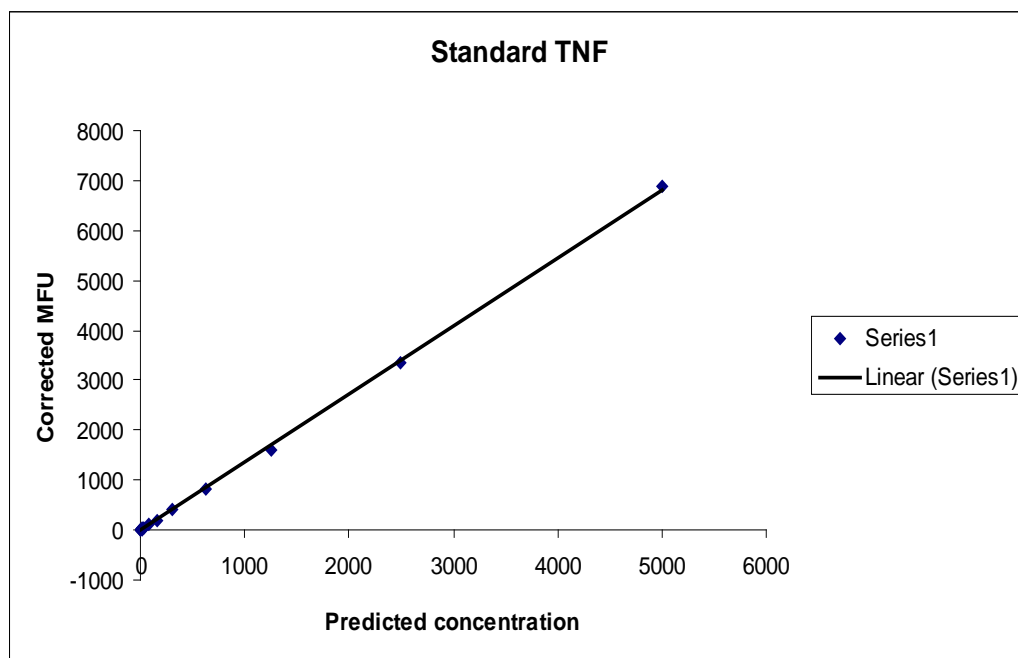
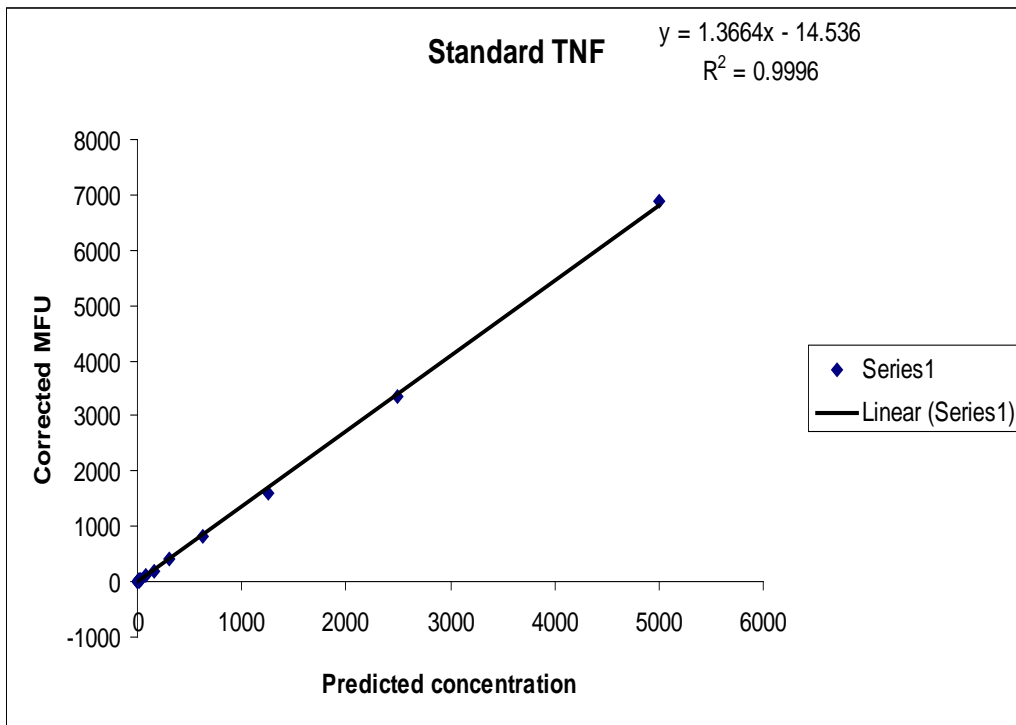


Figure 13: Exemple de Courbe Standard (cas du TNF)

2. Déterminer l'équation de la droite de régression



**Figure 14: Exemple de courbe avec droite de régression (cas du TNF)**

3. Appliquer l'équation aux valeurs obtenues à partir du dosage des différents échantillons.

A partir de différentes courbes standards tracées, on détermine l'intervalle de sensibilité du test. Toutes fluorescences converties en pg/ml devront être comprises entre ces deux valeurs. Lorsque la valeur de la fluorescence convertie en pg/ml est supérieure à la concentration maximale, le résultat n'est pas interprétable. L'échantillon devra être dilué et dosé de nouveau. Cependant lorsque la valeur est inférieure au

seuil minimal de détection, elle est ramenée à la concentration minimale.

## **7. Analyse des données**

Nos données ont été saisies sur Access et analysées sur stata version 10. Le test de khi carré de Pearson a été utilisé pour la comparaison de variables qualitatives dichotomiques (sexe) et quantitatives discrètes (âge).

Pour l'analyse des données immunologiques nous avons procédé à la détermination des différents taux plasmatiques médians par classe d'épisode et bras de traitement. Les tests P de Mann-Whitney et de Kruskal-Wallis ont été utilisés pour l'analyse comparative. Le seuil de significativité a été fixé à 5%.

## **8. Considérations éthiques**

L'étude a été approuvée par le comité d'éthique institutionnel de la Faculté de Médecine, de pharmacie et d'Odontostomatologie de l'université de Bamako. Le consentement éclairé de chaque participant d'âge supérieur ou égal à 18 ans, et celui des parents ou tuteurs pour les moins de 18 ans était obtenu avant toute inclusion dans l'étude.

## IV. RESULTATS

### 1. Résultats sociodémographiques

Tableau I: Distribution de la population d'étude par sexe et par bras de traitement.

Bras de traitement \ Sexe	AS/SP	AS/AQ	AR-L	total
Masculin	40	29	32	101
Féminin	33	37	41	111
Effectif	73	66	73	212

$p = \text{Chi}^2 \text{ de Pearson} = 0,3$

Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les bras de traitement quant à la répartition par sexe ( $p > 0,05$ ).

Le sexe ratio était de 1,09 en faveur des femmes.

Tableau II: Distribution de la population d'étude par classe d'âge et par bras de traitement.

Bras de traitement âge	AS/SP	AS/AQ	AR-L	TOTAL
Age < 5ans	42	44	45	131
Age >= 5ans	31	22	28	81
<b>Age médian</b>	3,8	3,6	4,2	
<b>Effectif</b>	73	66	73	<b>212</b>

p= Chi<sup>2</sup> de Pearson= 0,5

p= Kruskal Wallis = 0,98

Il y avait plus de volontaires âgés de moins de 5 ans quels que soit les bras de traitement. Cependant les volontaires de l'étude avaient des âges médians comparables selon les bras de traitement (P>0,05).

Tableau III: Distribution de la population d'étude par classe d'âge et par groupe étudié.

âge	Groupes			Total
	G1	G2	G3	
Age < 5ans	32	51	48	131
Age >= 5ans	21	30	30	81
Age médian	3,3	3,6	4,1	
Effectif	53	81	78	212

$p = \text{Chi}^2 \text{ de Pearson} = 0,5$

$p = \text{Kruskal Wallis} = 0,4$

Il y avait majoritairement plus de volontaires de moins de 5 ans dans les trois groupes. Les âges médians étaient comparables entre les groupes étudiés ( $p > 0,05$ ).

## 2. Résultats biologiques

Tableau IV: Moyenne de la densité parasitaire par bras de traitement au cours du premier épisode

Caractéristiques	Bras de traitement		
	AS/SP	AS/AQ	AR-L
MGDP (/μL) ± ET	29491 29743	± 38968 42665	± 24306 27045
Prévalence des porteurs de Gamétocytes (%)	10,96	3,03	8,22
Effectif	73	66	73

ET: Ecart type

MGDP: Moyenne Géométrique de la Densité Parasitaire

p= Kruskal Wallis= 0,09

p= Chi<sup>2</sup> de Pearson= 0,07

Les densités parasitaires des participants étaient comparables à l'inclusion dans les trois bras de traitement ( $p > 0,05$ ). Les porteurs de gamétocytes étaient plus nombreux dans le bras AS/SP et AR/L que dans le bras AS/AQ ( $p > 0,05$ ).

Tableau V: Distribution de la densité parasitaire à l'inclusion par groupe étudié.

Caractéristique	Groupes		
	G1	G2	G3
MGDP (/μL) ± ET	26575 34091	± 14575± 31020	21862± 36333
Effectif	53	81	78

**ET: Ecart type**

**MGDP: Moyenne Géométrique de la Densité Parasitaire**

**p= Kruskal Wallis= 0,11**

La densité parasitaire des participants à l'inclusion était comparable entre les groupes étudiés ( $p > 0,05$ ).



**Tableau VI: Comparaison du nombre médian des globules blancs et du taux médian d'hémoglobine par bras de traitement au cours du premier épisode de paludisme.**

Caractéristique	Bras de traitement			p
	AS/SP	AS/AQ	AR-L	
GB ( $10^9/L$ )	10,1	8,9	10	<b>0,73</b>
Hémoglobine (g/dl)	9,9	10,1	9,5	<b>0,83</b>
Effectif	73	66	73	

**GB: Globule Blanc**

**p= Kruskal Wallis**

Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les bras de traitement quant au nombre médian des globules blancs et du taux médian d'hémoglobine ( $p > 0,05$ ).

Tableau VII: Comparaison du nombre médian de GB et du taux médian d'hémoglobine par groupe étudié au cours du premier épisode de paludisme.

Groupes Caractéristique	G1	G2	G3	p
	GB ( $10^9/L$ )	9,8	10	9,3
Hémoglobine (g/dl)	9,9	9,6	10,3	<b>0,83</b>
Effectif	53	81	78	

**GB: Globule Blanc**

**p= Kruskal-Wallis**

Le nombre médian des Globules Blancs et du taux médian d'hémoglobine étaient comparable par groupe étudié ( $p > 0,05$ ).

Tableau VIII: Comparaison des titres d'IgG totaux spécifiques des différents antigènes entre les bras de traitement.

Bras de traitement \ Titres anticorps	AS-SP	AS-AQ	AR-L	p
AMA-1- IgG	78,8(66)	100,3(56)	107,7(68)	0,007
GLURP- IgG	71 (66)	97,3(52)	112,3(68)	0,0001
MSP-3- IgG	95,3(63)	90,7(55)	88,4(64)	0,7
Effectif	73	66	73	

(n): nombre d'expériences réussies.

p= valeur du Kruskal wallis

Les titres spécifiques IgG totaux anti-AMA-1 et anti-GLURP étaient significativement plus élevés dans les bras AR- L et AS- AQ que dans le bras AS- SP (respectivement  $p < 0,05$  et  $p < 0,001$ ). Par contre les titres spécifiques IgG totaux anti-MSP-3 ne variaient pas entre les bras de traitement ( $P > 0,05$ ).

Tableau IX: Comparaison des médianes des titres d'IgM et d'IgG1, IgG2, IgG3 spécifiques des différents antigènes entre les bras de traitement.

Titres D'anticorps	Bras de traitement			p
	AS-SP	AS-AQ	AR-L	
MSP-3 IgG1	94,4 (70)	113,3(63)	102,3(72)	0,1
MSP-3 IgG2	103,1(70)	112,0(63)	94,9 (72)	0,2
MSP-3 IgG3	103,8(70)	106,0(63)	99,4 (72)	0,8
MSP-3 IgM	110,6(70)	99,9 (63)	98,2 (72)	0,4
MSP-6 IgG1	99,9 (69)	104,1(62)	102,6(72)	0,9
MSP-6 IgG2	97,0 (69)	105,4(62)	103,7(72)	0,6
MSP-6 IgG3	105,8(69)	106,7(62)	94,2 (72)	0,4
MSP-6 IgM	109,0(69)	93,8 (62)	102,3(72)	0,3
SERP IgG1	97,9(70)	104,4(62)	105,2(72)	0,7
SERP IgG2	95,7(70)	106,2(62)	105,8(72)	0,4
SERP IgG3	98,8(70)	103,1(62)	105,5(72)	0,7
SERP IgM	97,5(70)	98,7 (62)	110,3(72)	0,3
GLURP IgG1	79,9(55)	90,6(51)	76,1(57)	0,2
GLURP IgG2	81,3(55)	92,2(51)	73,4(57)	0,1
GLURP IgG3	81,0(55)	83,6(51)	81,4(57)	0,9
GLURP IgM	83,6(55)	76,1(51)	85,7(57)	0,5
LSA-5 IgG1	98(68)	100 (59)	97,3(69)	0,9
LSA-5 IgG2	102,6(68)	93,1(59)	99(69)	0,6
LSA-5 IgG3	102,7(68)	93,2(59)	98,8(69)	0,6
LSA-5 IgM	94,7(68)	91,5(59)	108,1(69)	0,2
GBP-130IgG1	105(68)	103(59)	88(69)	0,2
GBP-130IgG2	107,2(68)	102,5(59)	86,4(69)	0,08
GBP-130IgG3	<b>113,1(68)</b>	<b>97,9(59)</b>	<b>84,7(69)</b>	<b>0,01</b>
GBP-130 IgM	105,9(68)	100,9(59)	89,1(69)	0,2
AMA-1 IgG1	90,9(63)	82,6(51)	93,6(64)	0.5
AMA-1 IgG2	88,6(63)	82,6(51)	96,2(64)	0.4
AMA-1 IgG3	89(63)	90,6(51)	89,1(64)	0.9
AMA-1 IgM	96,1( )	92,6(51)	80,5(64)	0.2
Effectif	73	66	73	

**(n): nombre d'expériences réussies.**

**p= Valeur de Kruskal Wallis**

Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les trois bras de traitement quant aux titres des sous-classes d'IgG anti- MSP-3 ; anti- MSP-6 ; anti- SERP ; anti- GLURP ; anti- LSA-5 et anti- AMA-1. Cependant une différence statistiquement significative était observée uniquement dans les titres d'IgG3 anti- GBP-130 ( $p < 0,05$ ).

Concernant les titres d'IgM, ils étaient comparables quels que soit le bras de traitement ( $p > 0,05$ ).

Tableau X: Comparaison des taux plasmatiques médians des cytokines Th1/Th2 entre les bras de traitement.

Cytokines	Bras de traitement			P
	AS-SP	AS-AQ	AR-L	
IL-2	53,7(60)	103,3(62)	127,1(70)	0,0001
IL-4	63,8(60)	106,9(62)	115,2(70)	0,0001
IL-5	96,5(60)	96,5(62)	96,5(70)	1
IL-10	80,9(55)	89,5(57)	92,8(63)	0,4
TNF- $\alpha$	96,6(60)	95 (62)	97,7(70)	0,4
IFN- $\gamma$	107,4(60)	106,5(62)	78,3(70)	0,003
Effectif	73	66	73	

(n): nombre d'expériences réussies.

p= Valeur de Kruskal Wallis

Les taux médians d'IL-2 et IL-4 étaient significativement plus élevés dans les bras AR- L et AS- AQ que dans le bras AS- SP ( $P < 0,001$ ). Par contre le taux d'IFN- $\gamma$  était significativement plus élevé dans les bras AS- SP et AS-AQ que dans le bras AR- L ( $P < 0,05$ ).

**Tableau XI: Comparaison des titres médians d'IgG totaux spécifiques des différents antigènes entre les groupes étudiés.**

Groupes Titres anticorps	G1	G2	G3	p
	AMA-1- IgG	4604.6(49)	6278.7(74)	11907.8(75)
GLURP- IgG	<b>255.2(51)</b>	<b>101.4(72)</b>	<b>104.3(71)</b>	<b>0,0003</b>
MSP-3- IgG	74.3(50)	97.2(72)	107.6(68)	0,46
Effectif	53	81	78	

**(n): nombre d'expériences réussies.**

**p= valeur du Kruskal wallis**

Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les titres spécifiques d'IgG totaux anti- AMA-1 et anti- MSP-3 entre les volontaires protégés et ceux susceptibles ( $p > 0,05$ ). Par contre les titres spécifiques d'IgG anti-GLURP étaient significativement plus élevés chez ceux qui ont fait 1 épisode comparés à ceux qui ont fait 3 ou plus de 5 épisodes de paludisme simple ( $p < 0,001$ ).

Tableau XII: Comparaison des titres médians d'IgM, d'IgG1, d'IgG2 et d'IgG3 spécifiques des différents antigènes entre les groupes des sujets étudiés.

Titres d'anticorps	Groupes		
	G 1	G 2+3	p
MSP-3 IgG1	0.9(52)	0.9(152)	0.5
MSP-3 IgG2	<b>0.8(52)</b>	<b>0.7(152)</b>	<b>0.0006</b>
MSP-3 IgG3	1.0(52)	0.9(152)	0.06
MSP-3 IgM	<b>2.5(52)</b>	<b>2.0(152)</b>	<b>0.004</b>
MSP-6 IgG1	<b>0.9(52)</b>	<b>1.4(150)</b>	<b>0.0001</b>
MSP-6 IgG2	<b>1.1(52)</b>	<b>0.9(150)</b>	<b>0.0001</b>
MSP-6 IgG3	1.0(52)	1.0(150)	0.7
MSP-6 IgM	1.6(52)	1.4(150)	0.7
SERP IgG1	<b>1.5(52)</b>	<b>1.0(151)</b>	<b>0.0001</b>
SERP IgG2	<b>1(52)</b>	<b>0.8(151)</b>	<b>0.0001</b>
SERP IgG3	<b>1.2(52)</b>	<b>1.0(151)</b>	<b>0.004</b>
SERP IgM	<b>2.1(52)</b>	<b>1.0(151)</b>	<b>0.0001</b>
GLURP IgG1	<b>1.9(50)</b>	<b>1.3(112)</b>	<b>0.001</b>
GLURP IgG2	<b>1.0(50)</b>	<b>0.7(112)</b>	<b>0.0001</b>
GLURP IgG3	<b>0.3(50)</b>	<b>0.9(112)</b>	<b>0.0001</b>
GLURP IgM	1.6(50)	1.4(112)	0.06
LSA-5 IgG1	1.1(51)	0.9(144)	0.08
LSA-5 IgG2	1.3(51)	1.3(144)	0.7
LSA-5 IgG3	<b>0.8(51)</b>	<b>0.6(144)</b>	<b>0.04</b>
LSA-5 IgM	<b>5.6(51)</b>	<b>3.8(144)</b>	<b>0.0001</b>
GBP-130IgG1	1.3(51)	1.4(144)	0.91
GBP-130IgG2	<b>0.9(51)</b>	<b>1.1(144)</b>	<b>0.0002</b>
GBP-130IgG3	<b>1.0(51)</b>	<b>1.2(144)</b>	<b>0.02</b>
GBP-130 IgM	1.4(51)	1.5(144)	0.6
AMA-1 IgG1	<b>1.4(50)</b>	<b>2.9(127)</b>	<b>0.004</b>
AMA-1 IgG2	<b>0.6(50)</b>	<b>0.8(127)</b>	<b>0.0001</b>
AMA-1 IgG3	<b>1.0(50)</b>	<b>1.2(127)</b>	<b>0.0006</b>
AMA-1 IgM	1.2(50)	1.4(127)	0.60
Effectif	53	159	



**G 1: groupe des sujets protégés ; G 2+3: groupe des sujets susceptibles**

Il y avait une différence statistiquement significative de titres spécifiques d'IgM et d'IgG2 anti- MSP-3 entre les sujets protégés et ceux qui étaient susceptibles (respectivement  $P < 0,05$  et  $P < 0,001$ ).

Les sujets protégés avaient plus d'IgG2 anti- MSP-6 que les sujets susceptibles ( $P = 0,0001$ ). Par contre les sujets susceptibles possédaient plus d'IgG1 anti-MSP6 que les sujets protégés ( $P < 0,001$ ).

Il existait une différence statistiquement significative entre Les titres d'IgG1, d'IgG2, d'IgG3 et d'IgM spécifiques anti-SERP en faveur des sujets protégés (respectivement  $P < 0,001$  ;  $P < 0,001$  ;  $P < 0,05$  ;  $P < 0,001$ ).

Les titres médians d'IgG1 et d'IgG2 anti-GLURP étaient significativement plus élevés chez les sujets protégés que les sujets susceptibles (respectivement  $p < 0,05$  et  $P < 0,001$ ). Par contre les sujets susceptibles avaient plus de titres d'IgG3 anti-GLURP que les protégés ( $p < 0,001$ ).

Il y avait une différence statistiquement significative quant aux titres spécifiques d'IgM et d'IgG3 anti-LSA5 en faveur des sujets protégés (respectivement  $p < 0,001$  et  $p < 0,05$ ).

Les sujets susceptibles avaient plus d'IgG2 et d'IgG3 anti-GBP-130 que les sujets protégés (respectivement  $P < 0,001$  et  $P < 0,05$ ).

Les titres médians d'anticorps de type IgG1, IgG2 et IgG3 anti- AMA-1 n'étaient pas comparables entre les sujets

protégés et les sujets susceptibles (respectivement  $p < 0,05$   
 $p < 0,001$  ;  $P < 0,05$ ).

**Tableau XIII: Comparaison des taux plasmatiques médians des cytokines Th1/Th2 entre les sujets protégés et les susceptibles.**

Cytokines	Groupes		
	G 1	G 2+3	P
IL-2	80 (52)	28.85(140)	0.00001
IL-4	13.2 (52)	12.67(140)	0.21
IL-5	20 (52)	20 (140)	1
IL-10	216.09(52)	216.21(140)	0.64
TNF- $\alpha$	20 (52)	20 (140)	1
IFN- $\gamma$	43.52(52)	33.20(140)	0.04
Effectif	53	159	

**(n): nombre d'expériences réussies.**

**G 1: groupe 1; groupe des protégés.**

**G 2+3: groupe 2+3; groupe des susceptibles.**

**P= Valeur de Mann whitney**

Parmi les cytokines évaluées les taux d'IFN- $\gamma$  et d'IL-2 étaient significativement plus élevés chez les volontaires qui ont fait 1 épisode de paludisme que ceux qui ont fait plus de 2 épisodes (respectivement  $p < 0,05$  et  $p < 0,0001$ ). Par contre les taux des autres cytokines étaient comparables entre les deux groupes de volontaires.

## V. DISCUSSION

L'objectif de notre travail était de déterminer l'impact de l'administration répétée de trois combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine sur les réponses immunitaires contre la malaria dans les conditions d'une exposition naturelle. Pour atteindre cet objectif nous avons choisi Bougoula-Hameau où les patients sont exposés naturellement au paludisme et sont traités avec différentes combinaisons d'antipaludiques et suivis pendant deux ans dans le cadre d'un essai clinique.

### 1. Méthodologie

Le choix de Bougoula s'expliquait par le fait de son accessibilité géographique en toute saison, l'existence de données épidémiologiques, l'adhésion de la population aux études antérieures et la présence de l'équipe du DEAP étaient des facteurs prometteurs pour le bon déroulement de cette étude. Au cours de cette étude nous avons effectué un suivi prospectif, longitudinal pour enregistrer l'ensemble des cas de paludisme confirmés par microscopie optique. L'analyse immunologique a été effectuée sur 212 sujets âgés d'au moins 6 mois et repartis en trois groupes en fonction du nombre d'épisodes palustres. Le dosage des différents anticorps a été effectué par une méthode ELISA standardisée et celui des cytokines par la cytométrie en flux. Concernant le CBA nous avons enregistré pour la plupart des échantillons testés des valeurs inférieures au seuil minimal de détection pour le TNF- $\alpha$  et L'IL5. Ces valeurs

ont été ramenées à la concentration minimale expliquant leur tendance de distribution.

## **1.1. Caractéristiques sociodémographiques de la sous-population.**

### **1.1.1. Le sexe**

Le sexe féminin était majoritaire avec 52,4%. Le sexe ratio était de 1,09 en faveur des femmes (Tableau I). Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les bras de traitement quant à la répartition de l'échantillon par sexe ( $p=0,3$ ) (Tableau I).

### **1.1.2. L'âge**

L'âge médian était de 3,8 ; 3,6 et 4,2 respectivement pour les bras AS-SP, AS-AQ et AR-L. Il était de 3,3 ; 3,6 et 4,1 respectivement pour le groupe1, groupe2 et groupe3. Il n'existait pas de différence statistiquement significative entre les âges médians par bras de traitement et groupes étudiés (respectivement  $P=0,98$  et  $P=0,4$ ) (Tableaux II et III). Dans les régions endémiques palustres, plusieurs études ont montré que la prévalence de l'infection palustre et l'incidence clinique du paludisme différaient parmi les groupes d'âges[1].

## **1.2. Caractéristiques parasitologiques et biologiques de la sous-population.**

### **1.2.1. Caractéristiques parasitologiques**

Les variables parasitologiques explorées étaient la densité parasitaire à *Pf* et le portage de gamétoocyte. Elles étaient comparables entre les bras de traitement ( $p > 0,05$ ) (Tableau IV). La densité parasitaire était comparable entre les groupes étudiés ( $P = 0,11$ ) (Tableau V). Ces résultats indiquent que les différences observées ne sauraient s'expliquer par la densité parasitaire, ni le portage de gamétoocyte.

### **1.2.2. Les caractéristiques biologiques**

Les variables biologiques mesurées étaient le nombre des Globules Blancs et le taux d'hémoglobine. Elles ne différaient pas statistiquement selon les bras de traitement ( $p > 0,05$ ) et les groupes étudiés ( $p > 0,05$ ). Les taux médians d'hémoglobine en fonction des bras de traitement et des groupes étudiés étaient supérieurs à 5g/dl.

## **2. Impact du bras de traitement sur les réponses immunitaires**

### **2.1. Les réponses humorales (protection d'anticorps)**

#### **➤ Les IgG totaux**

Les réponses naturelles d'IgG totaux spécifiques des antigènes AMA-1 et GLURP étaient plus élevées dans les bras de traitement AS- AQ et AR- L (respectivement  $P=0,007$  et  $P=0,0001$ ) (Tableau VIII). Cependant Togo A avait rapporté que les volontaires du bras AS- SP étaient plus protégés contre les réinfections que ceux des deux autres bras[97]. Nos résultats montrent que cette protection serait due à la demi-vie plus longue de la SP. En effet la lumefantrine a une demi-vie de trois jours, l'amodiaquine entre un à dix jours, la sulfadoxine entre quatre à neuf jours et la pyriméthamine quatre jours[107]. L'association sulfadoxine-pyriméthamine devrait avoir au maximum une demi-vie de 13 jours.

#### **➤ Les IgG1, IgG2, IgG3 et IgM**

Pour les réponses naturelles des sous-classes d'IgG (IgG1, IgG2, IgG3) et des IgM spécifiques des antigènes étudiés, seule la réponse IgG3 anti-GBP-130 présentait une différence statistiquement significative entre les bras de traitement ( $P=0,01$ ) (Tableau IX). Ces résultats seraient dus au fait que les IgG totaux ne représentent pas la somme arithmétique des sous-classes d'IgG.

Les techniques ELISA utilisées sont sensibles mais souvent peu spécifiques dans la détection des sous-classes d'IgG.

## **2.2. Les réponses cellulaires (cytokines Th1/Th2)**

Les taux d'IL-2 et IL-4 étaient plus élevés chez les sujets qui ont reçu les combinaisons AS- AQ et AR- L que ceux qui ont reçu la combinaison AS- SP ( $p < 0,001$ ). Par contre les taux de l'IFN- $\gamma$  étaient plus élevés chez les volontaires des bras AS- SP et AS- AQ que ceux du bras AR- L ( $p < 0,05$ ) (Tableau X). Selon nos résultats, il semble que l'artesunate produit un effet inflammatoire et que l'artemether produise un effet anti- inflammatoire.

## **3. Réponses immunitaires naturelles et résistance clinique.**

### **3.1. Les titres plasmatiques médians d'IgG totaux**

Concernant les réponses naturelles d'IgG totaux spécifiques des antigènes AMA-1, MSP-3 et GLURP, une seule réponse Ac en l'occurrence la réponse anticorps anti-GLURP est apparue très significativement plus élevée chez les individus protégés que ceux sensibles à l'infection palustre ( $P = 0,0003$ ) (Tableau XI). Ce résultat est conforté par des études menées au Ghana par Daniel Dodoo et collaborateurs qui ont trouvé que l'IgG anti-GLURP ( $P = 0,04$ ) était associée à la réduction du risque de faire le paludisme[33]. Aussi au Burkina-Faso, Issa Niébé et collaborateurs ont prouvé la



capacité d'IgG spécifiques anti-GLURP ( $P=0,009$ ) à réduire l'incidence du paludisme[56]. Les réponses naturelles d'IgG totaux spécifiques des antigènes AMA-1 et MSP-3 n'ont pas permis d'établir une association avec la protection. Plusieurs facteurs semblent pouvoir expliquer ces différences :

La première porte sur l'effectif des volontaires participants à ces études, dans les deux cas précédents, les cohortes étaient plus importantes en nombre de participants que la nôtre.

La seconde concerne, le design des études. Nous sommes partir d'un essai clinique randomisé ouvert comparatif à trois bras de traitement. Par contre les autres études étaient conçues pour identifier des potentiels candidats vaccins contre le paludisme dans les conditions d'une exposition naturelle.

### **3.2. Les IgG1, IgG2, IgG3 et l'isotype IgM**

Les réponses naturelles des IgG1, IgG2, IgG3 et de l'isotype IgM ont été analysées respectivement pour les antigènes MSP-3, MSP-6, SERP, GLURP, LSA-5, GBP-130 et AMA-1.

#### **➤ Les sous-classes cytophiles (IgG1 et IgG3)**

Concernant les réponses des sous-classes cytophiles étudiées, seulement les IgG1 et IgG3 anti-SERP ; IgG1 anti-GLURP et les IgG3 anti-LSA-5 étaient associées à la résistance clinique contre le paludisme (respectivement  $P=0,001$ ,  $P=0,004$ ,  $P=0,001$ ,  $P=0,04$ ) (Tableau XII). Nos résultats concordent avec ceux de Bouharoun Tayoun et

collaborateurs qui ont démontré à partir d'observations *in vivo et in vitro* que ces sous-classes cytophiles seraient impliquées dans les mécanismes de protection contre les *Plasmodium*[46]. Par contre les réponses IgG1 et IgG3 anti-AMA-1, IgG3 anti-GLURP, IgG3 anti-GBP-130 et IgG1 anti-MSP-6 n'étaient pas associées à la protection contre le paludisme (respectivement  $P=0,004$ ,  $P=0,0006$ ,  $P=0,0001$ ,  $P=0,02$ ,  $P=0,0001$ ).

#### ➤ La sous-classe non cytophile (IgG2)

Pour la sous-classe non cytophile, les réponses spécifiques IgG2 anti-MSP3, anti-MSP-6, anti-SERP et anti-GLURP étaient négativement corrélées aux cas de paludisme (respectivement  $P=0,0006$ ,  $P=0,0001$ ,  $P=0,0001$ ,  $P=0,0001$ ) (Tableau XII). Nos données sont en accord avec les observations de Chappel et collaborateur qui ont démontré que dans certains cas de polymorphisme, les IgG2 pouvaient être considérées par les récepteurs Fc $\gamma$ RI comme des IgG1 cytophiles donc protecteur [22]. Aussi Aucan et Collaborateurs ont démontré que les titres élevés d'anticorps IgG2 en combinaison avec des variants alléliques du Fc $\gamma$ RIIa étaient associés à une diminution du risque d'infection à *P.falciparum* [9]. Les anticorps interviennent dans la protection contre l'infection palustre par différents mécanismes dont ceux impliquant une inhibition directe de la croissance du parasite[32]. En revanche les réponses spécifiques d'IgG2 anti-GBP130 et AMA-1 étaient positivement corrélées aux accès palustres (respectivement  $P=0,0002$  et  $P=0,0001$ ). Des observations semblables ont été effectuées par Soe et Bouharoun Tayoun qui ont suggéré que les IgG2 seraient

neutres ou bloquant vis-à-vis des mécanismes de protection contre les *plasmodium* et donc potentiellement associées au paludisme [46,88].

#### ➤ **L'isotype IgM**

Concernant l'isotype IgM, les réponses spécifiques IgM anti-MSP-3, anti-SERP et anti-LSA-5 étaient associées à la résistance clinique contre le paludisme (respectivement  $P=0,004$ ,  $P=0,0001$ ,  $P=0,0001$ ) (Tableau XII). Nos résultats vont dans le même sens que les observations de Boudin et collaborateurs qui ont démontré la capacité des IgM à engendrer la protection contre le paludisme par le biais des mécanismes tels que : le blocage de l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes ; l'activation du complément et l'agglutination des mérozoïtes[14].

### **3.3. Les cytokines Th1/ Th2**

Pour les taux plasmatiques médians des cytokines Th1/Th2 l'analyse a montré que les niveaux d'IL-2 et d'INF- $\gamma$  dans les plasmas étaient significativement plus élevés chez les sujets protégés que les sujets susceptibles (respectivement  $P=0,0000$  et  $P=0,04$ ) (Tableau XIII). Ces résultats concordent avec ceux de Dodo et collaborateurs qui ont trouvé un effet protecteur de l'INF- $\gamma$  à *P. falciparum* chez les enfants vivant dans des régions d'endémie du paludisme[34]. Egalement Troye-Blomberg et collaborateurs avaient démontré le rôle des Cytokines pro-inflammatoires dans la protection contre le paludisme[100].

## VI. CONCLUSION

Nos résultats indiquent que :

- Les combinaisons AS- AQ et AR- L étaient associées à des titres plus élevées d'IgG anti- plasmodiales que la combinaison AS- SP.
- Les combinaisons à base d'artesunate étaient associées à une réponse INF- $\gamma$  et la combinaison à base d'artemether à une réponse IL-4.
- Les cytokines Th1 (IL2, INF- $\gamma$ ) étaient plus élevées chez les sujets protégés que chez ceux qui étaient susceptibles à l'infection palustre.
- Les réponses spécifiques anti- GLURP ; anti- SERP ; anti- MSP-3 et anti- LSA-5 étaient en faveur des sujets protégés.
- Les réponses spécifiques anti- AMA-1 et anti-GBP-130 étaient en faveur des sujets susceptibles.

Nos résultats pourraient avoir un intérêt dans:

- L'exploration des pistes d'identification des facteurs immunologiques de protection.
- La conception de futurs vaccins.

## VII. RECOMMANDATIONS

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

- De poursuivre cette étude pour explorer les IgG totaux des antigènes MSP-6, SERP, LSA-5 et GBP-130.
- De vérifier la fonctionnalité des immunoglobulines G protecteurs.
- D'entreprendre des études similaires dans d'autres faciès épidémiologiques afin de vérifier les résultats obtenus.

# BIBLIOGRAPHIE

- [1] Abdoulaye A.Djimde, Ogobara K.Doumbo, et coll, Clearance of drug-resistant parasites as a model for protective immunity in *PLASMODIUM FALCIPARUM* malaria, *Am J Trop Med Hyg* (2003) pp. 558-563.
- [2] Allen SJ, O'donnell A, Ilexander NDE, et al, **ALPHA+-Thalassemia protects children against disease caused by other Infections as well as malaria.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94 (1997) pp. 14736-14741.
- [3] Allison AC, **Population genetics of abnormal human haemoglobins and glucose-6-phosphate deshydrogenase deficiency** in Africa, Blackwell Scientific 6 (1957) pp. 431-434.
- [4] Alonso PL, Sacarlal J, et al, Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial, *Lancet* 364 (2004) pp. 1411-1420.
- [5] Alonso PL, Sacarlal J, et al, Duration of protection with RTS,S/AS02A malaria vaccine in prevention of *Plasmodium falciparum* disease in Mozambican children: single-blind extended follow-up of a randomised controlled trial, *Lancet* 366 (2005) pp. 2012-2018.
- [6] Anders RF, Crewther PE, et al, Immunisation with recombinant AMA-1 protects mice against infection with *Plasmodium chabaudi*, *Vaccine* 16 (1998) pp. 240-247.
- [7] Archives Nationales, Notice Géographique, Historique Et Statistique Poste De Sikasso, 2010.
- [8] Argawal A, Guindo A, et al, Hemoglobin C associated with protection from severe malaria in the Dogon of Mali, a West African population with a low prevalence of hemoglobin S, *Blood* 96 (2000) pp. 2358-2363.
- [9] Aucan C, Traore Y, et al, High immunoglobulin G2 (IgG2) and low IgG4 levels are associated with human resistance to *Plasmodium falciparum* malaria, *Infection And Immunity* 68 (2000) pp. 1252-1258.
- [10] Audran R, Cachat M, et al, Phase I malaria vaccine trial with a long synthetic peptide derived from the merozoite surface protein 3 antigen, *Infect Immun* 73 (2005) pp. 8017-8026.
- [11] Auron PE, Webb AC, et al, Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA, *Proc Natl Acad Sci* 8124 (1984) pp. 7907-7911.
- [12] Bai T, Becker M, et al, Structure of AMA1 from *Plasmodium falciparum* reveals a clustering of polymorphisms that surround a conserved hydrophobic pocket, *Proc Natl Acad Sci* 102 (2005) pp. 12736-12741.
- [13] Bojang KA, Milligan PJ, Pinder M, Vigneron L, et al, Efficacy of RTS,S/AS02 malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* infection in semi-immune adult men in The Gambia: a randomised trial, *Lancet* 358 (2001) pp. 1927-1934.

- [14] Boudin C, Chumpitazi B, et al, Possible role of specific immunoglobulin M antibodies to *Plasmodium falciparum* antigens in immunoprotection of humans living in a hyperendemic area, Burkina Faso, *J Clin Microbiol* 31 (2010) pp. 636-641.
- [15] Bouharoun-Tayoun H, Attanah P, Sabchareon A., et al, Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes, *J Exp Med* (1990) pp. 1633-1641.
- [16] Bouharoun-Tayoun H and Druilhe P, *Plasmodium falciparum* malaria: evidence for an isotype imbalance which may be responsible for delayed acquisition of protective immunity., *Infect Immun* 60 (1992) pp. 1473-1481.
- [17] Bronner U, Divis PC, et al, Swedish traveller with *Plasmodium knowlesi* malaria after visiting Malaysian Borneo, *Malar J* (2009).
- [18] Bruce-chwatt LJ, Man against malaria: conquest or defeat, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* 73 (1979) pp. 605-617.
- [19] Carme B, Kenmorgne D, al, Indices Plasmodiques et charges parasitaires chez des donneurs de sang à Brazzaville CONGO, *Ann. Soc. Belge Med Trop* 73 (1993) pp. 179-187.
- [20] Carson WE, Lindemann MJ, et al, The functional characterization of interleukin-10 receptor expression on human natural killer cells, *Blood* 85 (1995) pp. 3577-3585.
- [21] Chang SP, Case SE, et al, A recombinant baculovirus 42-kilodalton C-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 protects Aotus monkeys against malaria. *Infect Immun* 64 (1996) pp. 253-261.
- [22] Chappel M, Isenman D, et al, Identification of a secondary Fc gamma RI binding site within a genetically engineered human IgG antibody, *J Biol Chem* 268 (1993) pp. 25124-25131.
- [23] Cisse B, Sokhana C, Boulanger D, et al, Seasonal intermittent preventive treatment with artesunate and sulfadoxine-pyrimethamine for prevention of malaria in Senegalese children: a randomised, placebo-controlled, double-blind trial, *Lancet* 367 (2006) pp. 659-667.
- [24] Coggeshall L and Kumm U, Demonstration of passive immunity in experimental monkey malaria, *J. Exp. Med* (1937) pp. 66-177.
- [25] Cohen S, Mc Gregor A, al, Gamma globulin and acquired immunity to human malaria, *Nature* 192 (1961) pp. 733-737.
- [26] Coulibaly D, Diallo DA, Thera MA., et al, Impact of pre-season treatment on incidence of *falciparum* malaria and parasite density at a site for testing malaria vaccines in Bandiagara, Mali, *Am J Trop Med Hyg* 67 (2002) pp. 604-610.
- [27] Cowman AF, Crabb BS, et al, Invasion of red blood cells by malaria parasites, *Cell* 124 (2006) pp. 755-766.
- [28] Daniel Webster and Adrian V.S.Hill, Progress with new malaria vaccines, *Bull World Health Organ* 81 (2003) pp. 902-909.

- [29] Darie H and Haba M, Paludisme congénital, *Med Trop* 52 (1992) pp. 175-178.
- [30] Debacker M, Paludisme: Historique, Mythes, Croyances Et Idées Recues, Faculté de médecine de Creteil, *Paris Val de Marne*, 2000.
- [31] Dicko A, Sagara I, Sissoko SM, et al, Impact of intermittent preventive treatment with sulphadoxine-pyrimethamine targeting the transmission season on the incidence of clinical malaria in children in Mali, *Malaria Journal* 7 (2008) p.123.
- [32] Diouf B, Pradiens B, Spiegel A, et al, Réévaluation des tests d'inhibition de culture et de réinvasion parasitaire de *P. falciparum* pour mesurer un degré de prémunition chez des individus vivant en zone d'endémie, *Dakar Med* 47 (2002) pp. 5-11.
- [33] Dodoo D, Aikins A , et al, Cohort study of the association of antibody levels to AMA1, MSP1, MSP3 and GLURP with protection from clinical malaria in Ghanaian children, *Malaria Journal* 7 (2008) p.142.
- [34] Dodoo D, Omer FM, et al, Absolute levels and ratios of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in vitro predict clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria, *Journal of Infectious Diseases* 185 (2002) pp. 971-979.
- [35] Doumbo O, Ouattara N I, et al, Approche éco-géographique du paludisme en milieu urbain. La ville de Bamako au Mali, *Ecol Hum* 8 (1989) p.15.
- [36] Druilhe P, Khusmith S, et al, Epidemiological correlation between levels of antibodies promoting merozoite phagocytosis of *Plasmodium falciparum* and malaria- immune status. *Infect Immun* 55 (1987) pp. 888-891.
- [37] Fairley NH, Sidelights on malaria in man obtained by subinoculation experiments, *Trans R Soc Trop Med Hyg* 40 (1947) pp. 621-676.
- [38] Favia G, delta TA, Bagayoko M, et al, Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation , *Insect Mol Biol* 6 (1997) pp. 377-383.
- [39] Federica V, Jacques S, et al, Haemoglobin C and S Role in Acquired Immunity against *Plasmodium falciparum* Malaria., *PLoS ONE* 2 (2007) p.10.
- [40] Fiorentino DF, Zlotnik A, et al, IL-10 acts on the antigen presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells, *Journal of Immunology* 146 (1991) pp. 3444-3451.
- [41] Flint J, Harding RM, Boyce AJ., et al, The population genetics of the haemoglobinopathies, *Baillieres Clin Haematol* 111 (1998) pp. 1-51.
- [42] Genton B, Betuela I, et al, A recombinant blood-stage malaria vaccine reduces *Plasmodium falciparum* density and exerts selective pressure on parasite populations in a phase 1-2b trial in Papua New Guinea, *J Infect Dis* 185 (2002) pp. 820-827.
- [43] Goldring J.D, M.E.Molyneux, et al, *Plasmodium falciparum*: diversity of isolates from Malawi in their cytoadherence to melanoma cells and monocytes in vitro, *Br J Haematol* 81 (2010) pp. 413-418.
- [44] Gordon DM, McGovern TW, et al, Safety, immunogenicity, and efficacy of a recombinantly produced *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein- hepatitis B surface antigen subunit vaccine, *J Infect Dis* 171 (1995) pp. 1576-1585.



- [45] Grellier P, La Differentiation Des Mérozoïtes De *Plasmodium Falciparum* Et La Phase De Réinvasion Des Globules Rouges, Biologie fondamentale et appliquée, Poitiers, 1990.
- [46] Groux.H and J.Gysin, Opsonization as an effector mechanism in human protection against asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*: functional role of IgG subclasses, Res Immunol 141 (1990) pp. 529-542.
- [47] Guindo A, Fairhurst RM, Doumbo OK, Wellens TE, Diallo DA, X-linked G6PD deficiency protects hemizygous males but not heterozygous females against severe malaria., PLoS Med 4 (2007) p.3.
- [48] Gupta S, Snow RW, Donnelly CA, et al, Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections, Nat Med 5 (1999) pp. 340-343.
- [49] Healer J, D.McGuinness, et al, Complement-mediated lysis of *Plasmodium falciparum* gametes by malaria-immune human sera is associated with antibodies to the gamete surface antigen Pfs230, Infect Immun 65 (1997) pp. 3017-3023.
- [50] Healer J, Murphy V, et al, Allelic polymorphisms in apical membrane antigen-1 are responsible for evasion of antibody-mediated inhibition in *Plasmodium falciparum*, Mol Microbiol 52 (2004) pp. 159-168.
- [51] Herrington DA, Clyde DF, et al, Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* sporozoites, Nature 328 (1987) pp. 257-259.
- [52] Hill A, Pre-erythrocytic malaria vaccines: towards greater efficacy, Nat Rev Immunol 6 (2006) pp. 21-32.
- [53] Holder AA, Guevara Patino JA, et al, Merozoite surface protein 1, immune evasion, and vaccines against asexual blood stage malaria, Parasitologia 41 (1999) pp. 409-414.
- [54] Holland G and Zlotnik A, Interleukin-10 and cancer, Cancer Investigation 11 (1993) pp. 751-758.
- [55] Irwin W Sherman, *Plasmodium*, a genus of parasitic protozoans that are causative agents of disease malaria, Nature Publishing Group Encyclopedia of life sciences (2001).
- [56] Issa N, Amidou D, et al, Humoral Responses to *Plasmodium falciparum* Blood-Stage Antigens and Association with Incidence of Clinical Malaria in Children Living in an Area of Seasonal Malaria Transmission in Burkina Faso, West Africa, Infection And Immunity 76 (2008) pp. 759-766.
- [57] Karunaweera N, Grau G, et al, Dynamics of fever and serum levels of tumor necrosis factor are closely associated during clinical paroxysms in *Plasmodium vivax* malaria., Proc Natl Acad Sci 89 (1992) pp. 3200-3203.
- [58] Kern P, Hemmer CJ, et al, Elevated tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 serum level as markers for complicated *Plasmodium falciparum* malaria., Am J Med 87 (1989) pp. 139-143.
- [59] Khusmith S and Druilhe P, Antibody-dependent ingestion of *P. falciparum* merozoites by human blood monocytes, Parasite Immunol 5 (1983) pp. 357-368.

- [60] Kocken CH, Withers-Martinez C, et al, High-level expression of the malaria blood-stage vaccine candidate *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and induction of anti- bodies that inhibit erythrocyte invasion, *Infect Immun* 70 (2002) pp. 4471-4476.
- [61] Kumaratilake LM, Ferrante A, et al, The role of complement, antibody, and tumor necrosis factor alpha in the killing of *Plasmodium falciparum* by the monocytic cell line THP-1, *Infect Immun* 65 (1997) pp. 5342-5345.
- [62] Kwiatkowski D, Hill AV, et al, TNF concentration in fatal cerebral, non fatal cerebral and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria, *Lancet* 336 (1990) pp. 1201-1204.
- [63] Laveran A, Note sur un nouveau parasite trouvé dans le sang de plusieurs maladies atteints de fièvre palustre, *Bull. Acad. Med* (1880).
- [64] Macpherson G G, M J Warrell, et al, Human cerebral malari A quantitative ultrastructural analysis of parasitizederythrocyte sequestration, *Am J Patho* 119 (1985) pp. 385-401.
- [65] Malkin EM, Diemert DJ, et al, Phase 1 clinical trial of apical membrane antigen 1: an asexual blood-stage vaccine for *Plasmodium falciparum* malaria, *Infect Immun* 73 (2005) pp. 3677-3685.
- [66] Marc Gentilini, Martin Danis , et Jean Mouchet, *Médecine Tropicale* , (Université Francophone) Paludisme, 1991.
- [67] Marsh K, Otoo L, e, al, Antibodies to blood stage antigens of *Plasmodium falciparum* in rural Gambians and their relation to protection against infection, *Trans R Soc Trop Med Hyg* 83 (1989) pp. 293-303.
- [68] Marsh K, Sherwood J A, et al, Parasite-infected-cell-agglutination and indirect immunofluorescence assays for detection of human serum antibodies bound to antigens on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes, *J Immunol Methods* 91 (1986) pp. 107-115.
- [69] Martin Danis and Jean Mouchet, *Paludisme*, Paris, 1991.
- [70] Maxwell CA, Msuya E, Sudi M, t al, Effect of community-wide use of insecticide-treated nets for 3-4 years on malarial morbidity in Tanzania, *Trop Med Int Health* 7 (2002) pp. 1003-1008.
- [71] Mcgregor IA and Smith DA, A health, nutrition and parasitological survey in a rural village (Keneba) in west Kiang, Gambia, *Trans R Soc Trop Med* 46 (1952) pp. 403-427.
- [72] Mercerau-Puijalon O, Le polymorphisme de *Plasmodium falciparum* et ses conséquences biologiques, *L'Eurobiologiste* 34 (2000) pp. 81-86.
- [73] Miller L H, Mason S J, Clyde DF, et al, The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med* 295 (1976) pp. 302-304.
- [74] Miller R L, Ikram S, Armelagos GJ., et al, Diagnosis of *Plasmodium falciparum* infections in mummies using the rapid manual ParaSight-F test, *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88 (1994) pp. 31-32.

- [75] Modiano D and et al, **Haemoglobin C protects against clinical *P. falciparum* malaria**, Nature 15 (2001) pp. 305-308.
- [76] Mordmuller BG, Metzger WG, et al, Tumor necrosis factor in Plasmodium falciparum malaria: high plasma level is associated with fever but high production capacity is associated with rapid fever clearance, Eur Cytokine Netw 8 (2010) pp. 29-35.
- [77] Mosmann TR, Properties and functions of interleukin-10, Advances in Immunology 56 (1994) pp. 1-26.
- [78] Muegge K and Durum S, The role of interleukin 1 in the immune response. In: Bomford R and Henderson B eds Interleukine 1, Inflammation and Disease, Elsevier (1989).
- [79] Odile Mercereau-Puijalon, Vaccins contre le paludisme un long chemin semé d'embûche, Editions Scientifiques Et Médicales Elsevier SAS (2002).
- [80] Oeuvray C, Bouharoun-Tayoun H, et al, Merozoite surface protein-3: a malaria protein inducing antibodies that promote *Plasmodium falciparum* killing by cooperation with blood monocytes, Blood 84 (1994) pp. 1594-1602.
- [81] Ong'echa JM, Lal AA, Terlouw DJ, et al, Association of interferon-gamma responses to pre-erythrocytic stage vaccine candidate antigens of Plasmodium falciparum in young Kenyan children with improved hemoglobin level, Am J Trop Med Hyg. ; 685 (2003) pp. 590-597.
- [82] Ouologuem D, Déterminants Immunologiques Et Génomiques De La Clairance Des Souches De Plasmodium Falciparum Résistantes à La Chloroquine, Thèse pharmacie, Bamako, 2004.
- [83] Ruwende C, Fhoo SC, Snow RW, Yates SNR, Kwiatkowski D., **Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria**, Nature 376 (1995) pp. 246-249.
- [84] Saul A, Lawrence G, et al, A human phase 1 vaccine clinical trial of the Plasmodium falciparum malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1 in Montanide ISA720 adjuvant, Vaccine 23 (2005) pp. 3076-3083.
- [85] Sergente E, Parrot L, Donatien A, et al, une question de terminologie: immuniser et prémunir, Bull Soc Path Exot 17 (1924) pp. 37-38.
- [86] Singh S, Soe S, et al, Identification of a conserved region of Plasmodium falciparum MSP3 targeted by biologically active antibodies to improve vaccine design, J Infect Dis 190 (2004) pp. 1010-1018.
- [87] Snounou G, Gruner AC, et al, The Plasmodium sporozoite survives RTS,S vaccination, Trends Parasitol 21 (2005) pp. 456-461.
- [88] Soe S, Theisen M., et al, Association between protection against clinical malaria and antibodies to merozoite surface antigens in an area of hyperendemicity in Myanmar: complementarity between responses to merozoite surface protein 3 and the 220-kilodalton glutamate-rich protein, Infect Immun 72 (2004) pp. 247-252.
- [89] Storey J, Fleming AF, et al, Abnormal haemoglobins in the Sudan savannah of Nigeria.IV. Malaria immunoglobulins and antimalaria antibodies in haemoglobin AC individuals, Ann Trop Med Parasitol 73 (1979) pp. 311-315.

- [90] Stoute JA, Slaoui M, et al, A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. RTS,S Malaria Vaccine Evaluation Group, *N Engl J Med* 336 (1997) pp. 86-91.
- [91] Stowers AW, Kennedy MC, et al, Vaccination of monkeys with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 confers protection against blood-stage malaria, *Infect Immun* 70 (2002) pp. 6961-6967.
- [92] Taylor Robinson AW, Regulation of immunity to malaria valuable lessons learned from murine models, *Parasitol Today* 11 (1995) pp. 334-342.
- [93] Taylor TE, Molyneux ME, et al, Intravenous immunoglobulin in the treatment of paediatric cerebral malaria, *Clin Exp Immunol* 90 (1992) pp. 357-362.
- [94] Theisen M, Soe S, et al, The glutamate-rich protein (GLURP) of *Plasmodium falciparum* is a target for antibody-dependent monocyte-mediated inhibition of parasite growth in vitro, *Infect Immun* 66 (1998) pp. 11-17.
- [95] Theisen M, Vuust J, et al, Antigenicity and immunogenicity of recombinant glutamate-rich protein of *Plasmodium falciparum* expressed in *Escherichia coli*, *Clin Diagn Lab Immunol* 2 (1995) pp. 30-34.
- [96] Thèze J, Alzari P, et al, IL-2 and IL-2 receptors: recent advances and new immunological functions, *Immunology Today* 17 (1996) pp. 481-486.
- [97] Togo A, Intérêt En Santé Publique De L'Utilisation Des Combinaisons Thérapeutiques à Base D'Artémisinine Dans Le Traitement De L'Accès Palustre Simple Au Mali, Thèse de Médecine, Bamako, 2009.
- [98] Toure YT, Petrarca V, Coluzzi M, et al, Nueva entida del complejo *Anopheles gambiae* in Mali, *Parasitologia* 25 (1983) pp. 367-370.
- [99] Trager W and Jensen JB, Human malaria parasites in continuous culture, *Science* 193 (1976) pp. 673-675.
- [100] Troye-Blomberg M, Weidanz WP, et al, Le rôle des lymphocytes T dans l'immunité au paludisme et à la pathogénèse de la maladie, *Harwood Academic* (1999) pp. 403-438.
- [101] Troye-Blomberg M, Weidanz WP, et al, the role of T cells in immunity to malaria infections: Implications for malaria vaccine development, *Parasitol* 16 (2000) pp. 50-56.
- [102] Waal Malefyt R, Abrams J, et al, Interleukin 10 IL-10 inhibits cytokine synthesis by human monocytes: An autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes, *Journal of Experimental Medicine* 174 (2010) pp. 1209-1220.
- [103] Weatherall DJ, Clegg JB, et al, **Thalassaemia Syndromes**, Blackwell Scientific (2001).
- [104] White NJ, Why is it that antimalarial drug treatments do not always work? *Ann Trop Med Parasitol* 92 (2010) pp. 449-452.
- [105] WHO, Portfolio of Candidate Malaria Vaccines Currently in Development, 2005.
- [106] WHO, World Report, 2008.

- [107] WHO, Guidelines for the Treatment of Malaria, 2010.
- [108] Yang SX, Xie SS, Gao HL., et al, Artemisinin and its derivatives enhance T lymphocyte-mediated immune responses in normal mice and accelerate immunoreconstitution of mice with syngeneic bone marrow transplantation, Clin Immunol Immunopathol 69 (1993) pp. 143-148.

### Tampon de sensibilisation

Volume: 1Litre

Date de préparation: \_\_\_\_\_

Composants	Quantité	N°de lot:	Quantité utilisée	Vérification des étapes faites ( ✓ )
PBS	2 comprimés			
0.001% du rouge Phénol	1 ml de 1 % dans 1L			
H <sub>2</sub> O desionisée	1000 ml			

#### Procédure :

1. Ajoutez 2 comprimés de PBS à un bécher contenant de l'eau désionisée par 1000ml.
2. Placez le flacon sur un agitateur magnétique sans chauffage et remuez jusqu'à ce que tout soit en solution.
3. Ajoutez 1 ml d'une solution de rouge de phénol de 1 %. La solution de rouge de phénol de 1 % est préparée en ajoutant 10 ml de l'eau désionisée à 0.1 g de rouge de phénol.

#### Etiquette:

- " Tampon de Coating " + date + initiales

#### Conservation :

3 mois entre 2 – 8 °C

Préparer par: \_\_\_\_\_, sur \_\_\_\_\_

Nom

Date

### Tampon de blocage

Volume: 1Litre

Date de préparation: \_\_\_\_\_

Composants	Quantité	N°de lot:	Quantité utilisée	Vérification des étapes faites ( ✓ )
PBS	2 comprimés			
Poudre de lait écrémé	30 g			
Tween 20	1 ml			
H <sub>2</sub> O desionisée	1000 ml			

#### Procédure :

1. Ajoutez 2 comprimés de PBS à un bécher contenant 1000 ml d'eau désionisée et placez le flacon sur un agitateur magnétique sans chauffage et remuez jusqu'à ce que tout soit en solution
2. Ajoutez 30 g de lait écrémé.
3. Ajoutez 1 ml de Tween 20 et continuez de remuer jusqu'à ce que tout soit en solution.

#### Etiquette:

- "Tampon de blocage" + date + initiales

#### Conservation :

Utiliser le Tampon de blocage frais.

Préparer par: \_\_\_\_\_, sur \_\_\_\_\_

Nom

Date

### Tampon de dilution des sérums

Volume: 1Litre

Date de préparation: \_\_\_\_\_

Composants	Quantité	N°de lot:	Quantité utilisée	Vérification des étapes faites ( ✓ )
PBS	2 comprimés			
Poudre de lait écrémé	10 g			
Tween 20	1 ml			
10% Na-azide sol.	2 ml			
H <sub>2</sub> O desionisée	1000			

#### Procédure :

1. Ajoutez 2 comprimés de PBS à un bécher contenant 1000 ml d'eau désionisée et placez le flacon sur un agitateur magnétique sans chauffage et remuez jusqu'à ce que tout soit en solution
2. Ajoutez 10 g de lait écrémé.
3. Ajoutez 1 ml of Tween 20
4. Ajoutez 2 ml de la solution 10 % de Na-azoture et continuez de remuer jusqu'à ce que tout soit en solution. La solution 10 % de Na-azoture est préparée en ajoutant 40 ml de l'eau désionisée à 4 g d'une solution de Na-azide.

#### Etiquette :

“ Tampon de dilution de Sérum + date + initiales

#### Conservation :

3 semaines entre 2 – 8 °C

Préparer par: \_\_\_\_\_, sur \_\_\_\_\_



Name

Date

**Tampon de dilution**

Volume: 1Litre

Date de préparation: \_\_\_\_\_

Composants	Quantité	N°de lot:	Quantité utilisée	Vérification des étapes faites ( ✓ )
PBS	2 comprimés			
Poudre de lait écrémé	10 g			
Tween 20	1 ml			
H <sub>2</sub> O desionisée	1001			

**Procédure :**

1. Ajoutez 2 comprimés de PBS à un bécher contenant 1000 ml d'eau désionisée et placez le flacon sur un agitateur magnétique sans chauffage et remuez jusqu'à ce que tout soit en solution
2. Ajoutez 10 g de lait écrémé.
3. Ajoutez 1 ml of Tween 20

**Etiquette :**

“ Tampon de dilution + date + initiales

**Conservation :**

3 semaines entre 2 – 8 °C

Préparer par: \_\_\_\_\_, sur \_\_\_\_\_

Name

Date

### Tampon de lavage

Volume: 5Litres

Date de préparation: \_\_\_\_\_

Composants	Quantité	N°de lot:	Quantité utilisée	Vérification des étapes faites ( ✓ )
PBS	10 comprimés			
Tween 20	5 ml			
NaCl	145g			
H <sub>2</sub> O desionisée	5000 ml			

#### Procédure :

1. Ajoutez 10 comprimés de PBS à un bécher contenant 5000 ml d'eau désionisée et placez le flacon sur un agitateur magnétique sans chauffage et remuez jusqu'à ce que tout soit en solution.
2. Ajoutez 145g de NaCl.
3. Ajoutez 5 ml de Tween 20 et continuez de remuer jusqu'à ce que tout soit en solution.

#### Etiquette :

- a. "Tampon de lavage" + date + initiales

#### Conservation :

1 semaine à la température du laboratoire

Préparer par: \_\_\_\_\_, sur \_\_\_\_\_

Nom

Date

**Solution d'arrêt**

Volume: 1Litre

Date de préparation: \_\_\_\_\_

Composants	Quantité	N°de lot:	Quantité utilisée	Vérification des étapes faites ( ✓ )
10M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20 ml			
H <sub>2</sub> O désionisée	980 ml			

**Procédure :**

1. Ajoutez la quantité indiquée de l'eau à un flacon
2. Ajoutez la quantité indiquée de 10M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
3. Refroidissez à la température ambiante.

**Etiquette :**"0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>" + date + initiales**Conservation :**

8 mois à la température du laboratoire

Préparer par: \_\_\_\_\_, sur \_\_\_\_\_

Nom

Date

## 2.1 Protocol de travail ELISA IgG

Date:	Objectif:										Cocher	
N° de série :											les	
Initiales :											étapes	
											faites	(√)
Sensibilisation	Distribuer 100 µl par puits de <b>a)</b> Préparation IgG standard (dilutions en séries de raison 2) des colonnes 1 et 2 et <b>b)</b> rAg : <b>MSP-3 LSP</b> dans le PBS à 1 µg/ml des colonnes 3 - 12. Plaque: NUNC 439454 Maxisorb								Date de sensibilisation		4°C	
Lavage	Tampon de lavage								4 x 1 min.			
Blocage	150 µl par puits du tampon de blocage								1 h en agitation			
Lavage	Tampon de lavage								4 x 1 min.			
Incubation avec le premier anticorps.	Les sérums sont dilués à <b>1:200</b> dans le tampon de dilution  Distribuer 100 µl par puits								2 h en agitation			
Lavage	Tampon de lavage								4 x 1 min.			
Incubation avec le second anticorps.	Conjuguée Anti-IgG humaine de chèvre couplé à la Peroxydase (Caltag) diluée à 1:3000 dans le tampon de dilution. Ajouter 100 µl dans les puits								1 h en agitation			
Lavage	Tampon de lavage								4 x 1 min.			
Réaction de coloration	100 µl de la solution de mélange à part égale de TMB et H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> dans chaque puits.								30 min. à la température du labo à l'obscurité			
Arrêt	100 µl de 0.2 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> puis Lecture à 450 nm, réf. 620 nm											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std IgG* 100 ng/ml	Std IgG 100 ng/ml	PC-1	PC-1	S-1	S-1	S-9	S-9	S-17	S-17	S-25	S-25
B	50 ng/ml	50 ng/ml	PC-2	PC-2	S-2	S-2	S-10	S-10	S-18	S-18	S-26	S-26
C	25 ng/ml	25 ng/ml	PC-3	PC-3	S-3	S-4	S-11	S-11	S-19	S-19	S-27	S-27

D	12.5 ng/ml	12.5 ng/ml	PC-4	PC-4	S-4	S-4	S-12	S-12	S-20	S-20	S-28	S-28
E	6.25 ng/ml	6.25 ng/ml	NC-1	NC-1	S-5	S-5	S-13	S-13	S-21	S-21	S-29	S-29
F	3.13 ng/ml	3.13 ng/ml	NC-2	NC-2	S-6	S-6	S-14	S-14	S-22	S-22	S-30	S-30
G	1.56 ng/ml	1.56 ng/ml	PBS	PBS	S-7	S-7	S-15	S-15	S-23	S-23	S-31	S-31
H	0.78 ng/ml	0.78 ng/ml	PBS	PBS	S-8	S-8	S-16	S-16	S-24	S-24	S-32	S-32

**Commentaires :**

**Nom:** DIALLO

**Prénom:** Nouhoum

**Nationalité:** Malienne

**Date de soutenance:** / /2010

**Ville de soutenance:** Bamako

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

**Secteur d'intérêt:** Parasitologie, Immunologie, Vaccinologie

**TITRE:** Impact de l'administration répétée de trois combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine sur les réponses immunitaires naturelles anti-palustres

### **Résumé:**

Dans une étude prospective longitudinale qui s'est déroulée de Juillet 2005 à Juin 2007, nous avons exploré chez des volontaires atteints de paludisme simple à Bougoula, Mali ; l'impact de l'administration répétée de trois combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine sur les réponses immunitaires naturelles anti-palustres.

Les titres plasmatiques des cytokines: IL-2 ; IL-4 ; IL-5 ; IL-10 ; TNF- $\alpha$  ; INF- $\gamma$  et des immunoglobulines: IgG dirigées contre les Ag AMA-1, GLURP, MSP-3 et IgM, IgG1, IgG2, IgG3 dirigées contre les Ag AMA 1, GLURP , MSP3 , GBP-130 , MSP 6 , SERP , LSA-5 étaient analysées respectivement par cytométrie de flux et par ELISA chez 212 sujets symptomatiques âgés d'au moins 6 mois. Les volontaires ayant fait un seul épisode sont appelés sujets protégés et ceux ayant fait au moins trois épisodes sujets susceptibles.

Les combinaisons AS- AQ et AR- L étaient associées à des titres plus élevées d'IgG anti-plasmodiales que la combinaison AS- SP. Les combinaisons à base d'artesunate étaient associées à une réponse INF- $\gamma$  et la combinaison à base d'artemether à une réponse IL-4.

Les réponses spécifiques anti- GLURP ; anti- SERP ; anti- MSP-3 et anti- LSA-5 étaient en faveur des sujets protégés. Les réponses spécifiques anti- AMA-1 et anti-GBP-130 étaient en faveur des sujets susceptibles.

Les cytokines Th1 (IL2, INF- $\gamma$ ) étaient plus élevées chez les sujets protégés que chez ceux qui étaient susceptibles à l'infection palustre

**Mots clés:** paludisme, anticorps, cytokines, traitement

**NAME:** DIALLO

**SURNAME:** Nouhoum

**Nationality:** Malian

**Date of defense:** / / 2010

**Town of defense:** Bamako

**Place of storage:** Library of Faculty of Medicine, Pharmacy and Dentistry.

**Area of interest:** Parasitology, Immunology, Vaccinology

**Title:** Identification of natural antimalaria responses during repeated administration of three drug combinations based on artemisinin

### **Summary**

From July 2005 to June 2007 we conducted a prospective longitudinal study, we explored of individuals with uncomplicated malaria in Bougoula, Mali; the impact of repeated administration of three drug combinations based artemisinin on immune responses natural anti-malarial.

Cytokines IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  and immunoglobulins: IgG directed against AMA-1 Ag, GLURP, MSP-3 and IgM, IgG1, IgG2, IgG3 directed against AMA -1 Ag, GLURP, MSP-3, GBP-130, MSP-6, SERP and LSA-5 were analyzed respectively by flow cytometry and ELISA in 212 symptomatic subjects aged 6 months or older. The subjects who suffered a single episode of malaria were considered protected. Those suffering at least three episodes were considered susceptible.

Combinations AS-AQ and AR-L were associated with higher titers of IgG anti-plasmodial that the combination AS- SP. The artesunate-based combinations were associated with INF-  $\gamma$  response and the combination of artemether-based response to IL-4.

Specific responses to anti-GLURP, anti-SERP, anti-MSP-3 and anti-LSA-5 were in favor of protected subjects. Specific responses to anti-AMA-1 and anti-GBP-130 were in favor of susceptible individuals.

The Th1 cytokines (IL-2, INF-  $\gamma$ ) were higher in subjects protected than those who were susceptible to malaria infection.

**Keywords:** malaria, antibodies, cytokines, treatment

## *SERMENT D'HIPPOCRATE*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **JE LE JURE**