

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

REPUBLIQUE DU MALI

Un Peuple-Un But-Une Foi

UNIVERSITE DES SCIENCES, DES TECHNIQUES ET DES TECHNOLOGIES DE  
BAMAKO « USTTB »

FACULTE DE PHARMACIE (FAPH)



ANNEE UNIVERSITAIRE 2020 - 2021

THESE N°.....

Titre de la Thèse

**REPONSE HUMORALE AUX ANTIGENES GAMETOCYTAIRES DE *P. FALCIPARUM* A DANGASSA ET A SIRAKOROLA, DEUX VILLAGES AVEC DE MODALITES DISTINCTES DE TRANSMISSION PALUSTRE AU MALI**

Thèse présentée et soutenue publiquement le 01/12/2021 devant la Faculté de Pharmacie

**Par Mme Assitan DEMBELE**

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

**Jury**

**Président : Pr Mahamadou Ali THERA**

**Membres : Dr Bourama TRAORE**

**Dr Saidou BALAM**

**Co-directrice : Dr Merepen dite Agnès GUINDO**

**Directeur : Pr Mahamadou DIAKITE**

## Liste des professeurs

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

REPUBLIQUE DU MALI  
Un Peuple-Un But-Une Foi



# FACULTE DE PHARMACIE

## LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DE PHARMACIE ANNEE UNIVERSITAIRE 2020-2021

### ADMINISTRATION

Doyen : Boubacar TRAORE, Professeur

Vice-doyen : Sékou BAH, Maître de Conférences

Secrétaire principal : Seydou COULIBALY, Administrateur Civil

Agent comptable : Ismaël CISSE, Contrôleur des Finances.

### PROFESSEURS HONORAIRES

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Flabou	BOUGOUDOGO	Bactériologie-Virologie
2	Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
3	Bakary Mamadou	CISSE	Biochimie
4	Daouda	DIALLO	Chimie Générale et Minérale
5	Souleymane	DIALLO	Bactériologie - Virologie
6	Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
7	Ousmane	DOUMBIA	Chimie thérapeutique
8	Boukassoum	HAÏDARA	Législation
9	Gaoussou	KANOUTE	Chimie analytique
10	Alou A.	KEÏTA	Galénique
11	Mamadou	KONE	Physiologie
12	Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
13	Brehima	KOUMARE	Bactériologie/Virologie
14	Abdourahamane S.	MAÏGA	Parasitologie
15	Saïbou	MAÏGA	Législation
16	Elimane	MARIKO	Pharmacologie
17	Mahamadou	TRAORE	Génétique
18	Sékou Fantamady	TRAORE	Zoologie

### PROFESSEURS DECEDES

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
2	Mahamadou	CISSE	Biologie

## **DER : SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES**

### **1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE**

<b>N°</b>	<b>PRENOMS</b>	<b>NOM</b>	<b>SPECIALITE</b>
1	Mounirou	BABY	Hématologie
2	Abdoulaye	DABO	Biologie/Parasitologie
3	Mahamadou	DIAKITE	Immunologie-Génétique
4	Alassane	DICKO	Santé Publique
5	Abdoulaye	DJIMDE	Parasitologie-Mycologie
6	Amagana	DOLO	Parasitologie-Mycologie
7	Akory Ag	IKNANE	Santé Publique/Nutrition
8	Ousmane	KOITA	Biologie-Moléculaire
9	Boubacar	TRAORE	Parasitologie-Mycologie

### **2. MAITRE DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE**

<b>N°</b>	<b>PRENOMS</b>	<b>NOM</b>	<b>SPECIALITE</b>
1	Aldjouma	GUINDO	Hématologie
2	Kassoum	KAYENTAO	Santé publique/ Bio-statistique
3	Bourèma	KOURIBA	Immunologie <b>Chef de DER</b>
4	Issaka	SAGARA	Bio-statistique
5	Mahamadou Soumana	SISSOKO	Bio-statistique
6	Ousmane	TOURE	Santé Publiq/Santé environnement

### **3. MAITRE ASSISTANT/CHARGE DE RECHERCHE**

<b>N°</b>	<b>PRENOMS</b>	<b>NOM</b>	<b>SPECIALITE</b>
1	Mohamed	AG BARAIKA	Bactériologie-virologie
2	Charles	ARAMA	Immunologie
3	Boubacar Tiétiè	BISSAN	Biologie clinique
4	Djibril Mamadou	COULIBALY	Biochimie clinique
5	Seydou Sassou	COULIBALY	Biochimie Clinique
6	Antoine	DARA	Biologie Moléculaire
7	Souleymane	DAMA	Parasitologie -Mycologie
8	Djénéba Koumba	DABITAO	Biologie moléculaire
9	Laurent	DEMBELE	Biotechnologie Microbienne
10	Klétigui Casimir	DEMBELE	Biochimie Clinique
11	Seydina S. A.	DIAKITE	Immunologie
12	Yaya	GOÏTA	Biochimie Clinique
13	Ibrahima	GUINDO	Bactériologie virologie
14	Aminatou	KONE	Biologie moléculaire
15	Birama Apho	LY	Santé publique
16	Almoustapha Issiaka	MAÏGA	Bactériologie-Virologie
17	Dinkorma	OUOLOGUEM	Biologie Cellulaire
18	Fanta	SANGHO	Santé Publique/Santé communautaire
19	Oumar	SANGHO	Epidémiologie

#### 4. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Djénéba	COULIBALY	Nutrition/Diététique
2	Issa	DIARRA	Immunologie
3	Fatou	DIAWARA	Epidémiologie
4	Merepen dit Agnès	GUINDO	Immunologie
5	Falaye	KEÏTA	Santé publique/Santé Environnement
6	N'Deye Lallah Nina	KOITE	Nutrition
7	Amadou Birama	NIANGALY	Parasitologie-Mycologie
8	Djakaridia	TRAORE	Hématologie

#### **DER : SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

##### 1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Rokia	SANOGO	Pharmacognosie <b>Chef de DER</b>

##### 2. MAITRE DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
-	Néant	-	-

##### 3. MAITRE ASSISTANT/CHARGE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Loséni	BENGALY	Pharmacie hospitalière
2	Bakary Moussa	CISSE	Galénique
3	Yaya	COULIBALY	Législation
4	Issa	COULIBALY	Gestion
5	Balla Fatogoma	COULIBALY	Pharmacie hospitalière
6	Mahamane	HAÏDARA	Pharmacognosie
7	Hamma Boubacar	MAÏGA	Galénique
8	Moussa	SANOGO	Gestion
9	Adiaratou	TOGOLA	Pharmacognosie

##### 4. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Seydou Lahaye	COULIBALY	Gestion pharmaceutique
2	Daouda Lassine	DEMBELE	Pharmacognosie
3	Adama	DENOU	Pharmacognosie
4	Sékou	DOUMBIA	Pharmacognosie
5	Assitan	KALOGA	Législation
6	Ahmed	MAÏGA	Législation
7	Aïchata Ben Adam	MARIKO	Galénique

8	Aboubacar	SANGHO	Législation
9	Bourama	TRAORE	Législation
10	Karim	TRAORE	Sciences pharmaceutiques
11	Sylvestre	TRAORE	Gestion pharmaceutique
12	Aminata Tiéba	TRAORE	Pharmacie hospitalière
13	Mohamed dit Sarmoye	TRAORE	Pharmacie hospitalière

### **DER : SCIENCES DU MEDICAMENT**

#### **1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Benoît Yaranga	KOUMARE	Chimie Analytique <b>Chef de DER</b>
2	Ababacar I.	MAÏGA	Toxicologie

#### **2. MAITRE DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Sékou	BAH	Pharmacologie

#### **3. MAITRE ASSISTANT/CHARGE DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Dominique Patomo	ARAMA	Pharmacie chimique
2	Mody	CISSE	Chimie thérapeutique
3	Ousmane	DEMBELE	Chimie thérapeutique
4	Tidiane	DIALLO	Toxicologie
5	Madani	MARIKO	Chimie Analytique
6	Hamadoun Abba	TOURE	Bromatologie

#### **4. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mahamadou	BALLO	Pharmacologie
2	Dalaye Bernadette	COULIBALY	Chimie analytique
3	Blaise	DACKOUCO	Chimie Analytique
4	Fatoumata	DAOUCO	Pharmacologie
5	Abdourahmane	DIARA	Toxicologie
6	Aiguerou dit Abdoulaye	GUINDO	Pharmacologie
7	Mohamed El Béchir	NACO	Chimie analytique
8	Mahamadou	TANDIA	Chimie Analytique
9	Dougoutigui	TANGARA	Chimie analytique

## **DER : SCIENCES FONDAMENTALES**

### **1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mouctar	DIALLO	Biologie/ Chef de DER

### **2. MAITRE DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Lassana	DOUMBIA	Chimie appliquée

### **3. MAITRE ASSISTANT/CHARGE DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mamadou Lamine	DIARRA	Botanique-Biologie végétale
2	Abdoulaye	KANTE	Anatomie
3	Boureima	KELLY	Physiologie médicale

### **4. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Seydou Simbo	DIAKITE	Chimie organique
2	Modibo	DIALLO	Génétique
3	Moussa	KONE	Chimie Organique
4	Massiriba	KONE	Biologie Entomologie

## **CHARGES DE COURS (VACATAIRES)**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Cheick Oumar	BAGAYOKO	Informatique
2	Babou	BAH	Anatomie
3	Souleymane	COULIBALY	Psychologie
4	Yacouba	COULIBALY	Droit commercial
5	Bouba	DIARRA	Bactériologie
6	Moussa I	DIARRA	Biophysique
7	Babacar	DIOP	Chimie organique
8	Aboubakary	MAÏGA	Chimie organique
9	Modibo	SANGARE	Anglais
10	Satigui	SIDIBE	Pharmacie vétérinaire
11	Sidi Boula	SISSOKO	Histologie-embryologie

12	Fana	TANGARA	Mathématiques
13	Djénébou	TRAORE	Sémiologie et Pathologie médicale
14	Mamadou B	TRAORE	Physiologie
15	Boubacar	ZIBEÏROU	Physique

Bamako, le 26 juillet 2021



**P/Le Doyen PO**  
**Le Secrétaire Principal**

**Seydou COULIBALY**  
*Administrateur Civil*

Louanges à **Allah** le **Tout Clément, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux** de m'avoir donné la santé, le courage et la chance de réaliser ce travail. Je Te prie de m'accorder Ta grâce et une vie pieuse durant toute ma carrière professionnelle et familiale. Guide-moi vers le droit chemin. Amen !

Bénédictions et salut sur le **Prophète Muhammad (Paix et Salut sur Lui)**



## **DEDICACES**

### **A mon père tuteur Souleymane Dembélé**

Cher père, tu es un modèle et le pilier de toute la famille. Ta générosité, ton hospitalité, ton amour inconditionnel et ton encouragement m'ont permis de réaliser ce travail. Tu m'as donné toute l'affection qu'un père puisse offrir à son enfant en investissant dans mes études et à m'encourageant dans les moments difficiles. Merci pour l'éducation et le sens de fraternité que tu nous as inculqué. Ce travail est plus le tien que le mien. Que Dieu t'accorde une bonne santé et te garde longtemps à nos côtés. Amen !

### **A ma mère Awa Doumbia**

Ma confidente, une brave Dame qui s'est battue corps et âme pour nous élever après le décès de notre père quand mon frère et moi étions tout-petits. Ta sagesse, ton sens d'écoute, ton amour, tes conseils et ton dévouement pour la réussite de tes enfants n'ont jamais fait défaut. Ce travail est le fruit de ta bravoure, je prie Dieu pour que tes souffrances endurées ne soient pas vaines et qu'Il te prête longue vie dans la santé et le bonheur afin que tu bénéficies aussi longtemps que possible aux fruits de tes enfants. Maman, que le Tout Puissant t'accorde sa grâce. Amen !

### **A mon cher époux, Brahima Konaté**

Mon âme sœur, ma moitié, celui qui est apparu dans ma vie quand j'en avais le plus besoin. Ta rencontre est mon plus beau cadeau du ciel, depuis ce jour tu es devenu mon bouclier, tu as été une oreille disponible pour m'écouter et me conseiller, ton épaule mon lieu de refuge pour pleurer dans les moments difficiles. Tu es un mari extraordinaire par tes qualités d'Hommes de principe, de morale, d'intègre et par ta joie de vivre. Les mots me manquent pour exprimer à quel point tu as été un soutien total pour moi dans tout ce que j'entreprends, sache que tu es ma force et ce travail est le tien. Que Dieu nous garde longtemps l'un auprès de l'autre, qu'Il nous donne des enfants pieux, renforce nos liens et nous donne longue vie pleine de succès dans bonne santé. Amen !

## REMERCIEMENTS

**A mon père, feu Mamadou Dembélé,** à Allah nous appartenons et à Lui nous retournons. Tu es parti quand nous étions tout-petits et je n'ai pas eu la chance de te connaître assez mais ton amour pour tes enfants, tes qualités humaines, ta disponibilité et ton sens de partage avec tes proches ont été apprécié par tous. Que ton âme repose en paix, que la terre te soit légère et que le paradis soit ta dernière demeure. Amen !

**A ma tante Mme Keita Sira Kanouté,** tu m'as accueilli à bras ouverts au point-G durant tout mon cursus universitaire, ta générosité, ton hospitalité et le respect de ton mari et celui de tes enfants envers ma personne m'ont beaucoup marqué. Je n'oublierai jamais les nombreux services que vous m'avez rendus. Que Dieu guide tes pas et te garde en bonne santé à côté de ta famille.

**A mes frères Binkoro Konaté, Adama Dembélé, Sory Ibrahim Dembélé, Boubacar Kotié Diarra, Mamadou Dembélé, Youssouf Coulibaly, Salif Porna Dembélé, Abdoul Zanga Dembélé,** pour l'encouragement, l'affection et le soutien apporté.

**A mes sœurs, Maimouna Dembélé, Fanta Kida, Maman Djénèpo, Djénèbou Nieré Dembélé, Oumou Diarra, Mariam Diarra, Assan croix Diarra, Nafissatou Diarra,** d'avoir supporté toutes mes caprices. Le soutien moral dont j'ai bénéficié de votre part a été d'un appui inestimable pour ce travail. Que Dieu renforce nos liens.

**Au Pr Mahamadou Diakité,** de m'avoir accueilli à bras ouverts dans son unité de recherche. Merci cher professeur pour votre humilité, votre encouragement et votre soutien. Que Dieu guide votre pas et vous accorde une longue vie dans le bonheur et dans la bonne santé pour que nous et votre famille puissions encore bénéficier de vous.

**Au Dr Merepen dite Agnès GUINDO,** pour la confiance mise sur moi en me confiant ce travail. Merci cher Maître pour votre engagement, votre disponibilité, votre accompagnement tout long de ce travail, que Dieu vous donne une longue vie.

**Au Dr Drissa Konaté,** pour votre soutien, votre joie de vivre et votre apport scientifique nous ont beaucoup marqué. Merci pour tout, que Dieu vous protège et vous donne longue vie.

**A mes grand-mères : N'Galé Traoré, Fatoumata Tangara, feu Rokia Coulibaly, feu Halima Théra, Mariam Dembélé** pour votre soin, votre amour inconditionnel de m'avoir chéri et protégé depuis mon enfance jusqu'à maintenant.

**A mes Tontons : Youssouf Dembélé, Seydou Kalapo, Bakary Dembélé, Titie Dembélé, Baba Dembélé, Ladj Dembélé, Mamoutou Dembélé,** pour votre encouragement et conseil.

**A mes Tantes Haoua Traoré, Mariam Dembélé, Baro Dembélé, Bou Dembélé, Rokia Dembélé, Téné Dembélé,** pour vos conseils et accompagnements durant ce travail.

**A toute la famille Doumbia : Bassirou Doumbia, N'Galé Traoré, Mariam, Arnai Doumbia** pour votre accompagnement, soutien moral et bénédiction.

**A la famille Yaya Diarra,** de m'avoir accueilli avec bienveillance, amour et respect dans votre famille.

**A la famille Konaté,** de m'avoir accepté à bras ouverts en tant que votre fille, belle fille, épouse dans cette magnifique famille qui est désormais la mienne dont je suis fière d'en faire partie.

**A mes Amies Aminata Dramé, Doussou Sidibé, Aïssata Sangaré, Mariam Walet, Aminata Traoré, Kadidiatou Megnèta,** de m'avoir accepté telle que je suis, d'être toujours là pour moi, vous êtes devenues des sœurs pour moi qu'Allah renforce nos liens et nous accorde une vie pieuse. Je vous aime toutes.

**A tout le groupe « Mes Gos » : Aïssata Sangaré, Fanta Soumaré, Fatoumata Yayi Diarra, Dr Kany Sidibé, Dr Fatoumata Kassé, Aïssata Diall :** pour votre accompagnement, soutien moral durant notre cursus universitaire. Ce travail est aussi les vôtres.

**A tous mes amis de la FESPAO (Fédération des Etudiants en Science Pharmaceutique de l'Afrique de l'Ouest) : Dr Binetou, Dr Cherif, Dr Eric, Dr Marr Fall, Dr Khaly, Dr Secka, Dr Thierno, Djami, Yasmine,** pour votre sens de fraternité, hospitalité et accompagnement. Vous êtes mes plus belles rencontres, ce travail est aussi les vôtres.

**A toute l'équipe de l'Unité Immunogénétique et parasitologie du MRTC :** Dr Seidina Diakité, Dr Karim Traoré, Dr Sory I Diawara, Dr Drissa Konaté, Dr Agnes Guingo, Dr Ibrahim Sanogo, Dr Mory Doumbouya, Dr Bourama Keita, Dr Oumou Coulibaly, Dr Fousseny Doucouré, Dr Fatoumata Kassé, Dr Aboubacar Fomba, Dr Bakaina Diarra, Dr Larissa Denou, Dr Kadidiatou Koné, Dr job Koné, Dr M. Mahamadou Faiçal, Mme Mlle Salimata Kanté, M. Abdrahamane Cissé, M. Abdrouhamane Traoré, M. Katri Mouhamoud, sans vous cette thèse ne serait pas ce qu'elle est car vous avez tous participé à sa réalisation de par vos conseils et vos encouragements. Merci pour votre disponibilité. Recevez ici mes sincères salutations ainsi que ma reconnaissance.

**A mes grands frères et grande sœur :** Dr Fousseyni Doucouré, Dr Bourama Keita, Dr Oumou Coulibaly pour votre disponibilité, encadrement et conseil.

**A tout le personnel du MRTC.**

**A tous mes camarades de la 12<sup>e</sup> promotion du numerus clausus,** Demba Dembélé, Nouhoum Sangho, Amadou Diallo, Dramane Samaké, Dr Moussa Fofana, Abdrahamane Traoré, Mamadou Diallo dit Madess, Mahamadou Dabo, Fanta Sow, Fatoumata Inna Traoré, Aissata Sangaré, Fanta Soumaré, Salimata Kanté, Fatoumata yayi Diarra, Kany Sidibé.

Aux populations de Dangassa et de Sirakorola, pour leur adhésion à cette étude.

A tous les enseignants et étudiants de la faculté de Pharmacie, de la faculté de médecine et d'odontostomatologie de Bamako.

## **HOMMAGE AUX HONORABLES MEMBRES DE JURY**

**A notre Maître et Président du jury :**

**Pr Mahamadou Ali THERA**

- Professeur Titulaire de Parasitologie-Mycologie à la FMOS/USTTB
- Directeur Scientifique du BMP (Bandiagara Malaria Project) /MRTC/DEAP
- Membre de l'Académie des Sciences du Mali
- Chevalier de l'Ordre National du Mali
- Membre de l'Académie Africaine des Sciences (AAS)

Cher Maître, nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury malgré vos multiples sollicitations. L'immensité de vos connaissances scientifiques, votre rigueur dans le travail, votre humilité font de vous un grand maître admiré et respecté de tous. Nous vous prions d'accepter cher Maître, le témoignage de nos sentiments les plus distingués et les plus respectueux

**A notre Maître et juge :**

**Dr Bourama TRAORE**

- Pharmacien biologiste
- Attaché de recherche à l'hôpital de Dermatologie de Bamako (HDB) et à l'ICER-Mali
- Doctorant en Bio-informatique à l'Ecole Doctorale des Sciences et des Technologies du Mali (EDSTM)

Cher Maître,

Tout au long de ce travail, nous avons apprécié vos qualités humaines et scientifiques. Votre disponibilité constante et votre amour pour le travail bien fait nous ont beaucoup impressionnés. Permettez-nous cher Maître de vous adresser l'expression de notre gratitude et de notre reconnaissance.

**A notre Maître et juge :**

**Dr Saidou BALAM**

- Docteur en médecine à la FMOS
- PhD en Immunologie à l'Université de Lausanne, Suisse
- Maître-assistant en Immunologie à la FMOS

Cher Maître,

Tout au long de ce travail, nous avons apprécié vos qualités humaines et scientifiques. Votre disponibilité constante et votre amour pour le travail bien fait nous ont beaucoup impressionnés. Permettez-nous cher Maître de vous adresser l'expression de notre gratitude et de notre reconnaissance.

**A notre Maître et co-directrice :**

**Dr Merepen dite Agnès GUINDO**

- Docteur en Pharmacie à la Faculté de Pharmacie (FAPH)
- Assistante en immunologie à la FAPH
- Chercheuse à l'ICER-Mali de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB)

Cher Maître,

Tout au long de ce travail, nous avons apprécié vos qualités humaines et scientifiques. Votre simplicité, votre générosité et votre joie de vivre nous ont beaucoup marqué. Permettez-nous cher Maître de vous adresser l'expression de notre immense gratitude et de notre remerciement.



## **A nôtre maître et directeur de thèse : Pr Mahamadou DIAKITE**

- Professeur Titulaire d'Immunologie-Génétique à la FAPH
- Vice-recteur de l'USTTB
- Responsable du Laboratoire Immunogénétique et Parasitologie de l'ICER-Mali
- Directeur Scientifique Adjoint du Centre Universitaire de Recherche Clinique UCRC
- Secrétaire Permanent du Comité d'Ethique institutionnel de l'USTTB
- Membre du Comité national d'éthique pour la santé et les sciences de la vie

Cher Maître,

Vous nous avez fait un immense honneur en nous acceptant dans votre équipe de recherche. Tout au long de ce travail, nous avons apprécié vos grandes qualités scientifiques et humaines, vos enseignements et surtout votre sens élevé de la responsabilité et de la rigueur dans le travail qui font de vous un exemple à suivre. Veuillez recevoir en toute modestie l'expression de notre immense gratitude.

## SIGLES ET ABREVIATIONS

ADCC	<i>Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity</i> (Cytotoxicité Cellulaire Dépendante des Anticorps)
ADCI	<i>Antibody Dependent Cellular Inhibition</i> (Inhibition Cellulaire Dépendante des Anticorps)
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CRF	<i>Case Report Form</i> (Formulaire de Rapport de Cas)
CSCOM	Centre de Santé Communautaire
DCI	Dénomination Commune Internationale
EBA175	<i>Erythrocyte Binding Antigen 175</i> (Antigène d'adhésion érythrocytaire 175)
EDS	Enquêtes Démographiques de Santé
EDTA	Ethylène-Diamine-Tétra-Acétique
ELISA	Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (Technique d'Immuno-Absorption par Enzyme Liée)
FAPH	Faculté de Pharmacie
FMOS	Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie
G	Gramme
G6PD	Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase
GCP	<i>Good Clinical Practice</i> (Bonnes Pratiques Cliniques)
GIA	<i>Growth inhibition assay</i> (Test d'Inhibition de la Croissance)
GIS	<i>Geographic Information System</i> (Système d'Information Géographique)
ICEMR	Centre International d'Excellence en Recherche sur le Paludisme
IFN	Interféron
IFN $\gamma$	Interféron $\gamma$
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine (IL-1)
MII	Moustiquaires Imprégnées d'Insecticide
MIILD	Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide à Longue Durée d'Action
MRTC	<i>Malaria Research and Training Center</i> (Centre de recherche et de formation sur le paludisme)

NIH	<i>National Institutes of Health</i> (Instituts Nationaux de Santé des Etats-Unis d'Amérique)
NK cell	<i>Natural Killer cell</i> (cellule tueuse naturelle)
OHVN	Office de la Haute Vallée du Niger
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONG	Organisation Non Gouvernementale
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>Pfs230</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> surface protein of 230 kDa (Protéine de surface des gamétocytes de 230 kDa de <i>P. falciparum</i> )
<i>Pfs25</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> surface protein of 25 kDa (Protéine de surface des gamétocytes de 25 kDa de <i>P. falciparum</i> )
<i>Pfs28</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> surface protein of 28 kDa (Protéine de surface des gamétocytes de 28 kDa du <i>Plasmodium falciparum</i> )
<i>Pfs48/45</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> surface protein of 48 and 45 kDa (Protéine de surface des gamétocytes de 48/45 kDa de <i>P. falciparum</i> )
PID	Pulvérisation Intradomiciliaire
SP	Sulfadoxine-Pyriméthamine
SPSS	<i>Statistical Package for Social Scientist</i> (progiciel de statistiques pour les sciences sociales)
Std	Standard
TDR	Test de Diagnostic Rapide
TLR	<i>Toll-like Receptor</i> (récepteur de type Toll)
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i> (Facteur nécrosant tissulaire)
TPI	Traitement Préventif Intermittent
USTTB	Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako

## Table des matières

1. INTRODUCTION .....	1
2. OBJECTIFS .....	3
2.1. Objectif général .....	3
2.2. Objectifs spécifiques .....	3
3. GENERALITES .....	4
3.1. Epidémiologie.....	4
3.2. Agents pathogènes .....	7
3.3. Vecteurs .....	9
3.4. Cycle de développement.....	10
3.4.1. Cycle de développement chez l'homme.....	10
3.4.2. Cycle de développement chez l'anophèle femelle .....	11
3.5. Physiopathologie du paludisme.....	12
3.5.1. Accès palustre simple .....	12
3.5.2. Paludisme grave et compliqué .....	13
3.6. Immunité antipalustre .....	15
3.6.1. Immunité naturelle (innée) .....	16
3.6.2. Immunité adaptative ou acquise.....	16
3.6.3. Antigènes candidats vaccins de <i>P. falciparum</i> .....	18
3.6.4. Antigènes du stade gamétocytaire .....	19
3.7.3 Diagnostic biologique .....	22
3.8. Prise en charge du paludisme .....	22
3.8.1. Actions préventives .....	22
3.8.2. Action curative.....	23
4. METHODOLOGIE .....	24
4.1. Cadre d'étude.....	24
4.1.1. Village de Dangassa .....	24
4.2. Type et période d'étude.....	29

4.3. Population et échantillonnage .....	29
4.3.1. Critères d'inclusion.....	29
4.3.2. Critères de non-inclusion .....	29
4.4. Variables mesurées.....	29
4.5. Gestion et analyse des données .....	30
4.6. Techniques de laboratoire utilisées.....	30
4.6.1. Goutte épaisse/frottis sanguin.....	30
4.6.2. Test ELISA ( <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> ).....	30
4.7. Considérations éthiques .....	31
4.8. Déroulement de l'étude .....	32
4.9. Définitions opérationnelles .....	32
5. RESULTATS .....	34
5.1. Résultats globaux.....	34
5.2. Résultats descriptifs .....	35
5.3. Résultats analytiques .....	38
6. Commentaires et discussion.....	46
6.1. Données descriptives .....	47
6.2. Données analytiques.....	47
6.3. Limites de notre étude.....	50
7. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....	51
7.1. Conclusion.....	51
7.2. Recommandations .....	51
8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	52
9. ANNEXES .....	59
Annexe 1. Technique de goutte épaisse .....	59
Annexe 2. Technique Elisa.....	64
10. FICHE SIGNALÉTIQUE .....	74
Summary .....	75
SERMENT DE GALIEN.....	76

## Liste des tableaux

Tableau 1. Répartition des participants en fonction du sexe dans les sites en juin 2019.....	35
Tableau 2. Répartition des participants en fonction des tranches d'âge dans les sites en juin 2019.....	36
Tableau 3. Prévalence de l'infection palustre dans les sites d'étude en juin et en novembre 2019.....	37
Tableau 4. Prévalence de l'infection palustre en fonction des tranches d'âge dans les 2 sites en juin et novembre 2019.....	38
Tableau 5. Prévalence du portage des gamétocytes selon les classes d'âge en juin et en novembre 2019.....	39
Tableau 6. Séroprévalence des anticorps anti- <i>Pf</i> 48/45, <i>anti-Pf</i> 230 et <i>anti-Pf</i> 47 en juin et en novembre dans les deux sites en 2019.....	40

## Liste des figures

Figure 1 : Cycle biologique du <i>Plasmodium</i> .....	12
Figure 2. Carte du Mali avec le plan du village de Dangassa et de Sirakorola.....	25
Figure 3. Taux moyen anticorps anti- <i>Pf230</i> selon les sites en juin et en novembre 2019.....	41
Figure 4. Taux moyen des anticorps anti- <i>Pf230</i> chez les participants ayant la goutte épaisse positive en juin et en novembre 2019.....	42
Figure 5. Corrélation entre la parasitémie et le taux moyen des anticorps en juin 2019 .....	43
Figure 6. Corrélation entre la parasitémie et les taux d'anticorps en novembre 2019 .....	44
Figure 7. Taux moyen des anticorps <i>anti-Pf 230</i> en fonction des tranches d'âge en juin et novembre dans les deux sites.....	45
Figure 8. Technique de la goutte épaisse.....	61

## 1. INTRODUCTION

Le paludisme représente un problème majeur de santé publique tant par sa morbidité que par sa mortalité. Il est dû à un hématozoaire du genre *Plasmodium* transmis à l'homme par la pique d'un moustique femelle lors de son repas sanguin [1]. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le nombre de cas de paludisme s'estime à 229 millions dans les 87 pays endémiques au monde et 409 000 décès en 2019. L'Afrique subsaharienne totalise à elle seule plus de 90% des cas enregistrés dans le monde [2]. Au Mali, le paludisme demeure toujours une priorité de santé publique du fait de son poids parmi les affections courantes. Selon la dernière Enquête Démographique de Santé (EDS-VI) en 2018 [3], le paludisme représentait 39% des motifs de recours aux centres de santé avec une prévalence parasitaire à 19% chez les enfants de moins de 5 ans [3].

Au regard de son impact négatif sur le développement économique, l'OMS s'est fixé comme objectif de réduire de 90% la morbidité du paludisme dans son plan stratégique global 2020 à 2030 [2]. Pour y parvenir, l'OMS recommande de renforcer les interventions de lutte en cours telles que la Pulvérisation Intradomiciliaire (PID), l'utilisation des Moustiquaires Imprégnées d'Insecticide à Longue Durée d'Action (MIILD), le Traitement Préventif Intermittent au cours de la grossesse (TPIg), la Chimio-prévention du Paludisme Saisonnier (CPS) chez les enfants de moins de 5 ans etc. Malgré une réduction du nombre des cas du paludisme [2], l'efficacité de ces interventions à long terme est continuellement remise en cause par l'émergence des parasites résistants aux antipaludiques et des vecteurs aux insecticides [4]. C'est dans ce contexte que les efforts sont orientés actuellement vers le développement d'un vaccin antipaludique pour compléter les interventions de contrôle surtout dans les zones d'endémie.

Cependant, la recherche d'un potentiel candidat vaccin contre le *Plasmodium* a eu peu de succès à cause de la variabilité antigénique du *Plasmodium* [5]. Cette variation est à l'origine d'expression à la surface du parasite d'un nombre élevé d'antigènes qui sont souvent différents d'un clone à l'autre ou au sein d'un même clone parasitaire ; et serait un obstacle majeur dans la mise au point de vaccins efficace contre le paludisme [6]. Durant ces dernières années, plusieurs candidats vaccins au stade asexué ont été testés comme l'AMA1 (*Apical Merozoite Antigen 1*), le MSP1 (*Merozoite Surface*



*Protein 1*), l'EBA-175 (*Erythrocyte Binding Antigen 175*). Suite aux résultats prometteurs rapportés, l'OMS a récemment recommandé l'utilisation du vaccin RTS, S/AS01 chez les enfants dans la zone à forte transmission de *P. falciparum* de l'Afrique subsaharienne [7, 8].

Actuellement, les études s'orientent vers l'identification des antigènes du stade sexué qui pourront constituer de potentiels candidats vaccins bloquant la transmission du paludisme. Parmi les antigènes susceptibles de susciter la production des anticorps bloquant la transmission, il y'a le *Pfs230*, le *Pfs48/45*, le *Pfs27*, le *Pfs28*, le *Pfs25* et le *Pfs16* [9]. Leur activité bloquant la transmission des parasites a été déjà évoquée dans les études antérieures [7, 10, 11]. Ces antigènes sont présents au stade du gamétocyte, mais ne sont exprimés à la surface du parasite que plus tard au cours de la gamétogénèse [10]. Le but de notre étude était de déterminer la réponse humorale aux antigènes gamétocytaires *Pfs48/45*, *Pfs230* et *Pfs47* dans les échantillons des enfants vivants à Dangassa et à Sirakorola, deux zones d'endémicité différente, afin d'évaluer leur potentialité dans le cadre du développement d'un vaccin efficace.

## **2. OBJECTIFS**

### **2.1. Objectif général**

Etudier la réponse humorale dirigée contre les antigènes gamétozytaires (*Pfs48/45*, *Pfs230* et *Pfs47*) de *P. falciparum* chez les enfants de 5 à 15 ans à Dangassa et à Sirakorola en 2019.

### **2.2. Objectifs spécifiques**

- Déterminer la prévalence de l'infection palustre chez les enfants de 5 à 15 ans à Dangassa et à Sirakorola en 2019 ;
- Déterminer la séroprévalence des anticorps anti-*Pfs48/45*, anti-*Pfs230* et anti-*Pfs47* chez les enfants de 5 à 15 ans à Dangassa et à Sirakorola en 2019 ;
- Comparer le taux moyen des anticorps anti-*Pfs230* chez les enfants de 5 à 15 ans vivant à Dangassa à ceux de Sirakorola en 2019.

### 3. GENERALITES

#### 3.1. Epidémiologie

Le paludisme est une parasitose dû à un hématozoaire du genre *Plasmodium* transmis à l'homme par la piqure d'un moustique femelle (l'anophèle ; hôte définitif) lors de son repas sanguin.

A travers le monde, le nombre des cas de paludisme est estimé à 229 millions et celui des décès à 409 000 dans 87 pays d'endémie palustre [2]. Plus de  $\frac{3}{4}$  des cas et décès sont recensés dans la région africaine, et particulièrement chez les enfants de moins de 5 ans. L'incidence du paludisme a reculé au niveau mondial, passant de 80 en 2000 à 57 en 2019 ; mais depuis 2015 un ralentissement voir une petite augmentation du nombre de cas du paludisme et celui des décès a été constatée [2]. Parmi les 29 pays qui ont concentré environ 95% du nombre total des cas de paludisme en 2019, les pays comme le Nigeria avec 27%, la République Démocratique du Congo (12%), l'Ouganda (5%), le Mozambique (4%) et le Niger (3%) ont enregistré plus de la moitié des cas. Le Nigéria (23%), la République démocratique du Congo (11%), la Tanzanie (5%), le Mozambique (4%), le Niger (4%) et le Burkina Faso (4%) ont enregistré près de la moitié des décès recensés dans les 31 pays endémiques. De 2000 à 2019, la transmission du paludisme n'est réapparue dans aucun pays préalablement certifiés exempts de paludisme. Depuis 2010, le paludisme a été éliminé dans certains pays comme le Maroc en 2010, l'Arménie en 2011, le Kirghizistan et le Sri Lanka en 2016, l'Ouzbékistan et le Paraguay en 2018, l'Argentine et l'Algérie en 2019 [2, 12].

La région africaine de l'OMS représente 94% des cas estimés dans le monde en 2019 avec une réduction de l'incidence de 363 à 225 sur la période 2000-2019. La région Asie du sud-est représente 3% des cas de paludisme dans le monde. Le nombre de cas a chuté de 2,3 millions en 2000 à 600 mille en 2019. Dans la région Méditerranée orientale, le nombre de cas de paludisme est passé de 7 millions en 2000 à 5 millions en 2019, soit une baissé de 26% [12]. Près d'un quart de ces cas étaient dus à *P. vivax*, principalement en Afghanistan et au Pakistan. La région Pacifique occidental de l'OMS a enregistré 1,7 millions cas de paludisme en 2019, soit une baisse de 43 % par rapport à 2000. La Papouasie-Nouvelle-Guinée a enregistré près de 80% des cas du paludisme et 85% des décès dans cette région en 2019. Depuis le 30 juin 2021, l'OMS a déclaré la Chine comme ayant éradiqué le paludisme.

La région d'Amérique a observé une diminution de 40% du nombre de cas du paludisme entre 2000 et 2019 (1,5 millions à 900000 mille). Les progrès réalisés dans cette région ces dernières années ont souffert de la forte hausse du paludisme au Venezuela, qui avait recensé près de 35500 cas en 2000 contre 467000 en 2019. Le Brésil, la Colombie et le Venezuela concentrent plus de 86 % des cas dans cette région. Plus de 70% des décès en 2019 dans cette région ont été enregistrés au Venezuela [2, 12].

La distribution du paludisme est extrêmement variable d'une zone géographique à une autre. Elle est sous la dépendance de plusieurs facteurs liés au vecteur, à l'hôte, au parasite et à l'environnement [13]. L'indice de stabilité déterminé par Mac Donald permet de classer l'enracinement du paludisme en deux zones :

- ❖ les zones de paludisme stable ou endémique : la transmission du paludisme est longue et intense entraînant une prémunition permettant de limiter les manifestations cliniques graves chez les jeunes enfants ;
- ❖ les zones de paludisme instable ou épidémique : la transmission du paludisme est très courte et il sévit sous forme épidémique. Ce caractère épisodique de la transmission ne permet pas le développement de la prémunition. Tous les individus sont à risque de développer la maladie [14].

Dans une population donnée, les indices paludométriques qui permettent de déterminer l'endémicité du paludisme sont :

- **l'Indice Splénique (IS)** : c'est le pourcentage des enfants âgés de 2-9 ans présentant une rate palpable à l'examen clinique dans une population examinée.
- **l'Indice Plasmodique (IP)** : c'est le pourcentage des enfants âgés de 2-9 ans dont les étalements sanguins relèvent la présence des formes asexués d'hématozoaires du paludisme dans une population examinée.
- **l'Indice Gamétocytaire (IG)** : c'est le pourcentage de personnes dans une population examinée présentant les formes sexuées des plasmodies.
- **le Taux d'Inoculation Entomologique (TIE)** : c'est le nombre de piqûres infectantes que reçoit un homme pendant un intervalle de temps donné. C'est le produit de l'agressivité des moustiques par l'indice sporozoïtique.

L'étude de ces indices permet de classer les zones en termes d'endémicité du paludisme. Ces indices permettent aussi d'évaluer l'impact des différentes interventions de lutte contre le paludisme afin d'orienter les programmes nationaux de lutte contre le paludisme. Les deux classifications de l'endémie habituellement utilisées concernent les enfants âgés de 2 à 9 ans sont : la classification de Kampala en novembre 1950 (indice splénique) et de Yaoundé en juillet 1962 (indice plasmodique). Ils ont permis de définir 4 zones selon le niveau de transmission du paludisme.

- **Zone hypoendémique** : l'IS est compris entre 0-10% ou l'IP < 25%. Dans cette zone, l'état de prémunition de la population est faible et le risque d'épidémie est élevé selon les conditions climatiques. Le paludisme est instable et toute la population est exposée au même risque du paludisme.
- **Zone mésoendémique** : l'IS est compris entre 11-50% ou l'IP entre 26-50%. Dans cette zone, l'état de prémunition de la population est faible, le risque épidémique existe. Des cas d'accès perniciose sont observés chez les adultes jeunes.
- **Zone hyperendémique** : l'IS est compris entre 51-75%, IP entre 51-75% ; l'état de prémunition a atteint son maximum. C'est une zone sans risque épidémique. Mais il existe un risque important de paludisme grave et compliqué pour les patients neufs. Le taux de mortalité infantile liée au paludisme reste élevé. Les accès palustres peuvent évoluer en paludisme grave.
- **Zone Holoendémique** : l'IS et l'IP sont tous supérieurs à 75%. Il s'agit des zones de barrages. L'état de prémunition est solide, le risque épidémique est quasiment nul. Cependant, il existe un risque important de paludisme grave et compliqué pour les patients neufs, la morbidité et la mortalité infantile liée au paludisme restent notoires [15].

Au Mali, la situation épidémiologique du paludisme se résume en 5 modalités de transmission du paludisme [16] :

- **la zone soudano-guinéenne** à transmission saisonnière longue ( $\geq 6$  mois) au sud du pays. Elle correspond à la zone holoendémique avec un IP supérieur à 80%. L'état de prémunition est acquis vers l'âge de 6 ans.

- **la zone sahélienne à transmission saisonnière courte de 3 à 4 mois.** L'IP varie entre 50 et 75%. Le paludisme y est hyperendémique et l'état de prémunition est rarement atteint avant 10 ans.
- **la zone subsaharienne au nord,** la transmission est sporadique voire épidémique. Elle correspond au Nord des régions de Koulikoro et de Kayes (Nara, Diéma, Yélimané, Kayes). L'IP est inférieur à 5%, le paludisme est instable et tous les groupes d'âge sont à risque de faire le paludisme grave.
- **la zone de transmission bi ou plurimodale** comprenant le delta intérieur du fleuve Niger et les zones de barrages (Sélingué, Manantali et Markala). Le paludisme y est mésoendémique avec un IP inférieur à 50%. L'anémie reste le phénotype clinique le plus fréquent.
- **la zone peu propice à l'impaludation,** particulièrement dans les milieux urbains comme les villes de Bamako et de Mopti. Le paludisme y est hypoendémique avec un IP inférieur à 10%. Les cas graves du paludisme peuvent être rencontrés chez les adultes.

### 3.2. Agents pathogènes

Il existe de très nombreuses espèces de *Plasmodium* (plus de 140), touchant diverses espèces animales, mais habituellement on retrouve en pathologie humaine : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale curtisi*, *P. ovale wallikeri*, *P. malariae*, *P. knowlesi*, et *P. cynomolgi* [17].

#### 3.2.1. *Plasmodium falciparum*

*P. falciparum* est l'espèce la plus répandue à travers le monde. Il est de loin l'espèce la plus redoutable et responsable de la majorité des formes cliniques grave (neuropaludisme) et mortelles, et également des décès [17]. C'est l'espèce qui développe le plus des résistances aux différents antipaludiques même les plus récents que les autres [17]. Dans les régions équatoriales, il est transmis durant toute l'année avec des recrudescences saisonnières en fonction de la pluviométrie. Dans les régions subtropicales, il ne survient qu'en période chaude et humide. Sa transmission s'interrompt lorsque la température tombe en dessous de 18°C. Quelle que soit la latitude, le paludisme n'est plus transmis en altitude : au-dessus de 1 500 mètres en Afrique et 2 500 mètres en Amérique et en Asie [17]. Son incubation varie de 7 à 12 jours. Les accès tardifs, plus habituels avec les autres espèces (*P. vivax*, *P. ovale* et *P.*

*malariae*) s'observent très rarement. Plus de 90% des accès palustres à *P. falciparum* surviennent dans les 2 mois qui suivent le retour du pays d'endémie. C'est l'espèce la plus fréquemment observée en France, responsable de plus de 80% des cas de paludisme d'importation [17].

### **3.2.2. *Plasmodium vivax***

Le *P. vivax* est la deuxième espèce la plus fréquente des parasites du paludisme humain. Il est très largement répandu en Amérique du Sud et en Asie, mais beaucoup plus rarement en Afrique (Afrique de l'est et dans les îles de l'océan Indien). Les érythrocytes du groupe sanguin Duffy négatif, observé surtout chez des sujets originaires d'Afrique de l'ouest et centrale qui ne possèdent pas le récepteur membranaire habituellement nécessaire à l'infection par *P. vivax* [17, 18]. Sa transmission s'arrête en dessous de 15°C. Sa période d'incubation est comprise entre 11 à 15 jours. On peut observer des accès de reviviscence dues au réveil d'hypnozoïtes pendant 3 à 4 ans. L'affection par *P. vivax* est classiquement considérée comme bénigne. Dans les zones d'endémie, il peut entraîner des répercussions sur l'état de santé des populations comme l'anémie. Des cas de résistance de *P. vivax* commence à s'observer à la chloroquine [17].

### **3.2.3. *Plasmodium ovale***

Il sévit en Afrique intertropicale du centre et de l'ouest et dans certaines régions du Pacifique). Sa période d'incubation est de 15 jours mais peut être beaucoup plus longue. Il provoque des accès de fièvre bénigne et comme *P. vivax* dont il est très proche. Son évolution est bénigne mais on peut entraîner des rechutes tardives allant jusqu'à 5 ans. Schématiquement, on dit que *P. ovale* remplace *P. vivax* en Afrique, là où cette dernière espèce n'existe pas. *P. ovale* est composé de deux sous-espèces, *P. ovale curtisi* (variant) *P. ovale wallikeri* (classique), moléculairement distinctes mais qui ont une morphologie similaire [19].

### **3.2.4. *Plasmodium malariae***

Il sévit dans les pays tropicaux de manière beaucoup plus sporadique. Il se différencie des autres espèces par sa période d'incubation plus longue allant de 15 à 21 jours et des rechutes très tardives jusqu'à 20 ans dont les mécanismes physiopathologiques ne sont pas totalement clairs mais certains évoquent la présence de mérozoïtes latents

dans les voies lymphatiques [20]. L'infection par *P. malariae* est bénigne mais il peut parfois entraîner des complications rénales [21].

### **3.2.5. *Plasmodium knowlesi***

Le *P. knowlesi* sévit en Asie du sud-est particulièrement en Malaisie, à Bornéo, en zone forestière car il est étroitement lié à la répartition des singes macaques, son hôte habituel, et de son vecteur piquant l'homme et la singe. Il est morphologiquement proche de *P. malariae*. Il se différencie des autres espèces par un cycle érythrocytaire de 24 heures responsable d'une fièvre quotidienne. Il existe de rares formes graves, voire mortelles, avec une forte parasitémie. A ce jour aucune chimiorésistance n'a été observée pour cette espèce [22].

### **3.2.6. *Plasmodium cynomolgi***

*P. cynomolgi* fait partie des espèces des singes macaques comme le *P. knowlesi*, et principalement rencontré en Asie du Sud-Est. Il possède des caractéristiques biologiques et génétiques proches du *P. vivax* [23]. Récemment un cas de paludisme causé par *P. cynomolgi* a été signalé dans l'est de la Malaisie [24].

## **3.3. Vecteurs**

La transmission du paludisme est assurée par les moustiques *culicidea* du genre *Anophèles* dont il existe plus de 400 espèces, mais seuls une cinquantaine est capable de transmettre le paludisme à l'homme. Le développement et la longévité (environ 30jours) des *anophèles* dépendent de la température avec un optimum entre 20 et 30°C. Les vecteurs responsables de la transmission en Afrique sont : *An. gambiae* et *An. funestus* [25]. La distribution de ces vecteurs dépend fortement des variations spatiales et temporelles, *An. funestus* étant abondant pendant la saison froide et sèche, *An. gambiae* pendant la saison des pluies [26, 27]. Ces espèces sont d'autant plus redoutables qu'elles ont une affinité pour l'homme (espèces anthropophiles). Elles se nourrissent et se reposent dans les maisons (espèces endophiles ou domiciliaires). Seule la femelle hématophage assure la transmission du parasite.



### **3.4. Cycle de développement [28]**

Le cycle de développement du *Plasmodium* est un cycle complexe, il comprend deux phases : une phase asexuée chez l'homme (hôte intermédiaire) et l'autre sexuée chez l'anophèle femelle (hôte définitif).

#### **3.4.1. Cycle de développement chez l'homme**

##### **3.4.1.1. Phase hépatique ou exo-érythrocytaire**

Les sporozoïtes inoculés par l'anophèle femelle lors de son repas sanguin restent pendant une trentaine de minutes maximum dans la peau, la lymphe et le sang. Beaucoup sont détruits par les macrophages mais certains parviennent à gagner les hépatocytes. Ils se transforment en schizontes pré-érythrocytaires ou « corps bleus » (formes multinucléées) qui, après 7 à 5 jours de maturation, éclatent et libèrent des milliers de mérozoïtes dans le sang dont le nombre varie en fonction des espèces plasmodiales [17]. Dans les infections à *P. vivax* et *P. ovale*, certains sporozoïtes intrahépatiques restent quiescents (hypnozoïtes) et sont responsables d'une schizogonie hépatique retardée, qui entraîne la libération dans le sang de mérozoïtes plusieurs mois ou années après la piqure infectante du moustique, expliquant ainsi les reviviscences tardives observées avec ces deux espèces. Elle correspond à la phase d'incubation, cliniquement asymptomatique et dure environ 6 jours pour *P. falciparum*, 8 jours pour *P. vivax*, 9 jours pour *P. ovale*, 9-12 j pour *P. knowlesi*, 15 jours pour *P. malaria* [17].

##### **3.4.1.2. Phase sanguine ou érythrocytaire**

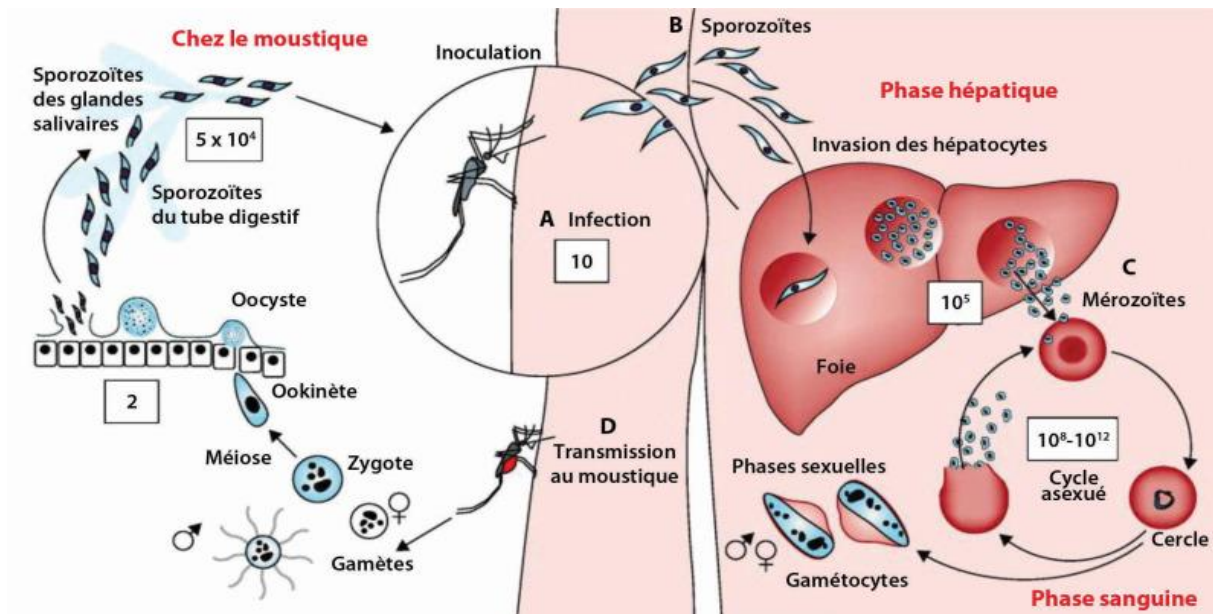
Après leur libération à la suite de l'éclatement des schizontes hépatiques, les mérozoïtes pénètrent dans les globules rouges et se transforment en trophozoïte jeune. Celui-ci se développe en important le contenu de l'érythrocyte et en le dirigeant dans sa vacuole digestive interne. Les produits de dégradation de l'hémoglobine donnent un pigment appelé hémozoïne. La maturation de trophozoïte en schizonte se fait en 24, 48 ou 72 heures et contient 8 à 30 mérozoïtes en fonction de l'espèce plasmodiale. Ces mérozoïtes sont identiques d'un point de vue morphologique à ceux de la phase hépatique. Après l'éclatement de l'hématie et la rupture des schizontes érythrocytaires, les mérozoïtes et les substances pyrogènes issues de la dégradation de l'érythrocyte sont libérés dans la circulation sanguine.

Les mérozoïtes libérés pénètrent dans les globules rouges sains environnants et débute un nouveau cycle de réplication érythrocytaire. Tous les schizontes érythrocytaires arrivent à maturation au même moment. La destruction des hématies se fait de façon synchrone : toutes les 24 heures pour *P. knowlesi*, toutes les 48 heures pour *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* et toutes les 72 heures pour *P. malaria*. Cette phase correspond à la phase clinique de la maladie. Au cours des différents cycles de multiplication, certains trophozoïtes matures se transforment en formes sexuées (gamétocytes mâle et femelle). Les gamétocytes sont ingérés par les moustiques anophèles lors de leur repas sanguin et commence le cycle chez le moustique.

### **3.4.2. Cycle de développement chez l'anophèle femelle**

Ingérés par le moustique lors d'un repas sanguin sur un sujet infecté, les gamétocytes se transforment en gamètes dans l'estomac de l'anophèle (les gamétocytes femelles se transforment en macrogamètes tandis que les gamétocytes mâles subissent une exflagellation et donnent plusieurs microgamètes). Celui-ci quitte la lumière du tube digestif du vecteur, se fixe sur la paroi externe de l'estomac et se transforme en oocyste.

L'oocyste donne naissance à des centaines de sporozoïtes qui gagent les glandes salivaires du moustique. Ces sporozoïtes sont les formes infectantes prêtes à être inoculées avec la salive du moustique, lors d'un repas sanguin sur un hôte. Le cycle sexué chez le moustique dure environ une à deux semaines lorsque les conditions environnementales sont optimales. Cependant, la durée de cette phase est étroitement liée à l'espèce de *Plasmodium* ainsi qu'à la température et peut donc être beaucoup plus longue [29].



**Figure 1 : Cycle biologique du *Plasmodium***

**Source :** posté par Argy, N et al. 2018 [Épidémiologie et cycle parasitaire d'un fléau mondial, le paludisme – Science Direct](#) [28]

### 3.5. Physiopathologie du paludisme

Le paludisme et ses complications sont la résultante d'une cascade d'événements physiopathologiques, influencés à la fois par les facteurs liés au parasite (espèce plasmodiale et virulence) et ceux liés à l'hôte (immunité et susceptibilité génétiques).

#### 3.5.1. Accès palustre simple

Les symptômes du paludisme commencent à se prononcer à partir du stade intra-érythrocytaire du cycle de développement du parasite. La fièvre, lors de l'accès simple, survient au moment de la lyse des hématies qui libèrent les mérozoïtes, l'hémozoïne (pigment malarique) et d'autres substance comme TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6. Pendant longtemps on a cru que le pigment malarique se comportait comme un pyrogène stimulant le centre hypothalamique thermorégulateur. Actuellement, il apparaît que la fièvre n'est pas propre au parasite lui-même, mais est due à des cytokines libérées par les macrophages et les cellules endothéliales de l'hôte [30]. Toute une série de cytokines peuvent avoir un effet pyrogène telles que l'IL-1, l'IL-6 et la lymphotoxine  $\beta$  ; mais c'est le TNF- $\alpha$  dont le lien avec la fièvre a été le mieux établi [31].

Ces cytokines se comportent comme des pyrogènes endogènes en stimulant le centre thermorégulateur hypothalamique. La fièvre n'apparaît que lorsque la parasitémie atteint un seuil critique (seuil pyrogène), variable d'un sujet à l'autre et d'une souche de parasite à l'autre. Au cours des accès de primo invasion, le cycle érythrocytaire est généralement non synchronisé ; la fièvre prend alors une allure continue ou irrégulière selon la parasitémie. Lorsque les cycles se synchronisent progressivement, la fièvre revêt alors son caractère de type de fièvre intermittente, tierce ou quarte [32]. Au cours de l'infection palustre, le système phagocytaire débarrasse l'organisme non seulement des pigments malariques mais aussi des débris érythrocytaires ce qui aboutit à l'hépto-splénomégalie [33].

### **3.5.2. Paludisme grave et compliqué**

*P. falciparum* est l'espèce la plus dangereuse puisqu'elle est à l'origine des formes graves et compliquées qui s'observent chez les patients non-immuns (jeunes enfants, femmes enceintes, expatriés provenant de zones non-endémiques palustres, habitants des zones hypoendémiques) [34]. Les concepts physiopathologiques du paludisme grave font intervenir deux phénomènes interdépendants : la séquestration des hématies parasitées et le phénomène immunologique.

#### **3.5.2.1. Séquestration**

Elle aboutit à une obstruction du microcapillaire par les globules rouges. Trois mécanismes concourent à ce phénomène : l'auto-agglutination, la formation de rosettes « ou rosetting » et la cytoadhérence.

##### **✚ Phénomène de l'auto-agglutination**

L'auto-agglutination des hématies parasitées a été observée sur de nombreuses souches de *P. falciparum* étudiées en culture au laboratoire. Il s'agit d'un regroupement des érythrocytes infectés entre eux pour former des micros-agrégats susceptibles d'obstruer les capillaires profonds. Ce phénomène a été observé chez les patients porteurs de forte parasitémie en dehors de tout phénotype d'adhésion. Les mécanismes moléculaires qui prédisposent à sa survenue sont encore mal connus [35].

## ✚ Phénomène de formation des rosettes « ou rosetting »

Les hématies parasitées ont la faculté d'attirer au tour d'elles des hématies infectées et saines pour former des rosettes : c'est le phénomène de « rosetting ». La formation des rosettes est la conséquence de la liaison entre les ligands parasitaires (PfEMP1) présents à la surface des hématies infectées et leurs récepteurs sur les globules rouges non infectés. Plusieurs récepteurs pour les ligands parasitaires (PfEMP1) ont été décrits à la surface des globules rouges. On peut citer entre autres, le récepteur-1 du complément (CR1/CD35), les trisaccharides des groupes sanguins A et B, le CD36, le PECAM-1/CD31. Les anticorps (IgM et IgG) et certains composants du complément (C3b et C4b) jouent aussi un rôle dans ce phénomène à travers le CR1. Il aboutit à la formation d'un agrégat qui contribue à l'obstruction des petits vaisseaux sanguins. Ce phénomène a été bien étudié *in-vitro* sur des lignées cellulaires (fibroblastes). Il varie d'une souche plasmodiale à l'autre et est corrélé au degré de sévérité du paludisme. La formation de rosettes constitue un mode de protection pour le parasite contre le système phagocytaire de la rate et exerce un effet délétère pour l'hôte par blocage du flux sanguin [36, 37].

## ✚ Phénomène de cytoadhérence

La cytoadhérence des hématies parasitées à l'endothélium vasculaire ou aux cellules trophoblastiques placentaires est le mécanisme qui a été le mieux étudié ces dernières années. Ce phénomène permet au *Plasmodium* de se développer plus facilement grâce à un environnement gazeux favorable et d'échapper à la clairance splénique. Les hématies parasitées expriment à leur surface des protubérances (knobs) qui semblent jouer un rôle important dans leur adhésion aux cellules endothéliales. Il s'agit de protubérances protéiniques auxquelles sont incorporés des antigènes plasmodiques. Parmi ces antigènes plasmodiques on peut citer la PfEMP-1 et 2 (*Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 et 2) ; la PfHRP-1 (*Plasmodium falciparum* Histidin Rich Protein) ou KAHRP (*Knob-Associated Histidin-Rich Protein*), RESA (*Ring Erythrocyte Surface Antigen*) et EDM (*Knob Associated Histidin-Rich Protein*), RESA (*Ring Erythrocyte Surface Antigen*) et EDM (*Electron-Dense-Material*).

Parmi les protéines parasitaires associées aux *knobs*, PfEMP-1 est le ligand parasitaire le mieux caractérisé. PfEMP-1 interagit avec des récepteurs spécifiques au

niveau des cellules endothéliales vasculaires et du syncytiotrophoblaste, comme l'ICAM-1 (*Inter Cellular Adhesion Molecule-1*), le CD36, le VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesing Molecular1*) le CD31 ou PECAM-1 et le CSA (*Chondroitin Sulfate A*) [38].

L'adhésion des hématies parasitées à ces récepteurs entraîne leur séquestration à l'intérieur de la microcirculation. La séquestration permet aux hématies parasitées d'échapper à la clairance splénique et contribue à la gravité du paludisme. Elle entraîne aussi une obstruction des micro-vaisseaux surtout au niveau cérébral qui semble être la principale cause du neuropaludisme. La séquestration entraînerait aussi une dilatation des micros-vaisseaux par la libération du monoxyde d'azote (NO), responsable de l'œdème cérébral et pulmonaire [39].

### **3.5.2.2. Mécanisme immunologique**

Le système à médiation cellulaire impliquant les lymphocytes CD4+ et les macrophages joue un rôle très important dans la pathogénèse du neuropaludisme. Les antigènes plasmodiaux facilitent le recrutement des macrophages et la libération de nombreuses cytokines pro inflammatoires dont l'interféron gamma, le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 et l'IL-6). Parmi les médiateurs macrophagiques, le TNF- $\alpha$  est un acteur important. Expérimentalement, l'injection du TNF- $\alpha$  chez les souris reproduit la plupart des manifestations cliniques et biologiques du paludisme grave. On pense aussi que la libération du TNF- $\alpha$  stimulerait l'expression des récepteurs des *knobs* au niveau endothélial, donc la séquestration. Il faut rappeler que les fièvres observées au cours des accès palustres seraient dues à la libération dans le sang de l'hémozoïne (substance pyrogène résultant de la dégradation de l'hémoglobine par le *Plasmodium*) après éclatement des schizontes. Cette fièvre peut également être due aux cytokines proinflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 et l'IL-6 [40].

### **3.6. Immunité antipalustre**

Dans les zones d'endémie palustre ou la population est quasiment exposée en permanence à des infections plasmodiales, l'hôte développe progressivement des réponses immunitaires qui protègent contre les formes cliniques graves avec l'âge. Les réponses immunitaires sont régulées aussi bien par le système immunitaire non spécifique dit l'immunité naturelle (ou inné) que par le système immunitaire spécifique ou acquis, tous régulés par des facteurs érythrocytaires (trait drépanocytaire, groupe

sanguin Duffy négatif, allèles HLA), polymorphisme de la réponse immune, facteurs ethniques et les facteurs environnementaux [41-43].

### **3.6.1. Immunité naturelle (innée)**

L'immunité innée se mobilise dès le début de l'infection en attendant la mise en place de l'immunité acquise. L'immunité innée est assurée par les cellules phagocytaires, les molécules et les enzymes (lysozymes). Les mécanismes cellulaires et humoraux de cette défense dite « non spécifique » ne sont pas très bien connus. De récentes études ont permis de démontrer qu'une famille de protéines codée par la lignée germinale (Toll-Like récepteurs ou TLR) serait importante pour la défense innée de l'hôte, aussi bien chez les vertébrés que chez les invertébrés [30] et que l'infection palustre induit l'activation des récepteurs Toll-like, TLR1, TLR2, TLR9 [44].

Parmi les cellules en première ligne dans la réponse immunitaire innée contre l'infection palustre, on distingue les cellules dendritiques (DC), les lymphocytes T gamma delta ( $T\gamma\delta$ ) et les cellules tueuses naturelles (cellules NK). Ces cellules sont impliquées dans l'élimination des érythrocytes infectés ainsi que des hépatocytes infectés. D'autres cellules comme les neutrophiles, les monocytes et les macrophages jouent également un rôle important dans l'élimination du parasite par le biais de la phagocytose et de la cytotoxicité cellulaire. Les cellules NK stimulent la production d'IFN- $\gamma$  qui active à son tour le macrophage conduisant ainsi à la phagocytose et la lyse des cellules parasitées [45].

### **3.6.2. Immunité adaptative ou acquise**

#### **3.6.2.1. Réponse humorale**

L'immunité acquise joue un rôle essentiel dans la protection contre le paludisme. Cette immunité s'acquiert progressivement et lentement en situation d'exposition continue. Cette immunité n'est pas stérilisante, elle n'empêche pas d'être de nouveau contaminé et ne permet pas de se débarrasser totalement du parasite mais elle empêche progressivement la survenue de formes cliniques graves. Cela explique pourquoi en zone de transmission intense, les jeunes enfants payent le plus lourd tribut à la maladie lorsque la protection maternelle transmise s'amenuise, et jusqu'à 4 à 6 ans [46]. Cet état immunitaire permet de contrôler la parasitémie à un seuil qui n'entraîne pas les

manifestations cliniques du paludisme. De nombreux travaux en zone d'endémie palustre ont démontré que l'induction de l'immunité antipaludique adaptative nécessite une exposition longue. Elle se met en place progressivement avec l'âge et les expositions répétées. Elle fait intervenir non seulement la réponse humorale mais aussi la réponse à médiation cellulaire [47]. L'immunité humorale acquise est principalement dirigée contre le stade érythrocytaire asexué, les cibles principales étant les mérozoïtes extracellulaires en circulation, mais le stade pré-érythrocytaire est également visé par les réponses immunitaires protectrices [47].

L'infection par le paludisme induit à la fois une production d'immunoglobulines polyclonales et spécifiques par les cellules lymphocytaires B. Ces anticorps produits au cours de l'infection palustre sont constitués essentiellement par les immunoglobines G (IgG), mais aussi d'autres isotypes d'immunoglobine. Bien que des anticorps d'isotypes différents puissent avoir des fonctions protectrices, le rôle des IgG dans la protection contre l'infection palustre a été largement évoqué [47, 48]. Les sous-classes cytophiliques IgG1 et IgG3 ont été fréquemment rencontrées dans le sérum des personnes protégées contre le paludisme. L'augmentation de la concentration de ces anticorps IgG peut être associée à une diminution du risque d'infection palustre. La sous-classe IgG4 qui est non cytophilique tout comme IgG2 peut inhiber les mécanismes effecteurs par inhibition des anticorps cytophiliques [49]. Le rôle protecteur des immunoglobulines IgM et IgA contre le paludisme n'est pas bien élucidé. De même, aucune fonction spécifique antique n'a été attribuée aux IgA [50].

Cependant, une élévation d'anticorps anti-paludisme IgE a été observée au laboratoire chez l'homme et les animaux au cours de l'infection palustre, traduisant le passage des activités régulatrices des cellules T de Th1 à Th2 en raison de l'exposition répétée des cellules du système immunitaire aux parasites du paludisme [51]. Il a été mentionné dans les études d'une part, que l'élévation de la concentration d'IgE pourrait être associée à l'apparition du paludisme cérébral [50], et d'autre part, une association positive entre la faible parasitémie et le taux élevé d'IgE spécifique d'antigènes de *P. falciparum* [52]. Tous les mécanismes par lesquels les anticorps agissent contre le *Plasmodium* ne sont pas connus, mais les plus évoqués sont l'inhibition de l'invasion des hépatocytes par les mérozoïtes, l'inhibition de la croissance intra-érythrocytaire du parasite, la clairance des érythrocytes infectés par ADCI « Anbody Dependant Cellular Inhibition : l'inhibition cellulaire dépendante des anticorps » [53].



### 3.6.2.2. Réponse cellulaire

Les cellules T CD4+ ou T helper et les T CD8+ ou T cytotoxiques interviennent dans l'immunité antipalustre. Il est actuellement bien établi que les cellules T CD4+ et T CD8+ reconnaissent des peptides antigéniques du *Plasmodium* présentés respectivement par les molécules du CMH classe II et Classe I exprimés à la surface des hépatocytes infectés [54, 55]. Il a été démontré que les cellules T CD4+ de type Th1 spécifiques d'épitopes de la CSP sont capables de conférer la protection contre *P. yeolii* chez la souris [56]. Les lymphocytes T CD4+ peuvent par le biais des cytokines activer les cellules T cytotoxiques contre les hépatocytes infectés. Ils sont essentiels à la protection contre les formes asexuées sanguines du *Plasmodium* aussi bien chez l'homme que chez la souris. Les souris immunisées présentaient des infiltrats inflammatoires après leur infection par des sporozoïtes de *P. berghei*. Ces infiltrats étaient dépendants des cellules T CD8+ spécifiques des antigènes de ce *Plasmodium* [57].

Chez la souris, les érythrocytes infectés induisent des réponses cellulaire T CD4+ et CD8+ spécifiques de *P. berghei*. En outre, ce parasite exprime des antigènes présentés par les cellules dendritiques lesquelles induisent des cellules T cytotoxiques spécifiques [58, 59]. Les études de vaccination avec les sporozoïtes atténués ont démontré que les cellules T cytotoxiques infiltraient le foie et pouvaient intervenir dans la destruction des hépatocytes infectés par le *Plasmodium* [60]. Les études de vaccination chez l'homme ont démontré qu'AMA-1 induit le développement d'une réponse cellulaire mémoire aussi bien chez les personnes naïves que chez celles vivant en zone d'endémie palustre [61].

### 3.6.3. Antigènes candidats vaccins de *P. falciparum*

Les candidats vaccins antipaludiques sont constitués d'antigènes qui servent de cibles pour le système immunitaire. Ces antigènes peuvent être des protéines entières exprimées par le parasite, des sous-unités de ces protéines antigéniques qui stimulent mieux le système immunitaire, des toxines parasitaires ou des gènes qui codent pour ces protéines. Tous les stades du cycle de vie du parasite chez l'hôte sont étudiés sur le plan immunologique afin de connaître les antigènes susceptibles d'être utilisés comme un vaccin [5]. Les antigènes des formes asexuées les plus étudiés durant les

dernières décennies sont le MSP1 (Protéine-1 à la surface du mérozoïte), l'AMA1 (Antigène-1 de la membrane Apicale du Mérozoïte), l'EBA175 (Antigène d'adhésion érythrocytaire 175), le MSP2 (Protéine-2 à la surface du mérozoïte). Les études ont montré que ces antigènes provoquent la production des anticorps qui jouent un rôle important dans la réponse immunitaire par différents mécanismes : inhibent la liaison avec les cellules et bloquent l'invasion des mérozoïtes *in-vitro* [62] et l'inhibition de la croissance des parasites [63]. Mais l'efficacité de ces antigènes reste toujours faible à cause de la diversité antigénique du parasite.

#### **3.6.4. Antigènes du stade gamétocytaire**

Actuellement, les efforts se concentrent sur l'identification des potentiels candidats vaccins ciblant les formes sexuées dans le but de bloquer la transmission du paludisme.

##### **3.6.4.1. Antigène *Pfs48/45* (Protéine de surface des gamétocytes de 48/45 kDa de *P. falciparum*)**

Les parasites du paludisme sont propagés dans la population humaine par les moustiques anophèles infectés par le *Plasmodium*. Après un repas de sang sur des humains infectés, les moustiques s'infestent en ingérant des formes sexuelles du *Plasmodium* appelée gamétocytes. Le développement sporogonique ultérieur chez le moustique peut être évité par la présence d'anticorps antipaludiques bloquant la transmission dans le repas de sang ingéré. Les anticorps anti-Pfs48/45 sont présents dans les sérums humains des zones endémiques. Chez les vertébrés, le gamétocyte est localisé dans le cytoplasme du globule rouge. Il est alors relativement à l'abri des mécanismes de défense immunitaire de l'hôte, mais il peut être phagocyté par les macrophages ou être inactivé (incapable de se transformer en gamètes) par les cytokines et les anticorps [64].

La transmission du paludisme dépend de la présence de parasites matures au stade sexuel, les gamétocytes, dans le sang périphérique humain. Une fois ingérés par un moustique prenant un repas de sang, les gamétocytes formeront des microgamètes mâles et des macrogamètes femelles qui, après la fécondation et la formation de zygotes, se transforment en ookinètes qui pénètrent dans la paroi de l'intestin moyen du moustique pour former un oocyste sous la lame basale de l'intestin moyen. Chaque

oocyste produit des milliers de sporozoïtes, rendant le moustique infectieux pour l'homme [65]. L'infectiosité des gamétocytes vis-à-vis des moustiques dépend de leur densité et de leur niveau de maturation, mais aussi de l'état des moustiques et des réponses immunitaires de l'hôte [66].

Les anticorps contre *Pfs48/45* provoquent une réduction significative de la transmission du paludisme en raison de l'inhibition du développement des zygotes et de l'infection par les moustiques. *Pfs48/45* est spécifiquement exprimé dans les gamétocytes et les gamètes [67]. Les anticorps humains réduisant la transmission sont ingérés par les moustiques anophèles avec les gamétocytes et peuvent interférer avec la formation du zygote et, par conséquent, impacter le développement ultérieur du parasite chez le moustique vecteur. Les interventions qui peuvent bloquer la transmission de *P. falciparum* entre l'hôte humain et le vecteur anophèle ont le potentiel de réduire l'incidence du paludisme. *Pfs48/45* est une protéine de surface gamétocytaire critique pour le développement et la transmission des parasites, et son ciblage par l'anticorps monoclonal (mAb) 85RF45.1 a conduit à la réduction significative de la transmission palustre [68].

Les trois candidats vaccins bloquant la transmission du paludisme (MTBV) les plus prometteurs pour *Plasmodium falciparum* à ce jour sont basés sur l'induction de réponses anticorps contre les antigènes parasitaires *Pfs230*, *Pfs48/45* et *Pfs25* dans la fécondation des macrogamétocytes par les microgamètes. Les molécules de surface des gamètes *Pfs48/45* sont également exprimées dans les gamétocytes circulant dans le sang humain et des réponses anticorps contre ces antigènes sont détectées chez des individus naturellement exposés. Cela permet d'étudier la nature et la durée de l'immunité spécifique au stade sexué chez les individus naturellement infectés. Des réponses anticorps spécifiques au stade sexué naturellement acquises peuvent être acquises après exposition aux gamétocytes et rapidement induites dans le cadre de la réponse initiale à l'infection.

Contrairement aux anticorps dirigés contre les antigènes pré-érythrocytaires et sanguins, la prévalence des anticorps spécifiques au stade sexué n'augmente pas avec l'âge. On sait peu de choses sur le taux d'induction ou la longévité des réponses anticorps au stade sexué et cela peut être important pour la stimulation naturelle de toute réponse induite par le vaccin. Les réponses immunitaires naturellement acquises

contre les stades sexués de *P. falciparum* peuvent réduire la transmission du paludisme des humains aux moustiques. Ces antigènes sont des vaccins candidats bloquant la transmission, mais on en sait peu sur l'acquisition de l'immunité au stade sexué après exposition aux gamétocytes, ou sur leur longévité et leur fonctionnalité.

#### **3.6.4.2. Antigène Pf230**

La protéine de surface de 230 kD de gamète de *P. falciparum* (*Pfs230*) est une cible des anticorps bloquant la transmission. Les anticorps *Anti-Pfs230* sont induits à la suite d'une infection naturelle par le *Plasmodium*, mais ne se trouvent pas *chez toutes les personnes exposées aux parasites*. Une étude a démontré qu'environ 40% des Gambiens exposés au paludisme n'ont pas produit des anticorps anti-*Pfs230*. Ce phénotype est remarquablement stable au fil du temps et ne semble pas être lié à l'âge, à l'exposition au paludisme ou au génotype complexe d'histocompatibilité majeur [69].

#### **3.6.4.3. Antigène Pf47**

La protéine parasitaire *Pfs47* est essentielle à la transmission de la maladie. Elle médie l'induction immunitaire des moustiques dans *Plasmodium berghei* (*Pbs47*) et *Plasmodium falciparum* (*Pfs47*) et s'est avéré être important pour une fertilité optimale des gamètes femelles chez *P. berghei*. *Pfs47* est une cible attrayante pour perturber la transmission du paludisme [68]. *Ps47* est l'un des 14 membres de la famille des protéines à six cystéines (6-Cys) [70], il est localisé à la surface des gamétocytes femelles et des gamètes, ainsi que des zygotes et ookinètes [71-73]. Chez *P. falciparum* et *P. berghei*, *Ps47* permet aux parasites d'échapper au système immunitaire des moustiques. *Pfs47* est essentiel pour la transmission du *Plasmodium*. Chez *P. berghei*, *Ps47* est requis pour une fertilisation optimale mais chez *P. falciparum*, cette exigence n'est pas bien établie. A la fois *P. falciparum* et *P. berghei*, *Ps47* est également important pour l'évasion immunitaire des moustiques. L'importance de *Ps47* pour la transmission du paludisme justifie la continuité des investigations pour évaluer sa faisabilité en tant que cible pour bloquer la transmission du paludisme.

### **3.7. Diagnostic biologique**

La goutte épaisse et le frottis mince sont les deux examens de référence permettant la mise en évidence du parasite dans le sang au microscope. Ces techniques permettent le repérage du *Plasmodium* dans le sang, la quantification de la charge parasitaire et la détermination de l'espèce plasmodiale. Le test de diagnostic rapide (TDR) est utilisé aussi pour le diagnostic du paludisme.

Au Mali, ces deux techniques sont recommandées pour le diagnostic biologique du paludisme surtout le TDR à cause de son accessibilité et son coût faible et peut être utilisé en absence d'électricité. Tout cas suspect de paludisme doit être systématiquement confirmé par TDR ou GE/FM avant un traitement.

### **3.8. Prise en charge du paludisme**

#### **3.8.1. Actions préventives**

Les mesures préventives visent à protéger soit contre l'infection, soit contre le développement de la maladie chez les personnes infectées. Il n'existe actuellement aucun vaccin autorisé sur le marché contre le paludisme, mais un essai vaccinal contre *P. falciparum* est en cours d'évaluation en Afrique subsaharienne. Le candidat vaccin le plus avancé dans ce groupe est le RTS, S/AS02A qui est le résultat de l'assemblage de trois composants : le CSP de *P. falciparum*, un antigène de surface du virus de l'hépatite B et un adjuvant AS02 de GlaxoSmithKline [74, 75]. Toutefois, ce vaccin vient d'être autorisé par l'OMS pour renforcer les autres mesures de prévention [76, 77].

Au Mali, le PNLP recommande des mesures de contrôle qui s'intègre dans les stratégies globales de l'OMS comme la lutte antivectorielle (utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides à longue durée d'action et la pulvérisation intradomiciliaire), le Traitement Préventif Intermittent (TPI) utilisant la sulfadoxine-pyriméthamine (SP) au cours des consultations prénatales et la Chimio-prévention du Paludisme Saisonnier (CPS) chez les enfants de 3 à 59 mois [2].

### 3.8.2. Action curative

L'OMS recommande l'utilisation des Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA) pour le traitement curatif du paludisme simple depuis 2004. Les différentes associations avec les dérivés de l'artémisinine sont :

- Artéméther + Luméfantrine se présente en comprimés à 20mg d'artéméther et à 120mg de luméfantrine pour le traitement de l'accès palustre simple à *P. falciparum*
- Artésunate + amodiaquine se présente en comprimé de différentes posologies : 25 mg/67,5mg, 50mg/135mg, 100mg/270mg et 100mg/270mg. Cette association est prescrite dans le traitement de l'accès palustre simple à *P. falciparum* en Afrique.
- Artésunate + méfloquine se présente en comprimé de 25mg/50mg et 100mg/200mg. Elle est recommandée par l'OMS pour le traitement du paludisme à *P. falciparum* non compliqué en Asie et en Amérique latine.

Pour le traitement de l'accès palustre grave, les molécules recommandées sont : la quinine en intraveineuse en raison de 24 mg/kg/j, l'artéméther par voie intramusculaire et surtout l'artésunate en intraveineux direct sont mieux tolérées et surtout moins dangereuses que la quinine.

Au Mali, le PNLN recommande l'association l'artéméther-luméfantrine et artésunate-amodiaquine pour le traitement du paludisme simple. Cette prise en charge est gratuite pour les enfants moins de 5 ans et les femmes enceintes. La prise en charge du paludisme grave se fait avec l'artésunate injectable, l'artéméther injectable ou la quinine injectable. Il faut passer à la voie orale dès que l'état du patient le permet. Ces trois molécules et l'artésunate suppositoire sont utilisées pour le pré-transfert. Ce traitement du paludisme est aussi valable pour la femme enceinte.

## **4. METHODOLOGIE**

### **4.1. Cadre d'étude**

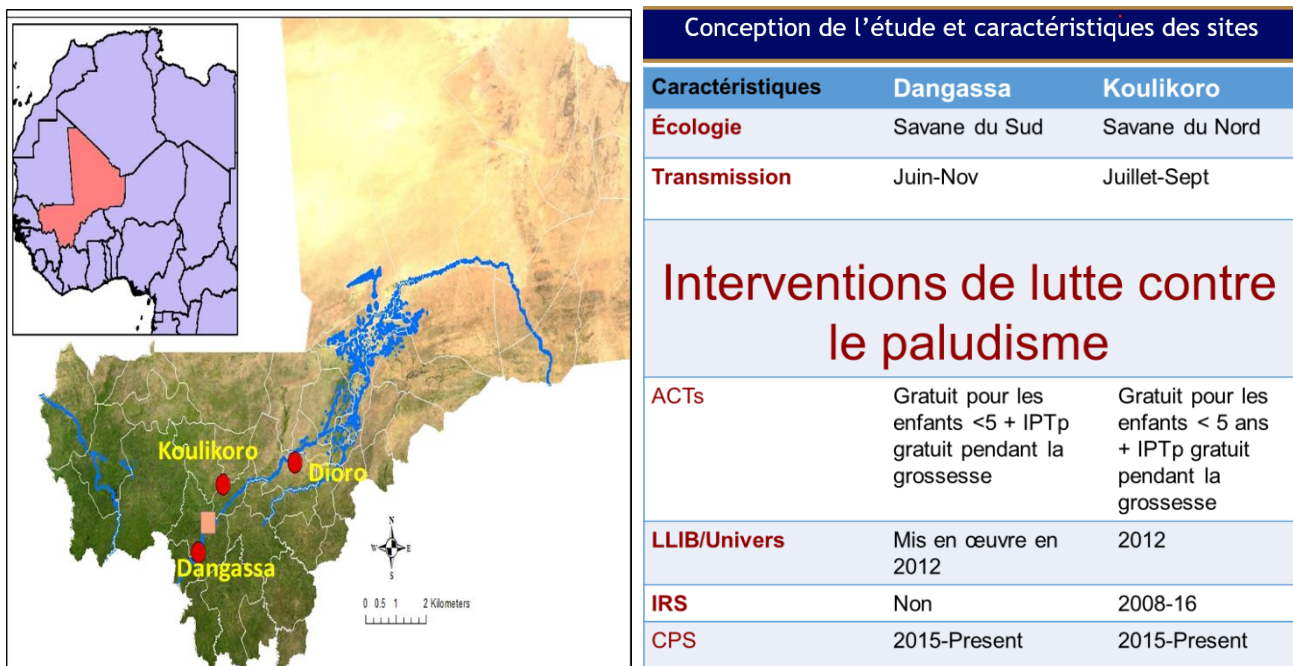
Notre étude s'inscrit dans le cadre d'un partenariat entre le Centre International d'Excellence en Recherche sur le Paludisme (ICEMR) de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB) ; et l'Université du Ghana (Wacsbip) et la NIH (Institut National de la santé) sur un projet de recherche de paludisme. Elle s'est déroulée dans les villages de Dangassa et de Sirakorola, deux zones éco-climatiques différentes dans la région de Koulikoro au Mali.

#### **4.1.1. Village de Dangassa**

C'est une zone d'endémie palustre où les cas de paludisme sont rencontrés durant toute l'année mais la transmission est surtout intense au cours de la saison des pluies. La durée et l'intensité varient aussi en fonction des conditions environnementales et du climat. Deux pics de transmission sont généralement observés.

##### **4.1.1.1. Situation géographique**

Le village de Dangassa est situé à 82 km au sud-ouest de Bamako sur la route nationale 7 (RN7), dans la commune rurale de Niagadina, dans le district sanitaire de Ouéléssébougou, région de Koulikoro. Autrefois Dangassa s'appelait Tintinibilé (plateau rouge), le village aurait été fondé vers le 13ème siècle par Manssa Dan Camara qui s'installa sur un plateau où poussait une herbe appelée en malinké Ngasan. Quand son frère Kamadjan lui rendit visite et dit « nous viendrons nous installer à Dan ka Ngasanfièra » ce qui signifie en malinké (le plateau où pousse l'herbe Ngasan) que le village prend le nom de Dangassa. Ce village compte 11000 habitants composés essentiellement par les malinkés mais on y retrouve aussi les bambara, les peuhls, les somonos, les dogons etc. (Source : CSCCom de Dangassa). Il est limité à l'est par le village de Balala, au nord-est par le village de Makono à l'ouest par le village de Niagadina, au nord par le fleuve Niger et au sud par le village de Faraba.



**Figure 2. Carte du Mali avec le plan du village de Dangassa et de Sirakorola**

**Source : Unité GIS/RS du MRTC-FMOS-USTTB- avril 2016**

#### 4.1.1.2. Climat et végétation

Le climat est de type soudano-guinéen avec deux grandes saisons : une saison pluvieuse de juin à octobre et une saison sèche de décembre à mai. Les vents dominants sont la mousson (en saison de pluies) et l'harmattan (en saison sèche).

La végétation est faite de savane arborée qui est menacée de disparition par les coupes abusives du bois et les feux de brousse. Parmi les plantes rencontrées, on y trouve le karité, le tamarinier, le néré, le caicédrat, le kundière etc.....

L'habitat est de type traditionnel, constitué de cases rondes et rectangulaires en terre battue et aux toitures en chaumes coniques mais les maisons ont des toitures de plus en plus en tôle maintenant. Ces types de maisons représentent un lieu de repos propices des moustiques favorisant ainsi l'agressivité anophélienne dans la zone. L'environnement physique du village est propice à la prolifération des moustiques tels que l'anophèle qui assure la transmission du paludisme. Pendant la saison des pluies il existe des cultures intra domiciliaires qui favorisent la prolifération d'herbes sauvages dans le village contribuent aussi à une augmentation de la densité et l'agressivité des moustiques. La température la plus élevée se situe à environ 40°C au mois de mai et



la plus basse est voisine de 18°C aux de décembre-janvier. La température moyenne annuelle est autour de 29°C. D'une manière générale, le climat est assez agréable et la végétation est passable bonne. La faune entomologique est constituée d'invertébré et d'arthropodes. *Anophèles gambiae* abondent dans le village où ils assurent la transmission du paludisme en saison des pluies. *Anophèles gambiae* est le vecteur majeur du paludisme rencontré dans la zone d'étude.

#### **4.1.1.3. Infrastructures socio-sanitaires**

Le village dispose d'un représentant de l'office de la haute vallée du Niger (OHVN) qui s'occupe de l'appui technique du monde paysan dans la production du coton et des cultures céréalières et une station FM locale (Dangassa kukan). Le village dispose d'une école de base (fondamentale) et une medersa. Il dispose également d'un centre de santé communautaire composé d'un dispensaire, d'une maternité et d'un magasin. Le dispensaire est composé de cinq salles (salle de consultation, une salle de soins, une salle de repos, une salle de dépôt médicament dénomination commerciale internationale (DCI) et d'un dortoir pour le chef de post.). La maternité est composée d'une salle de consultation prénatale, d'une salle de vaccination et d'accueil, d'une salle d'accouchement, d'une salle de repos et d'une salle de garde. Le personnel du centre se compose d'un médecin contractuel, un vaccinateur, une sage-femme, une matrone, une aide-soignante et une gérante du dépôt pharmaceutique. Les Organisations Non Gouvernementales (ONG) fonctionnant dans le village, en plus de l'ICEMR, sont le Plan Mali et Blue Start.

#### **4.1.1.4. Activités Socio-économiques et Culturelles**

Les activités économiques sont dominées principalement par l'agriculture mais on y pratique aussi l'élevage, la pêche, le commerce et l'artisanat. La plaine de Dangassa est propice aux cultures vivrières comme le sorgho, du mil, du maïs, le haricot, de l'arachide, de l'orange, de la papaye, du citron, du piment, la tomate etc..... Ces produits constituent d'importances sources de revenus pour la population. La taille des exploitations est très variable et dépend de la capacité du travail potentiel de la famille ainsi que le patrimoine foncier. L'élevage est basé sur les volailles, les ovins, les caprins et les bovins qui constitue l'économie secondaire. On trouve également quelques équidés (ânes et les chevaux) utilisés comme des animaux de trait. La

plupart des villageois investissent leurs revenus dans l'élevage et dans les cultures industrielles. La pêche est également pratiquée principalement dans les hameaux par les ethnies comme bozo et Somono. L'artisanat local est pratiqué principalement par les forgerons (la cordonnerie, la forgerie, la poterie). L'orpaillage ordinaire est devenu dans ces derniers temps une source importante de revenus des familles.

Cependant, il a des conséquences non seulement sur l'activité agricole pendant l'hivernage mais aussi sur la pêche, l'environnement et sur la santé de la population environnante. Une foire hebdomadaire à lieu à Dangassa chaque mercredi favorisant les échanges commerciaux. L'islam représente la religion la plus pratiquée mais les religions traditionnelles sont aussi présentes.

#### **4.2.2. Village de Sirakorola**

Sirakorola est situé à 112 km à l'Est de Bamako. Presque à cheval entre la ville de Koulikoro à 55 km et celle de Banamba à 30 km, et couvre une superficie de 987 km<sup>2</sup>. C'est l'une des neuf (9) communes du Cercle de Koulikoro. La commune de Sirakorola est limitée au nord par la commune de Banamba, au sud par la commune de Koula, à l'est par la commune de Tougouni et à l'ouest par la commune de Massantola, cercle de Kolokani. La commune est composée de 55 villages avec une population estimée à 25 053 habitants.

##### **4.2.2.1. Situation géographique**

Les traits physiques dominants sont des collines, les plaines et des marigots. La végétation est du type soudanien dominé par la savane herbeuse. Le relief est dominé par les terminus des monts Mandingues. La Commune de Sirakorola n'est traversée par aucun cours d'eau mais dispose de marigots qui servent d'abreuvoirs aux animaux à un certain moment de l'année (mai à novembre).

##### **4.2.2.2. Climat et végétation**

La végétation est celle d'une savane herbeuse parsemée de grands arbres tel que *Parkia biglobosa* (Néré), *Andansonia digitata* (N'zira Baobab) etc. Le climat est de type tropical, la faune est constituée d'une part, d'insectes d'intérêt médical (anophèles, culex, aèdes, phlébotomes), d'autre part de vertébrés tels que les reptiles (*Naja*

*nigricolis*, *Naja Katiensis*, *Echis carinatus*, *Varanus exanematicus* et *Varanus niloticus*), de mammifères tels que les phacochères (*Phacochoerus aethiopicus*), les singes et des oiseaux (tourterelles, etc.).

En saison sèche, les jeunes filles et garçons migrent à Bamako et vers d'autres régions du Mali et sont de retour au début du mois de mai. Les ressortissants regroupés en association participent économiquement au développement de leur localité. L'islam, le Christianisme et l'animisme sont les pratiques religieuses. L'habitat se compose de cases rondes avec toit en paille, de cases rectangulaires avec toit en tôle et des maisons en ciment. Les ethnies dominantes sont les Bambaras, Sarakolés, Peulhs.

#### **4.2.2.3. Infrastructures socio-sanitaires**

Le centre de santé communautaire de Sirakorola a été créé en 1995. Il est actuellement administré par un médecin, aidé par un technicien supérieur, deux infirmières obstétriciennes, un aide-soignant et un gérant du dépôt de pharmacie. C'est une zone à transmission courte ou presque tous les cas sont recensés durant la courte période de saison des pluies.

#### **4.2.2.4. Activités Socio-économiques et Culturelles**

L'activité dominante est l'agriculture. L'artisanat est peu développé. La pêche n'existe pratiquement pas parce qu'il n'existe ni de fleuve ni de grands lacs. Le commerce est peu développé en dépit de la position géographique de la commune. Le fait est aussi paradoxal dans la mesure où le marché de Sirakorola est le plus important du Cercle de Koulikoro. Cette foire hebdomadaire draine non seulement la population de la commune mais aussi celle des communes voisines. C'est un gros marché céréalier et de bétail. On y trouve des détaillants de produits de première nécessité. La foire hebdomadaire facilite la libre circulation des médicaments et par conséquent, l'automédication des antipaludiques.

## **4.2. Type et période d'étude**

Il s'agissait d'une étude longitudinale qui consistait à suivre un groupe d'enfants durant l'année 2019 avec deux passages transversaux en début (juin 2019) et en fin (novembre 2019) de saison de transmission.

## **4.3. Population et échantillonnage**

La population d'étude était composée de tous les enfants âgés de 5 à 15 ans résidant dans les deux villages de l'étude. La taille minimale de l'échantillon a été estimée à partir de la prévalence de la gamétocytémie à 16,1% [78], un intervalle de confiance à 95% et 10% comme perdus de vue. Au total, 576 participants dont 289 à Dangassa et 287 à Sirakorola ont été inclus dans cette étude et suivis durant l'année 2019. Un échantillonnage aléatoire simple a été fait pour sélectionner les participants à partir du fichier de recensement des deux populations d'étude.

### **4.3.1. Critères d'inclusion**

Nous avons inclus tous les enfants répondant aux critères suivants :

- ✓ donner son consentement volontaire, libre et éclairé pour participer à l'étude ;
- ✓ avoir un âge entre 5 et 15 ans ;
- ✓ résider dans le village de Dangassa ou dans le village de Sirakorola au cours de la saison de transmission 2019.

### **4.3.2. Critères de non-inclusion**

Les enfants répondant aux critères suivants n'ont pas été inclus dans notre étude :

- ✓ toutes conditions qui ne permettraient pas de suivre l'enfant ou contre-indiquant un prélèvement sanguin (exemples : maladie psychiatrie, hémophilie, etc.) ;
- ✓ les enfants ayant un taux d'hémoglobine bas < 8g/dl.

## **4.4. Variables mesurées**

Au cours de notre étude, nous avons mesuré les :

- ✓ variables sociaux démographiques tels que la résidence, l'âge et le sexe ;

- ✓ variables biologiques tels que la parasitémie, le taux des anticorps anti-*Pfs48/45*, *anti-Pfs230* et *anti-Pfs47*.

#### **4.5. Gestion et analyse des données**

La collecte des données a été faite à l'aide de l'application REDCap puis exportés sur Microsoft Excel 2007 pour le contrôle de qualité. L'analyse a été faite avec le logiciel STATA version14. Les résultats ont été présentés sous forme de tableaux et de figures. Les figures ont été faites avec le logiciel Prism 9 et les tableaux avec le Microsoft Word 2010. La recherche d'association entre les variables qualitatives a été effectuée en utilisant les tests de Chi2 et de Fisher. Le test de Student a été utilisé pour faire la comparaison du taux moyen d'anticorps. La corrélation de Pearson a été utilisé pour chercher un lien entre les taux d'anticorps et la parasitémie avec un seuil de signification statistique fixé à 5%.

#### **4.6. Techniques de laboratoire utilisées**

##### **4.6.1. Goutte épaisse/frottis sanguin**

C'est une technique de micro-concentration qui consiste à examiner quelques microlitres de sang après hémolyse des globules rouges et coloration en utilisant le Giemsa à 3%. C'est une excellente technique mais de réalisation un peu délicate et qui nécessite une bonne expérience pour la lecture. Elle permet de quantifier la parasitémie et de déterminer l'espèce en cause. Le nombre de parasites pour 300 leucocytes a été calculé et exprimé en parasites par microlitre de sang. Le seuil de détection de la technique est de 10 à 20 parasites par microlitre de sang (environ 0,0002 à 0,0004 % d'hématies infectées (cf. **annexe 1**).

##### **4.6.2. Test ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)**

Le test ELISA a été réalisé selon la procédure standard opératoire (SOP, Procédure Standard Opératoire) développée par le NIH (cf. **annexe 2**). Tous les échantillons de plasma ont été testés contre les antigènes gamétocytaires (*Pfs48/45*, *Pfs230*, *Pfs47*). Le taux d'anticorps de chaque échantillon a été converti en unité ELISA (cf. **annexe 2**). Le principe de cette technique est basé sur la détection et la quantification de la réaction antigène-anticorps dans un échantillon biologique.

Les étapes de l'ELISA indirect pour la détermination du taux d'anticorps dans les échantillons de sérum lors de cette étude sont :

- Sensibiliser la plaque d'ELISA (plaque de 96 puits) avec les antigènes (*Pfs230*, *Pfs47*, *Pfs48/45*) à une concentration finale de 1 µg/ml et laisser incuber à +4°C au moins une nuit ;
- Vider le contenu et bloquer la plaque avec la solution TBS-T+ 5% lait (300 ul /puits), puis incuber la plaque pendant deux heures à la température ambiante ;
- laver la plaque à 4 reprises avec la solution de lavage TBS-T (Tris Buffered Saline with Tween®20) ;
- transférer 100ul des échantillons de sérum à tester dilués à 1/500 dans la solution lait à 5% puis incuber la plaque pendant deux heures à la température ambiante ;
- laver la plaque à 4 reprises et transférer dans les puits 100 ul de l'anticorps secondaire dilué à 1/1000 dans la solution de lait 5% puis incuber la plaque pendant 2 heures à la température ambiante ;
- laver à 4 reprises la plaque et ajouter 100 ul de la solution de substrat dans chaque puits pour une incubation de 20 minutes;
- la lecture de la réaction était ensuite effectuée avec le lecteur ELISA SoftMaxPro.ppr (ou un programme pda).

Chaque échantillon a été utilisé en triplicata, tout échantillon avec une moyenne de DO supérieure ou égale à la moyenne + 3 standards de déviation des contrôles négatifs était considéré comme positif pour *Pfs48/45* et *Pfs47*. Tout échantillon était considéré comme positif au *Pfs230* si la moyenne était supérieure à 1UI.

#### **4.7. Considérations éthiques**

Ce protocole d'étude s'intègre dans le grand projet d'ICEMR dont le protocole de recherche a été approuvé par le comité d'éthique institutionnel de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako. Les leaders communautaires ont été informés de tous les aspects de l'étude avant le démarrage des activités proprement dites. Le consentement volontaire, libre et éclairé des parents et/ou tuteurs des enfants et/ou l'assentiment des enfants âgés de 12 à 17 ans a été obtenu avant leur inclusion dans l'étude.

Nous avons travaillé selon les bonnes pratiques cliniques (GCP) et les bonnes pratiques de laboratoire telles qu'énoncées dans les conventions internationales (déclaration d'Helsinki, Conférence internationale d'harmonisation des bonnes pratiques de recherche biomédicale). La sécurité et la confidentialité des données ont été assurées par les investigateurs, seul un numéro d'identification unique était porté sur le CRF et les échantillons biologiques durant toute la période de l'étude.

#### 4.8. Déroulement de l'étude

Avant le début de l'étude, le protocole a été expliqué aux autorités sanitaires, coutumières et administratives du village. Le consentement libre et éclairé des parents et ou tuteurs des enfants ont été obtenues. Pour chaque patient reçu au poste d'identification, un identifiant (ID) unique a été attribué qu'ils ont gardé tout au long de l'étude. Après l'identification ils se rendaient au poste de la clinique pour prendre des différents paramètres. Puis les participants ont été conduits au poste de biologie où un prélèvement capillaire était effectué au bout du doigt pour réaliser le taux d'hémoglobine suivi d'un prélèvement veineux de 2ml dans le tube EDTA pour la goutte épaisse, le frottis mince, confettis et le test de diagnostic rapide pour des participants présentant des symptômes de paludisme, le reste de sang était ensuite immédiatement centrifugé pour extraire le plasma qui a été conservé dans l'azote liquide puis transféré à Bamako pour la conservation à -80 C avant le test d'ELISA. Tous les cas confirmés du paludisme ont été traité selon les recommandations du programme national de lutte contre le paludisme du Mali.

#### 4.9. Définitions opérationnelles

- **Portage gamétocytaire** : c'est le pourcentage de patients examinés présentant les formes sexuées du parasite dans le sang par la technique de la goutte épaisse.
- **Goutte épaisse positive** : c'est le pourcentage de patients examinés en utilisant la goutte épaisse portant les formes asexuées du parasite dans le sang examiné.
- **La séroprévalence** : elle a été définie comme étant la proportion des participants ayant une moyenne de DO supérieure ou égale à la moyenne + 3

standards de déviation (3SD) des contrôles négatifs pour les antigènes Pfs48/45 et Pfs47 et 1UI pour l'antigène Pfs230.



## 5. RESULTATS

### 5.1. Résultats globaux

Au total, 576 participants ont été inclus dans cette étude dont 289 dans le village de Dangassa et 287 dans le village de Sirakorola. La prévalence de l'infection palustre était de 12,1% et 1,4% en juin et de 26,8% contre 14,6% en novembre à Dangassa et à Sirakorola, respectivement. La séroprévalence des anticorps anti-*Pfs48/45* et anti-*Pfs230* était plus élevée en novembre à Dangassa. Le taux moyen des anticorps anti-*Pfs230* était plus élevé à Dangassa qu'à Sirakorola.

## 5.2. Résultats descriptifs

Tableau 1. Répartition des participants en fonction du sexe dans les sites en juin 2019

Site	Dangassa n (%)	Sirakorola n (%)	Total N (%)
<b>Sexe</b>			
<b>Féminin</b>	128 (44,3)	138 (48,1)	<b>266 (46,2)</b>
<b>Masculin</b>	161(55,7)	149 (51,9)	<b>310 (53,8)</b>
<b>Total</b>	<b>289 (100)</b>	<b>287 (100)</b>	<b>576 (100)</b>

Le sex-ratio était de 1,3 et de 1,1 en faveur des masculins à Dangassa et à Sirakorola, respectivement.

**Tableau 2. Répartition des participants en fonction des tranches d'âge dans les sites en juin 2019**

<b>Tranche d'âge / Sites</b>	<b>5-9 ans n (%)</b>	<b>10-15 ans n (%)</b>	<b>Total</b>
<b>Dangassa</b>	163 (56,4)	126 (43,6)	289
<b>Sirakorola</b>	182 (63,4)	105 (36,6)	287
<b>Total</b>	<b>345 (59,9)</b>	<b>231 (40,1)</b>	<b>576</b>

La tranche d'âge de 5-9 ans était majoritaire aussi bien à Dangassa (56,4%) qu'à Sirakorola (63,4%).

**Tableau 3. Prévalence de l'infection palustre dans les sites d'étude en juin et en novembre 2019**

<b>Sites</b>	<b>Juin n (%)</b>	<b>Valeur du p</b>	<b>Novembre n (%)</b>	<b>Valeur du p</b>
<b>Dangassa</b>	35 (12,1)		62 (26,8)	
<b>Sirakorola</b>	4 (1,4)	0,001	27 (14,6)	0,002
<b>Total</b>	<b>39 (6,8)</b>		<b>89 (21,4)</b>	

Les fortes prévalences ont été observées à la fin de la saison des pluies en novembre 2019 dans les deux villages. La prévalence de l'infection palustre était plus élevée à Dangassa qu'à Sirakorola en début ( $p = 0,001$ ) et à la fin ( $p = 0,002$ ) de la saison de transmission palustre.

### 5.3. Résultats analytiques

**Tableau 4. Prévalence de l'infection palustre en fonction des tranches d'âge dans les 2 sites en juin et novembre 2019**

Sites	5-9 ans		10-15 ans	
	Juin n (%)	Novembre n (%)	Juin n (%)	Novembre n (%)
Dangassa	19 (11,7)	32 (23,7)	20 (15,9)	33 (34,4)
Sirakorola	4 (2,2)	17 (15,5)	2 (1,9)	11 (14,7)
<b>P</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,1</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,003</b>

La prévalence de l'infection palustre était plus élevée à Dangassa chez les enfants de 10-15 ans en juin (15,9% vs 1,9%,  $p = 0,0001$ ) et en novembre (34,4% vs 14,7%,  $p = 0,003$ ). En revanche, elle était plus élevée seulement à Dangassa qu'à Sirakorola chez les enfants de 5-9 ans en juin ( $p = 0,0001$ ).

**Tableau 5. Prévalence du portage des gamétocytes selon les classes d'âge en juin et en novembre 2019**

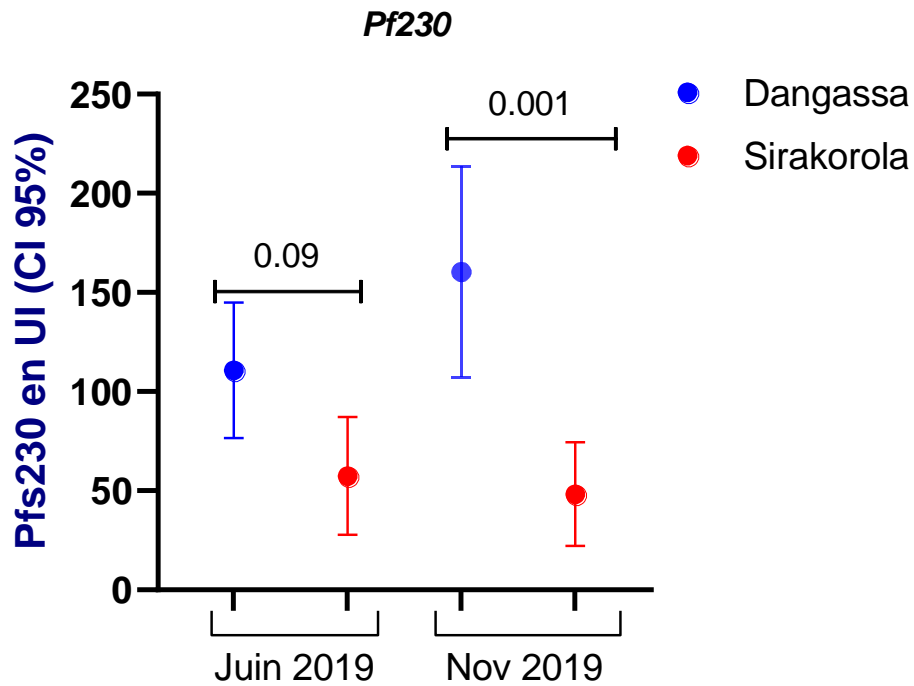
Sites	5-9 ans		10-15 ans	
	Jun n (%)	Novembre n (%)	Juin n (%)	Novembre n (%)
Dangassa	3 (1,8)	3 (2,2)	4 (3,2)	4 (4,2)
Sirakorola	2 (1,1)	6 (5,5)	0 (0)	4 (5,3)
<b>P</b>	<b>0,05</b>	<b>0,2</b>	<b>0,07</b>	<b>0,07</b>

Nous n'avons pas observé une différence significative du portage des gamétocytes en fonction des classes d'âge et des sites d'étude quel que soit le début ou la fin de la transmission.

**Tableau 6. Séroprévalence des anticorps anti-*Pfs48/45*, anti-*Pfs230* et anti-*Pfs47* en juin et en novembre dans les deux sites en 2019**

Sites		Ag <i>Pfs48/45</i> n(%)	Ag <i>Pfs47</i> n(%)	Ag <i>Pfs230</i> n(%)
<b>Dangassa</b>	Juin	31 (10,7)	38 (13,2)	83 (28,7)
	Novembre	39 (16,9)	30 (13)	99 (42,9)
		<i>p</i> = 0,041	<i>p</i> = 0,9	<i>p</i> = 0,0001
<b>Sirakorola</b>	Juin	4 (1,4)	17 (5,9)	65 (22,7)
	Novembre	4 (2,2)	7 (4,8)	23 (12,4)
		<i>p</i> = 0,5	<i>p</i> = 0,3	<i>p</i> = 0,005

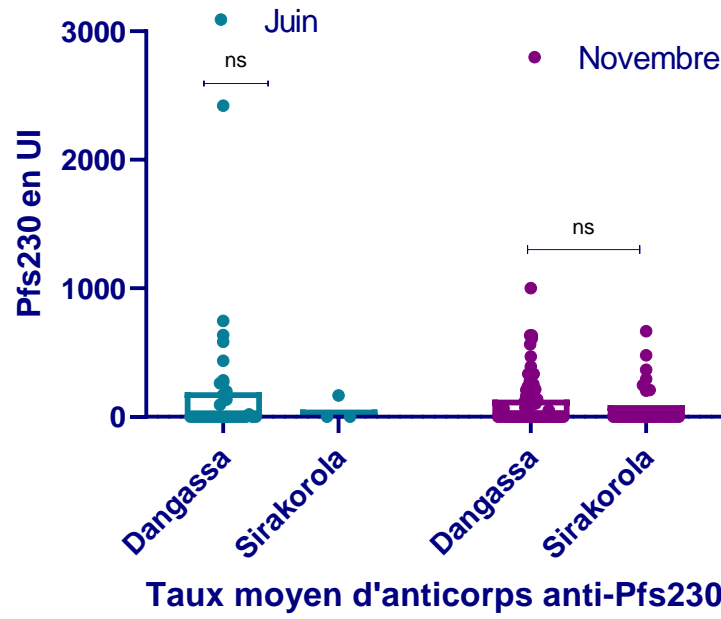
Nous avons observé une augmentation significative de la prévalence des anticorps anti-*Pfs48/45* ( $p = 0,041$ ) et anti-*Pfs230* ( $p = 0,0001$ ) en novembre à Dangassa. Cependant, une diminution significative de la prévalence des anticorps anti-*Pfs230* ( $p = 0,005$ ) a été observée en novembre à Sirakorola.



**Figure 3. Taux moyen anticorps anti-*Pfs230* selon les sites en juin et en novembre 2019**

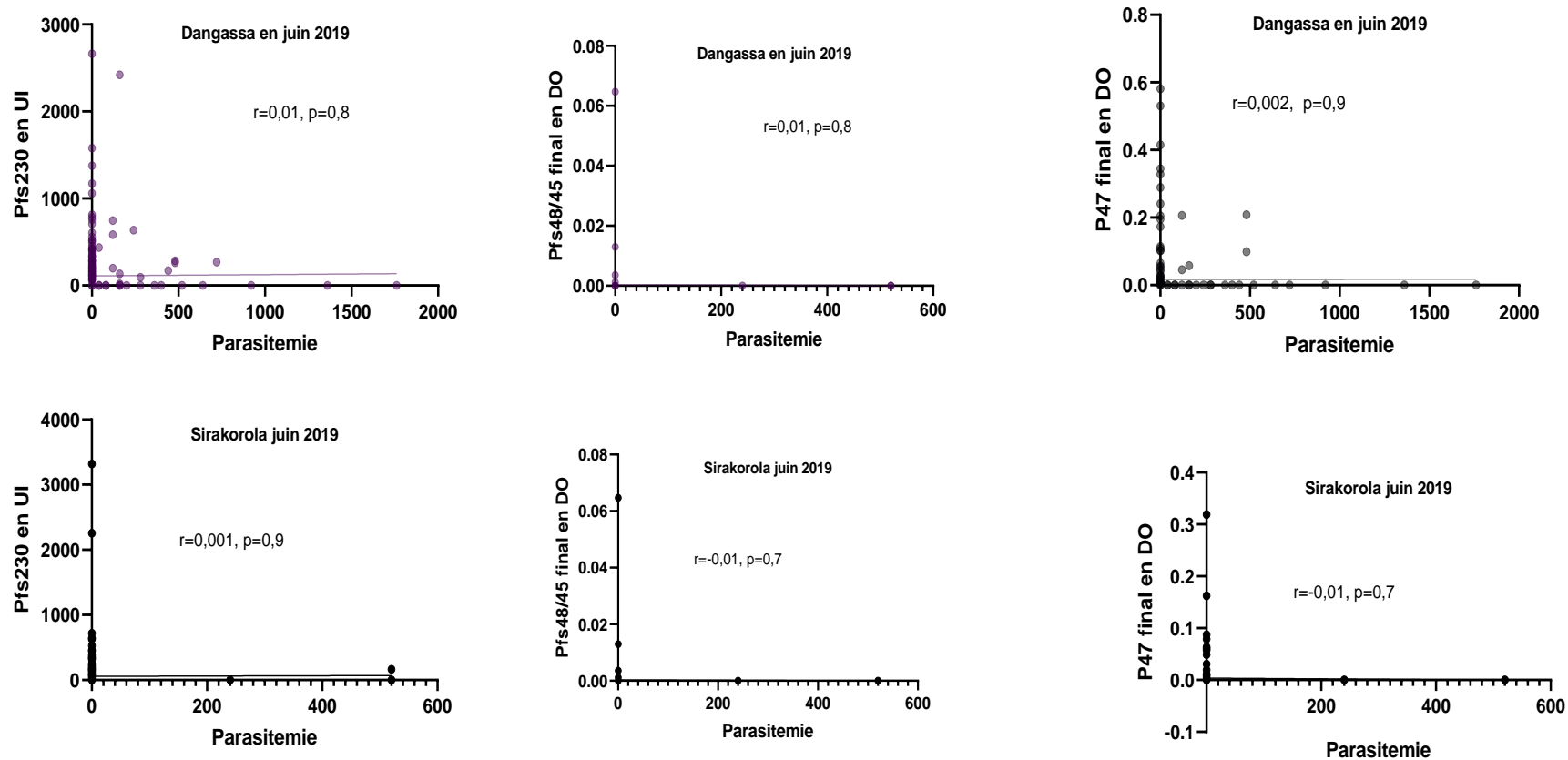
Le taux moyen des anticorps anti-*Pfs230* ne variait pas en fonction des sites en juin. En novembre, le taux moyen des anticorps anti-*Pfs230* était plus élevé à Dangassa ( $160,41 \pm 26,87$ ) qu'à Sirakorola ( $48,32 \pm 13,21$ ,  $p = 0,001$ ).





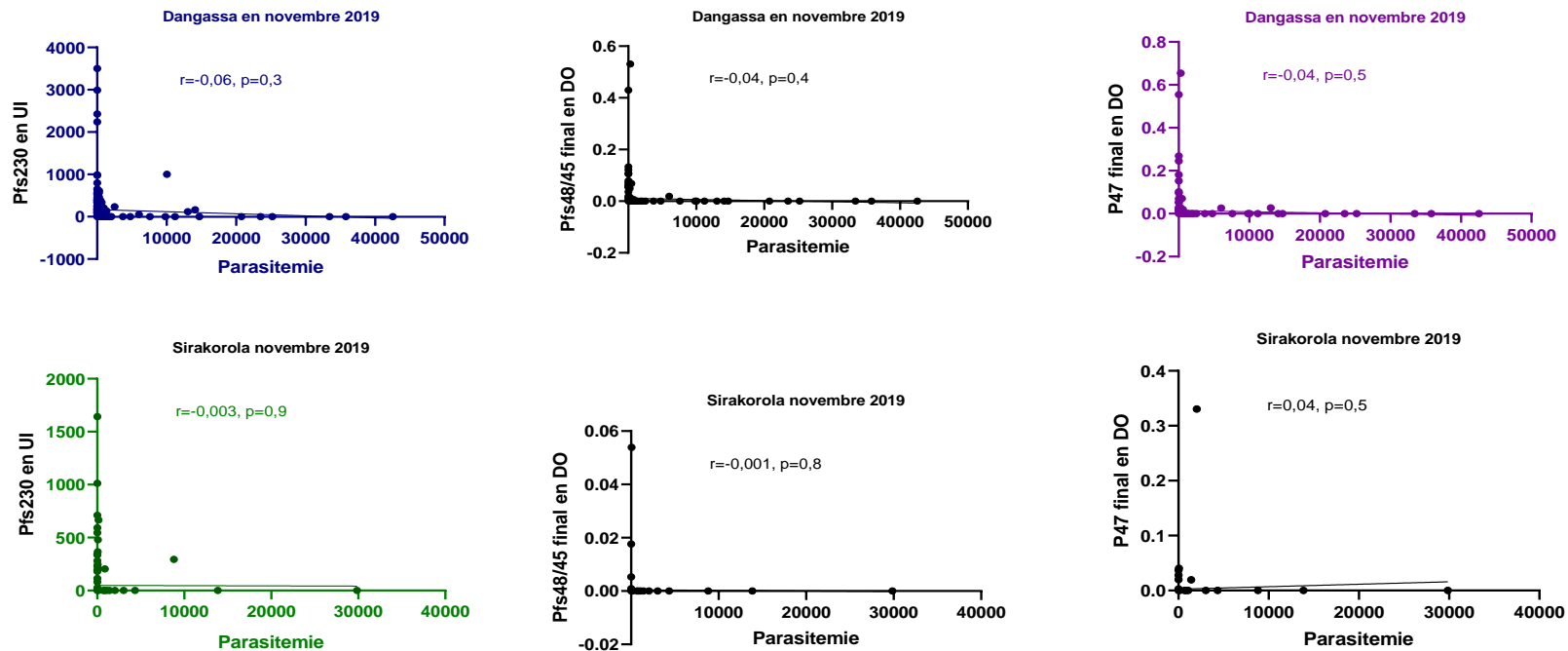
**Figure 4. Taux moyen des anticorps anti-*Pfs230* chez les participants ayant la goutte épaisse positive en juin et en novembre 2019**

Le taux moyen des anticorps anti-*Pfs230* ne variait pas chez les participants ayant la goutte épaisse positive en juin et en novembre dans les deux sites.



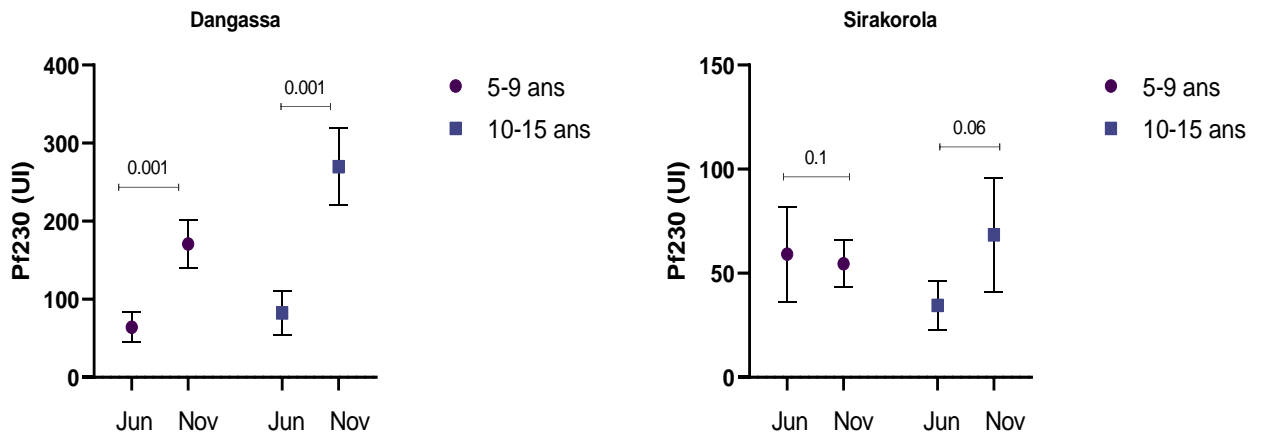
**Figure 5. Corrélation entre la parasitémie et le taux moyen des anticorps en juin 2019**

Nous n'avons pas observé de corrélation statistiquement significative entre le taux moyen des anticorps et la parasitémie à Dangassa et à Sirakorola en juin 2019.



**Figure 6. Corrélation entre la parasitémie et les taux d'anticorps en novembre 2019**

Nous n'avons pas observé de corrélation statistiquement significative entre le taux moyen des anticorps et la parasitémie à Dangassa et à Sirakorola en novembre 2019.



**Figure 7. Taux moyen des anticorps *anti-Pfs230* en fonction des tranches d'âge en juin et novembre dans les deux sites**

Le taux moyen des anticorps *anti-Pfs230* était plus élevé en novembre chez les deux tranches d'âge à Dangassa ( $p = 0,001$ ). Cependant, ce taux ne variait pas statistiquement significatif en fonction des tranches d'âge en novembre à Sirakorola.

## 6. Commentaires et discussion

La morbidité et la mortalité liées au paludisme à *P. falciparum* ont considérablement diminué au cours de la dernière décennie [79]. Ces progrès récents sont menacés par la propagation de parasites résistants à l'artémisinine [80] et de moustiques résistants aux insecticides [81]. Les récentes avancées dans la lutte contre le paludisme et la nécessité de contenir la résistance à l'artémisinine ont stimulé les initiatives d'élimination du paludisme qui nécessitent une compréhension approfondie de la biologie et de l'épidémiologie de la transmission du paludisme et des interventions alternatives de réduction de la transmission [82].

Dans cette étude, nous avons abordé de manière systématique la reconnaissance immunitaire des antigènes (*Pfs48/45*, *Pfs230* et *Pfs47*) présents à la surface des globules rouges infectés par des gamétocytes immatures de *P. falciparum* chez les enfants vivant dans deux villages d'endémicité palustre différentes au Mali en 2019.

La transmission de *P. falciparum* aux moustiques est initiée lorsqu'un petit sous-ensemble de parasites du stade sanguin à réplication asexuée produit une progéniture sexuelle ou gamétocytes. Les gamétocytes se développent dans les globules rouges (GR) humains selon cinq transitions morphologiques (stades I à V) ; le développement des stades I à IV a lieu principalement dans la niche extravasculaire de la moelle osseuse et de la rate [83-85]. Les gamétocytes matures de stade V sont libérés dans la circulation sanguine périphérique où ils peuvent être ingérés par un moustique qui se nourrit de sang. Ils sortent alors des globules rouges sous forme de gamètes activés, fusionnent et forment des zygotes mobiles. La poursuite du développement sporogonique rend le moustique infectieux pour l'homme. Plusieurs protéines du stade sexuel qui n'ont aucune fonction dans le développement des gamétocytes mais qui sont essentielles pour la fertilisation des gamètes (par exemple, *Pfs48/45* et *Pfs230*) ou le développement post-fertilisation chez le moustique (par exemple, *Pfs25* et *Pfs28*) [86] ont été identifiées.

Il n'existe actuellement que des preuves incomplètes des réponses immunitaires qui affectent la formation, la maturation ou la durée de circulation des gamétocytes [87]. Plusieurs études de terrain ont suggéré une élimination des gamétocytes matures après une exposition répétée au paludisme [88-91], et les réponses anticorps contre des cibles non caractérisées sur les GR infectés par les gamétocytes matures ont été

associées à des densités de gamétocytes plus faibles [91, 92]. Une autre étude de terrain a identifié des anticorps qui se liaient à la surface des GR infectés par les gamétocytes matures de stade II à V et déformaient la morphologie et la maturation des gamétocytes précoces [93].

### **6.1. Données descriptives**

Au total, 576 participants ont été enrôlés dont 289 à Dangassa et 287 à Sirakorola au début de l'étude. Le sexe ratio était de 1,3 et 1,1 en faveur des masculins respectivement à Dangassa et à Sirakorola (tableau 1). Cette tendance a été rapportée aussi par Sangaré et col. en 2011 [94] à Nanguilabougou contrairement à l'enquête démographique et de santé, les filles prédominent les garçons [3]. Les enfants dans la tranche d'âge de 5-9 ans étaient majoritaires dans les deux sites avec respectivement 56,4% à Dangassa et 63,4% à Sirakorola (tableau 2). La prévalence de l'infection palustre était plus élevée à Dangassa qu'à Sirakorola (12,1% vs 1,4%,  $p = 0,001$ ) aussi bien en juin qu'en novembre (26,8% vs 14,6%,  $p = 0,002$  ; tableau 3). Cela pourrait s'expliquer par le niveau d'endémicité élevé du paludisme dans la zone de Dangassa que Sirakorola comme mentionné antérieurement [95].

### **6.2. Données analytiques**

En tenant compte de l'âge, nous avons observé que la prévalence de l'infection palustre était plus élevée chez les enfants de 10-15 ans de Dangassa que ceux de Sirakorola aussi bien en juin ( $p=0,0001$ ) qu'en novembre ( $p=0,003$ ). En revanche, elle était plus élevée seulement chez les enfants de 5-9 ans vivant à Dangassa que ceux de Sirakorola en juin ( $p=0,0001$  ; tableau 4). Dans les zones d'endémie palustre, le portage des parasites est plus fréquent chez les grands enfants et les adultes en raison de l'immunité partielle qui protège contre les formes cliniques qui sont surtout observés chez les enfants comme rapporté par Akindeh et col au Cameroun en 2021 [96]. Le portage des gamétocytes ne variait pas en fonction des sites et les tranches d'âge même si une légère augmentation a été observée en fin de saison (novembre tableau 5). Ces résultats s'expliqueraient par la situation épidémiologique du paludisme à Dangassa de par son endémicité contrairement à Sirakorola [97]. Dans les zones d'endémie comme Dangassa, le taux d'infection palustre atteint son pic en fin de saison en relation avec le taux d'inoculation entomologique [98]. Les personnes vivant dans les zones d'endémie palustre portent généralement les parasites sans

développer la maladie à cause de l'immunité qu'ils développent avec l'âge et qui permet de maintenir la parasitémie à un seuil subclinique contrairement à Sirakorola, où toute la population est exposée au risque du paludisme par ce que la réponse immunitaire n'est pas bien développée pour maintenir cette parasitémie asymptomatique [99].

Une augmentation significative de la prévalence des anticorps anti-*Pfs48/45* ( $p = 0,041$ ) et anti-*Pfs230* ( $p = 0,0001$ ) a été observée en novembre à Dangassa contrairement à Sirakorola, une diminution significative de la prévalence des anticorps anti-*Pfs230* ( $p=0,005$ ) a été observée en novembre (tableau 6). Dans les zones d'endémie palustre, l'exposition répétée et continue des individus au *Plasmodium* suscite une production des anticorps au fil du temps et avec l'âge pouvant maintenir la parasitémie à un seuil subclinique ou empêcher l'apparition des formes cliniques surtout graves [50, 100]. Dans le même sens, la production des anticorps contre les antigènes gamétocytaires est liée aussi à l'exposition des individus à ces gamétocytes dans le temps [101]. En outre, plusieurs études ont émis l'hypothèse que la production des anticorps anti-*Pf48/45* serait associée à une protection contre le paludisme [101, 102].

Toutes ces hypothèses ont évoqué l'implication des cellules du système immunitaire (T CD4+ ou T helper et les T CD8+ ou T cytotoxiques) et l'action des six cystéines dans la survenue de la réponse immunitaire contre les antigènes gamétocytaires Pf48/45 [68]. La diminution de la prévalence des anticorps anti-*Pf230* observée en fin de saison à Sirakorola serait due au fait que c'est une zone à faible transmission où la durée de la transmission courte limite l'exposition des individus aux parasites pour pouvoir produire des anticorps, comme rapporté par Bousema et col. en 2010 en Tanzanie [101]. Dans ces zones, les individus ayant la parasitémie développent rapidement les signes cliniques motivant la mise en route d'un traitement qui va éliminer les parasites donc l'organisme n'est pas en contact fréquent et permanent avec le parasite pour maintenir des réponses immunitaires suffisantes [96].

Le taux moyen d'anticorps anti-*Pfs230* ne variait pas en fonction des sites en juin. En novembre, ce taux était plus élevé à Dangassa qu'à Sirakorola ( $p = 0,001$  ; figure 3). Chez les participants qui avaient la goutte épaisse positive en juin et novembre, le taux moyen d'anticorps anti-*Pfs230* ne variait pas en fonction des sites (figure 4).

Dangassa est une zone d'endémie où les individus sont en contact fréquent avec les parasites. Cette exposition permanente et répétée provoque la production d'anticorps et en quantité avec l'âge pour assurer l'immunité partielle comme rapporté par les auteurs dans les études antérieures [103, 104]. Cependant, Ouédraogo et col. ont rapporté que la production des anticorps contre les antigènes gamétozytaires serait liée plus à l'exposition récentes des individus aux formes sexuées que l'effet cumulative de l'exposition dans le temps [105].

Nous n'avons pas observé de corrélation significative entre la parasitémie et les taux d'anticorps anti-*Pfs230*, anti-*Pfs48/45* et anti-*Pfs47* aussi bien à Dangassa et qu'à Sirakorola en juin (figure 5) et en novembre (figure 6) comme rapporté par Babacar et col en 2016 au Sénégal [106]. Les antigènes testés dans notre étude étaient des antigènes gamétozytaires, donc les anticorps produits sont plutôt dirigés contre les formes sexuées du parasite et non les formes asexuées qui pourront probablement expliquer l'absence de corrélation significative entre la parasitémie et les taux d'anticorps. Le taux moyen d'anticorps *anti-Pfs230* était plus élevé chez les deux tranches d'âge en novembre à Dangassa ( $p = 0,001$ ). Cependant, ce taux ne variait pas en fonction des tranches en fin de saison de transmission (novembre) à Sirakorola (figure 7).

Dans les zones d'endémie palustre comme Dangassa, l'exposition longue aux parasites entraîne une production d'anticorps avec l'âge qui permet de maintenir la parasitémie subclinique ou réduire les manifestations cliniques du paludisme. Cette production est plus prononcée en fin de saison à cause de la fréquence élevée de l'exposition aux parasites surtout durant la saison des pluies qui correspond aux pics de la transmission palustre [107], et la dépendance de l'âge de la longévité des anticorps (IgG) produits contre les antigènes de *P. falciparum* a été déjà démontré [108].

La recherche d'un candidat vaccin bloquant la transmission permettra de surmonter les défis de la diversité antigénique du *Plasmodium*. La sélection des antigènes du stade sexué et asexué les plus immunogènes sera une bonne approche pour développer un bon candidat vaccin à la fois contre les formes sexuées et asexuées du parasite afin d'appuyer les autres mesures de lutte dans l'effort d'élimination du paludisme.



### **6.3. Limites de notre étude**

La présente étude avait pour but d'étudier la réponse humorale dirigée contre les antigènes gamétoctaires (*Pfs48/45*, *Pfs230* et *Pfs47*) chez les enfants de 5 à 15 ans dans 2 zones d'endémies palustres différentes au Mali. Cependant, nous n'avons pas collecté des données cliniques pour tester si les anticorps produits bloquent la transmission du parasite de l'homme vers le moustique. Également, le nombre insuffisant des porteurs des gamétoctes pour rechercher une association avec le taux d'anticorps peut-être aussi une limite de cette étude. Des investigations plus poussées seront nécessaires en tenant compte de ces limites pour mieux comprendre les caractéristiques de ces antigènes.

## **7. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS**

### **7.1. Conclusion**

Une augmentation significative du taux d'anticorps anti-Pfs230 entre le début et la fin de la saison de transmission palustre (28,7% à 42,9%) a été observé à Dangassa alors l'effet contraire a été observé à Sirakorola (22,7% à 12,4%). Le titre moyen des anticorps anti-Pfs230 était significativement plus élevé dans les deux tranches d'âge en fin de saison à Dangassa.

### **7.2. Recommandations**

Au terme de notre étude et au vu de nos résultats, nous formulons les recommandations suivantes :

#### **Aux autorités sanitaires et administratives**

- D'encourager et de financer d'avantage la recherche biomédicale fondamentale sur le paludisme afin de développer un vaccin efficace contre cette maladie.

#### **Aux chercheurs**

- Mener d'autres études sur ces antigènes gamétoctaires (Pfs48/45, Pfs230 et Pfs47) afin d'évaluer leur pouvoir de bloquer le passage du *Plasmodium* du vecteur à l'homme en tenant compte de l'âge et de la saisonnalité ;
- Tester la réactivité croisée de ces antigènes gamétoctaires avec ceux des formes asexuées dans le but de leur combinaison comme candidat vaccin potentiel contre le paludisme.

#### **A la population**

- Adhérer au protocole de recherche pour faciliter les études qui pourront aboutir au développement d'un vaccin efficace contre le paludisme.

## 8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Combemorel, P., *Le cycle de vie de Plasmodium falciparum*. 2016.
2. OMS. *World malaria report 2020*. 2020; Available from: <https://reliefweb.int/report/world/rapport-2020-sur-le-paludisme-dans-le-monde-messages-g-n-raux> (consulté le 15/12/2021).
3. INSTAT/CPS/SSDS-PF/ICF. *Enquête Démographique et de Santé 2018 Rapport de synthèse*. 2018; Available from: <https://dhsprogram.com/pubs/pdf/SR261/SR261.pdf> (consulté le 10/08/2021).
4. Guyant, P., et al., *Past and new challenges for malaria control and elimination: the role of operational research for innovation in designing interventions*. *Malaria Journal*, 2015. **14**(1): p. 279.
5. Carvalho, I.J.M. and C.T. Daniel-Ribeiro, *Vaccin antipaludique : antigènes candidats, mécanismes, contraintes et perspectives*. 2002.
6. Malcolm J. Gardner, Neil Hall, and e. al, *Séquence du génome du parasite du paludisme humain Plasmodium falciparum*. 2002.
7. Ouattara, A. and M.B. Laurens, *Vaccines against malaria*. *Clin Infect Dis*, 2015. **60**(6): p. 930-6.
8. WHO. *WHO recommends groundbreaking malaria vaccine for children at risk*. 2021; Available from: <https://www.who.int/news/item/06-10-2021-who-recommends-groundbreaking-malaria-vaccine-for-children-at-risk> (consulté le 26 octobre 2021).
9. Pradel, G., *Proteins of the malaria parasite sexual stages: expression, function and potential for transmission blocking strategies*. *Parasitology*, 2007. **134**(14): p. 1911-1929.
10. Kumar, N. and R. Carter, *Biosynthesis of the target antigens of antibodies blocking transmission of Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 1984. **13**(3): p. 333-42.
11. Vermeulen, A.N., et al., *Sequential expression of antigens on sexual stages of Plasmodium falciparum accessible to transmission-blocking antibodies in the mosquito*. *J Exp Med*, 1985. **162**(5): p. 1460-76.
12. Aubry, P. and B.-A. Gaüzère. *Paludisme Actualités 2020*. 2020; Available from: <http://medecinetropicale.free.fr/cours/paludisme.pdf> (consulté le 04/10/2021).
13. Noguer, A., *Les facteurs influençant la distribution géographique du paludisme dans le monde*. *Le Globe. Revue genevoise de géographie*, 1979.
14. Macdonald, G., *Epidemiological basis of malaria control*. *Bull World Health Organ*, 1956. **15**(3-5): p. 613-26.
15. Autino, B., et al., *Epidemiology of malaria in endemic areas*. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 2012. **4**(1): p. e2012060.
16. PNLP. *Plan stratégique de lutte contre le paludisme 2013-2017* 2013; Available from: [https://www.severemalaria.org/sites/mmv-smo/files/content/attachments/2017-07-25/Mali%20malaria%20PStrag%202013-17PNLP\\_0.pdf](https://www.severemalaria.org/sites/mmv-smo/files/content/attachments/2017-07-25/Mali%20malaria%20PStrag%202013-17PNLP_0.pdf) (consulté le 7/06/2021).
17. ANOFEL. *Paludisme*. 2014; Available from: <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/paludisme/site/html/cours.pdf> (consulté le 06-06-2021).
18. Twohig, K.A., et al., *Growing evidence of Plasmodium vivax across malaria-endemic Africa*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2019. **13**(1): p. e0007140.

19. Oguike, M.C., et al., *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri* circulate simultaneously in African communities. *International Journal for Parasitology*, 2011. **41**(6): p. 677-683.
20. Collins, W.E. and G.M. Jeffery, *Plasmodium malariae: parasite and disease*. *Clinical microbiology reviews*, 2007. **20**(4): p. 579-592.
21. Naqvi, R., et al., *Outcome in severe acute renal failure associated with malaria*. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2003. **18**(9): p. 1820-1823.
22. Amir, A., et al., *Plasmodium knowlesi malaria: current research perspectives*. *Infection and drug resistance*, 2018. **11**: p. 1145-1155.
23. Faust, C. and A.P. Dobson, *Primate malaria: Diversity, distribution and insights for zoonotic Plasmodium*. *One Health*, 2015. **1**: p. 66-75.
24. Ta, T.H., et al., *First case of a naturally acquired human infection with Plasmodium cynomolgi*. *Malar J*, 2014. **13**: p. 68.
25. Harbach, R.E., *The classification of genus Anopheles (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships*. *Bull Entomol Res*, 2004. **94**(6): p. 537-53.
26. Coetzee, M. and L.L. Koekemoer, *Molecular systematics and insecticide resistance in the major African malaria vector Anopheles funestus*. *Annu Rev Entomol*, 2013. **58**: p. 393-412.
27. Touré, Y.T., et al., *Ecological genetic studies in the chromosomal form Mopti of Anopheles gambiae s.str. in Mali, west Africa*. *Genetica*, 1994. **94**(2-3): p. 213-23.
28. Argy, N., S. Houzé, and e. al, *Épidémiologie et cycle parasitaire d'un fléau mondial, le paludisme* *Epidemiology and parasite lifecycle of a worldwide plague, malaria*. 2018.
29. Pages, F., E. Orlandi-Pradines, and V. Corbel, *Vectors of malaria: biology, diversity, prevention, and individual protection*. *Med Mal Infect*, 2007. **37**(3): p. 153-61.
30. Aderem, A. and R.J. Ulevitch, *Toll-like receptors in the induction of the innate immune response*. *Nature*, 2000. **406**(6797): p. 782-7.
31. May Ho, M.M., al, *L'interleukine-10 empêche la production de facteur de nécrose tumorale mais pas la lymphoprolifération antigène-spécifique dans le paludisme aigu de Plasmodium falciparum*. 1995.
32. Sofia Torreggiani, Giovanni Filocamo, and e. al., *Fièvre récurrente chez les enfants*. 2016.
33. Kevin N. Couper, D.G.B., Julius C. R. Hafalla et al, *Les réponses immunitaires innées médiées par les macrophages mais indépendantes de l'interféron gamma contrôlent l'onde primaire de la parasitémie Plasmodium yoelii*. 18 décembre 2020.
34. Dechavanne, C., *Construction de la réponse anticorps spécifique du paludisme chez le jeune enfant : étude combinée de l'hôte, du parasite et de leur environnement*. 2012.
35. Lansche, C., et al., *The sickle cell trait affects contact dynamics and endothelial cell activation in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes*. *Communications Biology*, 2018. **1**.
36. A. Rowe, J.O., et al, *Le rosure de Plasmodium falciparum est associé à la gravité du paludisme au Kenya*. 1995.
37. Rowe, J.A., et al., *P. falciparum rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1*. *Nature*, 1997. **388**(6639): p. 292-5.

38. Bull, P.C., et al., *Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria*. Nat Med, 1998. **4**(3): p. 358-60.
39. LAIL1000. *Mesure de l'activité inhibitrice de la croissance parasitaire des IgG*. 2021; Available from: <https://www.rapport-gratuit.com/mesure-de-lactivite-inhibitrice-de-la-croissance-parasitaire-des-igg/> (consulté le 15 decembre 2021).
40. Mayer, G. and D. Hudrisier. *Immunologie – chapitre treize cytokines et immunrégulation*. 2013; Available from: <https://microbiologybook.org/French-immuno/immchapter13.htm> (consulté le 15 decembre 2021).
41. Doolan, D.L., C. Dobaño, and J.K. Baird, *Acquired immunity to malaria*. Clinical microbiology reviews, 2009. **22**(1): p. 13-36.
42. Eridani, S., *Sickle cell protection from malaria*. Hematology reports, 2011. **3**(3): p. e24-e24.
43. Shelton, J.M.G., et al., *Genetic determinants of anti-malarial acquired immunity in a large multi-centre study*. Malaria Journal, 2015. **14**(1): p. 333.
44. Emily, M.E., G.S. Natália, and S. Louis, *Toll-Like Receptors and Malaria – Sensing and Susceptibility*. Journal of Tropical Diseases, 2013. **2**(1).
45. Roetynck, S., et al., *NK cells and innate immunity to malaria*. Med Sci (Paris), 2006. **22**(8-9): p. 739-44.
46. Artavanis-Tsakonas, K., J.E. Tongren, and E.M. Riley, *The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology*. Clin Exp Immunol, 2003. **133**(2): p. 145-52.
47. Dent, A.E., et al., *Temporal stability of naturally acquired immunity to Merozoite Surface Protein-1 in Kenyan adults*. Malar J, 2009. **8**: p. 162.
48. Tebo, A.E., P.G. Kremsner, and A.J. Luty, *Plasmodium falciparum: a major role for IgG3 in antibody-dependent monocyte-mediated cellular inhibition of parasite growth in vitro*. Exp Parasitol, 2001. **98**(1): p. 20-8.
49. Aucan, C., et al., *High immunoglobulin G2 (IgG2) and low IgG4 levels are associated with human resistance to Plasmodium falciparum malaria*. Infect Immun, 2000. **68**(3): p. 1252-8.
50. Leoratti, F.M., et al., *Pattern of humoral immune response to Plasmodium falciparum blood stages in individuals presenting different clinical expressions of malaria*. Malar J, 2008. **7**: p. 186.
51. Parker, H.M., *Plutonium--health implications for man: closing remarks and final discussion*. Health Phys, 1975. **29**(4): p. 627-32.
52. Fréville, A. *Identification et caractérisation des inhibiteurs de type 2 et 3 de la phosphatase de type 1 chez Plasmodium falciparum*. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II 2002; Available from: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00868793/document> (consulté le 04/10/2021).
53. H Bouharoun-Tayoun, et al., *Mécanismes sous-jacents à la destruction dépendante des anticorps médiés par les monocytes des stades sanguins asexués de Plasmodium falciparum*. 1995.
54. Hoffman, S.L., et al., *T lymphocytes from mice immunized with irradiated sporozoites eliminate malaria from hepatocytes*. Bull World Health Organ, 1990. **68 Suppl**: p. 132-7.
55. Hoffman, S.L., et al., *T lymphocytes from mice immunized with irradiated sporozoites eliminate malaria from hepatocytes*. Bulletin of the World Health Organization, 1990. **68 Suppl**(Suppl): p. 132-137.

56. Rénia, L., et al., *Effector functions of circumsporozoite peptide-primed CD4+ T cell clones against Plasmodium yoelii liver stages*. J Immunol, 1993. **150**(4): p. 1471-8.
57. Hoffman, S.L., et al., *Sporozoite vaccine induces genetically restricted T cell elimination of malaria from hepatocytes*. Science, 1989. **244**(4908): p. 1078-81.
58. Huaman, M.C., et al., *Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 vaccine elicits multifunctional CD4 cytokine-producing and memory T cells*. Vaccine, 2009. **27**(38): p. 5239-46.
59. Longley, R.J., et al., *Development of an in vitro assay and demonstration of Plasmodium berghei liver-stage inhibition by TRAP-specific CD8+ T cells*. PloS one, 2015. **10**(3): p. e0119880-e0119880.
60. Overstreet, M.G., et al., *Protective CD8 T cells against Plasmodium liver stages: immunobiology of an 'unnatural' immune response*. Immunol Rev, 2008. **225**: p. 272-83.
61. Lyke, K.E., et al., *Cell-mediated immunity elicited by the blood stage malaria vaccine apical membrane antigen 1 in Malian adults: results of a Phase I randomized trial*. Vaccine, 2009. **27**(15): p. 2171-6.
62. Sim, B.K., et al., *Induction of biologically active antibodies in mice, rabbits, and monkeys by Plasmodium falciparum EBA-175 region II DNA vaccine*. Mol Med, 2001. **7**(4): p. 247-54.
63. Moss, D.K., et al., *Plasmodium falciparum 19-kilodalton merozoite surface protein 1 (MSP1)-specific antibodies that interfere with parasite growth in vitro can inhibit MSP1 processing, merozoite invasion, and intracellular parasite development*. Infect Immun, 2012. **80**(3): p. 1280-7.
64. Raceline Gounoue, Gilbert Le Goff, and e. al., *Anticorps anti-PFS48/45 dans les sérums de deux populations vivant en zone d'endémie palustre de niveaux de transmission différents*. 1996.
65. Combemorel, P., *Le cycle de vie de Plasmodium falciparum*. 2019.
66. Kumar, N., *Modulation of transmission success of Plasmodium falciparum gametocytes (sexual stages) in various species of Anopheles by erythrocytic asexual stage parasites*. Acta Trop, 2017. **176**: p. 263-269.
67. van Dijk, M.R., et al., *A central role for P48/45 in malaria parasite male gamete fertility*. Cell, 2001. **104**(1): p. 153-64.
68. Molina-Cruz, A., G.E. Canepa, and C. Barillas-Mury, *Plasmodium P47 a key gene for malaria transmission by mosquito vectors*. Curr Opin Microbiol, 2017. **40**: p. 168-174.
69. Riley, E.M., et al., *Human antibody responses to Pfs 230, a sexual stage-specific surface antigen of Plasmodium falciparum: non-responsiveness is a stable phenotype but does not appear to be genetically regulated*. Parasite Immunol, 1994. **16**(2): p. 55-62.
70. Arredondo, S.A. and S.H.I. Kappe, *The s48/45 six-cysteine proteins: mediators of interaction throughout the Plasmodium life cycle*. International journal for parasitology, 2017. **47**(7): p. 409-423.
71. Molina-Cruz, A., et al., *The human malaria parasite Pfs47 gene mediates evasion of the mosquito immune system*. Science, 2013. **340**(6135): p. 984-7.
72. Khan, S.M., et al., *Proteome analysis of separated male and female gametocytes reveals novel sex-specific Plasmodium biology*. Cell, 2005. **121**(5): p. 675-87.

73. Van Schaijk, B.C., et al., *Pfs47, paralog of the male fertility factor Pfs48/45, is a female specific surface protein in Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol, 2006. **149**(2): p. 216-22.
74. Gordon, D.M., et al., *Safety, immunogenicity, and efficacy of a recombinantly produced Plasmodium falciparum circumsporozoite protein-hepatitis B surface antigen subunit vaccine*. J Infect Dis, 1995. **171**(6): p. 1576-85.
75. Alonso, P.L., 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, 2005. **366**(9502): p. 2012-8.
76. Greenwood, B., et al., *Combining malaria vaccination with chemoprevention: a promising new approach to malaria control*. Malar J, 2021. **20**(1): p. 361.
77. Vandoolaeghe, P. and L. Schuerman, *[The RTS,S/AS01 malaria vaccine in children aged 5-17 months at first vaccination]*. Pan Afr Med J, 2018. **30**: p. 142.
78. Assadou, M.H., et al., *Malaria Infection and Gametocyte Carriage Rates in Preparation for Transmission Blocking Vaccine Trials in Bancoumana, Mali*. Am J Trop Med Hyg, 2017. **97**(1): p. 183-187.
79. Bhatt, S., et al., *The effect of malaria control on Plasmodium falciparum in Africa between 2000 and 2015*. Nature, 2015. **526**(7572): p. 207-211.
80. Ashley, E.A., et al., *Spread of artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria*. N Engl J Med, 2014. **371**(5): p. 411-23.
81. Hemingway, J., et al., *Averting a malaria disaster: will insecticide resistance derail malaria control?* Lancet, 2016. **387**(10029): p. 1785-8.
82. Alonso, P.L., et al., *A research agenda to underpin malaria eradication*. PLoS Med, 2011. **8**(1): p. e1000406.
83. Aguilar, R., et al., *Molecular evidence for the localization of Plasmodium falciparum immature gametocytes in bone marrow*. Blood, 2014. **123**(7): p. 959-66.
84. Farfour, E., et al., *The extravascular compartment of the bone marrow: a niche for Plasmodium falciparum gametocyte maturation?* Malar J, 2012. **11**: p. 285.
85. Joice, R., et al., *Plasmodium falciparum transmission stages accumulate in the human bone marrow*. Sci Transl Med, 2014. **6**(244): p. 244re5.
86. Sauerwein, R.W. and T. Bousema, *Transmission blocking malaria vaccines: Assays and candidates in clinical development*. Vaccine, 2015. **33**(52): p. 7476-82.
87. Sutherland, C.J., *Surface antigens of Plasmodium falciparum gametocytes--a new class of transmission-blocking vaccine targets?* Mol Biochem Parasitol, 2009. **166**(2): p. 93-8.
88. Baird, J.K., et al., *Evidence for specific suppression of gametocytemia by Plasmodium falciparum in residents of hyperendemic Irian Jaya*. Am J Trop Med Hyg, 1991. **44**(2): p. 183-90.
89. Bousema, J.T., et al., *Plasmodium falciparum gametocyte carriage in asymptomatic children in western Kenya*. Malar J, 2004. **3**: p. 18.
90. Dunyo, S., et al., *Gametocytaemia after drug treatment of asymptomatic Plasmodium falciparum*. PLoS Clin Trials, 2006. **1**(4): p. e20.
91. Saeed, M., et al., *Plasmodium falciparum antigens on the surface of the gametocyte-infected erythrocyte*. PLoS One, 2008. **3**(5): p. e2280.
92. Dinko, B., et al., *Antibody responses to surface antigens of Plasmodium falciparum gametocyte-infected erythrocytes and their relation to gametocytaemia*. Parasite Immunol, 2016. **38**(6): p. 352-64.

93. Tonwong, N., et al., *Natural infection of Plasmodium falciparum induces inhibitory antibodies against gametocyte development in human hosts*. Jpn J Infect Dis, 2012. **65**(2): p. 152-6.
94. Sangaré, B. *Etude des cellules T régulatrices dans la protection contre le paludisme dans un cohorte d'enfants vivant en zone d'endémie palustre*. 2011; Available from: <https://www.bibliosante.ml/handle/123456789/1225> (consulté le 03/10/2021).
95. Konaté, D., et al., *Effect of routine seasonal malaria chemoprevention on malaria trends in children under 5 years in Dangassa, Mali*. Malaria Journal, 2020. **19**(1): p. 137.
96. Akindeh, N.M., et al., *Assessing Asymptomatic Malaria Carriage of Plasmodium falciparum and Non-falciparum Species in Children Resident in Nkolbisson, Yaoundé, Cameroon*. Children 2021. **6**: p. 960.
97. Ateba, F.F., et al., *Spatio-Temporal Dynamic of Malaria Incidence: A Comparison of Two Ecological Zones in Mali*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2020. **17**(13): p. 4698.
98. Keïta, M., et al., *Indoor and outdoor malaria transmission in two ecological settings in rural Mali: implications for vector control*. Malar J, 2021. **20**(1): p. 127.
99. Barua, P., et al., *The impact of early life exposure to Plasmodium falciparum on the development of naturally acquired immunity to malaria in young Malawian children*. Malaria Journal, 2019. **18**(1): p. 11.
100. Kwenti, T.E., et al., *Variation in the immune responses against Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 and apical membrane antigen-1 in children residing in the different epidemiological strata of malaria in Cameroon*. Malar J, 2017. **16**(1): p. 453.
101. Bousema, T., et al., *The Dynamics of Naturally Acquired Immune Responses to Plasmodium falciparum Sexual Stage Antigens Pfs230 & Pfs48/45 in a Low Endemic Area in Tanzania*. PLOS ONE, 2010. **5**(11): p. e14114.
102. Acquah, F.K., et al., *Antibody responses to two new Lactococcus lactis-produced recombinant Pfs48/45 and Pfs230 proteins increase with age in malaria patients living in the Central Region of Ghana*. Malaria Journal, 2017. **16**(1): p. 306.
103. Julien, J.P. and H. Wardemann, *Antibodies against Plasmodium falciparum malaria at the molecular level*. Nat Rev Immunol, 2019. **19**(12): p. 761-775.
104. Kale, S., et al., *Antibody responses within two leading Plasmodium vivax vaccine candidate antigens in three geographically diverse malaria-endemic regions of India*. Malaria Journal, 2019. **18**(1): p. 425.
105. Ouédraogo, A.L., et al., *Naturally acquired immune responses to Plasmodium falciparum sexual stage antigens Pfs48/45 and Pfs230 in an area of seasonal transmission*. Infect Immun, 2011. **79**(12): p. 4957-64.
106. Babacar Mbengue, M.M. Fall, and e. al, *Relationship between Antibody Levels, IgG Binding to Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes, and Disease Outcome in Hospitalized Urban Malaria Patients from Dakar, Sénégal*.
107. Kyei-Baafour, E., et al., *Suitability of IgG responses to multiple Plasmodium falciparum antigens as markers of transmission intensity and pattern*. PLoS One, 2021. **16**(4): p. e0249936.
108. Marsh, K. and S. Kinyanjui, *Immune effector mechanisms in malaria*. Parasite Immunol, 2006. **28**(1-2): p. 51-60.





## 9. ANNEXES

### Annexe 1. Technique de goutte épaisse

#### ✓ Principe

C'est une technique de concentration permettant un repérage rapide des parasites dans le sang et l'identification des différentes espèces (frottis sanguin).

#### ✓ Matériel

Deux (2) lames porte-objet propres et bien dégraissées, vaccinostyle stérile, alcool 70°C, colorant de Giemsa pur, coton hydrophile sec, eau tamponnée (PH=7,2), boîte à lames, chiffon de coton propre, crayon noir à mine grasse ou marqueur indélébile, stylo à bille, bacs de coloration, éprouvette graduées, râtelier, chronomètre, huile d'immersion, registre ou formulaire de notification, un compteur manuel et gant.

#### ✓ Lieu du prélèvement

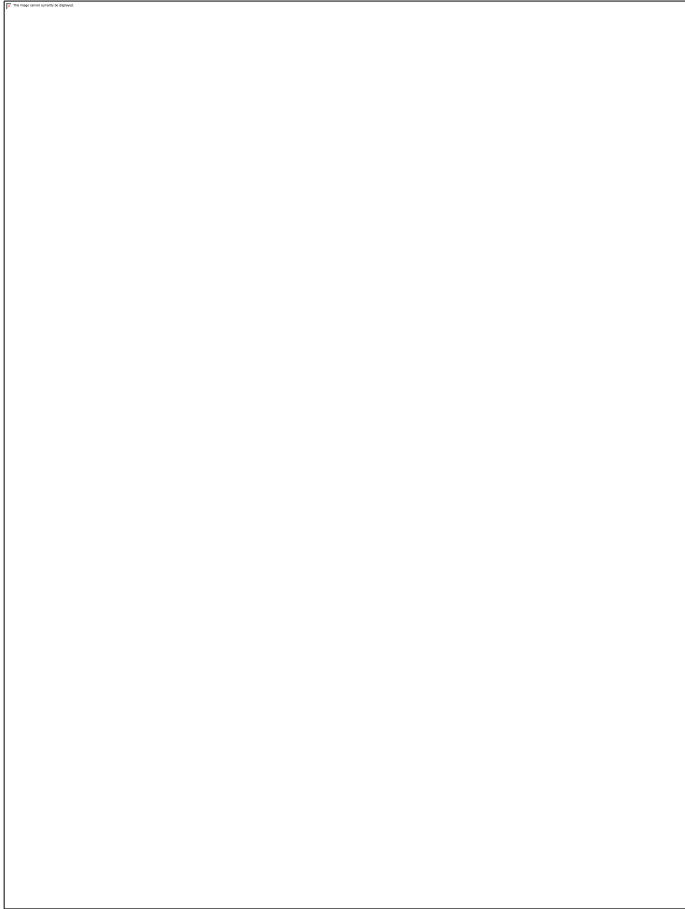
Face latérale à l'extrémité d'un doigt (en général gauche, 3<sup>e</sup> doigt après le pouce), sur le lobe de l'oreille après avoir réchauffé avec les doigts, au niveau du talon ou gros orteil chez le nourrisson.

#### ✓ Réalisation de la goutte épaisse

Après avoir noté les renseignements relatifs sur le formulaire ou le registre approprié, ainsi que l'identité du patient sur la lame, réaliser la goutte comme suite :

- ✓ En tenant la main gauche du malade la paume tournée vers le haut, choisir le troisième doigt après le pouce (le gros orteil peut être utilisé chez les nourrissons. Le pouce ne doit jamais être utilisé chez les adultes ou les enfants).
- ✓ Avec un tapon de coton légèrement imbibé d'alcool, nettoyer le doigt en appuyant fermement pour enlever la saleté et la graisse du bout du doigt ;
- ✓ Avec le chiffon de coton propre, essuyer le doigt en appuyant fermement pour stimuler la circulation du sang ;
- ✓ Avec un vaccinostyle stérile, piquer le bout du doigt d'un seul geste ;
- ✓ Essuyer la première goutte du sang avec du coton sec. S'assurer qu'il ne reste pas de fibres de coton sur le doigt, qui pourraient se mélanger avec du sang ;

- ✓ Appuyer doucement sur le doigt et recueillir une petite goutte de sang au milieu de la lame (**cf. figure 8**) ;
- ✓ Essuyer le sang restant sur le bout du doigt avec un tampon de coton ;
- ✓ Tenir la lame supérieure par les bords ;
- ✓ Placer le coin de l'autre lame au centre de la goutte de sang ;
- ✓ Étendre légèrement la surface de la goutte par des mouvements spiralés
- ✓ Appuyés de la lame (**cf. figure 8**) ;
- ✓ Assurer cette défibrination mécanique pendant quelques secondes et étendre la goutte environ 1cm de diamètre ;
- ✓ Laisser la préparation à plat, à l'abri de la poussière, de la chaleur et des mouches pendant deux heures en zone sahélienne. Respecter ce long temps de séchage sinon il y a risque de décollement de la préparation lors de la coloration (**cf. figure 8**)



## Figure 8. Technique de la goutte épaisse

### ✓ Coloration au GIEMSA

C'est une méthode de coloration classique employée en routine pour la coloration des étalements sanguins et pour le diagnostic du paludisme.

Toujours maintenir la bouteille bien fermée dans un endroit frais à l'abri de la lumière solaire directe. Les bouteilles en verre blanc peuvent être recouvertes d'une enveloppe de papier noir épais pour les protéger de la lumière.

-Fixer le frottis mince en le tapotant doucement avec un tampon de coton imbibé de méthanol, ou en le trempant dans un récipient de méthanol pendant quelques secondes.

-Préparer la solution de Giemsa à 3 ou 5 dans l'eau tamponnée (ph 7,2) et bien mélanger le colorant ;

-Verser doucement le colorant dans la bague jusqu'à ce que la lame soit entièrement recouverte ;

-Laisser colorer 30 à 45 min pour 30(15 mn pour 10), à l'abri de la lumière solaire et de la poussière ;

-Les lames sont ensuite rincées et séchées sur un râtelier.

### ✓ Aspect

La lecture se fait au microscope à l'objectif 100 à l'huile d'immersion

-Le fond doit être propre, exempt de débris, coloré en bleu ;

-Les noyaux des leucocytes sont en violet foncé ;

-Les parasites du paludisme sont bien définis, avec une chromaïne rouge foncée et un cytoplasme bleu pale. Dans les infections à *P. vivax* et *P.Ovale*, on peut voir un semis de granulations de Schuffner dans le fantôme de l'érythrocyte hôte, en particulier sur les bords du frottis.

✓ **Méthodes de numération des parasites du paludisme dans les gouttes épaisses**

On trouvera ci-dessous une méthode pratique de précision suffisante. Elle consiste à dénombrer les parasites par ul de sang dans un frottis épais, par rapport à un nombre prédéterminé de leucocytes. On prend comme norme une moyenne de 7500 leucocytes par ul de sang malgré l'imprécision due aux variations du nombre de leucocytes parmi des personnes en bonne santé et aux variations encore plus grandes observées chez les malades, cette valeur permet des comparaisons valables. Avant de commencer à compter, on examinera de 0,25 gr de sang (environ 100 champs, avec un oculaire 7X (ou 10X) et un objectif à immersion dans l'huile 100X) dans le frottis épais pour déterminer l'espèce de parasite et les stades présents. Ensuite, on appliquera la méthode suivante qui convient pour les frottis positifs :

1. Un compteur manuel à 4 chiffres est nécessaire pour dénombrer séparément les parasites et les leucocytes.
2. A) Si, après avoir compté 300 leucocytes, on identifie 10 parasites ou plus, on note les résultats sur le formulaire de notification, en indiquant le nombre de parasites par 500 leucocytes.
3. Dans chaque cas, le nombre de parasites par rapport au nombre de leucocytes peut être converti en nombre de parasites par micro par la simple formule mathématique suivante :

Nombre de parasites X 7500/ Nombre de leucocytes= parasites par ul

## **Annexe 2. Technique Elisa**

### **Prélèvement :**

Après avoir s'assurer de la disponibilité de tous les nécessaires pour le prélèvement, le numéro ID du participant est collé sur le tube. Le prélèvement peut être effectué sur du sang veineux en tube contenant une substance anticoagulante EDTA (éthylène diamine tétra acétique) qui va empêcher le sang de se « gélifier » et permet une meilleure conservation des cellules. Dès que la prise de sang est terminée il faut homogénéiser le prélèvement par des mouvements de retournement doux pour éviter l'apparition de caillot. Les tubes de prélèvement (la couleur du bouchon est normalisée en fonction de l'anticoagulant, en l'occurrence, le violet) utilisés dans la plupart des cas ont un volume de 5 ml et sont calibrés pour des prélèvements de 4 ml de sang + 1 ml d'EDTA. Ce prélèvement se fait selon les bonnes pratiques de laboratoires.

### **➤ Mode d'analyse**

En mode manuel, après que les échantillons aient été agités manuellement, les bouchons des tubes sont retirés à la main et l'échantillon est aspiré via l'aiguille d'aspiration de sang total.

### **Détermination du Taux d'anticorps**

Le dosage des anticorps a été effectué par la technique de l'ELISA.

### **Matériels et réactifs**

#### **Matériels**

- Tubes
- Plaques de microtitration Immulon 4 HBX à fond plat 3855 Fisher Scientific
- Plaques de dilution ELISA de 1 mL Thermo 260252 ou équivalent
- Plaques de dilution ELISA de 500 µL Thermo 249944 ou équivalent
- Capuchons de 96 puits Thermo 276000 ou équivalent
- Bassin, multicanaux NIH 6640013972460 ou équivalent
- Laveur de microplaques MultiWash+ Molecular Devices 5021825 ou équivalent

- Spectramax 190 Molecular Devices VersaMax ou équivalent
- Les centrifugeuses
- Agitateur Magnétique muni de deux systèmes de chauffage
- Micropipette multicanale 50-300µl
- Micropipette multicanale 5-50µl
- Micropipette 2 µl - Micropipette, 20 µl - Micropipette 200 µl - Micropipette, 1000 µl - Microplaque à fond plat
- Embout de micropipettes jetables de 1000µl, 200µl, 20µl ,10µl ,2µl
- la pipette à 12 canaux
- Feuille d'aluminium
- Mouchoirs de nettoyage jetable
- Eprouvettes graduées à 100ml, 500ml et 1000ml
- Gants en vinyle ou en latex
- Chronomètre approprié pour mesurer 20 min à 2 heures d'intervalle
- Des blouses
- Des masques
- Des lunettes de protection

## **LES REACTIFS**

- Carbonate de sodium Mallinckrodt AR 7521 ou équivalent
- Bicarbonate de sodium Macron Fine Chemicals 7412 ou équivalent
- Lait écrémé Difco BD 232100 ou équivalent
- TRIS Buffered Saline (TBS) 10x Crystalgen 302-003-1000 ou équivalent
- BSA Sigma A-7906 ou équivalent
- Comprimés de substrat de phosphatase Sigma S0942-200tab ou équivalent
- Tween-20 (Monolaurate de polyoxyéthylène sorbitane) Sigma P-1379 ou équivalent



-Stabilisateur d'AP Kirkegaard & Perry Labs 55-15-00

- Eau distillée

## **Procédures**

### **Tampons et préparation des anticorps secondaires**

- Tampon d'enrobage 10x : pH=9,6, carbonate de sodium 0,15M, bicarbonate de sodium 0,35M

Pour préparer 1000 ml de tampon d'enrobage 10x, dissoudre 15,74 g de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) et 29,4 g de bicarbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ ) dans 1000 ml d'eau distillée.

Étiqueter la bouteille en indiquant "Tampon d'enrobage 10x" et la date de préparation. Conservez à température ambiante jusqu'à un an.

Pour préparer une solution 1x à partir d'une solution 10x, mélangez 100 ml de solution 10x et 900 ml d'eau distillée. Étiquetez la bouteille en indiquant "1x Coating Buffer" et la date de préparation. Conservez à température ambiante jusqu'à un mois.

- Tampon de dilution 10x BSA : 1%BSA, 0,5%Tween-TBS

Pour préparer 1000 ml de tampon de dilution BSA 10x, mélanger 10 g de BSA, 5 ml de Tween-20 et 1000 ml de TBS 10x.

Mélanger sur un agitateur magnétique jusqu'à ce que la BSA et le Tween-20 se dissolvent (au moins 20 min à température ambiante). Stérilisez en filtrant la solution à travers un filtre de 0,2  $\mu\text{m}$ . Étiqueter la bouteille comme "Tampon de dilution de BSA 10x" et indiquer la date de préparation. Conserver à 4C pendant un an maximum.

Pour préparer une solution 1x à partir d'une solution 10x, mélangez 100 ml de solution 10x et 900 ml d'eau distillée. Étiqueter la bouteille comme "1x BSA Diluting Buffer" et indiquer la date de préparation. Conservez à 4C jusqu'à deux semaines.

- Tampon de lavage 10x : 1%Tween-10xTBS

Pour préparer 1000 ml de tampon de lavage 10x, mélanger 10 ml de Tween-20 et 1000 ml de TBS 10x.

Mélanger sur un agitateur magnétique jusqu'à ce que le Tween-20 se dissolve (au moins 20 minutes à température ambiante). Étiqueter le flacon comme "Tampon de lavage 10x" et indiquer la date de préparation. Conservez à température ambiante jusqu'à un an.

Pour préparer une solution 1x à partir d'une solution 10x, mélangez 100 ml de solution 10x et 900 ml d'eau distillée. Étiquetez la bouteille en indiquant "1x Wash Buffer" et la date de préparation. Conservez à température ambiante jusqu'à un an.

- Tampon de dilution/blocage du lait écrémé à 5 % : 5% de lait - 1X TBS

Pour préparer 300 ml d'un tampon de lait écrémé à 5%, mélanger 15 g de poudre de lait écrémé, 30 ml de TBS 10x et 270 ml d'eau distillée.

Mélangez sur un agitateur magnétique jusqu'à ce que le lait se dissolve (au moins 20 minutes à température ambiante). Étiqueter la bouteille comme "Tampon de lait à 5%" et indiquer la date de préparation. Conservez à 4°C jusqu'à deux semaines.

Facultatif : faire des aliquotes de 50 ml du tampon de lait à 5% préparé et les conserver à -20°C jusqu'à un an.

### **Anticorps secondaire**

Ajouter 1 ml de stabilisateur AP de KPL à chaque flacon d'anticorps secondaire et mélanger jusqu'à réhydratation complète. Étiqueter le flacon avec la date de réhydratation et le conserver à 4°C pendant un an maximum.

Facultatif : Pour minimiser la différence entre les flacons, faites un pool d'anticorps secondaires en utilisant plusieurs flacons, puis aliquotez l'anticorps et stockez-le(s) aliquote(s) à -80°C jusqu'à cinq ans.

- Enduction des plaques avec l'antigène

Note : Les plaques enduites doivent être conservées à +4°C et doivent être utilisées dans la semaine qui suit.

- Étiqueter chaque plaque avec le nom de l'antigène et la date d'enrobage avec un marqueur permanent et imperméable sur le côté de la plaque.

- Chaque plaque nécessite 10 ml de solution d'enrobage. Déterminer le volume total de solution d'enrobage nécessaire pour enrober le nombre de plaques de l'essai.
- Diluer l'antigène dans le tampon d'enrobage 1x jusqu'à une concentration de 1 µg/ml dans un tube de 50 ml (ou un erlenmeyer de 250 ml).
- Mélanger la solution en inversant le tube (ou la fiole), puis verser la solution dans un bassin de solution multicanaux.
- À l'aide d'une pipette multicanaux, remplir chaque puits avec 100 µl de la solution de revêtement.
- Empiler soigneusement les plaques en utilisant une plaque vide comme plaque supérieure, et les envelopper dans une pellicule plastique. Laisser les plaques pendant au moins une nuit au réfrigérateur à +4°C.

### **Précautions générales pour les anticorps primaires et les dilutions standard ELISA**

- Le facteur de dilution et le volume final des dilutions seront déterminés en fonction de la conception du test ELISA (p. ex. combien d'antigènes doivent être testés). Pour effectuer les dilutions, il n'est pas recommandé de manipuler moins de 5 µl de liquide à chaque étape.
- Une plaque peut être utilisée pour jusqu'à 24 anticorps primaires différents en triplicata (rangée A à F).
- Un diluant contenant du lait doit être utilisé pour tous les échantillons humains et un diluant contenant de la BSA doit être utilisé pour les échantillons animaux.
- Si l'anticorps primaire ou l'étalon ont été congelés, mélanger au vortex et/ou inverser, puis essorer avant l'utilisation.
- S'il n'y a pas de raison spécifique de faire autrement, tous les anticorps primaires doivent être testés par ELISA à une dilution de 1 :500 d'abord, et ensuite à une dilution plus élevée si nécessaire.
- Les dilutions d'anticorps primaires/standards peuvent être faites la veille de la réalisation du test ELISA (ou avant), mais les dilutions doivent être utilisées avant que le tampon n'expire. Si les dilutions sont conservées moins de 2 heures, garder la ou les plaques à température ambiante dans une chambre

humide ou avec un couvercle. Si les dilutions sont conservées pendant plus de 2 heures, couvrez-la ou les plaques de dilution et conservez-les entre 2-8 °C.

- Le traitement de l'anticorps primaire (c.-à-d., quel échantillon est testé, quelle plaque/quel puits à quelle dilution) et la façon de faire la ou les dilutions pour l'anticorps primaire/standard (p. ex., la dilution 1 :50 a été faite en mélangeant 5 µl de sérum original avec 245 µl de diluant. Ensuite, la dilution 1 :500 a été faite en mélangeant 15 µl de dilution 1 :50 avec 135 µl de diluant) doit être enregistrée.
- Pour obtenir la même forme de la courbe standard, la première dilution standard doit comporter 10 à 50 unités ELISA (habituellement 20 unités ELISA). Le nombre d'unités ELISA dans un étalon doit être déterminé à l'avance à l'aide de l'IM-6025-XX.
- Dans certains cas, le test ELISA sera effectué sans étalon ELISA (p. ex. la D.O. sera rapportée comme résultat final, au lieu des unités ELISA). Demandez des détails à un superviseur.

### **Préparation des anticorps primaires**

- Obtenir un nombre suffisant de plaques de dilution à 96 puits pour la dilution des échantillons. Étiqueter chaque plaque de dilution.
- Mettre le diluant 1x et les échantillons d'essai originaux dans les puits désirés pour toutes les plaques de dilution. Une pipette multicanaux peut être utilisée pour le diluant 1x, et une pipette monocanale doit être utilisée pour les échantillons de test originaux (utiliser un nouvel embout de pipette pour chaque puits). Pour la ou les plaques de dilution initiale, il est facultatif de mettre du ruban adhésif sur les rangées D et E pour écrire les numéros des échantillons ou d'autres commentaires (mettre les échantillons dans les rangées A-C ou F-H).
- En utilisant une pipette multicanaux de taille appropriée, mélanger le contenu de la rangée A. Sans changer d'embout, mélanger le contenu des rangées B et C. Changer d'embout, puis mélanger les rangées D, E et F (ou les rangées F, G et H).
- Pour une dilution supplémentaire, transférer le volume désiré de la plaque de dilution inférieure à une plaque de dilution supérieure (qui ne contient qu'un seul diluant). Mélanger le contenu.

- Conserver les plaques de façon appropriée.

### **Préparation de l'étalon ELISA**

- Obtenir une quantité suffisante de stock d'étalon ELISA. Il faut au moins 300 µl de la première solution de travail par plaque.
- Obtenir une quantité suffisante de tubes (ou de plaques de dilution à 96 puits) et mettre la quantité appropriée de diluant dans chaque tube (ou puits).
- Faire une dilution initiale à partir de l'étalon mère, puis faire des dilutions en série deux fois plus importantes. Faire un total de 10 dilutions sérielles doubles différentes.
- Transférer l'étalon ELISA dilué en série dans une plaque de dilution à 96 puits (la concentration la plus élevée est dans la colonne 1 et la plus faible dans la colonne 10). Mettre le diluant (sans anticorps) dans les colonnes 11 et 12.
- Conserver les plaques de façon appropriée.

### **Plaques de blocage**

- Sortir du réfrigérateur le nombre désiré de plaques enduites d'antigène. Numéroter chaque plaque à l'aide d'un marqueur permanent résistant à l'eau.
- Jeter la solution d'enrobage de la ou des plaques. Veiller à ce que les plaques ne soient pas complètement sèches avant l'ajout du tampon de lait à 5 %.
- À l'aide de la pipette multicanaux, remplir chaque puits avec 300-350 µl de tampon au lait à 5 % et placer la ou les plaques dans une chambre humidifiée (ou empiler la ou les plaques avec une plaque vierge sur le dessus) et laisser reposer pendant 2 heures 15 minutes à température ambiante.

Note : Si nécessaire, la ou les plaques peuvent être incubées avec du tampon lacté à 5% pendant une période plus longue que 2 heures.

### **Application de l'anticorps primaire**

- Décider d'un intervalle de temps entre les plaques, généralement de 2,5 à 4,0 minutes. Laver les plaques au même intervalle pendant toute la durée de l'essai. Utiliser une minuterie pour mesurer l'intervalle avec précision.
- Installer deux minuteries ; une pour mesurer l'intervalle entre les plaques et l'autre pour l'incubation de 2 heures des anticorps primaires.

- S'assurer que toutes les plaques de dilution des sérums d'essai et les plaques standard ELISA sont disponibles et à la température ambiante.
- Immédiatement, avant d'ajouter l'anticorps primaire, laver les plaques 4 fois en utilisant un laveur de microplaques. Lorsque le laveur de plaques commence le processus, démarrer le minuteur pour mesurer l'intervalle entre les plaques. Une fois qu'une plaque est passée dans le laveur de plaques, la secouer et la tapoter sur une serviette en papier pour éliminer l'excès de liquide dans la plaque.
- À l'aide d'une pipette multicanaux de 50 à 300 µl, transférer 100 µl d'anticorps primaire de la plaque de dilution à la plaque ELISA. Sans changer d'embout, transférer les échantillons des rangées A, B et C. Changer d'embout et transférer les échantillons des rangées D, E et F.
- Changer d'embout et ajouter 100 µl/puits d'étalons aux rangées G et H.
- Lorsque les étalons ont été ajoutés à la première plaque, démarrer la minuterie de 2 heures.
- Continuer à laver les plaques au même intervalle, tel que déterminé, en ajoutant l'anticorps primaire et les étalons.
- Placer la ou les plaques dans une chambre humidifiée (ou empiler la ou les plaques avec une plaque vierge sur le dessus) et incuber pendant 2 heures à la température ambiante.

### **Application de l'anticorps secondaire**

- Plusieurs minutes avant la fin de la période d'incubation de 2 heures de l'anticorps primaire, préparer l'anticorps secondaire. Diluer l'anticorps secondaire avec le diluant 1x approprié (lait à 5 % pour les échantillons humains et diluant BSA pour les échantillons animaux). Les facteurs de dilution peuvent différer selon l'espèce, le lot de l'anticorps secondaire et l'antigène testé, mais on choisit généralement une dilution de 1 :1000.
- Mettre en place deux minuteries ; une pour mesurer l'intervalle entre les plaques et l'autre pour mesurer l'incubation de 2 heures de l'anticorps secondaire.
- À la fin de l'incubation de 2 heures de l'anticorps primaire, commencer à laver les plaques

- Ajouter 100 µl/puits de l'anticorps secondaire aux plaques ELISA. Lorsque l'anticorps secondaire a été ajouté à la première plaque ELISA, démarrer la minuterie de 2 heures.
- Continuer à laver les plaques au même intervalle de temps et à ajouter l'anticorps secondaire
- Placer la ou les plaques dans une chambre humidifiée (ou empiler la ou les plaques avec une plaque vierge sur le dessus) et incuber pendant 2 heures à température ambiante.

### **Application du substrat**

- Environ 15 à 30 minutes avant la fin de la période d'incubation de 2 heures, préparer la solution de substrat. Utiliser 10 ml de solution de substrat par plaque ELISA. Pour préparer 10 ml de solution de substrat, dissoudre 2 comprimés de substrat de phosphatase dans du tampon d'enrobage 1x.
- Un lecteur de microplaques et un ordinateur doivent être allumés avant l'ajout de la solution de substrat. Sélectionnez un programme SoftMaxPro.ppr approprié (ou un fichier pda), et ouvrez-le en mettant en évidence la barre de la plaque 1.
- Régler deux minuteries ; une pour mesurer l'intervalle entre les plaques et l'autre pour l'incubation de 20 minutes du substrat.
- À la fin de l'incubation de 2 heures de l'anticorps secondaire, commencer à laver les plaques.
- Ajouter 100 µl/puits de la solution de substrat aux plaques ELISA.
- Lorsque la solution de substrat a été ajoutée à la première plaque ELISA, démarrer une minuterie de 20 minutes.
- Continuer à laver les plaques au même intervalle de temps et à ajouter la solution de substrat.
- Placer la ou les plaques dans une chambre humidifiée (ou empiler la ou les plaques avec une plaque vierge sur le dessus).
- Le temps d'incubation du substrat est de 20 minutes à la température ambiante.

**Remarque :** S'il y a plus de 8 plaques dans la série et qu'un intervalle de 3 minutes a été utilisé, il se peut que la lecture de la ou des premières plaques soit nécessaire avant que toutes les plaques soient lavées et que la solution de substrat soit ajoutée.

## **Lecture du test ELISA**

- Le lecteur de plaques doit être déjà réchauffé et un programme SoftMaxPro.ppr (ou un programme pda) approprié doit être sélectionné.
- Lire la plaque ELISA selon le manuel d'instruction du lecteur de microplaques après une incubation de 20 minutes.
- Lire toutes les plaques à l'intervalle approprié
- Sauvegarder les données dans un fichier. pda portant le nom "MMDDYY\_XXXn.pda" où MMDDYY est la date, XXX est les initiales de l'opérateur et n est le nième fichier créé ce jour-là.

## **Traitement des données**

- Détermination des unités ELISA des échantillons d'essai

S'il n'est pas nécessaire de déterminer les unités ELISA d'un ou de plusieurs échantillons d'essai (p. ex., rapporter la valeur brute de la D.O. comme résultat final, etc.), consulter un superviseur pour savoir comment effectuer le contrôle de qualité.



## 10. FICHE SIGNALÉTIQUE

**Nom** : DEMBELE

**Prénom** : ASSITAN

**Nationalité** : Malienne

**Ville de soutenance** : Bamako

**Titre** : Réponse humorale aux antigènes gamétoctaires de *P. falciparum* à Dangassa et à Sirakorola, deux villages avec de modalités distinctes de transmission palustre au Mali.

**Année universitaire** : 2020-2021

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

**Secteur d'intérêt** : Immunogénétique et Parasitologie

### Résumé

La recherche d'un potentiel candidat vaccin contre le *Plasmodium* a eu peu de succès à cause de la complexité du cycle de vie du parasite. Les études actuelles s'orientent sur les antigènes du stade sexué qui ont une activité bloquant la transmission. Notre étude avait pour but d'évaluer la réponse humorale aux antigènes gamétoctaires (*Pfs48/45*, *Pfs230* et *Psf47*) chez les enfants de 5 à 15 ans vivant dans les villages de Dangassa et de Sirakorola, deux zones de transmission palustre différentes. Deux passages transversaux ont été effectués en début de saison des pluies (juin 2019) et en fin de saison de transmission (novembre 2019) pour collecter des données chez 576 enfants. Un prélèvement capillaire était effectué au bout du doigt pour réaliser le taux d'hémoglobine suivi d'un prélèvement veineux de 2ml dans le tube EDTA pour effectuer la goutte épaisse/frottis mince, confectionner les confettis, et centrifuger le reste de sang pour le test d'ELISA. La prévalence de l'infection palustre était plus élevée à Dangassa qu'à Sirakorola en novembre (26,8% vs 14,6%,  $p = 0,002$ ). La prévalence des anticorps anti-*Pfs48/45* ( $p = 0,041$ ) et anti-*Pfs230* ( $p = 0,0001$ ) était significativement élevée en novembre à Dangassa contrairement à Sirakorola où la prévalence des anticorps anti-*Pfs230* était faible ( $p = 0,005$ ). Une augmentation significative du taux moyen des anticorps anti-*Pfs230* a été observée à Dangassa ( $p = 0,001$ ). Une augmentation significative du taux moyen des anticorps anti-*Pfs230* a été observée en fin de saison des pluies à Dangassa dans les deux tranches d'âge ( $p$

= 0,001). Nos résultats suggèrent que la séroprévalence des anticorps anti-*Pfs230* variait en fonction de l'endémicité.

**Mots-clés :** Paludisme, Antigènes gamétoctaires, Réponse humorale, Enfants, Mali

### Summary

The search for a potential vaccine candidate against *Plasmodium* has had little success due to the complexity of the parasite's life cycle. Current studies focus on sex stage antigens that have transmission blocking activity. The purpose of our study was to evaluate the humoral response to gametocyte antigens (*Pfs48/45*, *Pfs230*, and *Pfs47*) in children aged 5 to 15 years living in the villages of Dangassa and Sirakorola, two different malaria transmission areas. Two cross-sectional studies were conducted at the beginning of the rainy season (June 2019) and at the end of the transmission season (November 2019) to collect data from 576 children.

The prevalence of malaria infection was higher in Dangassa than in Sirakorola in November (26.8% vs. 14.6%,  $p = 0.002$ ). The prevalence of anti-*Pfs48/45* ( $p = 0.041$ ) and anti-*Pfs230* ( $p = 0.0001$ ) antibodies was significantly higher in November in Dangassa than in Sirakorola where the prevalence of anti-*Pfs230* antibodies was low ( $p = 0.005$ ). A significant increase in the mean level of anti-*Pfs230* antibodies was observed in Dangassa ( $p = 0.001$ ). A significant increase in the mean anti-*Pfs230* antibody level was observed at the end of the rainy season in Dangassa in both age groups ( $p = 0.001$ ). Our results suggest that the seroprevalence of anti-*Pfs230* antibodies varied according to malaria endemicity.

**Keywords:** Malaria, Gametocyte antigens, Humoral response, Children, Mali

## **SERMENT DE GALIEN**

Je jure en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

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

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

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

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

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

Je le jure.