

Ministère de l'Enseignement
Supérieur et de la Recherche
Scientifique



République du Mali
Un Peuple - Un But - Une Foi



FACULTE DE MEDECINE DE PHARMACIE ET D'ODONTOSTOMATOLOGIE

Année universitaire 2009- 2010

Thèse N°...../P

TITRE

**Réponse naturelle anticorps anti-MSP-3 LSP de
Plasmodium falciparum chez les enfants de 1 à 4 ans
vivant en zone périurbaine de Bamako (Sotuba)**

THESE

Présentée et soutenue publiquement le 27 février 2010 devant la
Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie

Par

M. Yamoussa KEITA

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

MEMBRES DU JURY

Président : Professeur Anatole TOUNKARA

Membres : Professeur Boubacar TRAORE

Docteur Mahamadou S. SISSOKO

Co-directeur : Docteur Bourema KOURIBA

Directeur : Professeur Ouhara K. DOUMBO

Ce travail a été financé par le réseau AMANET

FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTO-STOMATOLOGIE
ANNEE UNIVERSITAIRE 2009 - 2010

ADMINISTRATION

DOYEN : ANATOLE TOUNKARA - PROFESSEUR
1^{er} ASSESSEUR : DRISSA DIALLO - MAITRE DE CONFERENCES
2^{eme} ASSESSEUR : SEKOU SIDIBE - MAITRE DE CONFERENCES
SECRETAIRE PRINCIPAL : YENIMEGUE ALBERT DEMBELE - PROFESSEUR
AGENT COMPTABLE : MADAME COULIBALY FATOUMATA TALL - CONTROLEUR DES FINANCES

LES PROFESSEURS HONORAIRES

Mr Alou BA	Ophthalmologie
Mr Bocar SALL	Orthopédie Traumatologie - Secourisme
Mr Souleymane SANGARE	Pneumo-phtisiologie
Mr Yaya FOFANA	Hématologie
Mr Mamadou L. TRAORE	Chirurgie Générale
Mr Balla COULIBALY	Pédiatrie
Mr Mamadou DEMBELE	Chirurgie Générale
Mr Mamadou KOUMARE	Pharmacognosie
Mr Ali Nouhoum DIALLO	Médecine interne
Mr Aly GUINDO	Gastro-Entérologie
Mr Mamadou M. KEITA	Pédiatrie
Mr Siné BAYO	Anatomie-Pathologie-Histoembryologie
Mr Sidi Yaya SIMAGA	Santé Publique
Mr Abdoulaye Ag RHALY	Médecine Interne
Mr Boulkassoum HAIDARA	Législation
Mr Boubacar Sidiki CISSE	Toxicologie
Mr Massa SANOGO	Chimie Analytique
Mr Sambou SOUMARE	Chirurgie Générale
Mr Sanoussi KONATE	Santé Publique
Mr Abdou Alassane TOURE	Orthopédie - Traumatologie
Mr Daouda DIALLO	Chimie Générale & Minérale
Mr Issa TRAORE	Radiologie
Mr Mamadou K. TOURE	Cardiologie
Mme SY Assitan SOW	Gynéco-Obstétrique
Mr Salif DIAKITE	Gynéco-Obstétrique

LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT PAR D.E.R. & PAR GRADE

D.E.R. CHIRURGIE ET SPECIALITES CHIRURGICALES

1. PROFESSEURS

Mr Abdel Karim KOUMARE	Chirurgie Générale
Mr Kalilou OUATTARA	Urologie
Mr Amadou DOLO	Gynéco Obstétrique
Mr Alhousseini Ag MOHAMED	O.R.L.
Mr Abdoulaye DIALLO	Anesthésie – Réanimation (en détachement)
Mr Djibril SANGARE	Chirurgie Générale, Chef de D.E.R
Mr Abdel Kader TRAORE Dit DIOP	Chirurgie Générale
Mr Gangaly DIALLO	Chirurgie Viscérale

2. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Abdoulaye DIALLO	Ophthalmologie
Mr. Mamadou TRAORE	Gynéco-Obstétrique
Mr Filifing SISSOKO	Chirurgie Générale
Mr Sékou SIDIBE	Orthopédie. Traumatologie
Mr Abdoulaye DIALLO	Anesthésie - Réanimation
Mr Tiéman COULIBALY	Orthopédie Traumatologie
Mme TRAORE J. THOMAS	Ophthalmologie
Mr Mamadou L. DIOMBANA	Stomatologie
Mme DIALLO Fatimata S. DIABATE	Gynéco-Obstétrique (en détachement)
Mr Nouhoum ONGOIBA	Anatomie & Chirurgie Générale

Mr Sadio YENA
Mr Youssouf COULIBALY
Mr Zimogo Zié SANOGO
Mr Mohamed KEITA

Chirurgie Thoracique
Anesthésie – Réanimation
Chirurgie Générale
ORL

3. MAITRES ASSISTANTS

Mr Issa DIARRA
Mr Samba Karim TIMBO
Mme TOGOLA Fanta KONIPO
Mme Diénéba DOUMBIA
Mr Zanafon OUATTARA
Mr Adama SANGARE
Mr Sanoussi BAMANI
Mr Doulaye SACKO
Mr Ibrahim ALWATA
Mr Lamine TRAORE
Mr Mady MACALOU
Mr Aly TEMBELY
Mr Niani MOUNKORO
Mr Tiemoko D. COULIBALY
Mr Souleymane TOGORA
Mr Bouraïma MAIGA
Mr Youssouf SOW
Mr Djibo Mahamane DIANGO
Mr Moustapha TOURE
Mr Mamadou DIARRA
Mr Boubacary GUINDO
Mr Moussa Abdoulaye OUATTARA
Mr Birama TOGOLA
Mr Bréhima COULIBALY
Mr Adama Konoba KOITA
Mr Adégné TOGO
Mr Lassana KANTE
Mr Mamby KEITA
Mr Hamady TRAORE
Mme KEITA Fatoumata SYLLA
Mr Drissa KANIKOMO
Mme Kadiatou SINGARE
Mr Nouhoum DIANI
Mr Aladji Seydou DEMBELE
Mr Ibrahima TEGUETE
Mr Youssouf TRAORE
Mr Lamine Mamadou DIAKITE
Mme Fadima Koréïssy TALL
Mr Mohamed KEITA
Mr Broulaye Massaoulé SAMAKE
Mr Yacaria COULIBALY
Mr Seydou TOGO
Mr Tioukany THERA
Mr Oumar DIALLO
Mr Boubacar BA
Mme Assiatou SIMAGA
Mr Seydou BAKAYOKO
Mr Sidi Mohamed COULIBALY
Mr Japhet Pobanou THERA
Mr Adama GUINDO
Mme Fatimata KONANDJI
Mr Hamidou Baba SACKO
Mr Siaka SOUMAORO
Mr Honoré Jean Gabriel BERTHE
Mr Drissa TRAORE
Mr Bakary Tientigui DEMBELE
Mr Koniba KEITA
Mr Sidiki KEITA
Mr Soumaïla KEITA
Mr Alhassane TRAORE

Gynéco-Obstétrique
ORL
ORL
Anesthésie/Réanimation
Urologie
Orthopédie - Traumatologie
Ophtalmologie
Ophtalmologie (en détachement)
Orthopédie - Traumatologie
Ophtalmologie
Orthopédie/Traumatologie
Urologie
Gynécologie/Obstétrique
Odontologie
Odontologie
Gynéco/Obstétrique
Chirurgie Générale
Anesthésie-réanimation
Gynécologie
Ophtalmologie
ORL
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Chirurgie Pédiatrique
Odonto-Stomatologie
Ophtalmologie
Neuro Chirurgie
ORL-Rhino-Laryngologie
Anesthésie-Réanimation
Anesthésie-Réanimation
Gynécologie/Obstétrique
Gynécologie/Obstétrique
Urologie
Anesthésie Réanimation
Anesthésie Réanimation
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Pédiatrique
Chirurgie Thoracique et Cardio Vasculaire
Gynécologie
Neurochirurgie
Odontostomatologie
Ophtalmologie
Ophtalmologie
Ophtalmologie
Ophtalmologie
Ophtalmologie
Ophtalmologie
ORL
ORL
Urologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale

D.E.R. DE SCIENCES FONDAMENTALES

1. PROFESSEURS

Mr Amadou DIALLO	Biologie
Mr Moussa HARAMA	Chimie Organique
Mr Ogobara DOUMBO	Parasitologie – Mycologie
Mr Yénimégué Albert DEMBELE	Chimie Organique
Mr Anatole TOUNKARA	Immunologie
Mr Bakary M. CISSE	Biochimie
Mr Abdourahmane S. MAIGA	Parasitologie
Mr Adama DIARRA	Physiologie
Mr Mamadou KONE	Physiologie
Mr Sékou F.M. TRAORE	Entomologie Médicale

2. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Amadou TOURE	Histoembryologie
Mr Flabou BOUGOUDOGO	Bactériologie-Virologie
Mr Amagana DOLO	Parasitologie Chef de D.E.R.
Mr Mahamadou CISSE	Biologie
Mr Abdoulaye DABO	Malacologie, Biologie Animale
Mr Ibrahim I. MAIGA	Bactériologie – Virologie
Mr Mahamadou A. THERA	Parasitologie -Mycologie
Mr Moussa Issa DIARRA	Biophysique
Mr Mouctar DIALLO	Biologie Parasitologie
Mr Djibril SANGARE	Entomologie Moléculaire Médicale
Mr Boubacar TRAORE	Parasitologie Mycologie

3. MAITRES ASSISTANTS

Mr Lassana DOUMBIA	Chimie Organique
Mr Mounirou BABY	Hématologie
Mr Kaourou DOUCOURE	Biologie
Mr Bouréma KOURIBA	Immunologie
Mr Souleymane DIALLO	Bactériologie-Virologie
Mr Cheik Bougadari TRAORE	Anatomie-Pathologie
Mr Guimogo DOLO	Entomologie Moléculaire Médicale
Mr Abdoulaye TOURE	Entomologie Moléculaire Médicale
Mr Mahamadou DIAKITE	Immunologie – Génétique
Mr Bakarou KAMATE	Anatomie Pathologie
Mr Bakary MAIGA	Immunologie
Mr Bokary Y. SACKO	Biochimie

4. ASSISTANTS

Mr Mangara M. BAGAYOGO	Entomologie Moléculaire Médicale
Mr Mamadou BA	Biologie, Parasitologie Entomologie Médicale
Mr Moussa FANE	Parasitologie Entomologie
Mr Blaise DACKOUCO	Chimie Analytique
Mr Aldiouma GUINDO	Hématologie

D.E.R. DE MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES

1. PROFESSEURS

Mr Mahamane MAIGA	Néphrologie
Mr Baba KOUMARE	Psychiatrie, Chef de DER
Mr Moussa TRAORE	Neurologie
Mr Hamar A. TRAORE	Médecine Interne
Mr Dapa Aly DIALLO	Hématologie
Mr Moussa Y. MAIGA	Gastro-entérologie – Hépatologie
Mr Somita KEITA	Dermato-Léprologie
Mr Boubakar DIALLO	Cardiologie
Mr Toumani SIDIBE	Pédiatrie
Mr Mamady KANE	Radiologie

2. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Bah KEITA
Mr Abdel Kader TRAORE
Mr Siaka SIDIBE
Mr Mamadou DEMBELE
Mr Saharé FONGORO
Mr Bakoroba COULIBALY
Mr Bou DIAKITE
Mr Bougouzié SANOGO
Mme SIDIBE Assa TRAORE
Mr Adama D. KEITA
Mr Sounkalo DAO
Mme TRAORE Mariam SYLLA
Mr Daouda K. MINTA
Mr Souleymane DIALLO

Pneumo-Phtisiologie (en détachement)
Médecine Interne
Radiologie
Médecine Interne
Néphrologie
Psychiatrie
Psychiatrie
Gastro-entérologie
Endocrinologie
Radiologie
Maladies Infectieuses
Pédiatrie
Maladies Infectieuses
Pneumologie

3. MAITRES ASSISTANTS

Mme Habibatou DIAWARA
Mr Kassoum SANOGO
Mr Seydou DIAKITE
Mr Arouna TOGORA
Mme KAYA Assétou SOUCKO
Mr Boubacar TOGO
Mr Mahamadou TOURE
Mr Idrissa A. Cisse
Mr Mamadou B. DIARRA
Mr Anselme KONATE
Mr Moussa T. DIARRA
Mr Souleymane COULIBALY
Mr Cheick Oumar GUINTO
Mr Mahamadoun GUINDO
Mr Ousmane FAYE
Mr Yacouba TOLOBA
Mme Fatoumata DICKO
Mr Boubacar DIALLO
Mr Youssoufa Mamoudou MAIGA
Mr Modibo SISSOKO
Mr Ilo Bella DIALL
Mr Mahamadou DIALLO
Mr Adama Aguisa DICKO
Mr Abdoul Aziz DIAKITE
Mr Boubacar dit Fassara SISSOKO
Mr Salia COULIBALY
Mr Ichaka MENTA
Mr Souleymane COULIBALY

Dermatologie
Cardiologie
Cardiologie
Psychiatrie
Médecine Interne
Pédiatrie
Radiologie
Dermatologie
Cardiologie
Hépatogastro-entérologie
Hépatogastro-entérologie
Psychologie
Neurologie
Radiologie
Dermatologie
Pneumo-Phtisiologie
Pédiatrie
Médecine Interne
Neurologie
Psychiatrie
Cardiologie
Radiologie
Dermatologie
Pédiatrie
Pneumologie
Radiologie
Cardiologie
Cardiologie

D.E.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

1. PROFESSEURS

Mr Gaoussou KANOUTE
Mr Ousmane DOUMBIA
Mr Elimane MARIKO

Chimie analytique, **Chef de D.E.R.**
Pharmacie Chimique
Pharmacologie

2. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Drissa DIALLO
Mr Alou KEITA
Mr Benoît Yaranga KOUMARE
Mr Ababacar I. MAIGA
Mme Rokia SANOGO

Matières Médicales
Galénique
Chimie Analytique
Toxicologie
Pharmacognosie

3. MAITRES ASSISTANTS

Mr Yaya KANE	Galénique
Mr Saïbou MAIGA	Législation
Mr Ousmane KOITA	Parasitologie Moléculaire
Mr Yaya COULIBALY	Législation
Mr Abdoulaye DJIMDE	Microbiologie-Immunologie
Mr Sékou BAH	Pharmacologie
Loséni BENGALY	Pharmacie Hospitalière

D.E.R. DE SANTE PUBLIQUE

1. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Moussa A. MAIGA	Santé Publique
Mr Jean TESTA	Santé Publique
Mr Mamadou Sounalo TRAORE	Santé Publique, Chef de D.E.R.
Mr Massambou SACKO	Santé Publique
Mr Alassane A. DICKO	Santé Publique
Mr Seydou DOUMBIA	Epidémiologie
Mr Samba DIOP	Anthropologie Médicale

2. MAITRES ASSISTANTS

Mr Adama DIAWARA	Santé Publique
Mr Hamadoun SANGHO	Santé Publique
Mr Hammadoun Aly SANGO	Santé Publique
Mr Akory AG IKNANE	Santé Publique
Mr Ousmane LY	Santé Publique
Mr Cheick Oumar BAGAYOKO	Informatique Médecine
Mme Fanta SANGHO	Santé Communautaire

3. ASSISTANTS

Mr Oumar THIERO	Biostatistique
Mr Seydou DIARRA	Anthropologie Médicale

CHARGES DE COURS & ENSEIGNANTS VACATAIRES

Mr N'Golo DIARRA	Botanique
Mr Bouba DIARRA	Bactériologie
Mr Salikou SANOGO	Physique (Ministre)
Mr Boubacar KANTE	Galénique
Mr Souléymanne GUINDO	Gestion
Mme DEMBELE Sira DIARRA	Mathématiques
Mr Modibo DIARRA	Nutrition
Mme MAIGA Fatoumata SOKONA	Hygiène du Milieu
Mr Mahamadou TRAORE	Génétique
Mr Lassine SIDIBE	Chimie Organique
Mr Cheick O. DIAWARA	Bibliographie

ENSEIGNANTS EN MISSION

Pr. Doudou BA	Bromatologie
Pr. Babacar FAYE	Pharmacodynamie
Pr. Mounirou CISS	Hydrologie
Pr. Amadou Papa DIOP	Biochimie
Pr. Lamine GAYE	Physiologie
Pr. Pascal BONNABRY	Pharmacie Hospitalière

REMEMBRANCES

DEDICACES

DEDICACES

Louange et Gloire à ALLAH, Dieu d'Amour, Dieu tout Puissant, le Miséricordieux.

Je dédie ce travail:

A ma grand-mère, feu Mariam Berthé

Ton départ a laissé un grand vide dans notre cœur, tu as été une femme exemplaire, un fleuve dans lequel tout le monde pouvait se servir. Ton affection ne nous a jamais fait défaut. Ce modeste travail est l'occasion pour moi de te manifester ma gratitude.

Nous aurions voulu te voir là assise en ce jour solennel, mais Dieu en a décidé autrement. Dors en paix très chère Mamou, et que Dieu t'accueille dans son paradis *Amen!*

A mon père, Dramane Keita

Ton affection et ton soutien sans cesse ont fait de moi ce que je suis. Cher papa ce travail modeste qu'il soit, est le fruit de ta rigueur dans le travail de l'enseignement et de l'éducation que nous avons reçu de toi. Que le tout puissant t'accorde une longue vie, de santé et de bonheur.

A ma mère, Kadiatou Sogoba

Tu nous as toujours éduqués avec la rigueur d'une mère de famille exemplaire. Tu nous as soutenus avec ton amour maternel. Que Dieu le Clément t'accorde une bonne santé, longévité et bonheur.

A mes sœurs : Fatoumata, Salimata, Soundiè

Vous m'avez entouré de chaleur familiale, je ne saurais jamais vous remercier assez pour vos soutiens.

A ma cousine Awa Dembélé pour son soutien constant.

A mes frères : Sidi, Abdoulaye, Chaka, Daouda, Badra Alou, Sékou, Mamadou

Vous m'aviez assisté avec respect et spontanéité, je vous en suis chaleureusement reconnaissant. Que Dieu vous donne la chance et le courage de faire toujours mieux que moi.

A mon oncle Modibo Wally Sylla

Avec ta rigueur dans le travail, tu nous as suivis dans notre enseignement et notre éducation. Malgré tes multiples occupations tu as été toujours présent à nos côtés. Qu'ALLAH le tout Puissant t'accorde une longue vie de santé et de bonheur.

A Mr Wally Sylla et la grande famille Sylla au Point-G

Pour m'avoir assisté avec patience et altruisme. Recevez ici toute notre gratitude et soyez rassurés de mon fidèle attachement.

A mes oncles : Sidi Yaya Sylla, Demba Dembélé, Amadou Cheick Traoré, Daouda Sylla, Mady Keita, Fodé M Keita, Adama Keita, Moro Keita, Moussa Drabo, Seydou Ouattara, Ousmane Diarra, Abdou Sacko.

A mes tantes : Rokia Berthé, Sanaba Sylla, Oumou Sylla, Mako Sylla, Yayi Touré, Ami Diallo, Mariam Dembélé, Korotoumou Traoré, Adiaratou Sogoba, Assan Sogoba, Koumba Doumbia, Koura Doumbia, Oumou Sogoba, Awa Keita, Oumou Keita, Rokia Doumbia, Assétou Togo, Adiara Sylla, Dialia Diarra.

A mes grand-mères feu Mah Sogoba, Fanta Cissé, Kadia Goita, Maimouna

REMERCIEMENTS

A tous les enseignants de la FMPOS, pour la qualité de l'enseignement que nous avons reçu d'eux.

A l'équipe de Sotuba Malaria Center (SMC) pour leur confiance.

A mes Maîtres: Pr Amagana DOLO, Pr Alassane DICKO, Dr Abdoulaye DJIMDE, Dr Mouctar DIALLO, Dr Mamadou DIAKITE, Dr Amed OUATARA, Dr Kassoum KAYENTAO, Dr Issiaka SAGARA, Mr Ousmane TOURE, Dr Habib BEAVOGUI, Dr Moussa SOGOBA, Dr Bakary MAIGA, Dr DOUMBO Safi NIARE, Dr Mamadou TEKETE, Dr ONGOIBA Aissata ONGOIBA, Dr DOUMTABE Didier, Dr Aboubacar A. OUMAR, Dr Abdoulaye KATILE, Dr Sory DIAWARA, Dr Falaye KEITA, Mr Mamadou WELE, Mr Mamadou BA, Mr Seydou DIARRA, Mr Amadou ABATINA.

Au Pr Abdoulaye DABO : plus qu'un maître, vous avez été comme un père pour moi. Je ne pourrais jamais vous remercier assez pour votre bienveillance, votre disponibilité et votre sens élevé de l'humanité.

Au Pr Moussa HARAMA : pour votre soutien et vos encouragements, merci grand père.

Au Pr Mahamadou Aly THERA : nous ne saurions jamais vous remercier assez de votre soutien et de votre engagement. Recevez ici l'expression de toute notre reconnaissance, soyez rassurés de notre fidèle attachement.

Au Dr Issa Diarra : sans votre soutien et votre engagement ce travail n'aurait pu être réalisé, les mots nous manquent pour vous exprimer toute notre reconnaissance, nous vous disons un grand merci.

Aux docteurs: Modibo DAOU, Charles ARAMA, Souleymane DAMA, Antoine DARA, Ousmane KANTE, Cheick O KONE, Brehima DIALLO, Agnès GUINDO, Jacob DARA, Amadou NIANGALY, Abdourahamane SALL, Kourané SISSOKO, Amadou Tapily, Samba KOUMARE, Hamidou TRAORE, Drissa Guindo, Nana Kodio, et Mr Moussa B. DEMBELE, pour votre entière disponibilité, votre soutien, et votre sympathie. Ce travail est le vôtre. Je vous en suis sincèrement reconnaissant.

Aux docteurs: Drissa COULIBALY, Abdoulaye K. KONE, Ando GUINDO, Karim TRAORE, Youssouf TOLO, Paul KAMATE, Younouss KONE, Abdoulaye TAPILY, Seydou ARAMA, Mohamed Ag Bareika, Idrissa ML TRAORE, Modibo D DIARRA, Amadou Dèmbelé, Moussa Diakité, Mohamed Aly Fofana, Mr George A DARA, Mr Sékouba KEITA, Mr Sintri SANOGO, et Mr Moussa DIAKITE.

Vous n'aviez ménagé aucun effort pour la réussite de ce travail. Retrouvez ici notre profonde gratitude. Ce travail est le votre.

A mes cadets: Djeneba FOFANA, Oumar T DIARRA, Bourama COULIBALY

A tous les camarades de classe de Pharmacie de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie de l'université de Bamako, Mali.

Aux gestionnaires et comptables: Mr Danzélé COULIBALY, Mr Mouctar TRAORE, Mr Cheick Oumar COULIBALY, Mr Amadou ARAMA, Mr Sékouba MARIKO, Mme Assa DAMBA et Mr Sékou DOUMBO.

A tous les internes du MRTC/DEAP.

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

A tout le personnel du MRTC/DEAP.

A tous les chauffeurs du MRTC / DEAP

A tous les partenaires du MRTC/DEAP.

A tout le personnel du centre de santé de Sotuba.

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

Aux autorités et notables et à toute la population de Sotuba

Aux familles : Sylla, Diarra, Sacko, Diallo, Ouattara, Ballo, Koné, Diabaté, Sangaré Coulibaly, Bagayoko, et Fofana de Point-G.

Aux familles : Dembélé de Korofina, Traoré de Sabalibougou, Keita de Sebenikoro, Keita de Lafiabougou, Sogoba de Lafiabougou.

A mes cousins et cousines

Pour tous les efforts consentis ; recevez ici l'expression de toute ma reconnaissance, soyez rassurés de mon profond attachement.

A mes amis, camarades, parents et connaissances :

Dr Aichata Koné, Dr Souleymane Coulibaly, Dr Issiaka ML Traoré, Dr Abdoul K Berthé, Dr Zoumana Traoré, Fanta Sangaré, Abdoulaye Bagayoko, Arouna Coulibaly, Siramoussa Dembélé, Abdramane Diarra, Makan Diallo, Ibrahim Coulibaly, Boubacar B Maiga, Alpha Madani Koné, Yakou Diarra, Sokona Touré, Aicha Diabaté, Aicha Diallo, Aichata Sylla, Mariam Sylla, Djeneba Sylla, Fousseyni Sylla, Tenemakan Dao, Dr Boubacar Diamouténé, Bakary Dembelé Mamadou Lamine Sylla, Adama Coulibaly, Oudou Coulibaly, Lassine Ouattara, Salia Traoré, Sidiki Sangaré, salif Diarra.

A tous les membres de la Jeunesse-Union-Africaine (JUA) pour leur soutien constant.



HOMMAGE AUX MEMBRES

DU JURY

Hommages aux membres du jury

A notre Maître et président du jury

Professeur Anatole TOUNKARA

Professeur titulaire d'immunologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie.

Doyen de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie

Directeur du Centre de Recherche et de Formation sur le Sida et la Tuberculose (SEREFO).

Cher Maître, c'est un grand honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury malgré vos multiples occupations. Votre rigueur scientifique, votre amour pour le travail bien fait et votre honnêteté nous ont toujours fascinés et font de vous un homme admiré et respecté de tous.

Recevez ici nos sincères remerciements et notre plus grand respect.

A notre Maître et juge

Professeur Boubacar TRAORE

Maître de conférences de Parasitologie-Mycologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie.

Chef de l'unité « Paludisme et Grossesse » du MRTC /DEAP.

Cher Maître, c'est une chance pour nous de vous compter parmi les membres de ce jury malgré vos multiples occupations. Nous avons été impressionnés par votre qualité scientifique, votre disponibilité et la simplicité avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail. Trouvez ici cher Maître l'expression de nos sincères remerciements.

A notre Maître et juge

Docteur Mahamadou Soumana SISSOKO

Coordinateur du Cours Supérieur d'Epidémiologie pour cadres supérieurs de la santé en Afrique.

Chercheur au MRTC/DEAP de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie.

Les mots nous manquent pour vous exprimer toute notre joie de vous compter parmi les membres de ce jury. Cher Maître, votre rigueur scientifique, votre disponibilité et votre sollicitude vis à vis de vos élèves témoignent votre sens élevé de l'humanité. Nous vous remercions d'avoir autorisé l'utilisation des données de cette étude dont vous êtes le chercheur principal.

Veuillez accepter cher Maître l'expression de toute notre reconnaissance et notre plus grand respect.

A notre Maître et co-directeur de thèse

Docteur Bourema KOURIBA

Maître Assistant d'Immunologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie.

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

Responsable Assurance qualité du centre National de Transfusion Sanguine du Mali

Permettez-nous de vous remercier cher Maître de la confiance que vous nous avez faite en nous confiant ce travail.

Nous avons toujours admiré vos qualités scientifiques et sociales.

Vous avez cultivé en nous le sens du travail bien fait et la rigueur scientifique.

Recevez ici cher Maître toute notre reconnaissance et nos sincères remerciements.

Soyez rassurés de notre entière disponibilité.

A notre Maître et Directeur de thèse

Professeur Ogobara K. DOUMBO

Professeur Titulaire de Parasitologie-Mycologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie.

Médecin chef du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires, (DEAP).

Directeur du Pôle d'Excellence de Recherche sur le Paludisme, Malaria Research and Training Center (MRTC).

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

Membre honoraire « Alpha Oméga Alpha Honor Medical Society » des États Unis d'Amérique.

Permettez-nous de vous remercier cher Maître, pour la confiance que vous nous avez faite en nous acceptant dans votre centre.

Votre rigueur scientifique, votre persévérance et votre dévouement constant pour un travail bien fait, font de vous un chercheur émérite.

Les mots nous manquent pour vous exprimer toute notre gratitude, nous vous disons tout simplement MERCI.

Que le Seigneur vous rende vos bienfaits et qu'il nous permette de vous rendre hommage en ayant la force, le courage et la chance de suivre vos pas.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

	Pages
LISTE DES ABREVIATIONS.....	1
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES.....	3
I- INTRODUCTION.....	5
II- OBJECTIFS.....	7
1- Objectif général.....	7
2- Objectifs spécifiques.....	7
III- GENERALITES.....	8
1- Cycle biologiques du <i>Plasmodium falciparum</i> et les points d'interaction avec le système immunitaire.....	8
2- Quelques aspects immunologiques de l'infection palustre.....	12
2.1- Immunité innée ou naturelle.....	12
A- Les cellules de l'immunité innée	13
B- Les molécules de l'immunité innée.....	16
2.2- Immunité adaptative ou acquise	16
3. L'antigène <i>Merozoite Surface Protein-3</i> (MSP-3).....	21
3.1. Historique.....	21
3.2. Description.....	21
IV- METHODOLOGIE.....	24
1. Lieu d'étude.....	24
2. Type et période d'étude.....	26
3. Population d'étude et échantillonnage.....	26
4. Critères d'inclusion.....	26
5. Critères de non inclusion.....	26
6. Les techniques de laboratoire.....	26
6.1. Le prélèvement sanguin et préparation des échantillons biologiques.....	26
6.2. Dosage des anticorps sériques.....	27

6.3. Evaluation de la reconnaissance de MSP-3 natif par les IgG sériques spécifiques : technique de Western-blot ou immuno-empreinte.....	26
7. Considérations éthiques.....	34
8. Collecte, saisie et analyse des données.....	34
V- RESULTATS.....	35
VI- DISCUSSION.....	32
VII- CONCLUSION.....	47
VIII- RECOMMANDATIONS.....	48
IX- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	49
RESUME.....	63
ANNEXES.....	66

LISTE DES ABREVIATIONS

ADCC: Antibody Dependant Cell mediated Cytotoxicity
ADCI : Antibody Dependant Cellular Inhibition
ADN: Acide désoxyribonucléique
AMA-1: Apical Membrane Antigen 1
AMANET: Africain Malaria Network Trust
CD: Cluster of Differentiation
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CRF: Case Report Form
CSP: Circumsporozoite Protein
DEAP : Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires
EBA: Erythrocyte-Binding-Antigen
ELISA: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
GCP: Good Clinical Practice
GLP: Good Laboratory Practice
GLURP: Glutamate-Rich Protein
GPI: Glycosyl Phosphatidyl Inositol
HLA: Human Leucocyte Antigen
IFN γ : Interféron gamma
IFN α : Interféron alpha
IFN β : Interféron beta
IgA: Immunoglobuline A
IgE: Immunoglobuline E
IgG: Immunoglobuline G
IgM: Immunoglobuline M
IL: Interleukine
kDa: Kilo Dalton
LSA: Liver Stage Antigen
LSP: Long Synthetic Peptide
MRTC: Malaria Research and Training Center

MSP-1 : Merozoite Surface Protein 1

MSP-2 : Merozoite Surface Protein 2

MSP-3 : Merozoite Surface Protein 3

MSP-4 : Merozoite Surface Protein 4

MSP-5 : Merozoite Surface Protein 5

MSP-6 : Merozoite Surface Protein 6

NK cells: Natural Killer cells

NO: Nitric Oxide

Pfs25: Plasmodium falciparum ookinete surface antigen p25

Pvs28: Plasmodium vivax ookinete surface antigen p28

SOP: Standard Operating Procedure

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

SPf66: Synthetic polypeptid *Plasmodium falciparum* p66

TBVs: Transmission Blocking Vaccines

Th: T helper

TIE : Taux d'Inoculation Entomologique

TRAP: Thrombospondin Related Adhesive Protein

WB: Western-blotting

WHO: World Health Organization

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

	Pages
Tableau I : La répartition de la population d'étude selon l'âge et le sexe.....	35
Tableau II : Répartition des enfants de l'étude selon leur séropositivité IgM anti-MSP-3 LSP et selon les classes d'âge.....	36
Tableau III : Répartition des enfants de l'étude selon leur séropositivité IgG anti-MSP-3LSP et selon les classes d'âge.....	36
Tableau IV: Répartition des enfants de l'étude selon la réponse en IgG et IgM anti-MSP-3	37
Tableau V : Répartition des enfants de l'étude selon le résultat du Western-blot	39
Tableau VI : la moyenne des concentrations en IgG et IgM en fonction de l'âge.....	39

Figure 1 : Cycle biologique du <i>Plasmodium</i> et les points d'impact de l'immunité.....	11
Figure 2 : Schéma de l'Inhibition cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCI)....	19
Figure 3 : Schéma <i>Merozoite Surface Protein-3</i> (MSP-3) de <i>P.falciparum</i>	23
Figure 4 : Localisation du village de Sotuba par rapport à la Ferme.....	25
Figure 5 : Différentes étapes de l'ELISA indirecte.....	27
Figure 6 : Aspects de la culture de <i>Plasmodium falciparum</i> 3D7 pour la préparation d'extrait d'antigène MSP-3 natif.....	29
Figure 7 : Résultat de western blot réalisé avec un extrait de <i>Plasmodium falciparum</i> 3D7 et des sérums d'enfants de l'étude.....	33
Figure 8 : Localisation des cas de Séropositive en IgG ou en IgM anti MSP3 dans le à Sotuba.....	38
Figure 9 : Comparaison des concentrations en IgG spécifique de l'antigène MSP-3 en fonction de l'âge des enfants de l'étude	40
Figure 10 : Comparaison des concentrations en IgM spécifique de l'antigène MSP-3 en fonction de l'âge des enfants de l'étude	41
Figure 11: La corrélation entre les concentrations en IgG et IgM spécifiques de l'antigène MSP-3.....	42



INTRODUCTION

Le paludisme représente une menace pour près de 2 à 3 milliards de personnes dans le monde, avec 247 millions de cas de paludisme clinique rapportés par an. La mortalité liée à la maladie était de 881 000 personnes par an. Les couches vulnérables sont constituées surtout des enfants de moins de 5 ans, les femmes enceintes et les sujets non prémunis. En effet le paludisme tue un enfant toutes les 30 secondes dans le monde, la plupart en Afrique au sud du Sahara. Il est responsable d'anémie au cours de la grossesse et de petits poids de naissance [100].

En Afrique 30% des admissions hospitalières en pédiatrie et 40% des consultations au dispensaire ont pour cause le paludisme [71]. La mortalité infantile et maternelle due au paludisme y est élevée. Cette maladie frappe surtout les pauvres qui vivent en zones rurales dans des habitations qui ne les protègent guère contre les piqûres des moustiques. En débilisant les bras valides et réduisant ainsi leur productivité, la maladie ne fait que les appauvrir encore plus. En 1997 la Banque Mondiale a estimé à 2 milliards de dollar la perte économique que le paludisme inflige à l'Afrique [101].

Au Mali, selon le programme National de Lutte contre le Paludisme les fièvres palustres représentent 34% des consultations externes dans les structures de soins du pays [79].

L'homme acquiert une immunité protectrice dite « prémunition » non stérilisante et dépendante de l'exposition et de l'âge [88]. Dans les conditions naturelles, l'acquisition de la prémunition est fortement accélérée chez les individus vivant en zones de forte transmission du paludisme.

Face à cette endémie dont les effets pèsent sur les économies déjà précaires des pays concernés plusieurs stratégies de lutte ont été mises en œuvre avec des succès limités. La stratégie vaccinale offre une perspective de contrôle efficace et durable du paludisme. Un vaccin induisant une immunité stérilisante et durable est un outil idéal de contrôle du paludisme. Les études effectuées dans différents faciès épidémiologiques montrent qu'un vaccin est possible.

Plusieurs antigènes candidats vaccins ont été identifiés [33,71]. Certains ont fait l'objet d'essais cliniques au Mali. C'est le cas de l'antigène MSP-3 qui est en cours d'essai à Sotuba en zone périurbaine de Bamako. L'un des obstacles au développement de vaccin est le fait que les mécanismes effecteurs de l'immunité protectrice naturellement acquise contre le paludisme ne sont pas totalement élucidés [29,30]. La compréhension de l'immunité protectrice naturellement induite par un antigène est essentielle à son développement vers un vaccin efficace. Le MSP-3 est un antigène de la surface du mérozoïte qui a été identifié comme induisant des anticorps protecteurs chez les personnes vivant en zone d'endémie [4, 72,73]. Il semble que l'immunité induite par l'antigène MSP-3 s'acquiert lentement chez les jeunes enfants ce qui expliquerait leur sensibilité à l'infection palustre. Aucune étude n'avait été effectuée au Mali, sur la réponse naturelle anticorps contre MSP-3 alors qu'un essai vaccinal a débuté en collaboration avec l'institut Pasteur et AMANET.

Y a-t-il une réponse anticorps naturellement acquise chez des enfants vivants dans une zone de transmission faible du paludisme ? C'est la question de recherche de cette étude dont le but est d'analyser la réponse anticorps naturelle contre MSP-3 chez des enfants âgés de 1 à 4 ans.



OBJECTIFS

1. Objectif général

Etudier la réponse anticorps naturelle spécifique de MSP-3-LSP de *Plasmodium falciparum* chez les enfants âgés de 1 à 4 ans vivant en zone de transmission faible du paludisme à Sotuba.

2. Objectifs spécifiques

- Déterminer les taux sériques d'IgG spécifiques de MSP-3 LSP chez les enfants de 1-4 ans à Sotuba.
- Déterminer les taux sériques d'IgM spécifiques de MSP-3 LSP chez les enfants de 1-4 ans à Sotuba.
- Analyser la reconnaissance de la protéine native MSP3 par les anticorps IgG anti-MSP3 LSP chez les enfants de 1 à 4 ans à Sotuba.



GENERALITES

Le paludisme constitue un problème majeur de santé publique. Les outils utilisés jusqu'à présent dans le contrôle de cette maladie ont montré leur limite compte tenu de la complexité du cycle de vie de l'agent pathogène, le *Plasmodium*, échappant souvent au contrôle du système immunitaire de l'hôte [70].

Le paludisme humain est essentiellement causé par quatre espèces du genre *Plasmodium* : *Plasmodium falciparum* qui est de loin l'espèce la plus dangereuse, responsable des complications mortelles du paludisme, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* [70].

Une cinquième espèce *Plasmodium knowlesi* a été décrite comme pouvant infecter l'homme [21].

Parmi ces différentes espèces, *P. falciparum* est la plus répandue et la plus meurtrière car responsable des formes sévères. Le paludisme maladie est une immunopathologie.

Les mécanismes protecteurs de l'immunité contre le paludisme sont variés et étroitement liés à la diversité des antigènes du cycle de vie du *Plasmodium* ; d'où la nécessité d'étudier cette réponse immunitaire spécifique des différents stades de développement du parasite [9, 53,74]

1. Cycle biologiques du *Plasmodium falciparum* et les points d'impact de l'immunité

Dans la nature, le *Plasmodium* a deux hôtes : le moustique femelle du genre *Anopheles* chez lequel se déroule le cycle sexué ou sporogonique et l'hôte vertébré chez qui se déroule le cycle asexué ou schizogonique. Au cours de son développement chez l'homme, le *Plasmodium* passe par différents stades et expriment des antigènes divers [50].

Chaque antigène exprimé entraîne une réponse immunitaire spécifique, ce qui conduit à une multiplication des mécanismes immunitaires adaptatifs induits. La complexité du cycle biologique du *Plasmodium*, la diversité et la variabilité

antigénique induisant des réponses immunes diverses rendant difficile le développement d'un vaccin [50]. Par ailleurs il n'y a pas de marqueurs biologiques de protection !

De façon générale, le cycle biologique du Plasmodium comprend 3 phases successives.

1.1. Une phase pré-érythrocytaire ou phase hépatique

Le sporozoïte, forme infestante du parasite est injecté à l'homme avec la salive du moustique lors de son repas sanguin. Ces sporozoïtes gagnent rapidement le foie à travers la circulation sanguine et pénètrent dans les hépatocytes. Dans ces cellules, chaque sporozoïte se développe, se transforme en trophozoïte puis en schizonte. A maturité le schizonte appelé corps bleu éclate et libère environ 20.000 à 30.000 mérozoïtes de première génération dans la circulation sanguine. Le sporozoïte injecté peut être la cible d'anticorps qui sont capables d'inhiber sa pénétration dans les hépatocytes ou de ralentir leur développement intra-hépatocytaire (blocage de l'invasion des hépatocytes). Les hépatocytes infectés peuvent aussi être la cible des cellules immunitaires comme les macrophages, les cellules NK et les lymphocytes T cytotoxiques. En effet le sporozoïte exprime des antigènes Circumsporozoïte Protein (CSP) et Thrombospondin Related Adhesive Protein : (TRAP) inducteurs de réponse humorale et cellulaire. Le LSA (Liver Stage Antigène) est un antigène du stade hépatique. Cette réponse si elle est efficace assure une immunité stérilisante qui est difficile à obtenir dans l'infection palustre.

1.2. Une phase érythrocytaire qui correspond à l'invasion des globules rouges

Les mérozoïtes une fois libérés par l'hépatocyte pénètrent activement dans les érythrocytes, où ils se transforment en trophozoïtes puis en schizontes.

A maturité le schizonte éclate et libère des mérozoïtes de deuxième génération qui vont infecter à nouveau d'autres globules rouges et entretenir le cycle érythrocytaire. Cette phase du cycle biologique correspond à la phase d'expression clinique du paludisme. L'immunité peut intervenir pour bloquer

l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes issues du foie. Ceci par le biais des anticorps qui peuvent aussi inhiber la croissance des trophozoïtes en schizontes. Les globules rouges infectés peuvent être la cible des cellules phagocytaires. Au cours de cette phase le *Plasmodium* exprime des antigènes dont plusieurs ont été identifiés comme AMA-1, MSP-1, MSP-2, MSP3, GLURP, EBA. A cette phase l'immunité peut aussi affecter l'expression clinique de l'infection (immunité clinique).

1.3. Une phase sexuée qui se déroule chez l'anophèle

Après plusieurs cycles asexués schizogoniques, certains mérozoïtes se différencient en élément à potentiel sexuel, les gamétocytes mâles ou femelles. Le moustique du genre *Anopheles* au cours d'un repas sanguin sur un sujet porteur de formes sexuées absorbe les gamétocytes mâles et femelles. Le gamétocyte mâle se transforme par exflagellation en microgamètes alors que le gamétocyte femelle se transforme en un macrogamète. La fécondation d'un macrogamète par un microgamète donne naissance à un zygote puis à l'ookinète (œuf mobile) qui traverse la paroi de l'estomac du moustique formant à l'extérieur de la surface externe, l'oocyste dans lequel s'individualisent les sporozoïtes qui sont libérés par l'éclatement de l'oocyste mur. Les sporozoïtes gagneront avec prédilection les glandes salivaires de l'anophèle (où ils subissent une maturation), qui les injecte à l'homme à l'occasion d'un autre repas sanguin. L'immunité en particulier les anticorps humains peuvent inhiber l'exflagellation et la fertilisation des gamètes chez le moustique vecteur ou la formation de zygotes (anticorps bloquant la fécondation, anticorps bloquant la migration de l'ookinète). C'est l'immunité bloquant la transmission du paludisme.

Des antigènes spécifiques de cette phase ont été décrits : Pfs28, Pfs25, Pfs230 et Pfs48/45 [34].

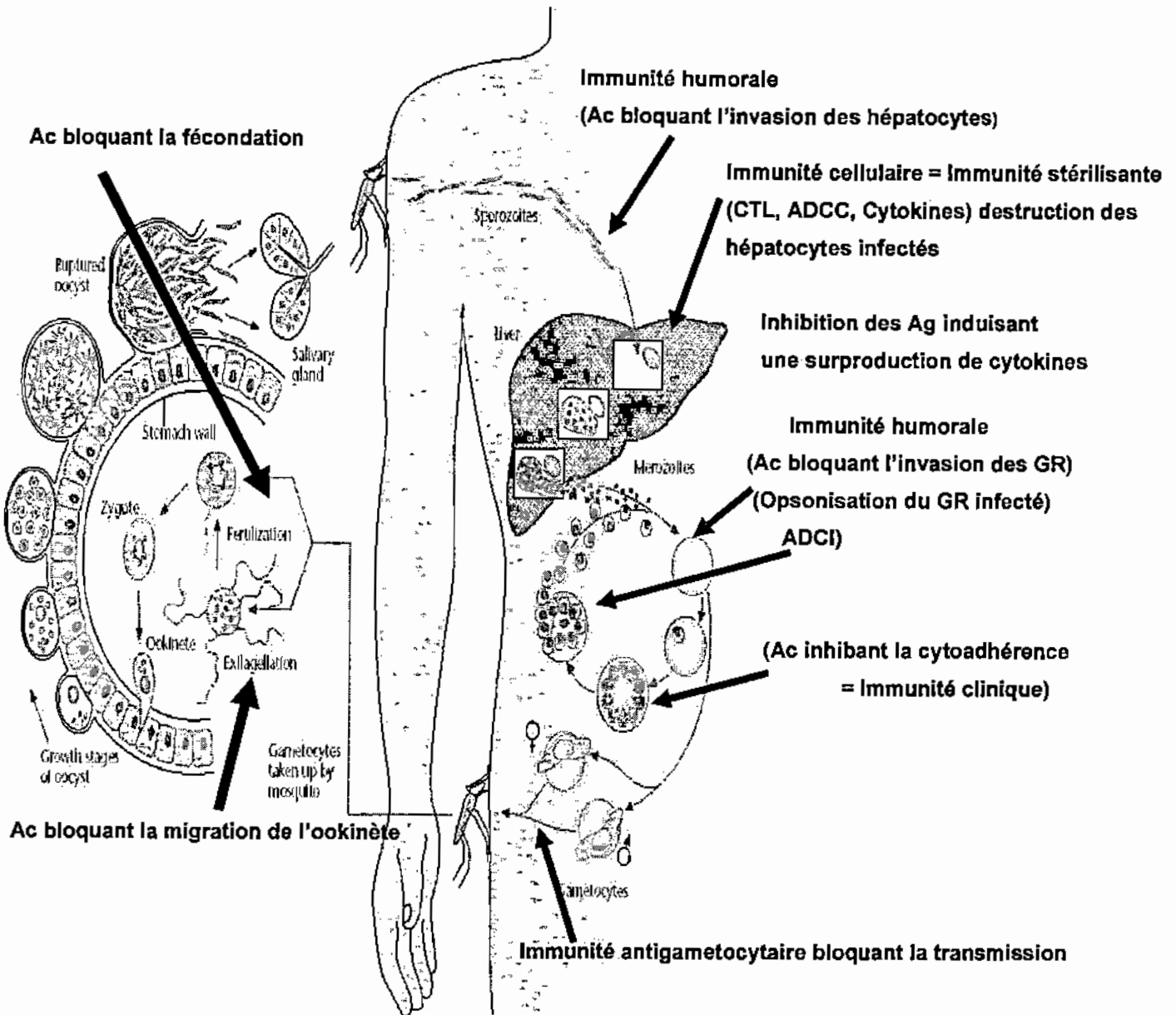


Figure 1 : Cycle biologique du *Plasmodium* et les points d'impact de l'immunité. Adapté de Sherman I W, Encyclopedia of life science © 2001 Nature Publishing Group. Ac: Anticorps; Ag: Antigène; CTL: Cytotoxic T Lymphocyte; ADCC: Antibody Dependant Cell mediated Cytotoxicity; ADCl: Antibody Dependant Cellular Inhibition; GR: Globule Rouge

2- Quelques aspects immunologiques de l'infection palustre

Le *Plasmodium* induit des réponses immunitaires chez l'hôte qui sont régulées par le système immunitaire inné et adaptatif mais aussi par les facteurs environnementaux. L'immunité acquise naturellement dépend des espèces parasitaires mais aussi des stades de développement spécifiques du parasite [58, 93].

Dans les régions endémiques, les enfants nés des mamans prémunies sont protégés contre le paludisme durant les 3-4 premiers mois après leur naissance. En général, l'acquisition de l'immunité protectrice contre le paludisme est lente et demande une exposition intense et répétée au parasite pour son maintien. La variabilité génétique de l'hôte et du *Plasmodium* rend instable cette immunité [58,88].

2.1- Immunité innée ou naturelle

Les mécanismes humoraux et cellulaires de cette immunité « non spécifique » sont moins bien définis. Le mécanisme d'activation du macrophage chez les mammifères à travers les « *Toll-Like-Receptors* » conduisant à l'induction des gènes effecteurs des défenses innées a été largement étudié chez un grand nombre de bactéries et de virus. Ce mécanisme semble intervenir également dans les infections causées par les parasites [1].

L'infection palustre induit une augmentation des concentrations sériques d'immunoglobulines non spécifiques. C'est une activation des cellules B polyclonales [20]. Les cellules de l'immunité innée comme les cellules tueuses naturelles (NK cells), les cellules dendritiques, et les cellules T $\gamma\delta$ sont impliquées dans la clairance des parasites et des érythrocytes infectés et l'élimination des hépatocytes infectés [43]. Les neutrophiles, monocytes et les macrophages participent à la phagocytose, à la cytotoxicité et à l'inhibition du parasite [98]. Les cellules NK stimulent la production de l'IFN γ qui active le macrophage conduisant ainsi à la lyse des cellules parasitées [62]. Les lymphocytes T gamma delta ($\gamma\delta$ T) semblent jouer un rôle protecteur pendant la

phase précoce de l'infection palustre indiquant une contribution de l'immunité innée dans le contrôle de la parasitémie [84].

L'immunité innée ou naturelle est assurée par les cellules, les molécules, et les enzymes (lysozymes). Ces cellules sont composées de monocytes/macrophages, de polynucléaires neutrophiles, de cellules NK, de cellules T gamma delta, et de cellules dendritiques. Le complément, les chémokines et les interférons (IFN α , IFN β) constituent les principales molécules de l'immunité innée jouant un rôle clé dans l'immunité anti-palustre. Cependant il n'existe pas un consensus sur le rôle protecteur ou pathogénique du complément.

Les principales enzymes impliquées dans la protection contre le paludisme constituent les lysozymes retrouvés dans les cellules phagocytaires.

A- Les cellules de l'immunité innée

✓ **Macrophages/Monocytes**

Il a été rapporté que les monocytes et les macrophages sont les principales cellules qui jouent un rôle important dans la défense contre le *Plasmodium* et sont responsables de la clairance des formes sanguines circulantes du parasite [41]. Les monocytes du sang périphérique et les macrophages spléniques et hépatiques présentent une activité phagocytaire considérable vis-à-vis des érythrocytes infectés surtout en présence d'anticorps spécifiques du parasite [41, 66]. Les monocytes incubés avec des anticorps anti-plasmodium sont capables de réduire de 80% la croissance in vitro de *Plasmodium falciparum* [67].

✓ **Neutrophiles**

Les **granulocytes neutrophiles** ou **polynucléaires neutrophiles** (PNN) ou simplement « les **neutrophiles** » sont des cellules sanguines appartenant à la lignée blanche (leucocytes), qui ont donc un rôle dans le système immunitaire. On les appelle polynucléaires de part le caractère polylobé de leur noyau (de deux à cinq lobes en général), on a longtemps cru que ces cellules possédaient plusieurs noyaux. Le qualificatif de « neutrophile » vient aussi d'une caractéristique visible en microscopie optique : après ajout des colorants vitaux usuels, ces cellules restent neutres (elles fixent les colorants acides et basiques).

Les neutrophiles représentent environ 65 % de l'ensemble des leucocytes du sang, et 99 % des granulocytes.

Ces cellules jouent le rôle de phagocytose tout comme le macrophage et les monocytes, également rôle de contrôle immunitaire. Le rôle protecteur du neutrophile a été rapporté dans le model animal [78]. Cependant le rôle du neutrophile dans l'immunité anti-palustre n'est pas bien étudié chez l'homme.

✓ Les cellules T gamma delta ($\gamma\delta$ T)

Ce sont des lymphocytes T CD3+ qui expriment à leur surface le TCR à chaînes γ et δ . Environ 75% de ces cellules ont dans la partie variable de leurs TCR V γ 9 et V δ 2 et 25% expriment plutôt V δ 1 associé à des V γ variés. L'activation des cellules $\gamma\delta$ T en *ex-vivo* inhibe la réplication des parasites intra-érythrocytaires, ce qui explique leur fonction effectrice au cours de l'immunité innée [35]. Après activation les cellules $\gamma\delta$ produisent des cytokines pro-inflammatoires: IFN γ , TNF- α , IL-17 et favorise le développement d'une réponse de type Th1 [99]. Elles se dégranulent et libèrent les molécules toxiques: perforine et granzyme.

Ce sont des cellules de l'immunité innée productrices d'IFN- γ et de TNF- α qui sont impliquées dans l'immunité antivirale [24]. La relation entre les lymphocytes T $\gamma\delta$ et la protection contre paludisme chez l'adulte a été démontrée par certains travaux [27]. Ces cellules sont capables de reconnaître des molécules produites par *P. falciparum*. Elles sont notamment activées par des phospho-antigènes non peptidiques de *P. falciparum* [10,39]. La stimulation *in vitro* des PBMCs d'individus non exposés au paludisme par un extrait de *P. falciparum* résulte en l'activation des lymphocytes T $\gamma\delta$. La majorité des cellules activées sont V γ 9V δ 2. Les cellules $\gamma\delta$ provenant de sujets non exposés sont capables d'inhiber la croissance des parasites dans les érythrocytes *in vitro* [94]. Elles sont capables de produire de l'IFN- γ et sont cytotoxiques vis-à-vis des érythrocytes infectés [37, 89]. Les cellules $\gamma\delta$ sont également dans le sang de cordon [17,63]

L'exposition *in utero* au paludisme modifierait la fréquence des cellules $\gamma\delta$ (par déplétion) dans le sang de cordon et pourrait ralentir le développement d'une immunité antipaludique chez le jeune enfant [63].

✓ Les cellules tueuses naturelles (cellules NK)

Ce sont des lymphocytes non T (CD3-), non B (CD19-); caractérisés chez l'humain par le marqueur CD56 et CD16. Ce sont des cellules de l'immunité innée capables de cytotoxicité naturelle. Elles sont des lymphocytes présents dans le sang, les organes lymphoïdes et les tissus périphériques [38]. Elles sont impliquées grâce à des récepteurs de surface, dans la reconnaissance directe des cellules ayant subi un stress infectieux ou tumoral [90]. Les lignées NK sont capables de former des rosettes avec les globules rouges infectés, ce qui suggère l'existence d'un ou de plusieurs récepteurs sur les cellules NK impliquées dans la reconnaissance directe des érythrocytes infectés. Des études ont suggéré une cytotoxicité des cellules NK contre des érythrocytes infectés de *P. falciparum* [59, 74]. Elles interviennent dans la production d'IFN γ et d'IL-12 qui est critique pour le développement des cellules CD8⁺ effectrices [31, 32]. Il a été indiqué que la réponse immunitaire précoce de volontaires sains non immuns infectés par une souche de *P. falciparum* inoculée par piqûre de moustique serait associée à un taux sérique de granzyme A, d'IFN γ , de l'IL-12 et de l'IL-8. Les cellules NK semblent être les sources principales de ces molécules [5, 42,81]. Les mécanismes moléculaires de l'activation des cellules NK et leur rôle dans le contrôle des formes érythrocytaires ne sont pas totalement élucidés.

✓ Cellules dendritiques

Cellules du système immunitaire qui présentent dans certaines conditions, comme leur nom l'indique, des dendrites (des prolongements cytoplasmiques). Ce sont des leucocytes spécialisés dans la capture, l'apprêtement et la présentation des antigènes aux lymphocytes. Ces cellules peuvent être classées en fonction de leur localisation en cellules de Langerhans (peaux et muqueuses), cellules dendritiques interstitielles (cœur, poumons, foie, rein, tractus gastro-intestinal), cellules dendritiques interdigitées (zones des cellules T du tissu lymphoïde secondaire et de la médullaire du thymus) et cellules dendritiques circulantes ou cellules voilées (sang et lymphe). Mais selon leur phénotype deux types de cellules dendritiques sont définies : les cellules dendritiques myéloïdes (mDC) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) en référence à leur

ressemblance avec les plasmocytes. Les mDC sont subdivisé selon les marqueurs de surface en 3 types distincts: CD4+ DC, CD8+ DC et CD4-CD8- DC. Les pDC expriment un récepteur particulier appelé PDCA (Plasmacytoid Dendritic Cells Antigen) .Les cellules dendritiques ont la capacité d'amorcer l'activation des lymphocytes T naïfs [54]. Bien que leur rôle dans la direction de la réponse immunitaire n'est pas totalement élucidé des travaux montrent que les pDC induiraient une réponse de type Th2 alors que les mDC favoriseraient une réponse de type Th1. Le rôle des cellules dendritiques dans l'immunité anti-palustre n'est pas encore bien clarifié [12, 86, 103, 104].

B- Les molécules de l'immunité innée.

On peut citer : le complément, les chémokines (IL-8), les Interférons, les lysozymes et l'oxyde nitrique (NO). Le rôle du complément n'est pas totalement élucidé. Il a été observé en Afrique de l'Ouest que les enfants souffrant de paludisme à *P falciparum* présentaient un faible taux de C3. Des études suggèrent que la formation des immuns complexes par des antigènes solubles du parasite est probablement la cause de l'activation du complément. On estime que le complément activé se fixe à des immuns complexes ; ces derniers se lient à la surface des parasites et entraînent leurs lyses par le biais du complexe d'attaque membranaire [28].

Le rôle de l'oxyde nitrique (NO) a été également décrit. En effet la production des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN γ , induit la synthèse de NO. Ce dernier inhibe le développement du parasite à ses différents stades de développement, y compris les stades asexués qui sont responsables de la maladie [16, 91].

2.2- Immunité adaptative ou acquise

Ce sont les travaux de Robert Koch en 1900 effectués dans deux populations différentes vivant dans une zone de transmission forte et faible de paludisme qui ont permis de montrer l'existence d'une immunité acquise protectrice contre cette infection. Cette immunité n'est pas stérilisante car en zone d'endémie de transmission stable de paludisme le portage du parasite sans manifester les

signes cliniques est fréquent. Cet état immunitaire qui permet de contrôler la parasitémie à un seuil sans manifestation clinique a été appelé prémunition par les frères Sergents [29]. De nombreux travaux en zone d'endémie ont montré 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 les réponses humorales mais aussi celles à médiations cellulaires [29].

➤ Réponses humorales ou Anticorps

Le rôle des anticorps particulièrement les IgG, dans la protection contre l'infection palustre a été démontré par les expériences de transfert passif de plasma provenant d'individus vivant en zone d'endémie à des personnes naïves non exposés [15, 20,83]. Chez les résidents des zones endémiques, l'infection palustre induit la production des immunoglobulines spécifiques et polyclonales. Ces anticorps sont produits par les cellules lymphocytaires B. Au cours de l'infection palustre, les anticorps produits sont constitués essentiellement par des immunoglobulines M et G (IgM et IgG), mais aussi d'autres types d'immunoglobulines telles que les immunoglobulines E(IgE), et immunoglobulines A(IgA).

L'IgG est la plus importante parmi les isotypes d'anticorps. Chez les individus protégés les sous-classes cytophiliques IgG1 et IgG3 ont été fréquemment rencontrées. Cependant, l'augmentation de la concentration d'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 [6, 14].

Le rôle protecteur des IgM dans le cas du paludisme reste à être élucidé. De même, aucune fonction spécifique antipaludique n'a été attribuée aux IgA [53].

Les infections palustres chez l'Homme aussi bien que chez les animaux ont été associées à des concentrations élevées d'IgE totale et IgE anti-malarique spécifique. L'élévation d'IgE apparaît être associée à la gravité du paludisme

(Paludisme cérébral et autres formes sévères de paludisme) [77]. Cependant une étude chez les Peulhs et les Dogons au Mali a montré une association entre de faibles parasitémies et des taux élevés d'IgE spécifiques d'antigènes de *P. falciparum* [37].

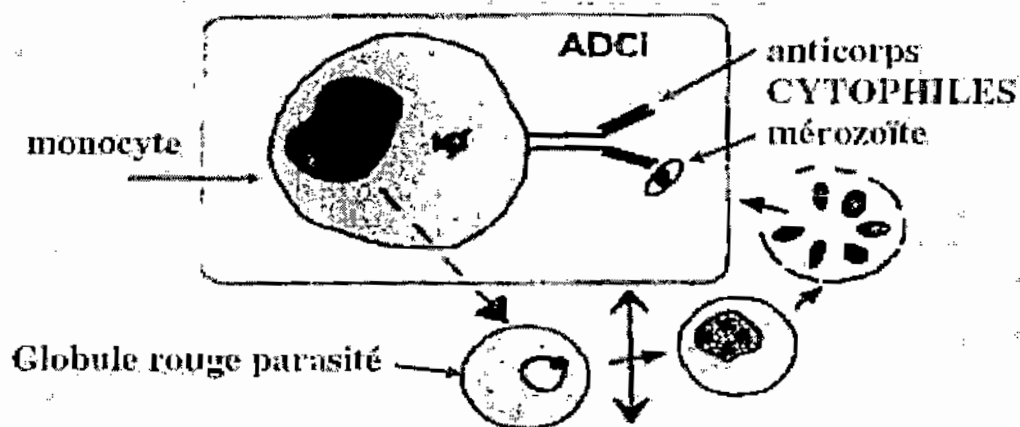
Les anticorps agissent par divers mécanismes : i) inhibition de l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes par opsonisation c'est-à-dire facilitation de leur phagocytose ; ii) inhibition de l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes ; iii) inhibition de la croissance intra érythrocytaire du parasite (mesurée par l'essai GIA « Growth Inhibition Assay »); liii) la clairance des érythrocytes infectés par ADCI «Antibody Dependant Cellular Inhibition» [13, 15, 98]. Des anticorps monoclonaux spécifiques de CSP de *P. falciparum* sont capables d'inhiber l'invasion et le développement de ce parasite dans les érythrocytes [60]. Les études séro-épidémiologiques conduites en Afrique de l'Ouest et au Kenya ont montré que la réponse anticorps naturelle contre AMA-1 est très largement distribuée avec une forte fréquence [92]. Les réponses humorales et cellulaires contre AMA-1 augmentent avec l'âge dans les populations continuellement exposées au paludisme [97]. Les anticorps spécifiques d'AMA-1 naturellement acquis chez les individus vivant en zone d'endémie palustre sont capables d'inhiber la croissance *in vitro* de *P. falciparum* [44].

L'antigène MSP-3 induit des anticorps cytophiliques protecteurs et le mécanisme de base serait l'ADCI [15].

De nombreuses études réalisées *in-vitro* ont démontré que des cellules effectrices comme les monocytes/macrophages ou les neutrophiles, étaient capables, en association avec les IgG spécifiques, d'éliminer les stades sanguins du parasite ou d'inhiber leur prolifération. En effet, les monocytes de souris, de singes, et des humains sont capables de phagocyter et d'éliminer les mérozoïtes et les globules rouges infectés, en présence de sérums d'individus immuns ou d'IgG purifiés à partir de ces sérums [41, 51, 64].

Une étude similaire réalisée sur des cultures de *P. falciparum in-vitro*, a mis en évidence un mécanisme original faisant intervenir les monocytes ou les neutrophiles, et les IgG spécifiques [15].

Ce nouveau mécanisme nommé ADCI (*Antibody Dependant Cellular Inhibition*) se distingue de l'ADCC (*Antibody Dependant Cellular Cytotoxicity*) par le fait qu'il n'induit pas uniquement la lyse des globules rouges parasités, mais aussi une inhibition de la croissance du parasite, partiellement réversible lorsque ceux-ci sont remis en culture sans monocyte, ni IgG. Par la suite, d'autres études ont démontré que l'ADCI avait pour cible principale des antigènes des mérozoïtes comme MSP-3 [13, 15, 72].



Antibody-dependent cellular inhibition of parasite multiplication : ADCI

Figure 2 : Schéma de l'inhibition cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCI)

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

➤ Réponse cellulaire

Les cellules T CD4+ ou T helper et les T CD8+ ou T cytotoxiques interviennent dans l'immunité anti-palustre. Il est actuellement bien établi que les cellules T CD4+ et T CD8+ reconnaissent des peptides antigéniques de *Plasmodium* présentés respectivement par les molécules CMH classe II et Classe I exprimés à la surface des hépatocytes infectés [45, 46, 47]. Il a été montré que les cellules T CD4+ de type Th1 spécifiques d'épitopes de la CSP sont capables de conférer la protection contre *P. yoelii* chez la souris [80]. 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* [47]. Chez la souris les érythrocytes infectés induisent une réponse cellulaire T CD4+ et CD8+ spécifiques de *P. berghei*. De plus ce parasite exprime des antigènes présentés par les cellules dendritiques lesquelles induisent des cellules T cytotoxiques spécifiques [49, 54].

Les études de vaccination avec les sporozoïtes atténués ont montré que les cellules T cytotoxiques infiltraient le foie et pouvaient intervenir dans la destruction des hépatocytes infectés par le *Plasmodium* [76].

Les études de vaccination chez l'homme ont montré 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 [49,55].

3. L'antigène *Merozoite Surface Protein-3* (MSP-3)

3.1. Historique

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

La plupart des recherches vaccinales de stade sanguin est concentrée sur les antigènes qui sont exprimés sur la surface du mérozoïte et ou du globule rouge parasité. Merozoite Surface Protein-3 (MSP-3) est une famille de protéines identifiée comme la cible des anticorps protecteurs d'africains de l'Ouest au cours d'une expérience de transfert passif chez les humains [73,83]

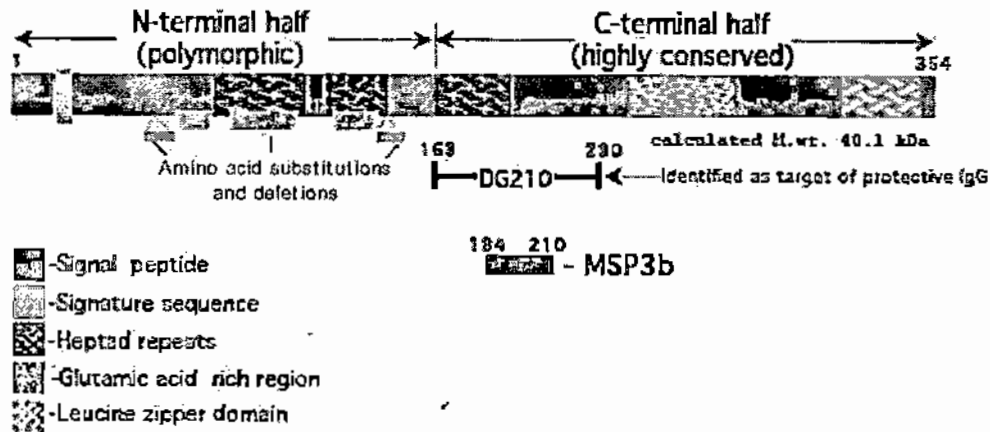
3.2. Description

Antigène peu polymorphique, il est exprimé dans la lumière de la vacuole parasitophore. La protéine MSP-3 utilisée comme candidat vaccin est fortement excrétée au moment de la rupture des schizontes matures et exprimée à la surface des mérozoïtes de *Plasmodium falciparum*. C'est une protéine de 48 kDa, composée de 354 acides aminés [73]. Elle est codée par un gène de 1065bp situé sur le chromosome 10 de *P. falciparum* souche 3D7 (source : <http://plasmodb.org/plasmo>). La protéine MSP-3 est constituée d'une région N-terminale (polymorphique), et une région C-terminale (fortement conservée). Dans cette dernière partie il été cloné un cDNA DG210 qui code pour la région cible des IgG protectrices. Le peptide MSP-3b composé des acides aminés 184 à 210 dérivant de la séquence DG210 constitue l'épitope immunogénique de l'antigène MSP-3 [73] (Figure 3).

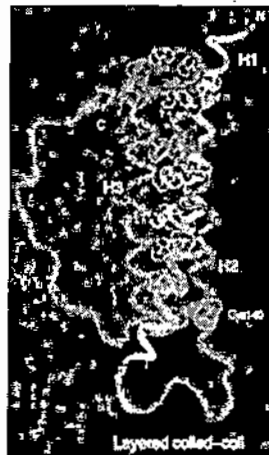
L'analyse du génome de *P. falciparum* 3D7 a montré la présence de plusieurs gènes sur le chromosome 10 codant pour MSP-3. C'est donc une famille multigénique dont il existe plusieurs membres caractérisés : MSP-3.1 (354 acides aminés), MSP-3.2 (371 acides aminés), MSP-3.3 (424 acides aminés), MSP-3.4 (697 acides aminés), MSP-3.5 (712 acides aminés), MSP-3.6 (566 acides aminés), MSP-3.7 (405 acides aminés), MSP-3.8 (762 acides aminés). Ces 8 gènes sont situés en tandem sur le chromosome 10 et les protéines MSP-3 qu'ils codent présentent dans leur partie N-terminale une séquence conservée de 5 aminoacides (NLRNAG). Six d'entre elles (MSP-3.1, MSP-3.2, MSP-3.3,

MSP-3.4, MSP-3.7 et MSP-3.8) possèdent une similarité de séquence de la partie C-terminale et sont exprimées à la surface des mérozoïtes. Par contre MSP-3.5 et MSP-3.6 ne présentent pas cette similarité de séquence C-terminale [73]. Les six membres de la famille de gène MSP-3 ayant une similarité dans leur partie C-terminale sont les cibles des anticorps intervenant dans le mécanisme ADCl et semblent jouer un rôle important dans l'immunité protectrice. Cependant ils présentent des caractéristiques antigéniques différentes.

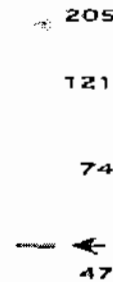
Notre candidat vaccin correspond au MSP-3.1 et les études antérieures ont démontré qu'elle induit la production des anticorps cytophiles IgG1 et IgG3. Ses isotypes sont responsables de l'activité ADCl (*Antibody Dependant Cellular Inhibition*) [33,73].

(A) *P. falciparum* Merozoite Surface Protein 3 (MSP3)

(B)



(C)



(A) Schematic presentation of *P. falciparum* MSP3 (from 3D7 strain). DG210 is the original cDNA clone identified to be the target of protective antibodies. MSP3b is an antigenic region (a peptide) derived from DG210 sequence (Ocvray, *et al.*, 1994). (B) The coiled-coil structure of the three MSP3 heptads (H1, H2 and H3), as determined by NMR studies (Mulhern, *et al.*, 1994). (C) Detection of MSP3 in parasite extract by using antibodies against DG210. Parasite extract was resolved by SDS-PAGE under reducing conditions. The position of MSP3 is indicated by the arrow, whereas the values show positions of molecular weight markers (kDa).

Figure 3 : Schéma Merozoite Surface Protein-3 (MSP-3) de *P. falciparum*

Source : Singh S. Thèse de doctorat d'Immunologie. Bio-Medical Parasitology Unit, Pasteur Institute, Paris, France



METHODOLOGIE

1. Lieu d'étude

Cette étude a été effectuée à Sotuba, un village périurbain de Bamako. Il est situé au sud-est de la ville à proximité de la rive gauche du fleuve Niger. Sa population est estimée à 6.472 habitants. La transmission du paludisme y est saisonnière de Juin à Décembre. Le taux d'Inoculation Entomologique (TIE) annuel est faible (inférieur à 15 piqûres infectantes par personne et par an). L'incidence du paludisme varie entre 0,4 à 1,7 chez les enfants de 0 à 2 ans [26]. Sotuba est un site de recherche du MRTC depuis 1990. L'équipe du MRTC a établi un bon rapport avec la communauté et y a construit un centre de santé comportant un laboratoire de diagnostic et un dépôt de médicament. Le centre dispose d'une connexion internet.

La proximité du Centre Hospitalier Universitaire Gabriel Touré offre la possibilité de référence rapide des cas graves de paludisme.

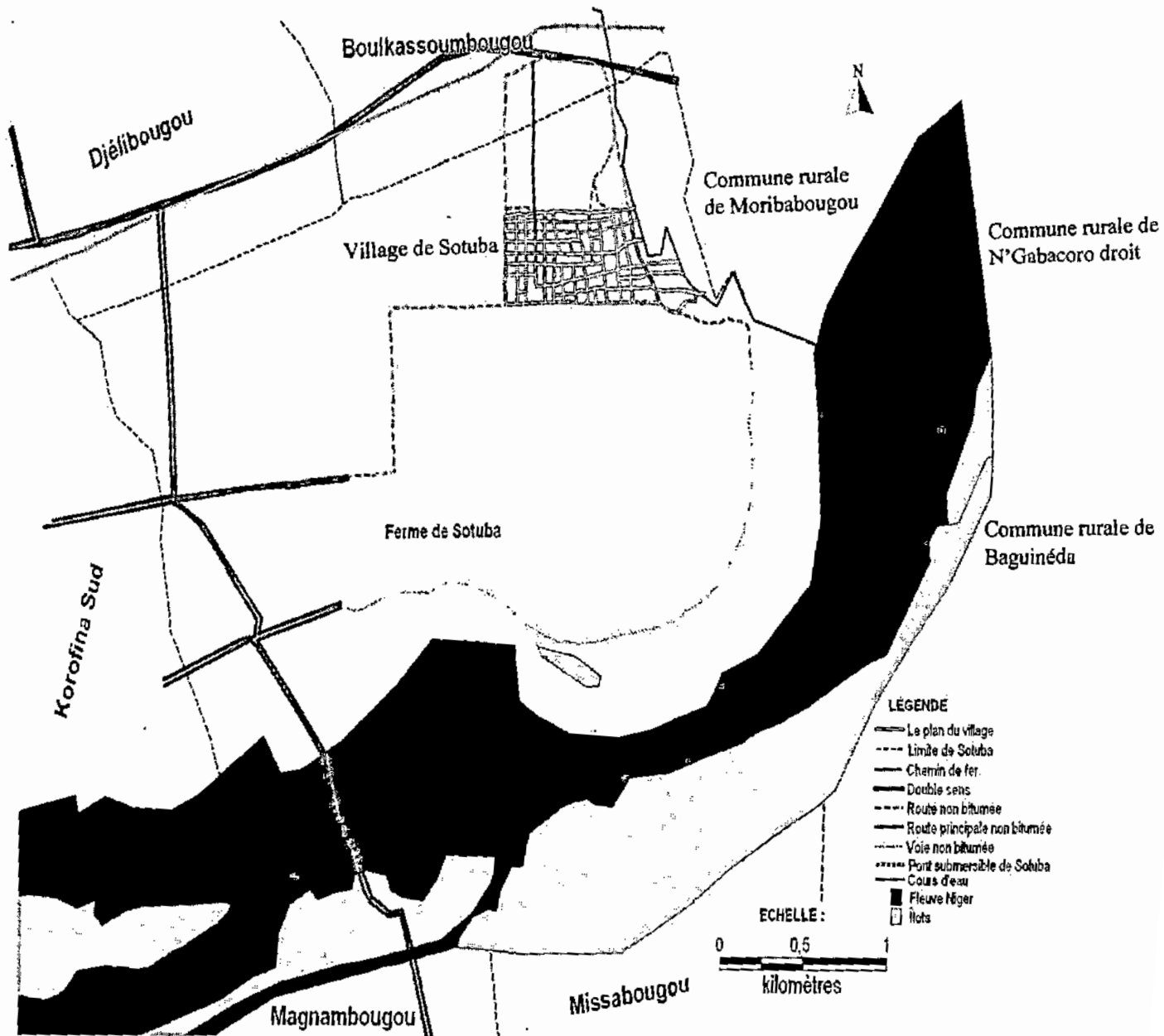


Figure 4 : Localisation du village de Sotuba par rapport à la Ferme

Source : Pr. Amadou BALLO et ses assistantes Binta TRAORE, Kamba KONE et Korotoumou SANGARE. Labo_Carto_ Université de Bamako

2. Type et période d'étude

Nous avons effectué une étude transversale au mois de mai 2008. Le passage a été effectué durant 2 semaines du 14 au 30 mai 2008.

3. Population d'étude et échantillonnage

Notre étude a concerné les enfants de 1 à 4 ans vivant à Sotuba et environnants. Ces enfants sont également des volontaires de l'essai vaccinal de phase 2b de MSP-3. Au total 400 enfants sains ont été inclus dans cette étude. Ces enfants ont subi un examen physique et biologique (hématologie, biochimie et goutte épaisse).

4. Critères d'inclusion

- Etre âgé de 1 à 4 ans
- Etre en bonne santé physique
- Résider Sotuba et ses environs pendant toute la période de l'étude
- Avoir reçu le consentement éclairé du parent ou du tuteur légal

5. Critères de non inclusion

- Avoir une goutte épaisse positive
- Avoir une splénomégalie
- Avoir un taux élevé de transaminase (ALT)
- Etre sous un traitement immunosuppresseur

6. Les techniques de laboratoire

Le dosage des anticorps a été effectué par la technique de l'ELISA et la reconnaissance de MSP-3 natif par le Western Blot. Les échantillons analysés étaient des plasmas.

6.1. Le prélèvement sanguin et la préparation des échantillons biologiques.

Au total 5 ml de sang veineux étaient prélevés chez chaque enfant dans des tubes contenant 1000 UI de deltaparine de sodium (Fragmine® Pfizer, Belgique). Les tubes de sang étaient acheminés au laboratoire dans les 2 heures qui suivaient le prélèvement. Ces tubes étaient transvasés sous hotte dans des tubes Leucosep (Greiner Bio-one, Hannover, Allemagne) pour la séparation des cellules mononuclées du sang périphérique. Après une centrifugation à 2000t/mn

pendant 20mn à 25°C sans frein, le plasma était collecté dans des tubes stériles fond conique de 0,5ml (Microwtubes® T332-2S).

Ces plasmas étaient conservés à une température <-15°C jusqu'au dosage des anticorps.

6.2. Dosage des anticorps sériques.

Il a concerné les IgG et IgM spécifiques de MSP-3 LSP. C'est la technique de l'ELISA indirecte qui a été utilisée. La technique a été transférée au MRTC dans le cadre du réseau Afroimmunoassay de AMANET. En effet l'objectif de ce réseau constitué de six institutions africaines de recherche sur le paludisme dont le MRTC du Mali, est de standardiser les méthodes d'évaluation des réponses immunes contre les antigènes candidats vaccins MSP-1₁₉, AMA-1, MSP-3, GLURP et CSP. Les procédures standardisées ont été écrites et partagées avec les différents partenaires du réseau. Nous avons effectué la mise au point de la technique au MRTC avant de la pratiquer sur les échantillons.

Principe

La technique ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) est une technique immuno-enzymatique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps obtenue par addition du plasma (anticorps) à l'antigène grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps.

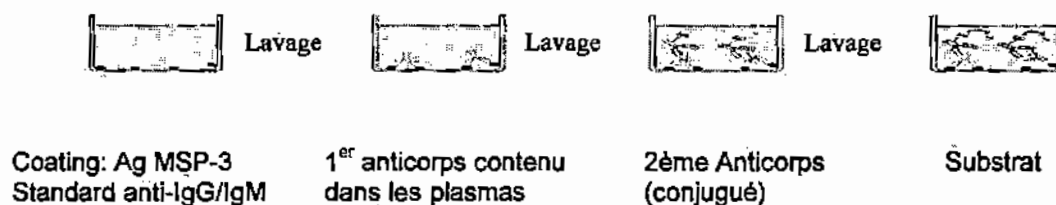


Figure 5 : Différentes étapes de l'ELISA indirecte.

6.3 Evaluation de la reconnaissance de MSP-3 natif par les IgG sériques spécifiques : technique de Western-blot ou immuno-empreinte

Principe

C'est une technique qui consiste dans un premier temps à séparer les antigènes de *P. falciparum* par électrophorèse en gel d'agarose dénaturant (les différentes protéines sont séparées dans le gel en fonction de leur poids moléculaire) et à les transférer sur une membrane de nitrocellulose qui est incubée dans un second temps avec le sérum contenant les IgG spécifiques des antigènes de *P. falciparum*. Le complexe MSP-3 natif-IgG anti-MSP-3 humain fixé sur la membrane de nitrocellulose est révélé par un conjugué anti-IgG humaine couplé à la peroxydase et le substrat chromogène. La protéine native apparaît sous forme d'une bande de 48kDa (voir figures 3 et 7).

La technique de Western blot (WB) a été effectuée sur 386 échantillons. Ce test ayant été effectué dans le cadre de l'essai vaccinal MSP-3 ; seuls les échantillons provenant des volontaires dont les prélèvements de J0 et J84 étaient à la fois disponibles ont été traités au WB.

➤ Préparation des extraits parasitaires de *P. falciparum*

Concentrer les formes mûres du parasite (clone 3D7) sur gélatine porcine (25% de culot de parasites + 25% de RPMI + 50% de gélatine porcine à 1%)

Incuber 30 minutes à 37°C

Obtention de 2 phases distinctes (conserver le volume flottant)

Centrifuger faire un frottis pour compter la parasitémie (doit être au moins 60%)

Diluer le culot de parasites 10 fois en PBS 1x puis volume à volume avec le tampon d'échantillon 2x.

Les extraits sont testés en western blot, ceux présentant une forte présence de MSP3 (formes très mûres du parasite) sont regroupés et des aliquots de 100µl sont constitués soit la quantité pour un gel et conservés à -20°C.

Juste avant de déposer sur le gel faire bouillir les extraits pendant 6 mn puis les centrifuger rapidement

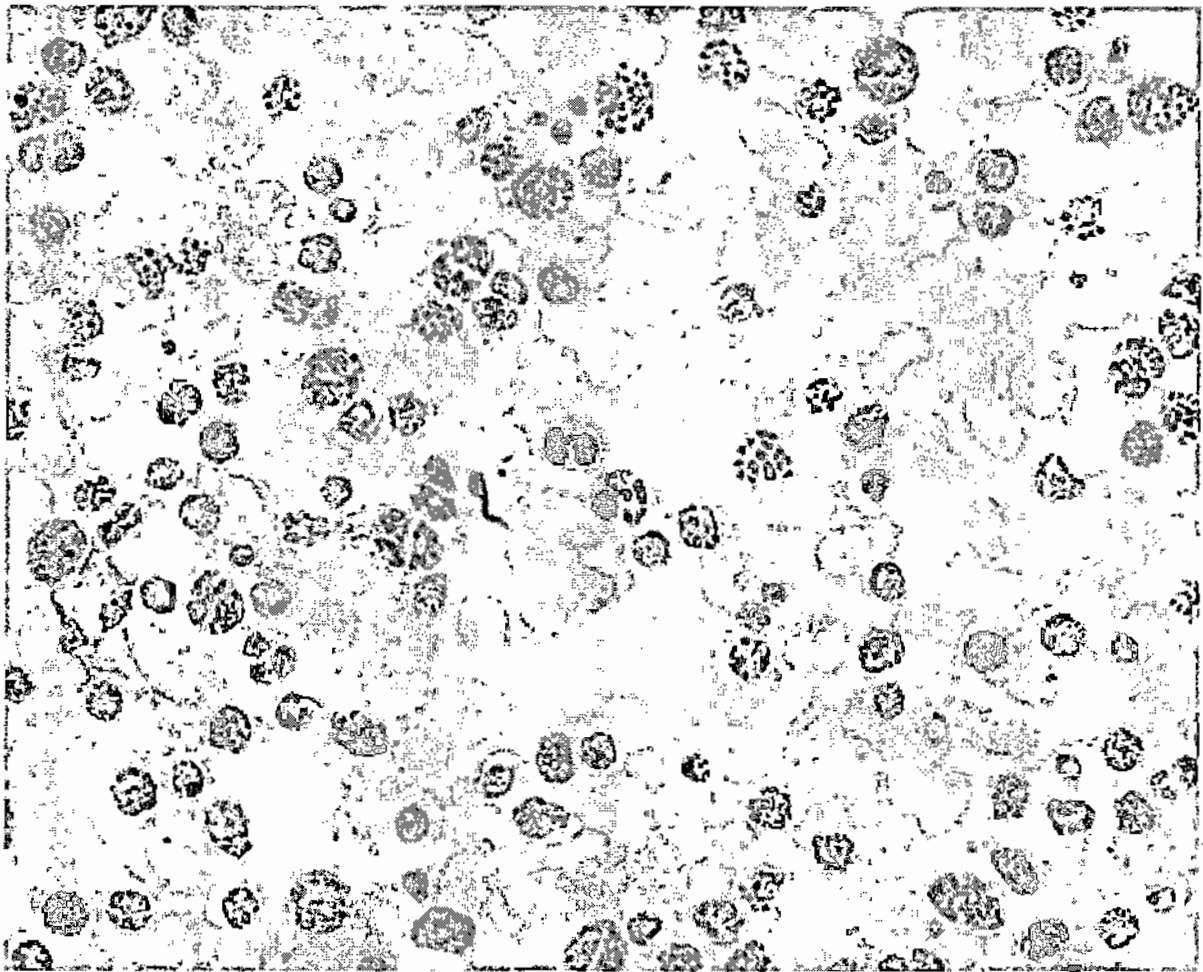


Figure 6 : Aspects de la culture de *Plasmodium falciparum* 3D7 pour la préparation d'extrait d'antigène MSP-3 natif.

➤ **Préparation des gels d'agarose**

Sortir les gels de la chambre froide les laisser réchauffer

Sortir les gels de leurs pochettes

Enlever délicatement la bande en bas du gel

Enlever délicatement les peignes

Placer les gels dans le (ou les) portoir de la cuve de migration Mini-PROTEAN

Tetra cell, la plaque la plus petite tournée vers l'intérieur

Remplir l'espace entre les gels avec le tampon de migration

Remplir le reste de la cuve avec le tampon de migration jusqu'au niveau indiqué pour 2 ou 4 gels.

Rincer avec une micropipette de 1ml le puits du gel avec le tampon de migration

➤ **Migration des protéines**

Faire bouillir les extraits parasitaires pendant 6mn puis les centrifuger rapidement.

Déposer délicatement 100µl d'extrait dans le grand puits en prenant soins de bien répartir et 10µl de marqueur de poids moléculaire dans le petit puits

Fermer le couvercle de la cuve

Faire migrer à 200 volts jusqu'à ce que le front de migration (bleu de bromophénol) commence à sortir du gel (cela dure 40 à 50 mn).

➤ **Préparation du transfert**

Remarque : toujours porter des gants pour toucher la nitrocellulose qui doit être manipulée avec beaucoup de précaution.

Découper dans du papier filtre Whatman 2 rectangles de 10 sur 8 cm par gel

Découper dans la feuille de nitrocellulose un rectangle de 9 sur 7 cm pour 1 gel

Faire tremper les éponges et les papiers filtres dans le tampon de transfert

Mouiller les rectangles de nitrocellulose dans de l'eau déminéralisée puis les faire tremper dans le tampon de transfert.

Sortir les gels de la cuve et de leur portoir

Déposer la cassette de gel la petite plaque en haut

Couper avec un scalpel le film plastique le long de la bande blanche sur le bord de la cassette

Séparer délicatement les plaques de la cassette

Enlever les parties supérieures du gel qui ont formé les deux puits

Prendre délicatement le gel et le mettre dans du tampon de transfert

Prendre une cassette de transfert et placer du côté noir, Déposer 1 éponge puis 1 un rectangle de papier filtre 80 cm² puis déposer délicatement le gel et ensuite le rectangle de nitrocellulose 63 cm² en évitant que des bulles d'air se forment. Recouvrir enfin avec le second rectangle de papier filtre 80 cm² et une éponge.

Fermer la cassette de transfert et placer dans le module de transfert, côté noir vers le côté noir du module qui correspond à la cathode

Procéder de même pour un deuxième gel

Disposer l'ensemble dans la cuve de migration

Mettre le bac de glace dans la cuve

Remplir la cuve de tampon de transfert et fermer le couvercle

Transférer pendant 2 heures à 150 mA

A la fin du temps, sortir les cassettes de la cuve et les déposer côté noir vers soi

Ouvrir délicatement le dispositif, enlever l'éponge et le papier filtre

Dessiner au stylo les contours du gel sur la nitrocellulose en faisant surtout attention au bas du gel

Décoller délicatement le gel et mettre le rectangle de nitrocellulose dans la solution de coloration au rouge Ponceau pendant 5 mn sous agitation

Laver le rectangle de nitrocellulose avec de l'eau déminéralisée (les protéines apparaissent en lignes rouges)

Placer le rectangle de nitrocellulose entre deux morceaux de parafilm afin d'éviter la dessiccation

Emballer le tout dans du papier aluminium et conserver à -20°C.

➤ **Immunoblot**

Sortir du congélateur, le rectangle de nitrocellulose emballé dans le parafilm et le papier aluminium et laisser réchauffer au moins 10 mn à la température du laboratoire.

Enlever la feuille d'aluminium et déposer sur une plaque en verre le rectangle de nitrocellulose tout en le gardant dans le parafilm

Découper des bandelettes d'environ 3 mm de large au scalpel (22 par gel en moyenne)

A l'aide d'une pince enlever le parafilm du dessus de la bandelette et inscrire le numéro du sérum à tester

Placer les bandelettes dans un bac circulaire en verre contenant 100ml de tampon de saturation

Incuber pendant 20mn en agitation à la température du laboratoire

Changer le tampon de saturation

Incuber à nouveau pendant 20mn en agitation à la température du laboratoire

Diluer les plasmas humains au 1/100 (en première intention) dans le tampon de dilution

Diluer le sérum de rat (témoin positif) au 1/2000

Déposer 1ml de chaque dilution dans un canal du bac en verre pour bandelettes

Alterner 1 témoin positif (Rat) toutes les trois bandelettes (positions 1, 4, 7, etc.)

Déposer les bandelettes chacune dans son canal en fonction du schéma adopté.

Incuber 1 heure en agitation à la température du laboratoire

Sortir les bandelettes des canaux et les répartir dans deux bacs circulaires en verre contenant chacun 100 ml de tampon de lavage avec lait (les bandelettes venant du sérum de rat dans un bac, celles avec les plasmas humains dans l'autre)

Mettre en agitation pendant 8mn à la température du laboratoire puis verser le tampon.

Effectuer cette opération 3 fois.

Diluer les conjugués anti-IgG humain et anti-IgG de rat au 1/7500 dans leur tampon de dilution dans des tubes différents.

Verser les conjugués dilués dans les bacs contenant les bandelettes (les bandelettes incubées avec les sérums humains sont plongées dans l'anti-IgG humain dilué et les bandelettes incubées avec les sérums de rat sont plongées dans l'anti-IgG rat dilué)

Incuber pendant 30 mn en agitation à température du laboratoire.

Laver trois fois les bandelettes dans du tampon de lavage sans lait pendant 8 mn en agitation.

Préparer le substrat extemporanément

Placer les bandelettes dans le substrat

Laisser incuber pendant 10 mn sans agitation

Arrêter la réaction en plongeant les bandelettes dans un grand volume d'eau déminéralisée

Placer les bandelettes entre deux feuilles de papier filtre pour les éponger

Ranger délicatement les bandelettes entre deux nouvelles feuilles de papier filtre et laisser sécher toute la nuit sous un poids.

➤ **Résultats et interprétation**

Arranger les bandelettes en les plaçant cote à cote de façon à alterner une bandelette incubées avec du sérum de rat avec 2 bandelettes incubées avec du sérum humain.

Colier à l'aide du scotch les bandelettes sur une feuille de papier transparent

Scanner l'ensemble

Plusieurs bandes sont visibles sur chaque bandelette et celle correspondant à MSP-3 apparait sous forme d'une double bande à 48kD.

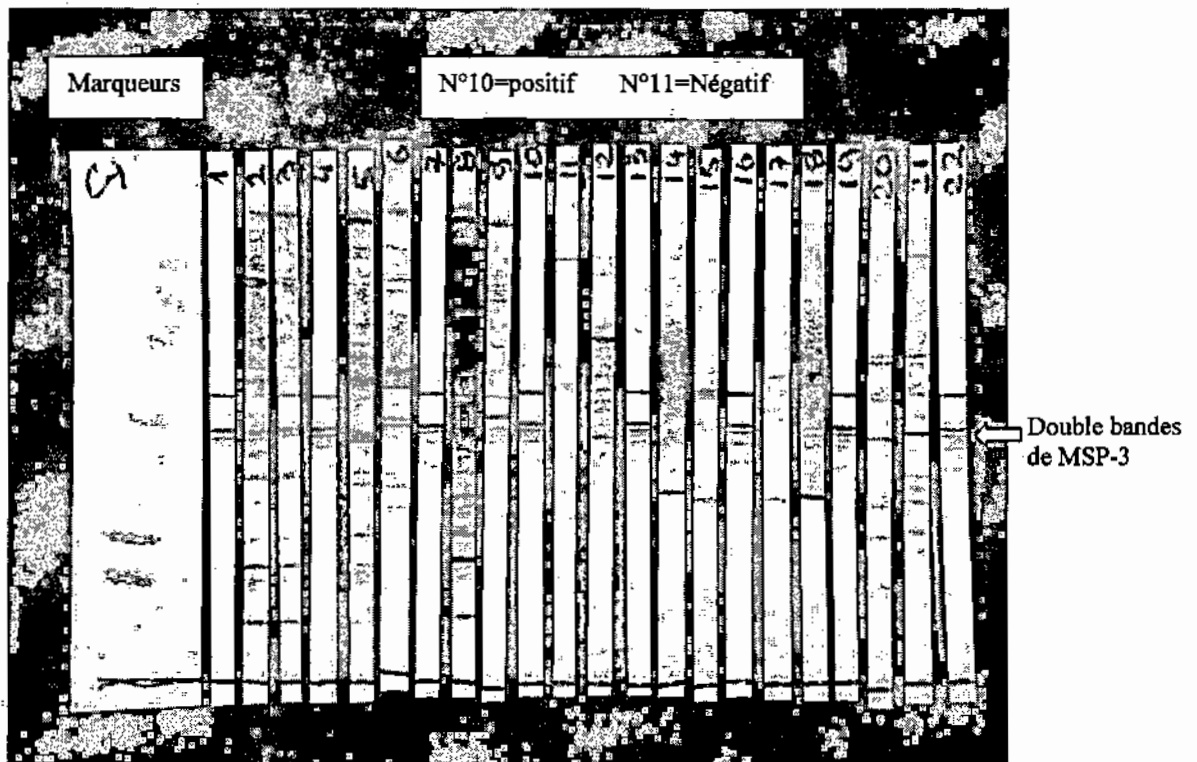


Figure 7 : Résultat de western blot réalisé avec un extrait de *Plasmodium falciparum* 3D7 et des sérums d'enfants de l'étude. Images scannées.

7. Considérations éthiques

Le protocole de l'étude a été approuvé par le Comité d'Ethique Institutionnel de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de l'Université de Bamako, Mali. L'étude a été conduite conformément aux principes de bonnes pratiques cliniques et de laboratoires en vigueur. Les participants et leurs parents ou tuteurs ont reçu une compensation pour les journées de travail perdues.

8. Collecte, saisie et analyse des données

Les données ont été récoltées dans des cahiers d'observation médicale et des fiches d'enquête. Les dossiers et les prélèvements sanguins ne portaient pas le nom des participants. Un numéro d'étude et un numéro de dépistage leurs avaient été attribués.

Les données ont été saisies sur Excel et analysées sur SPSS version 12.0 et sur STATA version 12.0.

Afin de déterminer la séropositivité IgG et IgM spécifiques de MSP-3 chez les enfants, des sérums témoins ont été utilisés. Le témoin négatif est un pool de sérums sélectionnés sur 400 volontaires français n'ayant jamais quitté la France dont les titres anticorps contre MSP3 sont égaux à la médiane des titres anticorps des 400. Le témoin positif est un pool de sérums utilisés dans l'étude de transfert in vivo à des enfants.

Nous avons calculé la moyenne et l'écart type des taux d'IgG et d'IgM mesurés aux cours des différents essais. Le seuil de positivité en IgG et IgM a été fixé à la valeur de la moyenne des taux des sérums témoins négatifs plus 3 déviations standards. Ces seuils étaient de 1000 ng/ml pour les IgG et IgM.

RESULTS

Tableau I : La répartition de la population d'étude selon l'âge et le sexe.

Age en années	Masculin		Féminin		Total
	N	%	N	%	
1	50	12,5	50	12,5	100
2	49	12,25	50	12,5	99
3	51	12,75	51	12,75	102
4	48	12	51	12,75	99
Total	198	49,5	202	50,5	400

N= Effectif

L'échantillon d'étude comportait des filles et des garçons en proportions égales. Le sexe ratio masculin / féminin était de 0,98. L'âge moyen de la population était de 2,5 ans avec un écart-type de 1,11. Il y avait dans l'échantillon des proportions égales d'enfants de 1, 2, 3, et 4ans.

Au plan parasitologique et clinique tous les enfants avaient une goutte épaisse négative et ne présentaient ni fièvre, ni splénomégalie au moment du passage.

Tableau II : Répartition des enfants de l'étude selon leur séropositivité IgM anti-MSP3 LSP et selon les classes d'âge.

Age en années	IgM anti-MSP3 LSP		Total
	Positifs	Négatifs	
1	24 (6%)	76	100
2	33 (8.3%)	66	99
3	37 (9.3%)	65	102
4	38 (9.5%)	61	99
Total	132 (33%)	268(67%)	400

$$\chi^2=5,46, p=0,1$$

La majorité des enfants (67%) était séronégative en IgM anti-MSP-3LSP contre 33% de séropositifs. Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les classes d'âge quant à la séropositivité en IgM anti-MSP3 LSP.

Tableau III : Répartition des enfants de l'étude selon leur séropositivité IgG anti-MSP3 LSP et selon les classes d'âge.

Age en années	IgG anti-MSP3 LSP		Total
	Positifs	Négatifs	
1	1 (1%)	99	100
2	0 (0%)	99	99
3	2 (2%)	100	102
4	1 (1%)	98	99
Total	4 (1%)	396	400

La majorité des enfants était séronégative en IgG anti-MSP-3. Seulement 1% avait des IgG anti-MSP-3 LSP. Il n'y a pas de différence entre les classes d'âge quant à la séropositivité en IgG anti-MSP3 LSP chez les enfants de l'étude.

Tableau IV : Répartition des enfants de l'étude selon la réponse en IgG et IgM anti-MSP3

<i>Age en années</i>	<i>IgG /IgM anti-MSP3 LSP</i>		<i>Total</i>
	<i>Positif</i>	<i>Négatif</i>	
1	0	75	75
2	0	66	66
3	2 (2,9%)	65	67
4	0	60	60
Total	2 (0,5%)	266	268

Seulement 2 enfants âgés de 3 ans possédaient des IgG et IgM anti-MSP3.LSP.

La distribution géographique à Sotuba des enfants selon leur statut sérologique en IgG et IgM anti-MSP-3 est présentée dans la figure 8. Les enfants porteurs d'IgM anti-MSP-3 sont repartis sur toute l'étendue du village. Seulement 3 des enfants porteurs d'IgG ont pu être localisés sur la carte et sont repartis dans des concessions différentes. Le quatrième enfant n'est pas dans le village de Sotuba mais à proximité c'est pourquoi il n'a pu être localisé sur la carte.

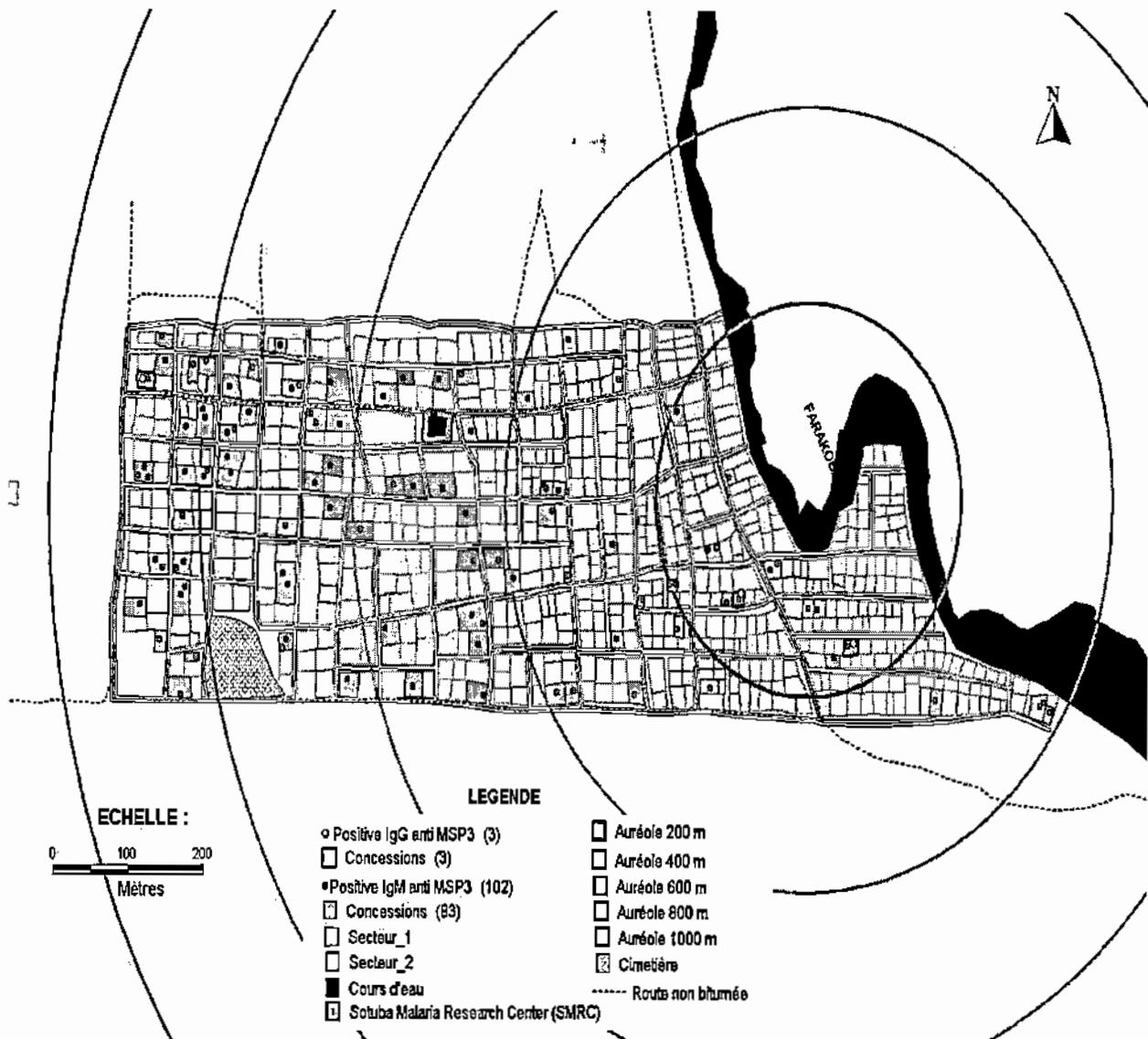


Figure 8 : Localisation des enfants séropositifs en IgG ou en IgM anti-MSP3 dans le village de Sotuba

Source : Pr. Amadou BALLO et ses assistantes Binta TRAORE, Kamba KONE et Korotoumou SANGARE. Labo_Carto_Université de Bamako,

Tableau V : Répartition des enfants de l'étude selon le résultat du Western-blot

<i>Western-blot</i>	<i>Effectifs</i>	<i>Pourcentage</i>
Positif	0	0
Négatif	386	100
Total	386*	100

*Sur un total de 400 plasma seulement 386 ont été testés au WB.

Les résultats manquant sont dus au fait que les plasmas étaient testés en paires (J0 et J84) et que 14 individus n'avaient qu'un seul plasma (J0). Tous les plasmas des enfants testés au western blot étaient négatifs en anticorps reconnaissant le MSP-3 natif (extrait de culture de *P. falciparum* au stade schizontes matures).

Tableau VI : Moyenne des concentrations en IgG et IgM anti-MSP-3 en fonction de l'âge des enfants de l'étude.

<i>Age en années</i>	<i>Effectif</i>	<i>Moyenne géométrique IgG en ng/ml</i>	<i>Moyenne géométrique IgM en ng/ml</i>
1	100	21,01	504,34
2	99	23,93	615,49
3	102	20,39	693,59
4	99	35,59	663,89
Total	400	24,53	615,13

IgG: $F=1.48$ $p=0.21$

IgM: $F=2.45$ $p=0.06$

Il n'y avait pas de différence statistiquement significative dans les taux moyens d'IgG et d'IgM anti-MSP3 LSP selon l'âge des enfants. Cependant les taux d'IgG des enfants de 4 étaient plus élevés que ceux des enfants moins âgés même si la différence n'est pas significative ($F=3,4$ $p=0,06$).

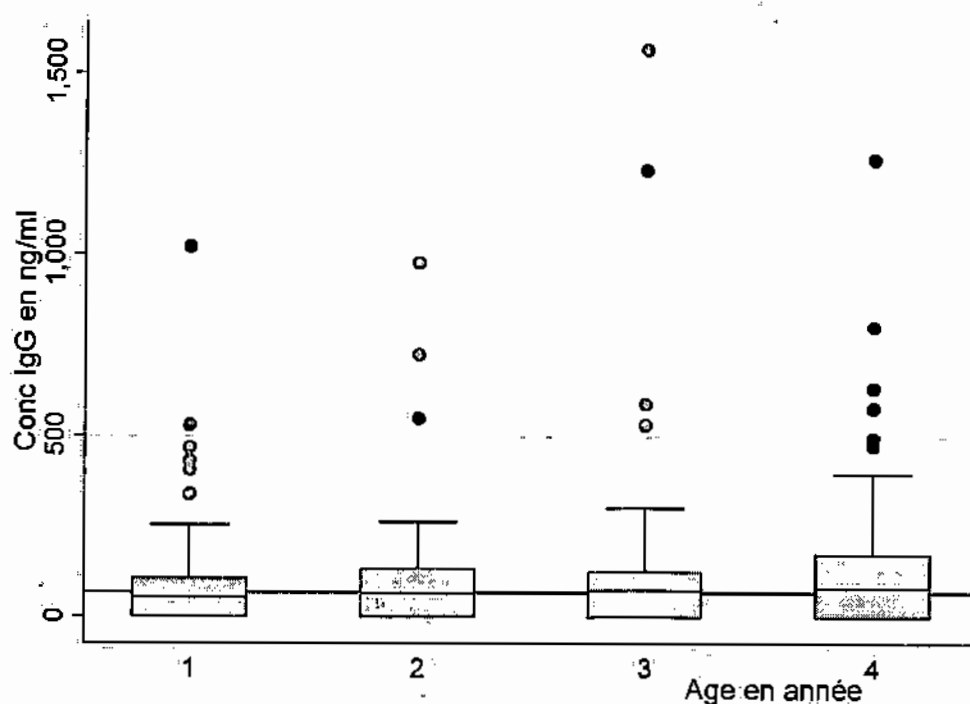


Figure 9 : Comparaison des concentrations en IgG spécifique de l'antigène MSP-3 en fonction de l'âge des enfants de l'étude.

Les boîtes montrent les médianes, les 25^{ième} et 75^{ième} percentiles et les points au dessus des boîtes représentent les valeurs extrêmes. Le test de Tukey n'a pas montré de différence statistiquement significative entre les taux médians d'IgG anti-MSP3 LSP selon l'âge.

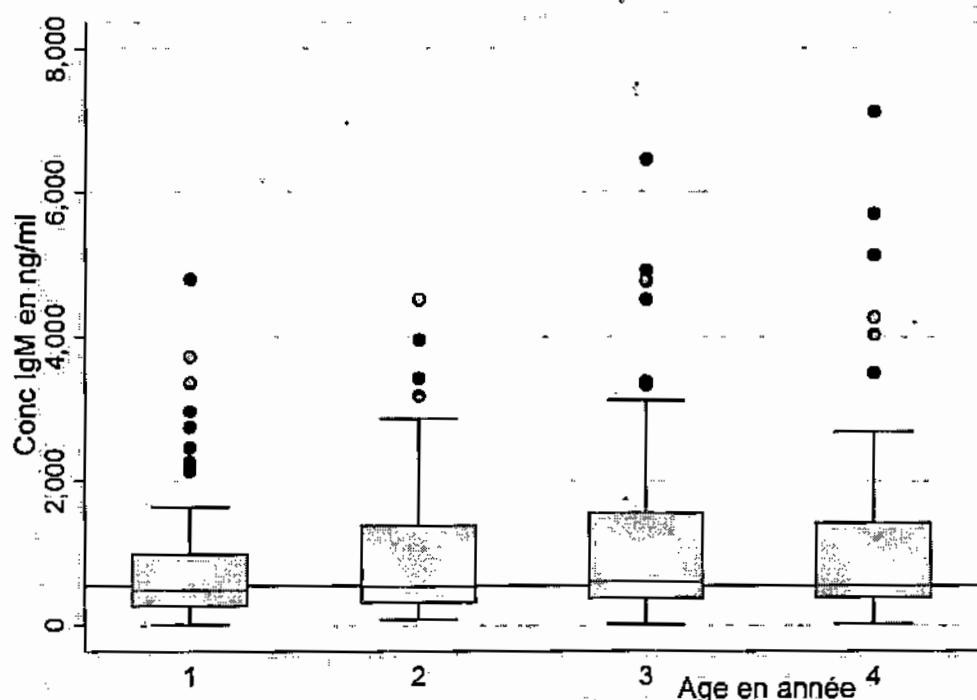


Figure 10 : Comparaison des concentrations d' IgM anti- MSP-3 en fonction de l'âge des enfants de l'étude.

Les boîtes montrent les médianes, les 25^{ième} et 75^{ième} percentiles et les points au dessus des boîtes représentent les valeurs extrêmes. Le test de Tukey n'a pas montré de différence statistiquement significative entre les taux médians d'IgM anti-MSP-3 selon l'âge.

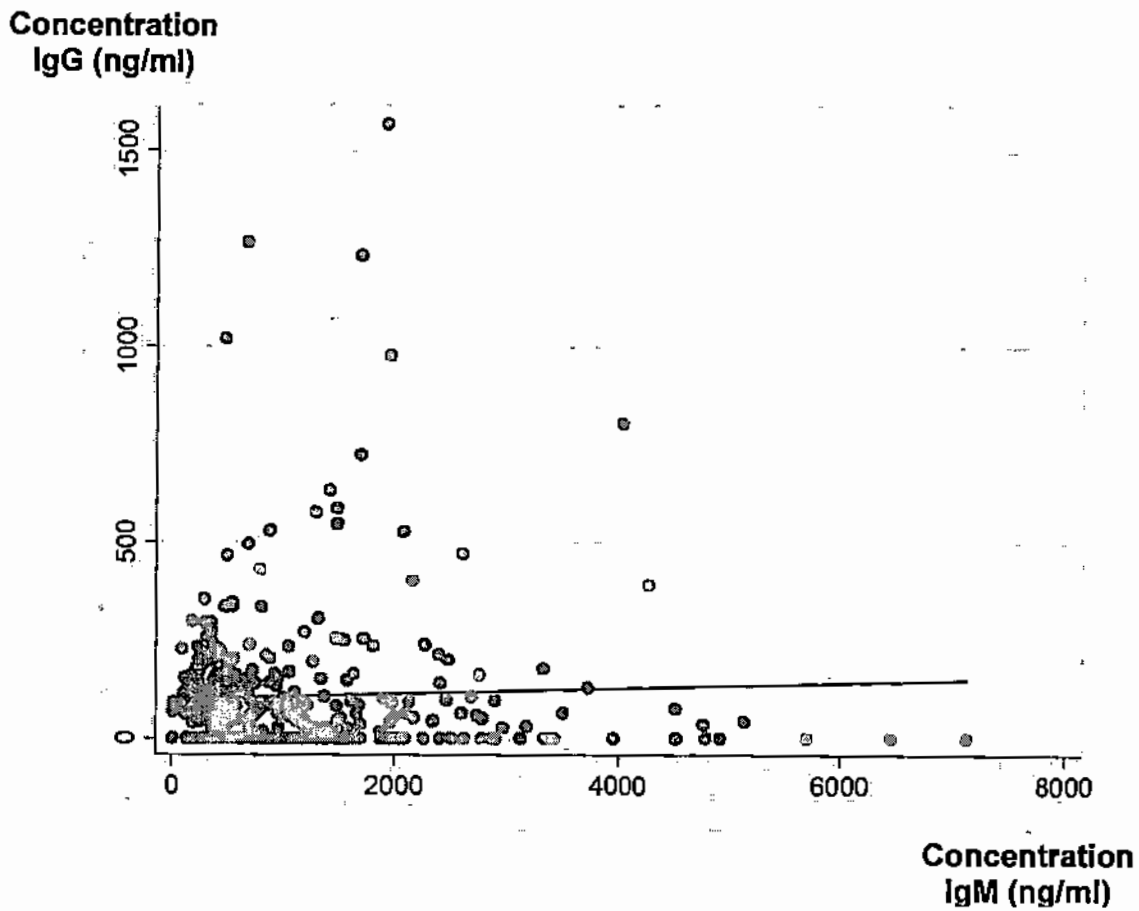


Figure 11 : Corrélation entre les concentrations en IgG et IgM anti-MSP-3

Il n'y avait pas de corrélation entre les taux d'IgG et d'IgM anti-MSP3 LSP ($r=0,04$; $p=0,39$).



DISCUSSION

1. Approche méthodologique

L'objectif de cette étude était d'analyser la réponse anticorps spécifique de MSP-3 LSP dans les conditions d'une exposition naturelle chez des enfants vivant en zone d'endémie palustre.

Pour atteindre cet objectif nous avons effectué l'étude à Sotuba, un village situé en zone périurbaine de Bamako où le MRTC effectue un essai pédiatrique de phase 2b du candidat vaccin MSP-3 en collaboration avec l'Unité de Parasitologie Biomédicale de l'Institut Pasteur de Paris, sponsorisée par le réseau AMANET. Nous avons voulu savoir si les enfants de l'essai avaient des taux d'anticorps anti-MSP-3 mesurables avant la saison de transmission du paludisme. Il a été décrit que la présence d'anticorps spécifiques de MSP-3 en début de saison de transmission est un indicateur de protection contre la survenue des cas de paludisme chez les enfants [61]. Au cours de cet essai les 3 doses du candidat vaccin ont été administrées avant le début de la transmission du paludisme afin d'éliminer l'effet d'une possible prémunition liée à l'exposition naturelle. L'argument était basé sur le fait que les enfants de 0 à 4 ans n'ayant pas été suffisamment exposés donc n'auraient pas d'anticorps spécifiques de MSP-3.

Nous avons pu au cours de cette étude appliquer des procédures standardisées du réseau Afro-Immuno Assay de AMANET pour les dosages des IgG et IgM spécifiques des antigènes du *Plasmodium*. Ceci a été possible dans le cadre du réseau AMANET. Egalement le transfert de la technique de Western-blot pour la reconnaissance de l'antigène natif par les IgG des volontaires a été effectué en collaboration avec l'Unité de parasitologie biomédicale de l'Institut Pasteur. Donc ce sont des techniques standardisées qui ont été utilisées.

2. Résultats descriptifs

La répartition équilibrée des enfants en fonction de l'âge et du sexe est due au hasard. Ils ont été sélectionnés de façon aléatoire pour l'essai vaccinal de MSP-3. Aussi tous ces enfants avaient une parasitémie négative à la goutte épaisse. Cependant vu que nous n'avons pas effectué de PCR, nous ne pouvons pas exclure qu'au moment du passage certains enfants possédaient des parasites. Le village de Sotuba est en zone périurbaine et des études antérieures ont montré qu'il n'y avait presque pas de transmission du paludisme au mois de mai [85].

Les taux d'IgG anti-MSP-3 observés chez les enfants de l'étude étaient faibles même s'ils augmentaient avec l'âge (Figure 9). Seulement 1% des enfants avaient une réponse IgG anti-MSP-3 positive (Tableau III). Ceci est en accord avec les observations de Niébié et al en 2008 qui ont montré que les taux d'IgG anti-MSP-3 étaient généralement faibles chez les enfants avec une augmentation dépendante de l'âge. Les taux d'IgG anti-MSP-3 étaient deux fois plus faibles chez les enfants de moins de 10ans que chez ceux de plus de 11 ans. Par contre 39% des enfants de l'étude effectuée au Burkina Faso avaient une réponse IgG positive contre MSP-3 LSP avant le début de la saison de transmission alors que nous avons eu seulement 1% [61]. Cette différence de proportion est due probablement à plusieurs raisons : des seuils de positivité différents dans les deux études, aux périodes différentes de collecte des échantillons et au niveau d'endémicité du paludisme.

Les taux faibles d'IgG anti-MSP-3 s'expliqueraient par leur acquisition lente mais progressive avec l'âge et l'exposition. Plusieurs études aussi bien épidémiologiques que d'essais cliniques ont montré le rôle protecteur des IgG anti-MSP3-LSP. En effet le transfert passif d'IgG provenant d'adultes africains à des personnes naïves pour le paludisme a montré un rôle protecteur de ces IgG qui étaient spécifiques de l'antigène MSP-3 [20, 61].

Ces IgGs protectrices sont de type IgG1 et IgG3 cytophiliques qui agissent par un mécanisme d'ADCI utilisant les monocytes [14, 61,69].

3. Résultats analytiques

Les IgG spécifiques de MSP-3 mesurées par ELISA doivent reconnaître la protéine native de MSP-3 exprimée sur *P. falciparum* pour être immunologiquement actives. Une façon de savoir si les IgG spécifiques de MSP-3 dosées par ELISA reconnaissent le MSP-3 natif est d'effectuer des Western blots sur des extraits de parasites avec les plasmas des volontaires. C'est cette méthode que nous avons pratiquée avec les plasmas des enfants de l'étude. Il ressort qu'aucun plasma ne contient des IgG reconnaissant MSP-3 natif (Tableau V). Même les 1% des enfants positifs en IgG anti-MSP-3 par ELISA étaient négatifs en Western blot. Ceci indique que soit les enfants ne possédaient pas d'IgG anti-MSP-3 et que les positifs à l'ELISA étaient des faux positifs, soit que les IgG anti-MSP-3 détectées ne reconnaissaient pas le MSP-3 natif. L'ELISA est une technique sensible mais moins spécifique que le WB dont les résultats semblent indiquer que les enfants de notre étude ne possédaient pas d'IgG spécifiques de MSP-3 avant la saison de transmission. Ce qui expliquerait la sensibilité au paludisme des enfants de moins de 5 ans.

Il a été observé que les isotypes IgG2 et IgM prédominaient chez les individus non protégés contre paludisme indiquant leur rôle non protecteurs [61]. Nous avons mesuré les taux d'IgM anti-MSP-3 LSP dans notre population d'enfants et les résultats montrent que les taux d'IgM anti-MSP3 étaient plus élevés que ceux des IgG. La proportion d'enfants séropositifs en IgM anti-MSP-3 était également plus élevée (33%) mais il n'y avait aucune corrélation entre les taux IgG et IgM anti-MSP3 (Figure 11). Les IgM étant des anticorps de la réponse primaire, il est surprenant de voir que leurs taux soient relativement plus élevés que ceux des IgG en période où la transmission est faible voire nulle. Deux hypothèses peuvent expliquer ces résultats. Soit la méthode que nous avons utilisée pour doser les IgM est trop sensible et les porteurs d'IgM sont en réalité des faux positifs soit ces IgM sont les témoins d'une transmission récente. Si les porteurs d'IgM étaient regroupés dans une zone de Sotuba nous pourrions penser que

ces IgM seraient les témoins d'une transmission récente de paludisme. Mais ces enfants sont largement distribués (Figure 8). Il est donc peu probable que les IgM anti-MSP-3 que nous avons détecté ne soient pas liés à une transmission courante. Les relations entre les taux d'IgM et la protection contre le paludisme sont contradictoires. Certaines études ont montré que les IgM anti-MSP-3 ne sont pas associés avec la protection contre le paludisme [69, 73]. Le rôle des IgM spécifiques de MSP-3 dans le paludisme reste donc à élucider.

Nous avons effectué une enquête transversale mais il aurait été intéressant d'investiguer la corrélation entre la présence des anticorps anti-MSP-3 et la protection contre le paludisme dans notre population d'étude. Ceci pourra faire l'objet d'étude ultérieure.



CONCLUSION

- Les enfants de Sotuba, volontaires de l'essai de Phase 2b du candidat vaccin MSP-3 LSP ne possédaient pas d'IgG spécifiques capables de reconnaître la protéine native MSP-3 avant le début de la saison de transmission du paludisme.

- Les enfants porteurs d'IgM anti-MSP-3 étaient élevés ; et il n'y avait pas de corrélation entre les taux d'IgG et d'IgM anti-MSP-3 chez ces enfants.

RECOMMENDATIONS

Recommandations.

Effectuer une étude de cohorte en élargissant l'âge de la population d'étude de 0 à 15 ans ; et de rechercher s'il existe une corrélation des taux d'anticorps (IgG, sous classes d'IgG, IgM et IgA) spécifiques de MSP-3 avec la protection contre le paludisme.



BIBLIOGRAPHIE

- 1- **Aderem A, Ulevitch RJ.** Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 2000 Aug 17; 406(6797):782-7. Review.
- 2- **Aguiar JC, Hedstrom RC, Rogers WO, Charoenvit Y, Sacci JB Jr, Lanar DE, Majam VF, Stout RR, Hoffman SL.** Enhancement of the immune response in rabbits to a malaria DNA vaccine by immunization with a needle-free jet device. *Vaccine*. 2001 Oct 12; 20(1-2):275-80
- 3- **Aidoo M, Udhayakumar V.** Field studies of cytotoxic T lymphocytes in malaria infections: implications for malaria vaccine development. *Parasitol Today*. 2000 Feb; 16(2):50-6.
- 4- **Aribot G, Rogier C, Sarthou JL, Trape JF, Balde AT, Druilhe P, Roussilhon C.** Pattern of immunoglobulin isotype response to *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens in individuals living in a holoendemic area of Senegal (Dielmo, westAfrica). *Am J Trop Med Hyg*. 1996 May; 54(5):449-57.
- 5- **Artavanis-Tsakonas K, Riley EM.** Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol*. 2002 Sep 15;169(6):2956-63.
- 6- **Aucan C, Traoré Y, Tall F, Nacro B, Traoré-Leroux T, Fumoux F, Rihet P.** High immunoglobulin G2 (IgG2) and low IgG4 levels are associated with human resistance to *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun*. 2000 Mar; 68(3):1252-8.
- 7- **Augustine AD, Hall BF, Leitner WW, Mo AX, Wali TM, Fauci AS.** NIAID workshop on immunity to malaria: addressing immunological challenges. *Nat Immunol*. 2009 Jul;10(7):673-8.

- 8- **Barchet W, Cella M, Colonna M.** Plasmacytoid dendritic cells--virus experts of innate immunity. *Semin Immunol.* 2005 Aug;17(4):253-61.
- 9- **Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T.** Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science.* 1999 Jul 30; 285(5428):727-9.
- 10- **Behr C, Poupot R, Peyrat MA, Poquet Y, Constant P, Dubois P, Bonneville M, Fournie JJ.** *Plasmodium falciparum* stimuli for human gamma delta T cells are related to phosphorylated antigens of mycobacteria. *Infect Immun.* 1996 Aug;64(8):2892-6.
- 11- **Black CG, Wang L, Hibbs AR, Werner E, Coppel RL.** Identification of the *Plasmodium chabaudi* homologue of merozoite surface proteins 4 and 5 of *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun.* 1999 May; 67(5):2075-81.
- 12- **Boonstra A, Asselin-Paturel C, Gilliet M, Crain C, Trinchieri G, Liu YJ, O'Garra A.** Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J Exp Med.* 2003 Jan 6; 197(1):101-9.
- 13- **Bouharoun-Tayoun H, Oeuvray C, Lunel F, Druilhe P:** Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *J Exp Med.* 1995 Aug 1; 182(2):409-18.
- 14- **Bouharoun TH, Druilhe P:** *Plasmodium falciparum* malaria: Evidence for an isotype imbalance which may be responsible for delayed acquisition of protective immunity. *Infect Immun* 1992; 60: 1473-1481.

- 15- Bouharoun-Tayoun H, Attanath P, Sabchareon A, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P.** Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. *J Exp Med.* 1990 Dec 1; 172(6):1633-41.
- 16- Burgner D, Rockett K, Kwiatkowski D:** Nitric oxide and infectious diseases. *Arch Dis Child.* 1999 Aug; 81(2):185-8. Review. No abstract available.
- 17- Cairo C, Propp N, Auricchio G, Armstrong CL, Abimiku A, Mancino G, Colizzi V, Blattner W, Pauza CD.** Altered cord blood gamma delta T cell repertoire in Nigeria: possible impacts of environmental factors on neonatal immunity. *Mol Immunol.* 2008 Jun; 45(11):3190-7. Epub 2008 Apr 28.
- 18- Camus D, Hadley TJ:** *Plasmodium falciparum* antigen that binds to host erythrocytes and merozoites. *Science* 1985; 230: 553-556,
- 19- Charoenvit Y, Leef MF, Yuan LF, et al :** Characterization of *Plasmodium yoelii* monoclonal antibodies directed against stage-specific sporozoite antigens. *Infect Immun* 1987; 55; 604-608.
- 20- Cohen S, Mc Gregor IA, Carrington S:** Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature* 1961 Nov 25; 192: 733-7.
- 21- Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Ratnam S, Rahman HA, Conway DJ, Singh B:** *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis.* 2008 Jan 15; 46(2):165-7
- 22- Crewther PE, Culvenor JG, Silva A, Cooper JA, Anders RF.** *Plasmodium falciparum*: two antigens of similar size are located in different compartments of the rhoptry. *Exp Parasitol.* 1990 Feb; 70(2):193-206.

- 23- Day NPJ, Hien TT, Schoollaardt T, Loc PP, et al:** The pronostic and pathophysiologic role of pro-and anti-inflamatory cytikines in severs malaria. *J Infect Dis* 1999; 180: 1288-1297.
- 24- De Paoli P, D'Andrea M, Santini G, Zagonel V, Pinto A, Carbone A.** Serum levels of adhesion molecules in haematopietic tumours. *Immunol Today*. 1994 Jul; 15(7):339.
- 25- Deloron P, Dumont N, Nyongabo T, Aubry P, Astagneau P, Ndarugirire F, Menetrier-Caux C, Burdin N, Brelivet JC, Peyron F :** Immunologic and biochemical alterations in severe falciparum malaria: relation to neurological symptoms and outcome. *Clin Infect Dis*. 1994 Sep; 19(3):480-5
- 26- Dicko A, Sagara I, Diemert D, Sogoba M, Niambele MB, Dao A, Dolo G, Yalcouye D, Diallo DA, Saul A, Miller LH, Toure YT, Klion AD, Doumbo OK.** Year-to-year variation in the age-specific incidence of clinical malaria in two potential vaccine testing sites in Mali with different levels of malaria transmission intensity. *Am J Trop Med Hyg*. 2007 Dec; 77(6):1028-33.
- 27- Dieli F, Troye-Blomberg M, Farouk SE, Sireci G, Salerno A.** Biology of gammadelta T cells in tuberculosis and malaria. *Curr Mol Med*. 2001 Sep; 1(4):437-46
- 28- Dolo A :** Réponse immunitaire anti-TRAP (Thrombospondin Related Adhesive Protein et morbidité palustre dans une zone d'hyper-endémie palustre du Mali (Afrique de l'Ouest). thèse de Doctorat, Italie, Rome, 1997.
- 29- Doolan DL, Dobaño C, Baird JK.** Acquired immunity to malaria. *Clin Microbiol Rev*. 2009 Jan; 22(1):13-36, Table of Contents. Review.

- 30- Doolan DL, Mu Y, Unal B, Sundaresh S, Hirst S, Valdez C, Randall A, Molina D, Liang X, Freilich DA, Oloo JA, Blair PL, Profiling humoral immune responses to *P. falciparum* infection with protein microarrays. Proteomics. 2008 Nov;8(22):4680-94 Aguiar JC, Baldi P, Davies DH, Felgner PL.**
- 31- Doolan DL, Hoffman SL. The complexity of protective immunity against liver-stage malaria. J Immunol. 2000 Aug 1;165(3):1453-62.**
- 32- Doolan DL, Hoffman SL. IL-12 and NK cells are required for antigen-specific adaptive immunity against malaria initiated by CD8+ T cells in the *Plasmodium yoelii* model. J Immunol. 1999 Jul 15;163(2):884-92.**
- 33- Druilhe P, Spertini F, Soesoe D, Corradin G, Mejia P, Singh S, Audran R, Bouzidi A, Oeuvray C, Roussilhon C : A malaria vaccine that elicits in humans antibodies able to kill *Plasmodium falciparum*. PLoS Med. 2005 Nov;2(11):e344. Epub 2005 Nov 8.**
- 34- Duffy PE, Kaslow DC: A novel malaria protein, Pfs28, and Pfs25 are genetically linked and synergistic as *falciparum* malaria transmission-blocking vaccines. Infection and immunity 1997; Mar 65(3): 1109-13**
- 35- Elloso MM, van der Heyde HC, Troutt A, Manning DD, Weidanz WP: Human gamma delta T cell subset-proliferative response to malarial antigen in vitro depends on CD4+ T cells or cytokines that signal through components of the IL-2R. J Immunol. 1996 Sep 1;157(5):2096-102.**
- 36- Escalante AA, Grebert HM, Chaiyaroj SC, Magris M, Biswas S, Nahlen BL, Lal AA. Polymorphism in the gene encoding the apical membrane antigen-1 (AMA-1) of *Plasmodium falciparum*. X. Asembo Bay Cohort Project. Mol Biochem Parasitol. 2001 Apr 6;113(2):279-87.**

37- Farouk SE, Dolo A, Berczky S, Kouriba B, Maiga B, Färnert A, Perlmann H, Hayano M, Montgomery SM, Doumbo OK, Troye-Blomberg M. Different antibody- and cytokine-mediated responses to *Plasmodium falciparum* parasite in two sympatric ethnic tribes living in Mali. *Microbes Infect.* 2005 Jan;7(1):110-7..

38- Ferlazzo G, Münz C. NK cell compartments and their activation by dendritic cells. *J Immunol.* 2004 Feb 1;172(3):1333-9

39- Fournié JJ , Bonneville M. Stimulation of gamma delta T cells by phosphoantigens. *Res Immunol.* 1996 Jun;147(5):338-47.

40- Groux H, Perraut R, Garraud O, Poingt JP, Gysin J: Functional characterization of the antibody-mediated protection against blood stages of *Plasmodium falciparum* in the monkey *Saimiri sciureus*. *Eur J Immunol.* 1990 Oct;20(10):2317-23.

41- Groux H, Gysin J. Opsonization as an effector mechanism in human protection against asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*: functional role of IgG subclasses. *Res Immunol.* 1990 Jul-Aug; 141(6):529-42

42- Hermsen CC, Konijnenberg Y, Mulder L, Loé C, van Deuren M, van der Meer JW, van Mierlo GJ, Eling WM, Hack CE, Sauerwein RW. Circulating concentrations of soluble granzyme A and B increase during natural and experimental *Plasmodium falciparum* infections. *Clin Exp Immunol.* 2003 Jun;132(3):467-72.

43- Ho M, Sexton MM, Tongtawe P, Looareesuwan S, Suntharasamai P, Webster HK: Interleukin-10 inhibits tumor necrosis factor production but not antigen-specific lymphoproliferation in acute *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis.* 1995 Sep; 172(3):838-44.

44- Hodder AN, Crewther PE, Anders RF. Specificity of the protective antibody response to apical membrane antigen 1. *Infect Immun.* 2001 May; 69(5):3286-94.

45- Hoffman SL, Isenbarger D, Long GW, Sedegah M, Szarfman A, Mellouk S, Ballou WR. T lymphocytes from mice immunized with irradiated sporozoites eliminate malaria from hepatocytes. *Bull World Health Organ.* 1990;68 Suppl:132-7.

46- Hoffman SL, Weiss W, Mellouk S, Sedegah M. Irradiated sporozoite vaccine induces cytotoxic T lymphocytes that recognize malaria antigens on the surface of infected hepatocytes. *Immunol Lett.* 1990 Aug; 25(1-3):33-8.

47- Hoffman SL, Isenbarger D, Long GW, Sedegah M, Szarfman A, Waters L, Hollingdale MR, van der Meide PH, Finbloom DS, Ballou WR. Sporozoite vaccine induces genetically restricted T cell elimination of malaria from hepatocytes. *Science,* 1989 Jun 2; 244(4908):1078-81.

48- Hollingdale MR, Aikawa M, Atkinson CT, Ballou WR, Chen GX, Li J, Meis JF, Sina B, Wright C, Zhu JD. Non-CS pre-erythrocytic protective antigens. *Immunol Lett.* 1990 Aug; 25(1-3):71-6.

49- Huaman MC, Mullen GE, Long CA, Mahanty S. *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 vaccine elicits multifunctional CD4 cytokine-producing and memory T cells. *Vaccine.* 2009 Aug 20; 27(38):5239-46;

50- Irwin W Sherman: *Plasmodium*, a genus of parasitic protozoans that are causative agents of disease malaria. *Encyclopedia of life sciences/* © 2001 Nature Publishing Group.

- 51- Khusmith S, Druilhe P:** Antibody-dependent ingestion of *P. falciparum* merozoites by human blood monocytes. *Parasite Immunol.* 1983 Jul; 5(4):357-68.
- 52- Koné A., Dicko A., Lyke KE., Traore K., Coulibaly D., Guindo A., Cissoko Y., Dao M., Diarra I., Dakouo B., Thera MA., Diallo DA., Plowe CV., Doumbo O.:** Clinical presentation and risk factors for death from severe *falciparum* malaria in Bandiagara, Mali. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69(3) Suppl: 317-8 (2003).
- 53- Leoratti FM, Durlacher RR, Lacerda MV, Alecrim MG, Ferreira AW, Sanchez MC, Moraes SL :** Pattern of humoral immune response to *Plasmodium falciparum* blood stages in individuals presenting different clinical expressions of malaria. *Malar J.* 2008 Sep 24;7:186.
- 54- Lundie RJ, de Koning-Ward TF, Davey GM, Nie CQ, Hansen DS, Lau LS, Mintern JD, Belz GT, Schofield L, Carbone FR, Villadangos JA, Crabb BS, Heath WR.** Blood-stage *Plasmodium* infection induces CD8⁺ T lymphocytes to parasite-expressed antigens, largely regulated by CD8 α ⁺ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Sep 23;105(38):14509-14.
- 55- Lyke KE, Daou M, Diarra I, Kone A, Kouriba B, Thera MA, Dutta S, Lanar DE, Heppner DG Jr, Doumbo OK, Plowe CV, Sztein MB.** 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 Mar 26; 27(15):2171-6).
- 56- Lyke KE, Burges RB, Cissoko Y, Sangare L, Kone A, Dao M, Diarra I, Fernández-Vina MA, Plowe CV, Doumbo OK, Sztein MB :** HLA-A2 supertype-restricted cell-mediated immunity by peripheral blood mononuclear cells derived from Malian children with severe or uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria and healthy controls. *Infect Immun.* 2005 Sep; 73(9):5799-808.

- 57- **Marc Gentilini, Martin Danis et Jean Mouchet.** Médecine tropicale (Université Francophone) Paludisme ; ©Edition Marketing/Ellipses, 1991.
- 58- **Marssh K :** Malaria-A neglected disease? Parasitology 1992; 104: S53- S69.
- 59- **Mavoungou E, Luty AJ, Kremsner PG.** Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity of *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells in vitro. Eur Cytokine Netw. 2003 Jul-Sep;14(3):134-42.
- 60- **Mazier D, Mellouk S, Beaudoin RL, Texier B, Druilhe P, Hockmeyer W, Tropper J, Paul C, Charoenvit Y, Young J, Miltgen F., Chedid L., Chigot J.P., Galley B., Brandicourt O. and Gentilini M.** Effect of antibodies to recombinant and synthetic peptides on *P. falciparum* sporozoites in vitro. Science. 1986 Jan10;231(4734):156-9.
- 61- **Meraldi. V, Nebié. I, Tiono .A. B, Diallo .D, E. Sanogo, Theisen. M, Druilhe. P, Corradin. G, Moret. R & Sirima. B. S:** Natural antibody response to *Plasmodium falciparum* Exp-1, MSP-3 and GLURP long synthetic peptides and association with protection. Parasite Immunology 2004, 26, 265-272.
- 62- **Mohan K, Moulin P, Stevenson MM.** Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. J Immunol. 1997 Nov 15; 159(10):4990-8.
- 63- **Morita CT, Parker CM, Brenner MB, Band H.** TCR usage and functional capabilities of human gamma delta T cells at birth. J Immunol. 1994 Nov 1; 153(9):3979-88.
- 64- **Mota MM, Brown KN, Holder AA, Jarra W:** Acute *Plasmodium chabaudi* malaria infection induces antibodies which bind to the surfaces of parasitized erythrocytes and promote their phagocytosis by macrophages in vitro. Infect Immun. 1998 Sep; 66(9):4080-6.

65- Muller HM, Reckmann I, Hollingdale MR, Bujard H, Robson KJ, Crisanti A. Thrombospondin related anonymous protein (TRAP) of *Plasmodium falciparum* binds specifically to sulfated glycoconjugates and to HepG2 hepatoma cells suggesting a role for this molecule in sporozoite invasion of hepatocytes. EMBO J. 1993 Jul.; 12 (7) p: 2881-2889.

66- Muniz-Junqueira MI, Tosta CE. Stages of in vitro phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes by human monocytes. Rev Soc Bras Med Trop. 2009 Mar-Apr;42(2):103-6).

67- Muniz-Junqueira MI , Dos Santos-Neto LL, Tosta CE. Influence of tumor necrosis factor-alpha on the ability of monocytes and lymphocytes to destroy intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* in vitro. Cell Immunol. 2001 Mar 15; 208(2):73-9.

68- Narum DL, Thomas AW. Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. Mol Biochem Parasitol. 1994 Sep;67(1):59-68.

69- Nebie I, Diarra A, Ouedraogo A, Soulama I, Bougouma EC, Tiono AB, Konate AT, Chilengi R, Theisen M, Dodoo D, Remarque E, Bosomprah S, Milligan P, Sirima SB. Humoral responses to *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens and association with incidence of clinical malaria in children living in an area of seasonal malaria transmission in Burkina Faso, West Africa. Infect Immun. 2008 Feb;76(2):759-66. Epub 2007 Dec 10.

70- Niangaly A : Evaluation de la tolérance et de l'immunogénicité d'un candidat vaccin antipaludique dérivé de la MSP1 (FMP1) associé à l'adjuvant AS02A dans une population adulte semi-immune à Bandiagara, Mali. Thèse de Pharmacie, Bamako, 2006, 26p ; 134.

71- Odile Mercereau-Puijalon : Vaccins contre le paludisme un long chemin semé d'embûche. ©2002 Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS, 1p

72- Oeuvray C., Bouharoun-Tayoun H., Gras-masse H. Lepers JP, Ralamboranto L, Tartar A, Druilhe P.: A novel merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum* (MSP-3) identified by cellular-antibody cooperative mechanism antigenicity and biological activity of antibodies. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1994; 89:77-80.

73- Oeuvray C, Bouharoun-Tayoun H, Gras-Masse H, Bottius E, Kaidoh T, Aikawa M, Filgueira MC, Tartar A, Druilhe P. Merozoite surface protein-3: a malaria protein inducing antibodies that promote *Plasmodium falciparum* killing by cooperation with blood monocytes. Blood. 1994 Sep 1; 84(5):1594-1602.

74- Orago AS, Facer CA. Cytotoxicity of human natural killer (NK) cell subsets for *Plasmodium falciparum* erythrocytic schizonts: stimulation by cytokines and inhibition by neomycin. Clin Exp Immunol. 1991 Oct;86(1):22-9.

75- Othoro C, Lal AA, Nahlen B, Koech D, Orago AS, Udhayakumar V: A low interleukin-10 tumor necrosis factor-alpha ratio is associated with malaria anemia in children residing in a holoendemic malaria region in western Kenya. J Infect Dis. 1999 Jan; 179(1):279-82.

76- Overstreet MG, Cockburn IA, Chen YC, Zavala F. Protective CD8 T cells against *Plasmodium* liver stages: immunobiology of an 'unnatural' immune response. Immunol Rev. 2008 Oct;225:272-83).

77- Perlmann H, Helmy H, Hagstedt M, Carlson J, Larsson PH, Troye-Blomberg M, Perlmann P. IgE elevation and IgE anti-malarial antibodies in *Plasmodium falciparum* malaria: association of high IgE levels with cerebral malaria. Clin Exp Immunol. 1994 Aug;97(2):284-92.

- 78- Pierrot C, Adam E, Hot D, Lafitte S, Capron M, George JD, Khalife J.** Contribution of T cells and neutrophils in protection of young susceptible rats from fatal experimental malaria. *J Immunol.* 2007 Feb 1; 178(3):1713-22.)
- 79- Programme National de lutte contre le paludisme : Politique Nationale de lutte contre le Paludisme au Mali. Deuxième révision. Bamako, Mali (2003).**
- 80- Rénia L, Grillot D, Marussig M, Corradin G, Miltgen F, Lambert PH, Mazier D, Del Giudice G.** Effector functions of circumsporozoite peptide-primed CD4+ T cell clones against *Plasmodium yoelii* liver stages. *J Immunol.* 1993 Feb 15; 150(4):1471-80.
- 81- Roetynck S, Baratin M, Vivier E, Ugolini S.** NK cells and innate immunity to malaria. *Med Sci (Paris).* 2006 Aug-Sep; 22(8-9):739-44.
- 82- Rogers WO, Malik A, Mellouk S, Nakamura K, Rogers MD, Szarfman A, Gordon DM, Nussler AK, Aikawa M, Hoffman SL.** Characterization of *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Oct1;89(19):9176-80.
- 83- Sabchareon A, Burnouf T, Ouattara D, Attanath P, Bouharoun-Tayoun H, Chantavanich P, Foucault C, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P.** Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1991 Sep;45(3):297-308.
- 84- Salerno A, Dief F:** Role of gamma delta T lymphocytes in immune responses in humans and mice, *Crit Rev immunol* 1998; 18: 327-357.

85- Sagara I, Sangaré D, Dolo G, Guindo A, Sissoko M, Sogoba M, Niambélé MB, Yalcoué D, Kaslow DC, Dicko A, Klion AD, Diallo D, Miller LH, Touré Y, Doumbo O: A high malaria reinfection rate in children and young adults living under a low entomological inoculation rate in a periurban area of Bamako, Mali. *Am J Trop Med Hyg.* 2002 Mar; 66(3):310-3.

86- Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol.* 2002 Mar;2(3):151-61

87- Smythe JA, Coppel RL, Brown JV, Ramassamy R, Kemp DJ, Anders RF : Identification of two integral membrane proteins of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 5195-5199.

88- Stephen M, Todryk,1,2,6* Philip Bejon,1,2 Tabitha Mwangi,2 Magdalena Plebanski,4 Britta Urban,1,2 Kevin Marsh,2 Adrian V. S. Hill,1,3 and Katie L. Flanagan2,5 : Correlation of Memory T Cell Responses against TRAP with Protection from Clinical Malaria, and CD4+ CD25high T Cells with Susceptibility in Kenyans. *PLoS ONE.* 2008 Apr 30;3(4):e2027

89- Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol.* 2004 Mar;4(3):169-80.

90- Stewart CA, Vivier E, Colonna M. Strategies of natural killer cell recognition and signaling. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;298:1-21.

91- Taylor-Robinson AW, Smith EC: A dichotomous role for nitric oxide in protection against blood stage malaria infection. *Immunol Lett.* 1999 Mar 15; 67(1):1-9.

92- Thomas AW, Trape JF, Rogier C, Goncalves A, Rosario VE, Narum DL. High prevalence of natural antibodies against *Plasmodium falciparum* 83-kilodalton apical membrane antigen (PF83/AMA-1) as detected by capture-enzyme-linked immunosorbent assay using full-length baculovirus recombinant PF83/AMA-1. *Am J Trop Med Hyg.* 1994 Dec;51(6):730-40.

93- Trape JF, Rogier C, Konate L, Diagne N, Bouganali H, Canque B, Legros F, Badji A, Ndiaye G, Ndiaye P, et al. The Dielmo project: a longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal. *Am J Trop Med Hyg.* 1994 Aug;51(2):123-37.

94- Troye-Blomberg M, Perlmann P, Mincheva Nilsson L, Perlmann H : Immune regulation of protection and pathogenesis in *Plasmodium falciparum* malaria. *Parassitologia.* 1999 Sep;41(1-3):131-8.

95- Troye-Blomberg M, Perlmann P : Malaria immunity : An overview with emphasis on T cells fonction ; in Good MF, Saul AJ (eds) : *Molecular Immunological Considerations in Malaria Vaccine Development.* Boca Raton, CRC Press, 1994, pp 1-46.

96- Troye-Blomberg M, Berzins K, Perlmann P : T-cell control of immunity to the asexual blood stages of the malaria parasite. *Crit Rev Immunol.* 1994; 14(2):131-55.

97- Udhayakumar V, Kariuki S, Kolczack M, Girma M, Roberts JM, Oloo AJ, Nahlen BL, Lal AA. Longitudinal study of natural immune responses to the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen (AMA-1) in a holoendemic region of malaria in western Kenya: Asembo Bay Cohort Project VIII. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Aug;65(2):100-7.

- 98- Wählin B, Wahlgren M, Perlmann H, Berzins k, Björkman A, Patarryo M, Perlmann P:** Human antibodies to a Mr 155, 000 *Plasmodium falciparum* antigen efficiently inhibit merozoite invasion. Proc Natl Acad Sci USA 1984 ; 81 : 7912-7916.
- 99- Waterfall M, Black A, Riley E:** Gammadelta+ T cells preferentially respond to live rather than killed malaria parasites. Infect Immun. 1998 May;66(5):2393-8.
- 100- World Health Organization:** World malaria report 2008. WHO/HTM/GMP/2008.1
- 101- World Bank:** Economics of Malaria. 1999.
- 102- World Health Organization:** Malaria fact sheet No 94. Geneva: WHO 1996.
- 103- Wykes M, Keighley C, Pinzon-Charry A, Good MF.** Dendritic cell biology during malaria. Cell Microbiol. 2007 Feb;9(2):300-5.
- 104- Wykes MN, Good MF.** What really happens to dendritic cells during malaria? Nat Rev Microbiol. 2008 Nov;6(11):864-70.



RESUME

Résumé

Fiche signalétique

Nom: KEITA

Prénom: Yamoussa

Nationalité: Malienne

Date de soutenance: Février 2010

Ville de soutenance: Bamako

Titre: Réponse naturelle anticorps anti-MSP-3 de *Plasmodium falciparum* chez les enfants de 1 à 4 ans vivant en zone périurbaine de Bamako (Sotuba).

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

Secteur d'intérêt: Paludisme, immunologie, essai clinique vaccinal et Santé publique.

Résumé

Ce travail avait pour but d'analyser la réponse anticorps naturelle spécifique de MSP-3-LSP de *Plasmodium falciparum* chez les enfants âgés de 1 à 4 ans vivant en zone de transmission faible du paludisme à Sotuba.

C'était une étude transversale qui s'est déroulée à Sotuba, Bamako, Mali en mai 2008. L'étude a été portée sur 400 enfants qui étaient également des volontaires de l'essai vaccinal de phase 2b de MSP-3.

Les tests biologiques appliqués étaient l'Elisa indirect et le Western-blot sur le plasma. Les anticorps mesurés étaient IgG anti-MSP-3 et IgM anti-MSP-3.

Les concentrations médianes d'IgG anti-MSP-3 et d'IgM anti-MSP-3 étaient relativement faibles titres chez les enfants.

Il n'y avait que 1% de discordance entre les résultats de l'Elisa indirect et le Western-blot. Une faible corrélation positive entre les taux d'IgG et d'IgM anti-MSP-3.

Les enfants de Sotuba volontaires de l'essai de Phase 2b du candidat vaccin MSP-3 LSP ne possédaient pas d'IgG spécifiques capables de reconnaître la protéine native MSP-3 avant le début de la saison de transmission du paludisme.

Mots clés : Paludisme, *Plasmodium falciparum*, anticorps, Merozoite-Surface-Protein-3, ELISA indirect -et Western-blot.

Last Name: KEITA

First Name: Yamoussa

Nationality: Malian

Locale of Defense: Bamako

Date of Defense: February 2010

Title: Natural antibodies responses to MSP-3 of *Plasmodium falciparum* in the children from 1 to 4 years living in peripheral area of Bamako (Sotuba).

Stored in the library of the Faculty of medicine, Pharmacy and Dentistry

Interested areas: Malaria, Immunology, Clinical Trial vaccine and Public Health

Abstract

The purpose of this work was to analyze the answer natural antibodies specific of MSP-3-LSP of *Plasmodium falciparum* in the older children from 1 to 4 years living in zone of weak transmission of malaria to Sotuba. It was a cross-sectional study which proceeded in Sotuba, Bamako, Mali in May 2008. The study was related to 400 children who were also volunteers of the vaccine test of phase 2b of MSP-3.

The measure of anti-MSP-3 antibodies IgG and IgM were performed by Indirect Elisa. We used Western-blot assay for concordance test with indirected ELISA assay.

The results showed weak levels of anti-MSP-3 IgG and anti-MSP-3 IgM in children's plasma.

There was only 1% of discordance between the results of indirect Elisa and the Western-blot.

A weak positive correlation enters the rates of IgG and IgM anti-MSP-3.

The voluntary children of Sotuba of the test of Phase 2b of the candidate vaccine MSP-3 LSP did not have IgG specific able to recognize native protein MSP-3 before the beginning of the season of transmission of malaria.

Key words: Malaria, *Plasmodium falciparum*, Antibody, Merozoite-Surface-Protein-3, indirect ELISA and Western-blot.



ANNEXES

Annexes**1- La technique ELISA****Matériel et réactifs****➤ Matériels**

	Fournisseur
Micropipettes 1-20 µl, 20 –100 µl, 40-200 µl, 200 –1000µl	Institution
Micropipettes multicanaux (8 canaux)	Institution
Agitateur rotatif de plaque ELISA	Institution
Spectrophotomètre	Institution
Ordinateur de bureau	Institution
Logiciel d'analyse des données ADAMSEL	Ed Remarque

Plaques de tritration en Polystyrène	Maxisorp F 96 439454	Nunc / SSI
--------------------------------------	-------------------------	------------

Réservoir de réactif en plastique		Institution
Erlenmeyer de 500ml, 2l et 5l		Institution
Embout jaunes pour les pipettes		SSI
Feuille de plastic adhésif		SSI

➤ Réactifs Chimiques:

	Référence	Fournisseur
Acide sulfurique 10M	BBB 133552	Bie & Berntsen
Tween 20	Merck cat. no 822184	Merck Eurolab
3,3' 5,5' Tétraméthylbenzidine + H ₂ O ₂ (TMB ONE)	4380	KEM EN TEC
Tampon de phosphate de sodium (PBS)	18912-014	Gibco
Lait écrémé en poudre		Matas
NaCl		
IgG de chèvre anti-IgG humain conjuguées à la peroxydase	H10007	Caltag
Conjugué anti-IgG humaines de chèvre	H15007	Caltag

couplé à la peroxydase

IgG Poly-clonales humaines purifiées

**The Binding
Site BP055**

The Binding Site

IgM kappa humaines purifiées

**The Binding
Site BP090**

The Binding Site

Plasma témoin positif

Institut Pasteur France

Plasma témoin négatif

Institut Pasteur France

Solution de sensibilisation (Coating buffer)

Solution de blocage

Solution de dilution de sérum

Solution de lavage

Tampon de coloration

Tampon de dilution

Solution d'arrêt 10 M H₂SO₄

Antigène MSP-3 LSP₂₁₂₋₃₈₀

Institut Pasteur France

Modes opératoires

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

Dosage des IgG spécifiques de MSP-3 LSP

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

- D'abord l'initiale du technicien et la date de réalisation sont inscrites sur la plaque.
- Pour la courbe de référence préparer une solution stock de 500ng/ml d'IgG humaines pures
- Mettre à l'aide d'une micropipette 100 µl de cette dilution dans les puits A1 et A2 de la plaque
- Effectuer une dilution en série de raison 2 des A1, A2 jusqu'au puits H1 et H2 puis jeter les 100µl en excès des derniers puits.
- Sensibiliser les puits des colonnes 3 à 12 avec 100 µl de l'antigène MSP-3 LSP dilué à 1.0 µg/ml.
- Couvrez la plaque avec la feuille de plastique adhésive.
- Incuber la plaque pendant une nuit à 2-8°C (la plaque ainsi sensibilisée peut être conservée pendant 21 jours dans le réfrigérateur à 2 à 8°C).

❖ Blocage des plaques

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

❖ Addition du premier anticorps (plasma)

- Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et essorer.

- Pendant la période d'incubation du blocage, diluer les sérums témoins positif et négatifs et les plasmas de volontaires au 1:200 dans le tampon de dilution.
- Distribuer 100µl des sérums et plasmas dilués dans les puits conformément au schéma de plaque.
- Incuber pendant 2heures la plaque à la température du laboratoire dans une chambre humide en agitation lente.
- ❖ **Addition du second anticorps ou conjugué**
 - Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et essorer.
 - Distribuer dans les puits 100µl du conjugué anti-IgG humaine de chèvre dilué à 1:3000 dans le tampon de dilution.
 - Incuber pendant 1heure la plaque à la température du laboratoire dans une chambre humide en agitation lente.
- ❖ **Addition de substrat (TMB)**
 - Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et bien essorer.
 - Distribuer 100 µl de substrat dans chaque puits.
 - Incuber pendant 30 minutes à l'abri de la lumière.
 - Arrêter la réaction en ajoutant 100µl d'une solution H₂SO₄ 1M dans chaque puits.
- ❖ **Lecture et expression des résultats**
 - Mesurer les densités optiques des puits à l'aide d'un spectrophotomètre à 450 nm avec un filtre de référence de 620 nm en utilisant le logiciel SOFTmaxPRO 5.0.
 - Analyser les résultats avec le logiciel ADAMSEL®

Dosage des IgM spécifiques de MSP-3 LSP

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

- D'abord l'initiale du technicien et la date de réalisation sont inscrites sur la plaque.
- Pour la courbe de référence préparer une solution stock de 500ng/ml d'IgM humaines pures
- Mettre à l'aide d'une micropipette 100 µl de cette dilution dans les puits A1 et A2 de la plaque
- Effectuer une dilution en série de raison 2 des A1, A2 jusqu'au puits H1 et H2 puis jeter les 100 µl en excès des derniers puits.
- Sensibiliser les puits des colonnes 3 à 12 avec 100 µl de l'antigène MSP-3 LSP dilué à 1.0 µg/ml.
- Couvrez la plaque avec la feuille de plastique adhésive.
- Incuber la plaque pendant une nuit à 2-8°C (la plaque ainsi sensibilisée peut être conservée pendant 21 jours dans le réfrigérateur à 2 à 8°C).

❖ Blocage des plaques

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

❖ Addition du premier anticorps (plasma)

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

❖ **Addition du second anticorps ou conjugué**

- Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et essorer.
- Distribuer dans les puits 100µl du conjugué anti-IgM humaine de chèvre dilué à 1:3000 dans le tampon de dilution.
- Incuber pendant 1 heure la plaque à la température du laboratoire dans une chambre humide en agitation lente.

❖ **Addition de substrat (TMB one)**

- Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et bien essorer.
- Distribuer 100 µl de substrat dans chaque puits.
- Incuber pendant 30 minutes à l'abri de la lumière.
- Arrêter la réaction en ajoutant 100µl d'une solution H₂SO₄ 1M dans chaque puits.

❖ **Lecture et expression des résultats**

- Mesurer les densités optiques des puits à l'aide d'un spectrophotomètre à 450 nm avec un filtre de référence de 620nm en utilisant le logiciel SOFTmaxPRO 5.0.
- Analyser les résultats avec le logiciel ADAMSEL®
- Les seuils de détection étaient de 1000 ng/ml pour les IgG et IgM.

2- Western blot :

Matériels et réactifs:

➤ Matériels

Cuves de migration Mini-PROTEAN Tetra cell (BioRad Cat N°165-8001)

Module de transfert Mini Trans Blot Module (BioRad Cat N°170-3935)

Générateur PowerPac Basic (BioRad Cat N°165-5052)

Bac pour bandelettes 24 canaux Hoéfer Scientific Instruments

Bac en verre circulaire 9 cm de diamètre et 5cm profondeur

Erlenmeyer

Pipettes de 10ml, 50ml

Micropipettes de 10 µl, 100 µl et 1000 µl

Embouts de 10 µl, 100 µl et 1000 µl

Pinces

Lames de bistouri

Règle

Crayon mine fine

Plaque de verre

➤ Réactifs

RPMI poudre (Gibco N°074-01800)

Gélatine porcine (Sigma G2625)

PBS 10X GIBCO (Cat N° 14200-067)

UltraPURE Distilled Water (GIBCO Cat N° 10977-035)

Tris base (trizma base SIGMA Cat N° T1503)

Glyciné (Fluka Cat N° 50052)

NaCl (Prolabo Cat N° 27810.295)

MgCl₂ anhydre (Merck)

SDS Solution 10% (BioRad Cat N°1610416)

Méthanol (Sigma Aldrich Cat N° 32213)

Glycerol (VWR Prolabo Cat N° 24388-295)

Dithiothreitol (Sigma Cat N° D9779)

EDTA (Sigma Cat N° E5134)

Bleu de Bromophenol (Merck Cat N° 8122)
Ponceau S (Merck Cat N° 15927)
Acide acétique (Riedel-de Haën Cat N° 27221)
Ready gel, 4-20 % Tris-HCL, 2D/PREP1 (BioRad Cat N° 1611141)
Ready gel, 12 % TRIS-HCL, 2D/PREP1 (BioRad Cat N° 1611138)
Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards (BioRad Cat N°1610375)
Nitrocellulose Hybond C Extra (Amersham Biosciences Cat N° RPN 303E)
Papier filtre Whatman 3mm Chr (Schleicher & Schuell Cat N° 3030 917)
Lait écrémé en poudre
Tween 20 (PROLABO Cat N° 28 829. 296)
Sérum de rat immunisé par MSP3 TLP (témoin positif)
Anti-Human IgG (H+L), AP (phosphatase alcaline) Conjugate (PROMEGA Cat N° S3821)
Anti-Rat IgG (H+L), AP (phosphatase alcaline) Conjugate (PROMEGA Cat N° S3831)
BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) / NBT(nitrobleutetrazolium) color development substrate (PROMEGA Cat N° S3771)
Eau déminéralisée
Papier buvard

➤ **Solutions**

- Gélatine porcine 1% : diluer sous agitation en chauffant légèrement 1 gr de poudre dans 100 ml de RPMI

-Tampon d'échantillon (2x) réducteur pour 100ml à conserver aliquoté à -20°C

Upper tris pH 6,8	25ml
SDS solution 10%	40 ml
Glycérol	20ml
Dithiothreitol (200mM)	3,1g
EDTA (10mM)	372 mg
Bleu de bromophéno!	
H ₂ O	qsp 100ml

-Upper tris (4x)

tris base 0,5M

SDS 0,4%

pH 6,8

- Tampon électrophorèse et de transfert 10x pour 1 litre

Tris base 30,3 grs

Glycine 144 grs

H₂O qsp 1 litre

- Coloration nitrocellulose

Rouge Ponceau S 0,2% dans acide acétique 5%

- Tampon TBS solution stock 10x

Tris Base 60,55 grs

NaCl 87,66 grs

H₂O qsp 1 litre

Ajuster à pH 8 avant de ramener au volume final

- Tampon AP (substrat phosphatase alcaline) pH 9,5 solution stock 10X

Tris- base 121,10 grs

NaCl 58,44 grs

MgCl₂ 4,76 grs

H₂O qsp 1 litre

Ajuster à pH 9,5 avant de ramener au volume final

Préparation des solutions

Tampon de migration pour l'électrophorèse (pour 1 litre) : 890 ml H₂O + 100 ml solution stock + 10ml de SDS 10% soit SDS 0,1% final

Tampon de transfert : pour 1 litre : 700ml H₂O + 100ml tampon 10x + 200ml Méthanol

Tampon de saturation : lait écrémé 5 % dans du TBS 1x

Tampon de dilution des plasmas : lait écrémé 5% dans du TBS 1x tween 0,05%

Tampon de lavage avec lait : lait écrémé 5% dans du TBS 1x tween 0,05%

Tampon de lavage sans lait : TBS 1x Tween 0,05%

Tampon de dilution de l'anticorps marqué : TBS 1x tween 0,05%

Substrat : 66 µl de NBT + 33 µl de BCIP pour 10ml de tampon AP1x (à préparer extemporanément).

3- Tampon de sensibilisation

Volume: 1Litre

Date de préparation: _____

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

Procédure :

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

Etiquette:

- " Tampon de Coating " + date + initiales

Conservation :

3 mois entre 2 – 8 °C

Préparer par: _____, sur -

Nom_____
Date

4- Tampon de blocage

Volume: 1Litre

Date de préparation: _____

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

Procédure :

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

Etiquette:

- "Tampon de blocage" + date + initiales

Conservation :

Utiliser le Tampon de blocage frais.

Préparer par: _____, sur -

Nom_____
Date

5- Tampon de dilution des sérums

Volume: 1Litre

Date de préparation: _____

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

Procédure :

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

Etiquette :

" Tampon de dilution de Sérum + date + initiales

Conservation :

3 semaines entre 2 – 8 °C

Préparer par: _____, sur -

Name

Date

6- Tampon de dilution

Volume: 1Litre

Date de préparation: _____

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

Procédure :

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

Etiquette :

* Tampon de dilution + date + initiales

Conservation :

3 semaines entre 2 – 8 °C

Préparer par: _____, sur -

Name

Date

7- Tampon de lavage

Volume: 5Litres

Date de préparation: _____

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

Procédure :

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

Etiquette :

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

Conservation :

1 semaine à la température du laboratoire

Préparer par: _____, sur -

Nom_____
Date

8- Solution d'arrêt

Volume: 1Litre

Date de préparation: _____

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

Procédure :

1. Ajoutez la quantité indiquée de l'eau à un flacon
2. Ajoutez la quantité indiquée de 10M H₂SO₄.
3. Refroidissez à la température ambiante.

Etiquette :"0.2 M H₂SO₄" + date + initiales**Conservation :**

8 mois à la température du laboratoire

Préparer par: _____, sur -

Nom_____
Date

9- Protocol de travail ELISA IgG												
Date: N° de série : Initiales :	Objectif:											Cocher les étapes faites (√)
Sensibilisation	Distribuer 100 µl par puits de a) Préparation IgG standard (dilutions en séries de raison 2) des colonnes 1 et 2 et b) rAg : MSP-3 LSP dans le PBS à 1 µg/ml des colonnes 3 - 12. Plaque: NUNC 439454 Maxisorb								Date de sensibilisation 4°C			
Lavage	Tampon de lavage								4 x 1 min.			
Blocage	150 µl par puits du tampon de blocage								1 h en agitation			
Lavage	Tampon de lavage								4 x 1 min.			
Incubation avec le premier anticorps.	Les sérums sont dilués à 1:200 dans le tampon de dilution Distribuer 100 µl par puits								2 h en agitation			
Lavage	Tampon de lavage								4 x 1 min.			
Incubation avec le second anticorps.	Conjuguée Anti-IgG humaine de chèvre couplé à la Peroxydase (Caltag) diluée à 1:3000 dans le tampon de dilution. Ajouter 100 µl dans les puits								1 h en agitation			
Lavage	Tampon de lavage								4 x 1 min.			
Réaction de coloration	100 µl de la solution de mélange à part égale de TMB et H ₂ O ₂ dans chaque puits.								30 min. à la température du labo à l'obscurité			
Arrêt	100 µl de 0.2 M H ₂ SO ₄ puis Lecture à 450 nm, réf. 620 nm											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std IgG* 100 ng/ml	Std IgG 100 ng/ml	PC-1	PC-1	S-1	S-1	S-9	S-9	S-17	S-17	S-25	S-25
B	50 ng/ml	50 ng/ml	PC-2	PC-2	S-2	S-2	S-10	S-10	S-18	S-18	S-26	S-26
C	25 ng/ml	25 ng/ml	PC-3	PC-3	S-3	S-4	S-11	S-11	S-19	S-19	S-27	S-27
D	12.5 ng/ml	12.5 ng/ml	PC-4	PC-4	S-4	S-4	S-12	S-12	S-20	S-20	S-28	S-28
E	6.25 ng/ml	6.25 ng/ml	NC-1	NC-1	S-5	S-5	S-13	S-13	S-21	S-21	S-29	S-29
F	3.13 ng/ml	3.13 ng/ml	NC-2	NC-2	S-6	S-6	S-14	S-14	S-22	S-22	S-30	S-30
G	1.56 ng/ml	1.56 ng/ml	PBS	PBS	S-7	S-7	S-15	S-15	S-23	S-23	S-31	S-31
H	0.78 ng/ml	0.78 ng/ml	PBS	PBS	S-8	S-8	S-16	S-16	S-24	S-24	S-32	S-32

*Std IgG = IgG Standard (protéine pure de myélome)

Commentaires :

10- Protocol de travail ELISA IgM												
Date: N° de série : Initiales :	Objectif:										Cocher les étapes faites (√)	
Sensibilisation	Distribuer 100 µl par puits de a) Préparation IgM standard (dilutions en séries de raison 2) des colonnes 1 et 2 et b) rAg : MSP-3 LSP dans le PBS à 1 µg/ml des colonnes 3 - 12. Plaque: NUNC 439454 Maxisorb							Date de sensibilisation 4°C				
Lavage	Tampon de lavage							4 x 1 min.				
Blocage	150 µl par puits du tampon de blocage							1 h en agitation				
Lavage	Tampon de lavage							4 x 1 min.				
Incubation avec le premier anticorps.	Les sérums sont dilués à 1:200__ dans le tampon de dilution Distribuer 100 µl par puits							2 h en agitation				
Lavage	Tampon de lavage							4 x 1 min.				
Incubation avec le second anticorps.	Conjugué anti- IgM humaine de chèvre couplé à la Peroxydase (Caltag) diluée à 1:3000 dans le tampon de dilution. Ajouter 100 µl dans les puits							1 h en agitation				
Lavage	Tampon de lavage							4 x 1 min.				
Réaction de coloration	100 µl de la solution du mélange à parts égales de TMB et de H ₂ O ₂ dans chaque puits							30 min. à la température du labo à l'obscurité				
Arrêt	100 µl de 0.2 M H ₂ SO ₄ , Lecture à 450 nm, réf. 620 nm											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std* IgM 100 ng/ml	Std IgM 100 ng/ml	PC-1	PC-1	S-1	S-1	S-9	S-9	S-17	S-17	S-25	S-25
B	50 ng/ml	50 ng/ml	PC-2	PC-2	S-2	S-2	S-10	S-10	S-18	S-18	S-26	S-26
C	25 ng/ml	25 ng/ml	PC-3	PC-3	S-3	S-4	S-11	S-11	S-19	S-19	S-27	S-27
D	12.5 ng/ml	12.5 ng/ml	PC-4	PC-4	S-4	S-4	S-12	S-12	S-20	S-20	S-28	S-28
E	6.25 ng/ml	6.25 ng/ml	NC-1	NC-1	S-5	S-5	S-13	S-13	S-21	S-21	S-29	S-29
F	3.13 ng/ml	3.13 ng/ml	NC-2	NC-2	S-6	S-6	S-14	S-14	S-22	S-22	S-30	S-30
G	1.56 ng/ml	1.56 ng/ml	PBS	PBS	S-7	S-7	S-15	S-15	S-23	S-23	S-31	S-31
H	0.78 ng/ml	0.78 ng/ml	PBS	PBS	S-8	S-8	S-16	S-16	S-24	S-24	S-32	S-32

*Std IgM = IgM Standard (protéine pure de myélome)

Commentaires :

SERMENT DE GALIEN



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

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

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

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

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

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

Je le jure!