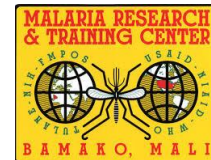


**REPUBLIQUE DU MALI**  
**Un Peuple-Un But-Une Foi**

**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE DES SCIENCES DES TECHNIQUES  
ET DES TECHNOLOGIES DE BAMAKO**

**FACULTE DE PHARMACIE**



*Année universitaire...*

*N...*

***Etude des populations lymphocytaires T avant et après  
administration des candidats vaccin Pfs25M-EPA/ASO1 et  
Pfs230D1M-EPA/ASO1, bloquants la transmission du  
Plasmodium falciparum chez les adultes à Sotuba, Mali***

**THÈSE :**

*Présentée et soutenue publiquement, le 10 /Août/ 2019*

*Devant la Faculté de Pharmacie*

PAR :

**M. Coulibaly Barasse**

*Pour l'obtention du grade de Docteur en Pharmacie (Diplôme d'Etat)*

JURY :

Président : **Pr Boubacar TRAORE**

Membres : **Dr Seidina A.S DIAKITE**

**Dr Oumar ATTAHER**

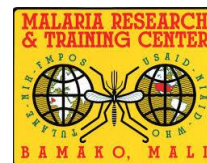
Directeur de thèse : **Pr Issaka SAGARA**

REPUBLIQUE DU MALI  
**Un Peuple-Un But-Une Foi**

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DES SCIENCES DES TECHNIQUES  
ET DES TECHNOLOGIES DE BAMAKO

FACULTE DE PHARMACIE



*Année universitaire...*

*N...*

***Etude des populations lymphocytaires T avant et après administration des candidats vaccin Pfs25M-EPA/ASO<sub>1</sub> et Pfs230D<sub>1</sub>M-EPA/ASO<sub>1</sub>, bloquants la transmission du Plasmodium falciparum chez les adultes à Sotuba, Mali***

**THÈSE :**

*Présentée et soutenue publiquement, le 10 /Août/ 2019*

*Devant la Faculté de Pharmacie*

PAR :

**M. COULIBALY BARASSE**

Pour l'obtention du grade de Docteur en Pharmacie (Diplôme d'Etat)

JURY :

Président : **Pr Boubacar TRAORE**

Membres : **Dr Seidina A.S DIAKITE**

**Dr Oumar ATTAHER**

Directeur de thèse : **Pr Issaka SAGARA**

# LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DE PHARMACIE

---

## ➤ ADMINISTRATION

**Doyen : Boubacar TRAORE, Professeur**

**Vice-doyen : Ababacar I. MAIGA, Professeur**

**Secrétaire principal : Seydou COULIBALY, Administrateur Civil**

**Agent comptable : Famalé DIONSAN, Contrôleur des Finances.**

## ➤ PROFESSEURS HONORAIRES

<i>N</i>	<i>PRENOMS</i>	<i>NOM</i>	<i>SPECIALITE</i>
1	Bouacac Sidiki	CISSE	Toxicologie
2	Mahamadou	CISSE	Biologie
3	Daouda	DIALLO	Chimie Générale et Minérale
4	Souleymane	DIALLO	Bactériologie-Virologie
5	Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
6	Ousmane	DOUMBIA	Chimie thérapeutique
7	Boukassoum	H Aidara	Législation
8	Gaoussou	KANOUTE	Chimie Analytique
9	Alou A.	KEITA	Galénique
10	Mamadou	KONE	Physiologie
11	Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
12	Bréhima	KOUMARE	Bactériologie et Virologie
13	Abdourahamane S.	MAIGA	Parasitologie
14	Elimane	MARIKO	Pharmacologie

---

➤ **DER : SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES**

**1. PROFESSEURS / DIRECTEURS DE RECHERCHE**

<i>NO</i>	<i>PRENOMS</i>	<i>NOM</i>	<i>SPECIALITE</i>
1	Mounirou	BABY	Hématologie
2	Bakary Mamadou	CISSE	Biochimie
3	Abdoulaye	DABO	Biologie / Parasitologie
4	Mahamadou	DIAKITE	Immunologie-Génétique
5	Alassane	DICKO	Santé Publique
6	Amagana	DOLO	Parasitologie - Mycologie
7	Akory Ag	IKNANE	Sante Publique
8	Ousmane	KOITA	Biologie Moléculaire
9	Boubacar	TRAORE	Parasitologie - Mycologie

**2. MAITRES DE CONFERENCE / MAITRE DE RECHERCHE**

<i>NO</i>	<i>PRENOMS</i>	<i>NOM</i>	<i>SPECIALITE</i>
1	Flabou	BOUGOUDOGO	Bactériologie-Virologie
2	Abdoulaye	DJIMDE	Parasitologie-Mycologie
3	Aldjouma	GUINDO	Hématologie
4	Kassoum	KAYENTAO	Santé publique/ Bio-statistique
5	Bourèma	KOURIBA	Immunologie <b>chef de DER</b>
6	Issaka	SAGARA	Bio-statistique
7	Mahamadou Soumana	SISSOKO	Bio-statistique
8	Ousmane	TOURE	Santé Publiq/Santé Environnem

**3. MAITRES ASSISTANTS / CHARGE DE RECHERCHE**

<i>NO</i>	<i>PRENOMS</i>	<i>NOM</i>	<i>SPECIALITE</i>
1	Mohamed	AG BARAIKA	Bactériologie-virologie
2	Charles	ARAMA	Immunologie
3	Boubacar Tiétiè	BISSAN	Biologie Clinique
4	Djibril Mamadou	COULIBALY	Biochimie clinique
5	Seydou Sassou	COULIBALY	Biochimie clinique
6	Antoine	DARA	Biologie Moléculaire
7	Souleymane	DAMA	Parasitologie-Mycologie
8	Djénéba Koumba	DABITAO	Biologie Moléculaire
9	Laurent	DEMBELE	Biotechnologie Microbienne

10	Klétigui Casimir	DEMBELE	Biochimie clinique
11	Seydina S.A.	DIAKITE	Immunologie
12	Yaya	GOITA	Biochimie clinique
13	Ibrahima	GUINDO	Bactériologie-Virologie
14	Aminatou	KONE	Biologie Moléculaire
15	Birama Apho	LY	Santé Publique
17	Samba Adama	SANGARE	Biologie Cellulaire
18	Fanta	SANGHO	Santé Publique

#### 4. ASSISTANTS / ATTACHE DE RECHERCHE

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Djénéba	COULIBALY	Nutrition/Diététique
2	Issa	DIARRA	Immunologie
3	Fatou	DIAWARA	Epidemiologie
4	Merepen dite Agnes	GUINDO	Immunologie
5	Oumar	GUINDO	Epidemiologie
6	Falaye	KEITA	Santé publiq/sante Environnem
7	N'Deye Lallah Nina	KOITE	Nutrition
8	Amadou Birama	NIANGALY	Parasitologie-Mycologie
9	Oumar	SANGHO	Epidémiologie
10	Djakaridia	TRAORE	Hématologie

#### ➤ DER : SCIENCES PHARMACEUTIQUES

##### 1. PROFESSEURS / DIRECTEUR DE RECHERCHE

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
2	Saïbou	MAIGA	Législation
3	Rokia	SANOGO	Pharmacognosie <b>Chef de DER</b>

##### 2. MAITRES DE CONFERENCES / MAITRES DE RECHERCHE

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
-	Néant	-	-

**3. MAITRES ASSISTANTS / CHARGE DE RECHERCHE**

<i>NO</i>	<i>PRENOMS</i>	<i>NOM</i>	<i>SPECIALITE</i>
1	Loséni	BENGALY	Pharmacie Hospitalière
2	Bakary Moussa	CISSE	Galénique
3	Yaya	COULIBALY	Législation
4	Issa	COULIBALY	Gestion
5	Balla Fatogoma	COULIBALY	Pharmacie hospitalière
6	Mahamane	HADARA	Pharmacognosie
8	Moussa	SANOGO	Gestion
7	Hamma Boubacar	MAIGA	Galénique
9	Adiaratou	TOGOLA	Pharmacognosie

**4. ASSISTANTS / ATTACHE DE RECHERCHE**

<i>NO</i>	<i>PRENOMS</i>	<i>NOM</i>	<i>SPECIALITE</i>
1	Seydou Lahaye	COULIBALY	Gestion Pharmaceutique
2	Daouda Lassine	DEMBELE	Pharmacognosie
3	Adama	DENOU	Pharmacognosie
4	Sékou	DOUMBIA	Pharmacognosie
5	Assitan	KALOGA	Législation
6	Ahmed	MAIGA	Législation
7	Aichata Ben Adam	MARIKO	Galénique
8	Aboubacar	SANGHO	Législation
9	Bourama	TRAORE	Législation
10	Karim	TRAORE	Sciences Pharmaceutiques
11	Sylvestre	TRAORE	Gestion Pharmaceutique
12	Aminata Tièba	TRAORE	Pharmacie Hospitalière
13	Mohamed dit Sarmoye	TRAORE	Pharmacie Hospitalière

**DER : SCIENCES DU MEDICAMENT****1. PROFESSEURS / DIRECTEUR DE RECHERCHE**

<i>NO</i>	<i>PRENOMS</i>	<i>NOM</i>	<i>SPECIALITE</i>
1	Benoit Yaranga	KOUMARE	Chimie Analytique
2	Ababacar I.	MAIGA	Toxicologie

## 2. MAITRES DE CONFERENCE / MAITRE DE RECHERCHE

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Sékou	BAH	Pharmacologie <b>Chef de DER</b>

## 3. MAITRES ASSISTANTS / CHARGE DE RECHERCHE

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Dominique Patomo	ARAMA	Pharmacie Chimique
2	Mody	CISSE	Chimie Thérapeutique
3	Ousmane	DEMBELE	Chimie Thérapeutique
4	Tidiane	DIALLO	Toxicologie
5	Hamadoun Abba	TOURE	Bromatologie

## 4. ASSISTANTS / ATTACHE DE RECHERCHE

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mahamadou	BALLO	Pharmacologie
2	Dalaye Bernadette	COULIBALY	Chimie Analytique
3	Blaise	DACKOOU	Chimie Analytique
4	Fatoumata	DAOU	Pharmacologie
5	Abdourahamane	DIARA	Toxicologie
6	Aiguerou dit Abdoulaye	GUINDO	Pharmacologie
7	Madani	MARIKO	Chimie Analytique
8	Mohamed El Béchir	NACO	Chimie Analytique
9	Mahamadou	TANDIA	Chimie Analytique
10	Dougoutigui	TANGARA	Chimie Analytique

### ➤ DER : SCIENCES FONDAMENTALES

## 1. PROFESSEURS / DIRECTEUR DE RECHERCHE

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mouctar	DIALLO	Biologie/ <b>Chef de DER</b>
2	Cheick F.	TRAORE	Biologie / Entomologie
3	Mahamadou	TRAORE	Génétique

## 2. MAITRES DE CONFERENCES / MAITRE DE RECHERCHE

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Lassana	DOUMBIA	Chimie Appliquée

**3. MAITRES ASSISTANTS / CARGE DE RECHERCHE**

<i>NO</i>	<i>PRENOMS</i>	<i>NOM</i>	<i>SPECIALITE</i>
1	Abdoulaye	KANTE	Anatomie
2	Boureima	KELLY	Physiologie medicale

**4. ASSISTANTS / ATTACHE DE RECHERCHE**

<i>NO</i>	<i>PRENOMS</i>	<i>NOM</i>	<i>SPECIALITE</i>
1	Seydou Simbo	DIAKITE	Chimie Organique
2	Modibo	DIALLO	Génétique
3	Moussa	KONE	Chimie Organique
4	Mamadou Lamine	DIARRA	Biologie Végétale, Botanique
5	Massiriba	KONE	Biologie Entomologie

➤ **CHARGES DE COURS (VACATAIRES)**

<i>NO</i>	<i>PRENOMS</i>	<i>NOM</i>	<i>SPECIALITE</i>
1	Cheick Oumar	BAGAYOKO	Informatique
2	Babou	BAH	Anatomie
3	Abdourahamane	COULIBALY	Anthropologie Médicale
4	Souleymane	COULIBALY	Psychologie
5	Bouba	DIARRA	Bactériologie
6	Modibo	DIARRA	Nutrition
7	Moussa I.	DIARRA	Biophysique
8	Babacar	DIOP	Chimie
9	Atimé	DJIMDE	Bromatologie
10	Yaya	KANE	Galénique
11	Boubacar	KANTE	Galénique
12	Aboubakary	MAIGA	Chimie Organique
13	Massambou	SACKO	SCMP / SIM
14	Modibo	SANGARE	Anglais
15	Sidi Boula	SISSOKO	Histologie-Embryologie
16	Fatoumata	SOKONA	Hygiène du Milieu
17	Fana	TANGARA	Maths
18	Abdel Kader	TRAORE	Pathologies Médicales



19	Djénébou	TRAORE	Sémiologie et Pathologie médic
20	Boubacar	ZIBEIROU	Physique

---

# DEDICACES

---

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

*Je dédie cette thèse de Doctorat :*

A ma grand-mère **Djisson KONARE** pour l'amour, la patience, l'amitié et pour avoir fait de moi un homme. Comment puis-je te récompenser, **Mah**, si ce n'est par le travail bien fait. Voici que je te présente un cadeau, accepte le comme le couronnement de tes efforts.

Tes conseils, ton accompagnement ne nous ont jamais fait défaut et nous donnent le courage d'aller toujours de l'avent. Que **DIEU** le **Clément** te donne une longue vie et qu'il te garde longtemps à nos côtés.

A mes mères **Assetou KONARE**, **Assaitou COULIBALY**, **Sitan COULIBALY**, **Sayon DIARRA**

La générosité et l'affection font de vous des femmes sages et exceptionnelles, vous nous avez toujours assistés avec vos enseignements de mère de famille exemplaires. Ce travail est la consécration de tous les efforts que vous avez déployés pour mes frères, mes sœurs et moi. Que Dieu puisse vous prêter logue vie pleine de bonheur

A mes pères **Louis Itilen**, **Francis B** et **Harouna Ntio Coulibaly**

Vous êtes pour nous des pères exemplaires. Merci pour tout ce que vous nous avez donnés ; vos affections, vos conseils et vos dévouements pour la réussite de vos enfants n'ont jamais fait défaut. Toujours présents à nos côtés, Vous nous avez suivis dans notre enseignement et notre éducation malgré vos multiples occupations.

Qu'**ALLAH** le **tout Puissant** vous accorde une longue vie pleine de santé et de bonheur

A mes sœurs et frères ; **Marie Josee**, **Kesse**, **Agnes Massaran**, **Joseph Desire**, **Maman f**, **Youssef**, **Karim**, **Fousseyni**, **Fadjigui COULIBALY**

Vous avez tous de près ou de loin contribué à la réalisation de ce travail. Je ne me suis jamais senti abandonné, même aux moments les plus difficiles au cours de cette longue étude. Je

---

vous souhaite un avenir brillant en rappelant que le travail est libérateur. <<Allah ka balen maya to>>

**A la mémoire de mon très cher ami Feu Seydou Bouare**

Autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes soient-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Merci pour tout ce que tu as consenti pour moi. Reposez en paix mon chers et que Dieu t'accorde son paradis éternel.

---

# REMERCIEMENTS

---

Ma profonde reconnaissance et mes sincères et chaleureux remerciements aux personnes et groupes de personnes suivantes, sans lesquelles ce travail fruit d'un véritable effort collectif n'aurait vu le jour :

A **Dr Kalifa DIARRA** pour son soutien, son encouragement, sa disponibilité et ses conseils qui ne m'ont à aucun moment fait défaut. Merci pour ton encadrement et tes contributions exceptionnelles dans la réalisation de ce travail. Que **Dieu** vous permette de gravir plein d'échelons scientifiques.

A **Dr Amatigué Zeguime** 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.

A **Dr Oumar ATTAHER** Cette thèse a été facilitée par votre appui technique et bienveillance. En dehors du travail votre humanisme fait de vous un modèle. Chers aîné, je vous remercie pour tout.

A **Kadidia CISSE** Pour la considération et la confiance que vous avez pour moi, Bonheur et longévité à toi et toute ta famille

A toute l'équipe de l'unité d'immunologie : **Boubacar DEMBELE, Ahamadou Youssouf CISSE, Sidi Mohamed NIAMBELE, Ali TOGORA, Amara CISSE Mamoutou YATTOURA, Keita YAYA et Ibrahim KONE** Soldats infatigables et dévoués à la lutte quotidienne contre le paludisme et aux progrès de la recherche: soyez infiniment remerciés pour l'extraordinaire esprit d'équipe et la productivité

A **Cheick Hamalla Diallo, Mamoutou Diarra, Moussa Papi Keita, Boubacar Moukoro, Aiché Keita, Alassane Doumbia, Kadi Ina Sall, Almam Keita** je n'oublierai jamais le soutien moral et matériel que vous m'avez apporté. Trouvez ici l'expression de mes sentiments sincères de reconnaissance

Une mention spéciale

---

A mes amis de la faculté de pharmacie (FAPH) et de la faculté de médecine et d'odontostomatologie (FMOS) : **Modibo Salia Drame, Hamidou Cisse, Arkiétou Maiga, Hamadoun Traore, Aminata Dembele, Gouro S Cisse, Aboubacar Y Sidibé, Aboubacar Sadick Koné, Alkali Doumbia, Aoua Traore, Nema Dembélé, Yasmina Diarra, Kadidiatou B Coulibaly, Yamadou Kanouté, Mahady Sissoko, Hawa Bayogo, Binta Sangare, Kanourou Bayogo, Aissata Cissé, Massaran Diallo, .....**

Ce travail est le vôtre, je n'oublierai jamais les moments difficiles qu'on a franchis ensemble, pendant lesquels vos qualités sont ressorties. Je ne saurais oublier les luttes farouches que nous avons menées nuit et jour pour notre réussite. Les mots me manquent aujourd'hui pour vous apprécier à vos justes valeurs.

A mes amis de la cité : **Allassane Doumbia, Modibo Koné, Mohamed Boré, Mamadou Sagara, Amaguiré Diallo, Drissa Bouaré, Idrissa Bouaré, Sadou Diallo, Moussa sidibe, Lamine Keita, Mouctar Keita**, pour les bons moments passés ensemble depuis l'adolescence. Puisse Dieu raffermir nos liens

Aux amis de LEO CLUB INTERNATIONAL du Mali et d'ailleurs, spécifiquement LEO club SIGUI DANKELE de BAMAKO. C'est avec vous que je partage la réussite de ce travail. Veuillez croire à mon attachement fraternel très profond.

A **Dr Chantal Afou Bengaly** qui m'a toujours soutenu et encouragé tout au long de ce cheminement.

A toute la promotion «Pr N'golo Diarra» pour le climat d'entente, de gaieté et de compassion mutuelle que nous avons fait prévaloir durant notre cycle. Que **Dieu** nous accorde beaucoup de chance et de réussite dans toutes nos carrières professionnelles respectives.

A tous les Professeurs responsables de cours à la FAPH (faculté de Pharmacie) et à la FMOS (faculté de Médecine et d'Odontostomatologie), pour la qualité de vos enseignements

A tout le personnel du MRTC/DEAP.

A nos partenaires : NIH, NIAID, LMIV, GSK

A nos guides locaux et tous les membres de l'équipe 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 Secrétaires, gestionnaires, chauffeurs et manœuvres du MRTC/DEAP/FAPH-FMOS :  
Merci pour le service rendu.

A toutes et à tous, qui de près ou de loin m'ont soutenu, les mots me manquent pour vous exprimer toute ma gratitude, ma reconnaissance et tout mon respect.

---

# HOMMAGE AUX MEMBRES DU JURY

---

**A notre Maître et Président du jury**

**Professeur Boubacar TRAORE**

- ✓ Professeur Titulaire de Parasitologie-Mycologie à la FAPH
- ✓ Doyen de la faculté de pharmacie
- ✓ Directeur scientifique du laboratoire clinique du MRTC
- ✓ Responsable de l'unité Paludisme/Grossesse et Immuno-pathologie du Département d'Epidémiologie des Affection Parasitaires;

Cher Maître

Votre simplicité, votre modestie, votre rigueur scientifique et votre dévouement pour le travail bien fait font de vous un maître exemplaire, de renommé international et de surcroit, apprécié de tous

Recevez cher maître, notre profond respect et toute notre reconnaissance.

---

**A notre Maitre et juge****Dr Oumar Attaher**

- ✓ Pharmacien chercheur au MRTC
- ✓ DES en Biologie Clinique
- ✓ Candidat PhD à l'université

Cher Maitre

C'est un grand honneur et un réel plaisir de vous avoir parmi nos membres du jury

Votre bonne collaboration avec toute l'équipe de LMIV, votre humilité et votre attention ne nous ont pas laissés indifférents et font de vous une référence scientifique.

Veillez agréer cher MAITRE, l'expression de notre profonde gratitude et soyez assuré de nos sentiments de sincères remerciements.

---



**A notre Maitre et juge.**

**Docteur Seidina DIAKITE**

- ✓ Pharmacien chercheur au MRTC
- ✓ PhD en immunologie à l'Université pierre et Marie Curie/USTTB
- ✓ Maitre-assistant en Immunologie à la FAPH

Cher Maitre

Nous avons été impressionnés par la promptitude et la modestie avec lesquelles vous avez accepté de juger ce travail malgré vos multiples sollicitations

Votre dévouement, votre rigueur scientifique et votre sens élevé de la personnalité humaine font de vous un exemple à suivre

Veillez accepter cher Maitre, nos sentiments d'estime et de profond respect

.

---

**A notre Maitre et Directeur de thèse.**

**Professeur Issaka SAGARA**

- ✓ Maitre de conférences/Maitre de recherché en Biostatistique, FAPH/USTTB
- ✓ Chef de l'unité Biostatistique et data management au MRTC/DEAP/FMOS de Bamako.
- ✓ Investigateur principal (PI) des essais vaccinaux à Bancoumana, Donéguébougou et Sotuba.

Cher Maitre

Vous nous avez fait un grand honneur en nous acceptant dans votre SERVICE et cela, avec la plus grande amabilité qui soit. Soyez en remercié

Votre simplicité, votre générosité, votre culture scientifique et votre ouverture envers les étudiants, font de vous un homme remarquable et un professeur exemplaire

Sans vos sages conseils, votre disponibilité, votre patience et votre encadrement à hauteur de souhait, ce travail n'aurait pas vu le jour

Veillez agréer honorable MAITRE, l'assurance de notre profonde reconnaissance.

---

# SIGLE DES ABREVIATIONS

---

**ADCI:** Antibody Dependent Cell Mediated Inhibition

**AMA-1:** Apical Membrane Antigen1

*P.f:* *Plasmodium falciparum*

**TBV:** Transmission Blocking malaria Vaccines

**OMS:** Organisation Mondiale de la Santé

**MRTC:** Malaria Research and Training Center

**USTTB:** Université des Sciences des Techniques et des Technologies de Bamako

**LMIV:** Laboratory of Malaria Immunology and Vaccinology

**NIAID:** National Institute of Allergy and Infectious Diseases

**NIH:** National Institute of Health

**PAMP:** Pathogen Associated Molecular Pattern

**TRAP:** Thrombosporin Related Adhesion Protein

**DMSO:** Dimethyl Sulfoxid

**PBS:** Phosphate Buffered Saline

**EIPM :** Enquetes sur les Indicateurs du Paludisme au Mali

**EDTA:** Ethylène Diamine Tétra Acétique

**β-hCG:** Hormone chorionique Gonadotrope

**PD1:** Programmed Cell Death 1

**CD8:** Cluster de différenciation 8

**S.D:** Standard Deviation

**CD4:** Cluster de différenciation 4

**LSA-3:** Liver Stage Antigen-3

**EPA:** Exo Protein A

**SMFA:** Standard Membrane Feeding Assay

**FDA:** Food and Drugs Administration

**LT:** Lymphocyte T

**LB:** Lymphocyte B

**NK Cell:** Natural Killer Cell

**CMH:** Complexe Majeur Histocompatibilité

**Ig:** Immunoglobuline

**Hbs:** Antigène de Surface de l'Hépatite B

**G-6PD:** Glucose 6 Phosphate Déshydrogénase

**TLR1:** Recepteurs Toll Like

**DC:** Cellule Dendritique

**IFN:** Interféron

**CSP:** Circum Sporozoite Protein

**NANP:** Asn-Ala-Asn Pro

**FBS:** Fetal Bovine Serum

**RPMI:** Roswell Park Memorial institute

**TRAP:** Thrombospondin Related Adhesion Protein

**SST:** Serum Separating Tube

**BD:** Becton Dickinson

**CXCR5:** Chemokine Receptor Type 5

---

# TABLE DES MATIERES

---

LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DE PHARMACIE .....	I
DEDICACES .....	VIII
REMERCIEMENTS .....	X
HOMMAGE AUX MEMBRES DU JURY .....	XIII
SIGLE DES ABREVIATIONS .....	XVII
TABLE DES MATIERES.....	XVII
LISTE DES TABLEAUX .....	XVIII
LISTE DES FIGURES.....	XIX
1. Introduction.....	1
2. Question de Recherche .....	4
3. Hypothèse de Recherche.....	5
4. Objectifs.....	6
4.1. <b>Objectif général</b> : .....	6
4.2. <b>Objectifs spécifiques</b> : .....	6
5. Généralités .....	7
5.1. <b>Immunologie anti palustre.</b> .....	7
5.1.1. <b>L'immunité innée</b> .....	7
5.1.1.1. <b>Les facteurs génétiques de résistance</b> .....	7
5.1.1.2. <b>Les réponses cellulaires de l'immunité innée antipaludique</b> : .....	8
5.1.1.3. <b>le système du complément:</b> .....	12
5.1.2. <b>L'immunité acquise:</b> .....	13
5.1.2.1. <b>Les réponses cellulaires:</b> .....	13
5.1.2.2. <b>Les réponses humorales</b> : .....	15
5.2 <b>les lymphocytes T</b> .....	16
5.2.1. <b>Morphologie</b> .....	16
5.2.2. <b>Sous population de lymphocytes T</b> .....	17
5.2.3. <b>les marqueurs phénotypiques</b> .....	20
5.3. <b>Les vaccins antipaludiques état des lieux:</b> .....	21
5.3.1. <b>Vaccins contre les stades pré érythrocytaires (vaccins antispérozoites)</b> .....	21

---

5.3.2.	Vaccins contre les stades asexués érythrocytaires (Vaccins antimerozoïtes) ....	23
5.3.3.	Le vaccin bloquant la transmission (Transmission-blocking Vaccine ou TBV)	24
5.4.	Les principales difficultés .....	26
5.5.	Développement clinique d'un vaccin antipaludique.....	27
5.6.	Les vaccins antipaludiques en cours d'étude.....	29
5.7.	Les produits de l'étude: .....	30
5.7.1.	Les vaccins bloquant la transmission (Pfs25M-EPA/AS01, Pfs230D1M-EPA/AS01).....	30
5.7.2.	ENGERIX-B (vaccin contre l'hépatite B: recombinant):.....	32
6.	Matériels et Méthodes .....	34
6.1.	lieu d'étude.....	34
6.2.	Type d'étude .....	36
6.3.	Période d'étude.....	36
6.4.	population d'étude :.....	36
6.4.1.	Échantillonnage: .....	36
6.4.2.	Critères d'Inclusion :.....	36
6.4.3.	Critères de non Inclusion .....	37
6.5.	Critères de jugement de l'étude .....	38
6.6.	Considérations éthiques .....	38
6.7.	Organisation pratique du travail .....	38
6.7.1.	Dépistage .....	38
6.7.2.	Vaccination.....	39
6.7.3.	Suivi :.....	40
6.7.4.	Salle de réanimation : .....	40
6.7.5.	Etude immunologique .....	40
6.7.6.	Analyses des réponses cellulaires.....	41
6.8.	Collecte, saisie, analyse des données .....	42
7	Résultat .....	43
7.1.	Les caractéristiques de base .....	43
7.2.	Les réponses cellulaires aux vaccins .....	44
7.2.1.	Expression des cellules TCD4 .....	44
7.2.2.	Expression des cellules TCD8 .....	46
7.2.3.	Expression de cellules TCD4+PD1+CXCR5-.....	48

---

8	Commentaires et Discussion.....	50
9	Conclusion et recommandations .....	56
10	Références Bibliographiques .....	57
11	Fiche signalétique en français et anglais .....	64
12	Annexes .....	68
13	Serment de Galien .....	72

---

---

# LISTE DES TABLEAUX

---

<i>Tableau 1: Répartition des participants selon le sexe et le groupe.....</i>	<i>43</i>
<i>Tableau 2: Répartition des participants selon l'âge et le groupe .....</i>	<i>43</i>
<i>Tableau 3 : Evolution du niveau des cellules T CD4+ chez les participants après les doses des vaccins .....</i>	<i>44</i>
<i>Tableau 4 : Evolution du niveau des cellules T CD8+ chez les participants après les doses des vaccins .....</i>	<i>46</i>
<i>Tableau 5 : Evolution de l'expression des cellules T CD4+PD1+CXCR5 chez les participants après les doses des vaccins. ....</i>	<i>48</i>

---

# LISTE DES FIGURES

---

<i>Figure 1 : Structure des Granulocytes .....</i>	9
<i>Figure 2: Structure de Monocyte/Macrophage.....</i>	10
<i>Figure 3: Structure de Monocyte/Macrophage.....</i>	11
<i>Figure 4 : Réponse immunitaire innée et adaptative.....</i>	15
<i>Figure 5 : STRUCTURE DU LYMPHOCYTE T .....</i>	17
<i>Figure 6 : Voies de différenciation des LT CD4+ naïfs. ....</i>	19
<i>Figure 7 :Les différents candidats vaccins en fonctions du cycle biologique du plasmodium falciparum.....</i>	25
<i>Figure 8 : Les différents vaccins antipaludique en cours d'étude .....</i>	30
<i>Figure 9 : Carte montrant l'emplacement de Bamako, la Capitale du Mali .....</i>	34
<i>Figure 10 : Carte montrant l'emplacement du site d'étude de Sotuba, une zone périurbaine de Bamako .....</i>	35
<i>Figure 11: Stratégie d'analyse d'expression des cellules T-CD8+, T-CD4+ et T-CD4+PD-1+ sur les cellules T.....</i>	42
<i>Figure 12 : Stratégie d'analyse de l'expression des cellules TCD4 .....</i>	44
<i>Figure 13 : Expression de cellules T CD4 + selon les groupes et les jours de suivi. ....</i>	45
<i>Figure 14: Stratégie d'analyse de l'expression des cellules TCD8 .....</i>	46
<i>Figure 15: Expression de cellules T CD8 + selon les bras et les jours de suivi.....</i>	47
<i>Figure 16 : Stratégie d'analyse de l'expression des cellules T CD4+PD1+CXCR5.....</i>	48
<i>Figure 17 : Expression de cellules T CD4+PD1+CXCR5 .....</i>	49

---



# 1. INTRODUCTION

Le paludisme (Malaria en anglais) est une érythrocytopathie fébrile et hémolysante causée par le développement et la multiplication dans l'organisme d'un hématozoaire du genre *Plasmodium*, transmis à l'hôte vertébré par la pique infestante d'un moustique femelle du genre *Anopheles* lors de son repas sanguin. Il existe cinq (5) types d'espèces de parasite responsables du paludisme chez l'homme : *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malarie*, *P. ovale* et *P. knowlesi* ; le *P. falciparum* est le plus dangereux de toutes. Grâce à sa capacité de variation antigénique (1), il peut échapper à la réponse immunitaire de l'hôte, c'est le parasite le plus prévalent dans la région Afrique de l'OMS ; il est en effet à l'origine de 99,7% des cas de paludisme estimés en 2017, tout comme dans les Asie du Sud-Est (62,8%), Méditerranée orientale (69%) et pacifique occidentale (71,9%) (2).

Principale maladie parasitaire humaine, le paludisme est aujourd'hui un problème majeur de santé publique. En 2017, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a estimé le nombre de cas de paludisme à 219 millions. Pour la même année le nombre de décès dus au paludisme était estimé à 435 000 dont 93% en Afrique (2). A l'échelle mondiale 61% (266 000) des décès imputables au paludisme touchent les enfants de moins de cinq 5 ans [(2)].

Au Mali, le paludisme représente 39% des motifs de consultation dans les centres de santé, c'est la première cause de morbidité et de mortalité dans la population générale soit respectivement 15,6% et 13% (3). En 2017, au Mali, sur l'ensemble du territoire national 2.097.797 cas de paludisme confirmés ont été enregistrés avec 1.424.223 (67,9%) cas simples et 673.574 (32,1%) cas graves et 1050 décès. (4). Les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes paient chaque année le plus lourd tribut à cette maladie.

Selon une étude menée par l'Institut National de Recherche en Santé Publique (INRSP), les pertes économiques dues au paludisme sont estimées à 72 milliards de francs CFA par an au Mali (5). Il est ainsi considéré comme une maladie de la pauvreté et une cause de pauvreté dans les zones endémiques. Les adultes qui vivent depuis l'enfance dans des zones

caractérisées par une forte transmission palustre et qui continuent de résider dans ces zones développent une prémunition.

Selon l'Organisation mondiale de la santé, les efforts mondiaux de lutte contre le paludisme ont donné lieu à une réduction du nombre de décès, soit une baisse de 48% depuis 2000 (2). Dans nombreux pays, ces progrès sont menacés par le développement et la propagation rapide de la résistance des moustiques aux insecticides, le changement climatique, la pharmacorésistance des *Plasmodies*, et le besoin croissant de voyage des humains pourrait ainsi mettre en péril ces avancées récentes.

Ainsi l'OMS estime que les données concernant la période 2015-2017 ne révèlent aucun progrès significatif vers une diminution du nombre de cas de paludisme dans le monde (219 millions en 2017 contre 217 millions en 2016) (2). D'où la nécessité de nouvelles approches pour le contrôle et l'éradication de la maladie.

Les vaccins constitueraient à cet effet les outils privilégiés de lutte contre ce fléau. Le développement d'un vaccin anti-palustre se heurte non seulement à la complexité du parasite à travers, son polymorphisme et sa variation antigénique, mais aussi à la complexité des interactions entre le parasite et le système immunitaire de l'hôte. Cependant les efforts de développement de vaccins antipaludiques ciblent essentiellement les étapes de cycle biologique de *Plasmodium falciparum* notamment (le stade pré-érythrocytaire, le stade érythrocytaire et le stade sexué chez le moustique). Cette cible détermine son effet sur l'infection, la maladie et la transmission du paludisme.

A l'heure actuelle plusieurs équipes de chercheurs travaillent sur l'identification, la synthèse et le test d'antigènes vaccinant issus de ces stades de développement du parasite. L'objectif visé est de trouver les candidats vaccins plus immunogènes, susceptibles de provoquer une réaction immunitaire protectrice bien tolérée et durable. Ainsi des études ont été menées dans le passé et sont actuellement conduites pour le développement de trois types de vaccin à savoir: a-) Le premier qui vise à prévenir l'entrée des sporozoïtes dans les hépatocytes ou à inhiber leur développement afin d'empêcher la progression de l'infection (6), b-) Le second qui est dirigé contre les stades asexués érythrocytaires et les toxines paludiques vise respectivement à réduire la parasitémie ou à interférer avec les toxines métaboliques dans le but de limiter les manifestations cliniques de la maladie (7) et c-) Le troisième qui vise les formes sexuées, c'est un vaccin bloquant la transmission du paludisme (TBVs), il vise à

induire des anticorps anti-sporogoniques chez l'hôte humain. Ces anticorps seront repris lors du repas sanguin et bloqueront le développement du parasite chez le moustique, arrêtant ainsi la transmission à un autre hôte humain.

Un vaccin qui interrompt la transmission du paludisme (de VIMT) serait une ressource précieuse dans la lutte pour éliminer ou éradiquer cette maladie.

C'est dans cette optique, que le centre de recherche et de formation sur le paludisme (MRTC Ogobara Doumbo), de l'Université des Sciences, Techniques et Technologies de Bamako USTTB (Mali) s'est investi en collaboration avec des institutions Américaines telles que: Laboratory of Malaria Immunology and Vaccinology (LMIV), National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) et le National Institutes of Health (NIH) dans le développement et la conduite des essais cliniques des candidats vaccins dont le (Pfs25M-EPA/AS01 et Pfs230D1M-EPA/AS01) à Sotuba; Mali.

Les Pfs25 et Pfs230 sont des antigènes de surface d'ookinètes au stade moustique de *P. falciparum* ; ces candidats vaccin bloquant la transmission du paludisme, ont été chacun conjugué à un Exo protéine A de *Pseudomonas aeruginosa* (EPA), avec l'adjuvant AS01.

La présente thèse est une contribution pour évaluer les réponses cellulaires dirigées contre ces candidats vaccins.

## 2. QUESTION DE RECHERCHE

---

Les candidats vaccins étudiés, Pfs25M-EPA/AS01 et Pfs230D1M-EPA/AS01 modifient ils les réponses cellulaires T chez les adultes en bonne santé au Mali ?

# 3. HYPOTHESE DE RECHERCHE

---

Nous formulons l'hypothèse que les candidats vaccins Pfs25M - EPA/AS01 et Pfs230D1M - EPA/AS01 induiront des réponses immunitaires cellulaires spécifiques.

# 4. OBJECTIFS

---

## 4.1. OBJECTIF GENERAL :

- ✓ Evaluer les réponses cellulaires des candidats vaccins Pfs25M-EPA/AS01, Pfs230D1M-EPA/AS01, Pfs25M-EPA/AS01+Pfs230D1M-EPA/AS01 chez les adultes à Sotuba, Mali.

## 4.2. OBJECTIFS SPECIFIQUES :

- ✓ Déterminer les proportions des différentes sous-populations de cellule T des candidats vaccins Pfs25M-EPA/AS01 avant et après les vaccinations chez les adultes résidants à Sotuba.
- ✓ Déterminer les proportions des différentes sous-populations de cellule T des candidats vaccins Pfs230D1M-EPA/AS01 avant et après les vaccinations chez les adultes résidants à Sotuba.
- ✓ Déterminer les proportions des différentes sous-populations de cellule T des candidats vaccins Pfs230D1M-EPA/AS01 combiné au Pfs25M-EPA/AS01 avant et après la vaccination chez les adultes résidants à Sotuba.
- ✓ Déterminer les proportions des différentes sous-populations de cellule T des candidats vaccins Engerix B avant et après les vaccinations chez les adultes résidants à Sotuba

# 5. GENERALITES

## 5.1. IMMUNOLOGIE ANTI PALUSTRE.

L'infection par *Plasmodium*, responsable du paludisme, engendre deux mécanismes immunitaires chez l'hôte (l'immunité naturelle ou innée et l'immunité acquise ou spécifique).

Ces deux types d'immunité sont complémentaires.

L'immunité innée se mobilise dès le début (dans les premières heures) de toute infection et se traduit chez l'homme par un état réfractaire au parasite dès le premier contact par des mécanismes non spécifiques.

L'immunité acquise donne une réponse spécifique impliquant la réponse humorale et cellulaire, elle est opérationnelle dans les dix jours suivant l'infection, joue un rôle essentiel dans le contrôle de la maladie.

### 5.1.1. L'IMMUNITE INNEE

L'immunité innée se distingue de l'immunité acquise par le fait qu'elle s'active très rapidement, sans sensibilisation préalable et elle est non spécifique. Elle se met en place dès le début de toute infection et se maintient jusqu'à la mise en place de l'immunité acquise.

Les mécanismes de cette immunité impliquent des paramètres liés au parasite et à l'hôte, elle repose sur des mécanismes humoraux et cellulaires (8).

Cependant certains aspects de cette immunité restent encore mal élucidés.

#### 5.1.1.1. LES FACTEURS GENETIQUES DE RESISTANCE

- ✓ **Les hémoglobines anormales**, HbF (thalassémies) et HbS (drépanocytose), HbC perturbent la schizogonie et diminuent donc la virulence du parasite (8), (9)]
- ✓ Une étude menée au Mali par Dolo et al en 2005 a révélé une réduction du taux d'infection et de morbidité entre les peulhs et les dogons (10)
- ✓ La déficience en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G-6PD) perturbe le développement du parasite.
- ✓ L'absence des antigènes de groupe sanguin Duffy sur la paroi de l'érythrocyte protégerait contre l'infection à *P.vivax* (10)

- ✓ L'ovalocytose, une anomalie du cytosquelette du globule rouge qui rend la membrane externe plus rigide, empêche la pénétration du mérozoïte (10).

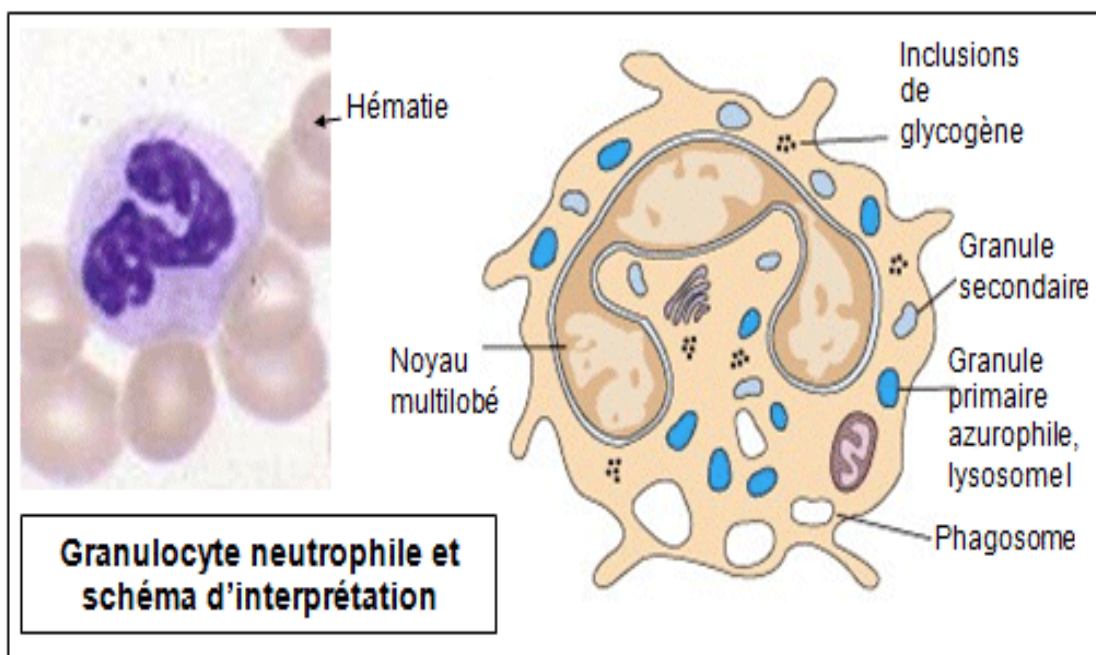
### 5.1.1.2. LES REPONSES CELLULAIRES DE L'IMMUNITE INNEE ANTIPALUDIQUE :

Les mécanismes cellulaires de cette défense dite « non spécifique », ne sont pas très bien connus.

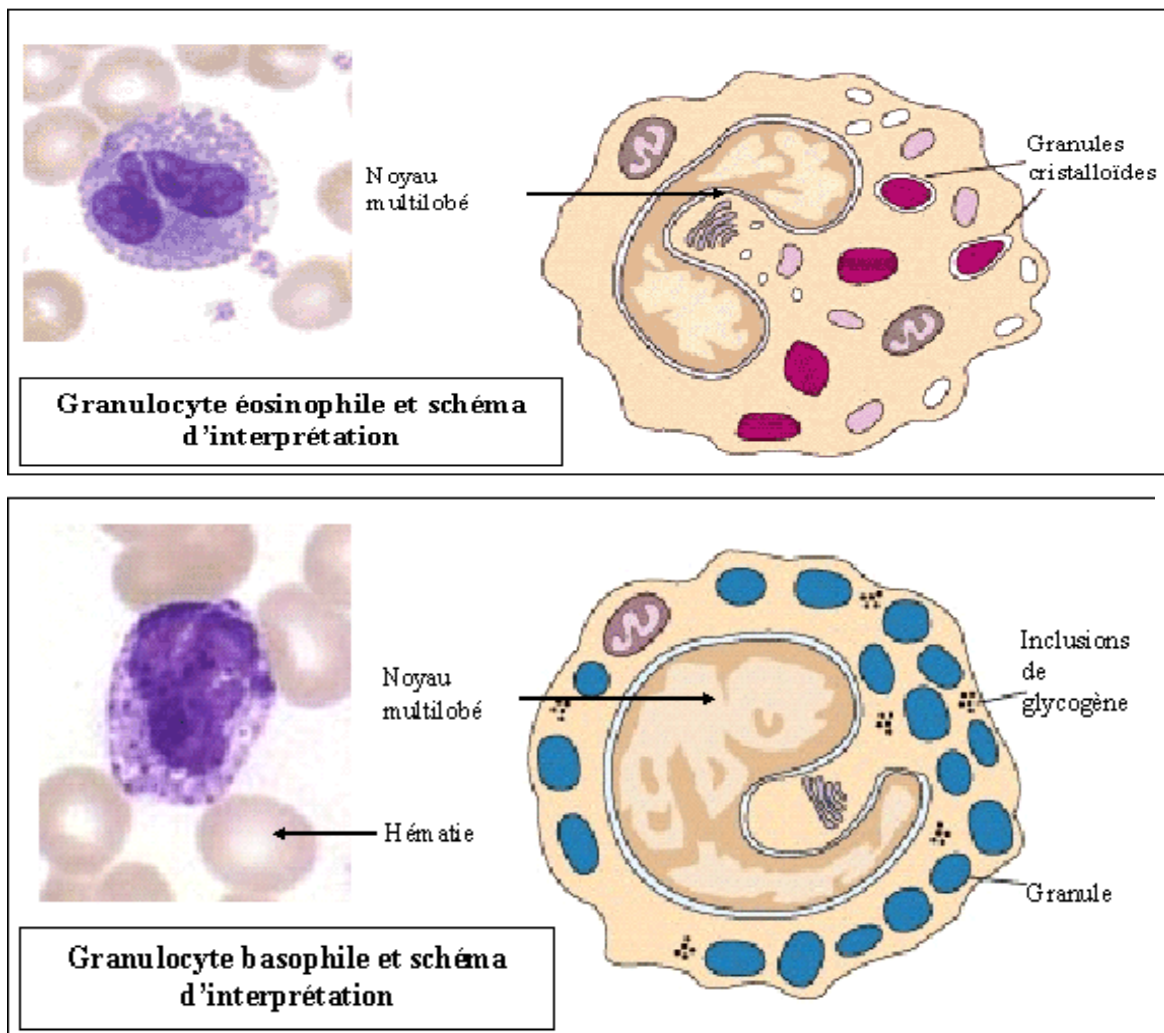
Ce pendant des études ont montrées que l'infection palustre déclenche des réponses immunitaires à la fois chez la souris et chez l'homme et certaines de ces réponses immunitaires contribuent à la fois à la pathogenèse de la maladie et à l'immunité protectrice. (12)

- ✓ **Les granulocytes**

**Morphologies :**







**FIGURE 1 : STRUCTURE DES GRANULOCYTES**

**Source:** [accs.ens-lyon.fr](http://accs.ens-lyon.fr)

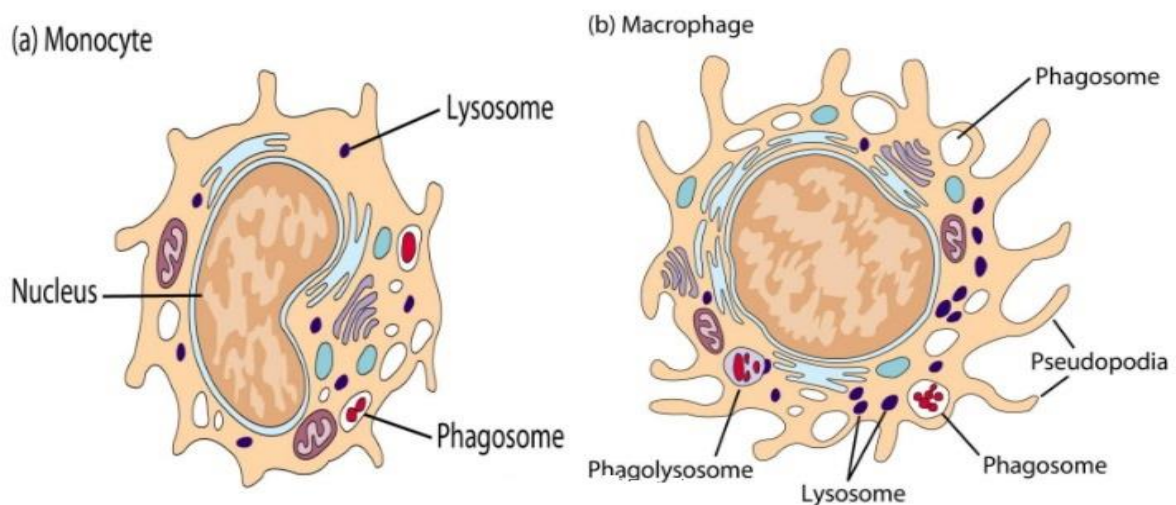
Les granulocytes ou polynucléaires sont des leucocytes caractérisés par un noyau polylobé et la présence de granules dans leur cytoplasme. Il existe 3 types de granulocytes : polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles.

Les neutrophiles sont les plus nombreux et représentent les premières cellules phagocytaires. Il a été montré qu'ils sont capables de phagocyter les mérozoïtes (13). Ils expriment à leur surface des récepteurs pour la fraction Fc des immunoglobulines et des récepteurs du complément. Ce qui facilitera la phagocytose des parasites par l'intermédiaire du complément et des anticorps présents dans les sérums d'individus exposés (14). Des cytokines telles que le TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , le GM-CSF et IL-1 $\beta$  activent les neutrophiles et induisent significativement la phagocytose des mérozoïtes (15).

L'expression du Human Leucocyte Antigen-B35 a été aussi associée à la résistance à l'infection palustre (16).

✓ **Monocytes/macrophages**

**Morphologie :**



**FIGURE 2: STRUCTURE DE MONOCYTE/MACROPHAGE**

**Source:** [www.researchgate.net](http://www.researchgate.net)

Les monocytes ont pour origine la moelle osseuse et sont libérés dans la circulation périphérique. Ce sont de grosses cellules mesurant 15 à 30  $\mu\text{m}$ , avec un noyau en fer à cheval caractéristique. La membrane plasmique à un contour irrégulier et le cytoplasme contient de nombreux lysosomes. Ils représentent 5-10% des leucocytes et sont morphologiquement et fonctionnellement hétérogènes (17).

Le marqueur spécifique des monocytes est le CD14. Ils peuvent exprimer également le CD16 et la co-expression de CD14 et de CD16 permet de distinguer 3 sous-classes de monocytes :

- les monocytes CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> dits «monocytes classiques» ; ayant pour rôle le recrutement des neutrophiles sur le site de l'inflammation.

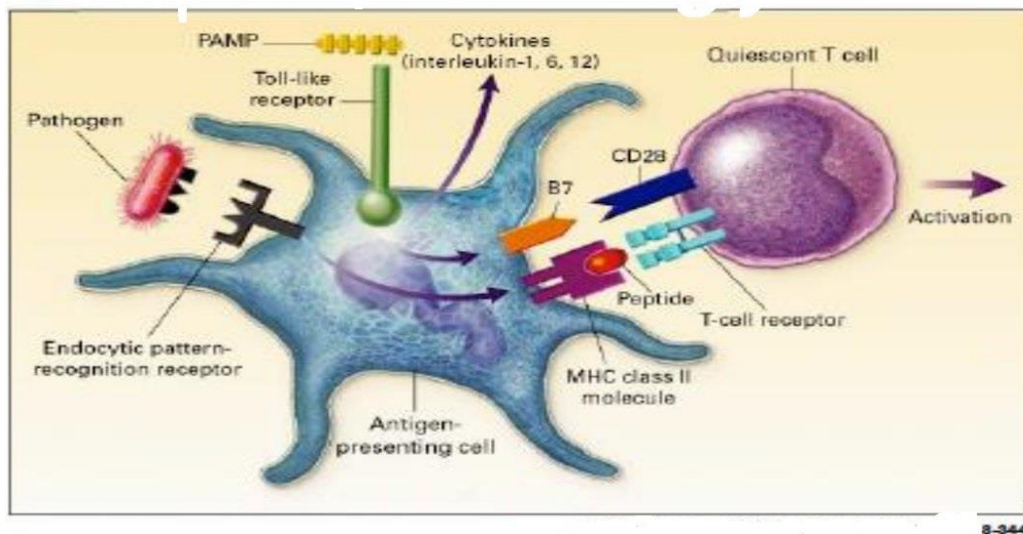
- les monocytes CD14+CD16+ appelés «monocytes pro-inflammatoires» sécrétant de cytokines pro-inflammatoires et
- une population dite intermédiaire exprimant CD14++CD16+ appelés aussi monocytes anti-inflammatoires, sécrétant principalement l'IL-10.

Les monocytes se différencient en macrophages dans les tissus. Ces macrophages sont groupés en sous-populations ayant des fonctions différentes selon leur mode d'activation.

Les monocytes/macrophages sécrètent des facteurs solubles comme les cytokines et libèrent l'oxyde nitrique (NO), les radicaux libres oxygénés ( $O_2^-$ ,  $OH^-$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Ces monocytes peuvent également inhiber la croissance des parasites par le mécanisme d'inhibition cellulaire dépendante des anticorps (ADCI) (18).

### ✓ Les cellules dendritiques

#### Morphologie



**FIGURE 3: STRUCTURE DE MONOCYTE/MACROPHAGE**

*Source: medicinus.net*

Les cellules dendritiques (CDs) constituent la première ligne de défense du système immunitaire. Elles sont issues de la moelle osseuse et se divisent en deux groupes : les CDs myéloïdes et les CDs lymphoïdes (19).

Les CD<sub>4</sub> lymphoïdes dérivent de cellules précurseurs issues de la moelle osseuse et colonisent primairement et secondairement les tissus lymphoïdes (thymus, rate, foie et ganglions lymphatiques) et y résident (20).

Les CD<sub>4</sub> ont une capacité migratoire et de présentation d'antigènes au niveau des organes lymphoïdes secondaires plus accrue que les macrophages qui vivent et meurent sur place après recrutement par les tissus. Ce sont les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (20).

Les CD<sub>4</sub> sont fondamentales pour l'initiation de la réponse immune par éducation des cellules B et T, qui sont les cellules effectrices de l'immunité acquise.

Les différents sous-groupes de CD<sub>4</sub> sont réparties dans les tissus périphériques et dans le sang, reconnaissent les molécules de surface exprimées par les microbes et sécrètent des cytokines. Sous l'influence d'un stimulus inflammatoire, les CD<sub>4</sub> sont activées et entament leur processus de maturation conduisant à l'activation et à l'initiation de la réponse cellulaire T (20).

#### ✓ **Les cellules tueuses naturelles**

Les cellules tueuses naturelles (Natural killer ou NK) sont des types de lymphocytes, qui sont principalement trouvés dans le sang périphérique, la rate et dans la moelle osseuse. Elles constituent un composant important du système immunitaire inné (20).

Ces cellules jouent un rôle majeur dans la destruction des cellules infectées par les virus et des tumeurs. Leur rôle dans la protection contre l'infection palustre reste encore à être élucidé. Il a été prouvé que l'activité des NK augmente chez les sujets infectés par le *Plasmodium* et que cette activité dépend de la parasitémie et du taux d'IFN- $\gamma$ . Une autre étude a montré que lorsque les cellules mononuclées du sang périphérique sont exposées aux globules rouges parasités, les NK sont les premières à produire l'IFN- $\gamma$  [46]. La production d'IFN- $\gamma$  semble être liée à la fois à un contact direct entre les globules rouges parasités et les cellules NK et aussi à la présence des cellules accessoires lymphoïdes et myéloïdes (20).

#### **5.1.1.3. LE SYSTEME DU COMPLEMENT:**

Le système de complément (C) joue un rôle important dans la défense contre les pathogènes par l'opsonisation, la réponse inflammatoire, l'élimination des complexes antigène-anticorps

ou par destruction des pathogènes. Il est constitué d'une trentaine de protéines membranaires et plasmatiques (22).

Au cours du paludisme le système du complément est activé par les antigènes exprimés à la surface des globules rouges parasités (23);(24). L'hémoglobine et l'hématine libérés par la lyse intravasculaire des érythrocytes infectés par *P.falciparum* ont des propriétés inflammatoires et peuvent activer le complément (25);(26). Chez des enfants faisant le paludisme simple un taux faible de C3, C4 et C1q a été observé. Selon l'étude de Wenish, l'activation de la voie classique aussi bien que de la voie alterne est associée à une augmentation de Bb, Sc5b-9 et de C4d [50]. La voie des « Mannose Binding Lectines »(MLB) quant à elle pourrait être activée par la liaison des lectines aux érythrocytes infectés. Ainsi un déficit en lectine liant les mannoses, peut compromettre la capacité de l'organisme à lutter contre le paludisme (27);(28). Les fractions C3a et C5a obtenues par clivage de C ont des propriétés chimiotactiques permettant le recrutement des cellules inflammatoires (29).

### 5.1.2. L'IMMUNITE ACQUISE:

- ✓ **La prémunition ou semi-immunité :** C'est un état immunitaire qui confère une protection relative acquise progressivement (2 à 6 ans), provoqué et entretenu par la présence du parasite dans l'organisme de l'hôte, il empêche la survenue de formes cliniques graves du paludisme (10). Cet état n'est pas stérilisant et il s'estompe après le départ de la zone d'endémie [42](10).
- ✓ **L'immunité congénitale,** anticorps IgG passés de la mère immune au nouveau-né, protège celui-ci pendant environ six mois contre les accès graves du paludisme (9)

#### 5.1.2.1. LES REPONSES CELLULAIRES:

L'activité phagocytaire des cellules de lignée monocyte/macrophage et des polynucléaires neutrophiles vis-à-vis des hématies parasitées, ou des parasites libres et de leurs débris, a été rapportée depuis longtemps (30). Cette phagocytose est directe ou indirecte.

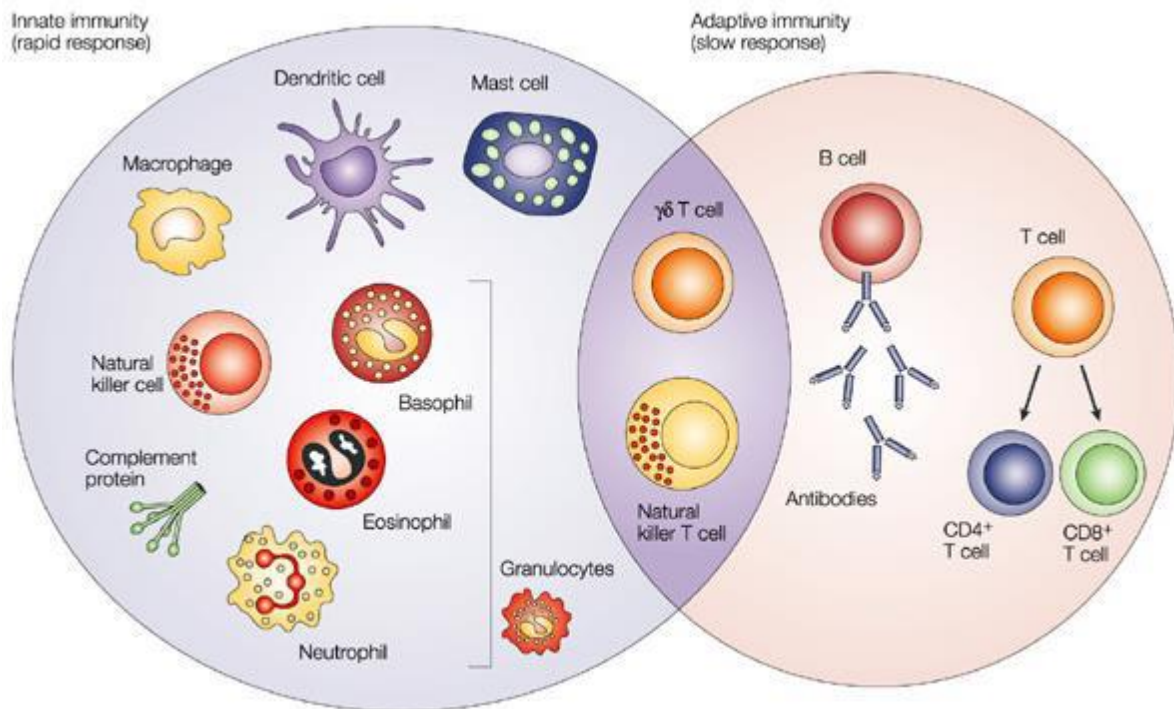
L'internalisation du matériel parasitaire ou érythrocytaire par le macrophage sera suivie d'une protéolyse des antigènes de *Plasmodium* et certains de leurs dérivés peptidiques seront sélectionnés et exprimés à la surface cellulaire, en association à des molécules de présentation des antigènes, des molécules HLA. Leur reconnaissance par le TCR des cellules T déclenche l'activation des lymphocytes T qui possèdent un rôle critique en tant que cellule effectrices dans l'immunité contre les stades sanguins.

Les lymphocytes T CD8+ interviennent directement par une activité cytotoxique. Les cellules T CD4+ agissent indirectement par le contrôle et l'activation d'autre cellule effectrice via les lymphokines. En effet des études menées chez la souris ont montré que deux des fonctions des CD4+ les plus connus, à savoir la stimulation des monocytes/macrophages comme cellules effectrices de la réaction inflammatoire et la coopération avec les lymphocytes B dans la synthèse des immunoglobulines sont accomplies par deux sous populations différentes (31) (32). Dans le premier cas il s'agit de Th1 (T helper type 1) et dans le second des Th2 (T helper type 2) ;ces différentes cellules secrètent de nombreuses cytokines (33).

Les lymphocytes Th1 seraient impliqués dans la réponse immunitaire dirigée contre les stades pré-érythrocytaires et érythrocytaires (34). Lorsqu'elles sont activées par les Ag parasitaires, elles secrètent entre autres des médiateurs comme l'IL-2, l'IFN $\gamma$ , la lymphotoxine ou TNF $\beta$  et l'IL-3. Les cytokines produites par les lymphocytes Th2 sont l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 et l'IL-13 qui favorisent la production d'Anticorps par les cellules B (35). D'autres sous populations ont été décrites plus tard notamment les Th17 et les T reg. Le rôle des cellules Th17 et des T reg dans la protection contre le paludisme reste à explorer. Les cellules T CD8+ se subdivisent en trois sous-groupes selon l'expression de CD62 et de CD127. Les cellules T mémoires expriment à la fois CD62 et CD127L : CD62L+ CD127+ (20).

Les lymphocytes B arrivent à maturation au sein de la moelle osseuse. Lorsqu'ils quittent cette dernière, chacun exprime sur sa membrane un récepteur de liaison à l'antigène spécifique. Le récepteur des cellules B (BCR, de B-cell Receptor) est constitué principalement d'une molécule d'anticorps membranaire qui ne reconnaît qu'un seul antigène donné.





**FIGURE 4 : REPONSE IMMUNITAIRE INNEE ET ADAPTATIVE**

*Source : Nature Reviews Cancer 2004*

### 5.1.2.2. LES REPONSES HUMORALES :

Les cellules B, les seules capables de se différencier en plasmocytes sécréteurs d'anticorps, jouent un rôle important dans l'immunité humorale. Elles constituent 15% des lymphocytes (20).

Dans des études longitudinales, la prévalence et le niveau des anticorps anti-plasmodiaux étaient associés à la protection contre le paludisme clinique (36). Les anticorps agissent : Soit directement sur l'élément parasitaire et/ou sur les hématies parasitées par agglutination ou par lyse en présence du complément, Soit en association avec des cellules immunocompétentes par le système d'ADCI (Antibody Dependant Cell-mediated Inhibition) in vitro (37)

A chaque stade du cycle de développement du parasite correspond une réponse immune spécifique.

-Au niveau du foie, les anticorps et les cytokines telles que  $IFN\gamma$  dirigés contre les sporozoïtes seraient capables d'altérer leurs revêtements de surface, d'inhiber leur pénétration dans les hépatocytes ou de ralentir leur développement intra-hépatocytaire .

Les anticorps anti-TRAP (Thrombospondin Related Adhesion Protein) inhibent in vitro l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes (38)

Les anticorps anti- LSA-3 et anti-AMA1 bloquent l'invasion des hépatocytes (39),(40).

-Au niveau des érythrocytes, au cours de la schizogonie érythrocytaire l'organisme réagit en mettant en place des immunoglobulines G (IgG) cytophiliques qui activent les fonctions effectrices cytotoxiques et phagocytaires des neutrophiles et des monocytes, et aussi une grande production d'immunoglobuline E (IgE). Le complexe immun IgE-antigène est impliqué dans l'activation des monocytes qui produisent du monoxyde d'azote qui est toxique pour les mérozoïtes.

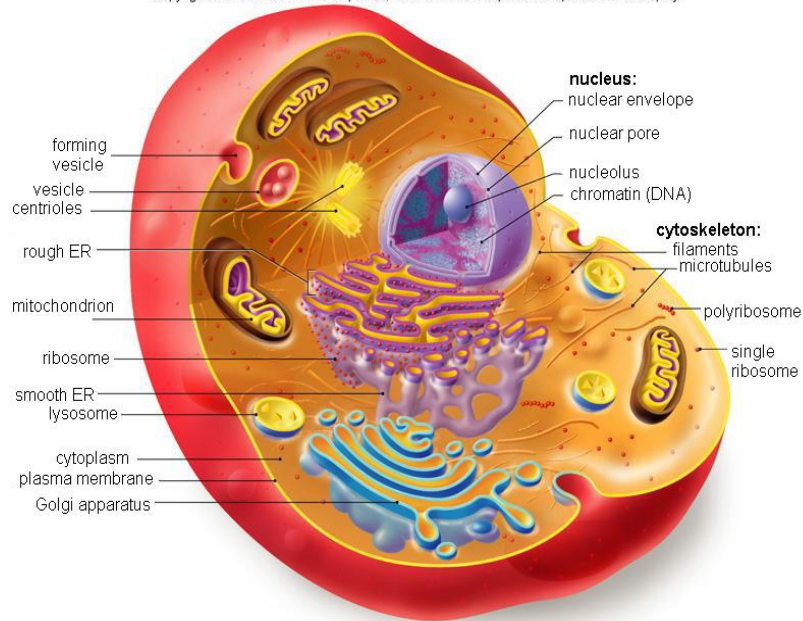
-Une étude menée au Mali en 2015 (Numéro du protocole USTTB, FMPOS: 2015/16/CE/FMPOS). a montré que les antigènes Pfs25 et Pfs230 étaient immunogènes et induisaient une réponse de type humorale conférant une activité de blocage de la transmission du *P falciparum*.

## **5.2 LES LYMPHOCYTES T**

### **5.2.1. MORPHOLOGIE**

Au microscope, les lymphocytes apparaissent comme des cellules ovoïdes, nucléées, dont le noyau de grande taille (environ 7  $\mu\text{m}$ , soit le diamètre d'un globule rouge) occupe quasiment tout le cytoplasme. Sa chromatine est disposée en mottes.





**FIGURE 5 : STRUCTURE DU LYMPHOCYTE T**

**Source :** [<https://fr.wikipedia.org/wiki/Lymphocyte#Structure>]

Les lymphocytes T, ou cellules T, sont une catégorie de leucocytes qui jouent un grand rôle dans la réponse immunitaire secondaire. « T » est l'abréviation de thymus, l'organe dans lequel leur développement s'achève.

Ils sont responsables de l'immunité cellulaire : les cellules infectées par un virus par exemple, ou les cellules cancéreuses reconnues comme étrangères à l'organisme (c'est-à-dire distinctes des cellules que les lymphocytes T ont appris à tolérer lors de leur maturation) sont détruites par un mécanisme complexe.

Les lymphocytes T expriment tous le marqueur membranaire CD3.

### **5.2.2. SOUS POPULATION DE LYMPHOCYTES T**

#### **✓ Lymphocytes T conventionnels**

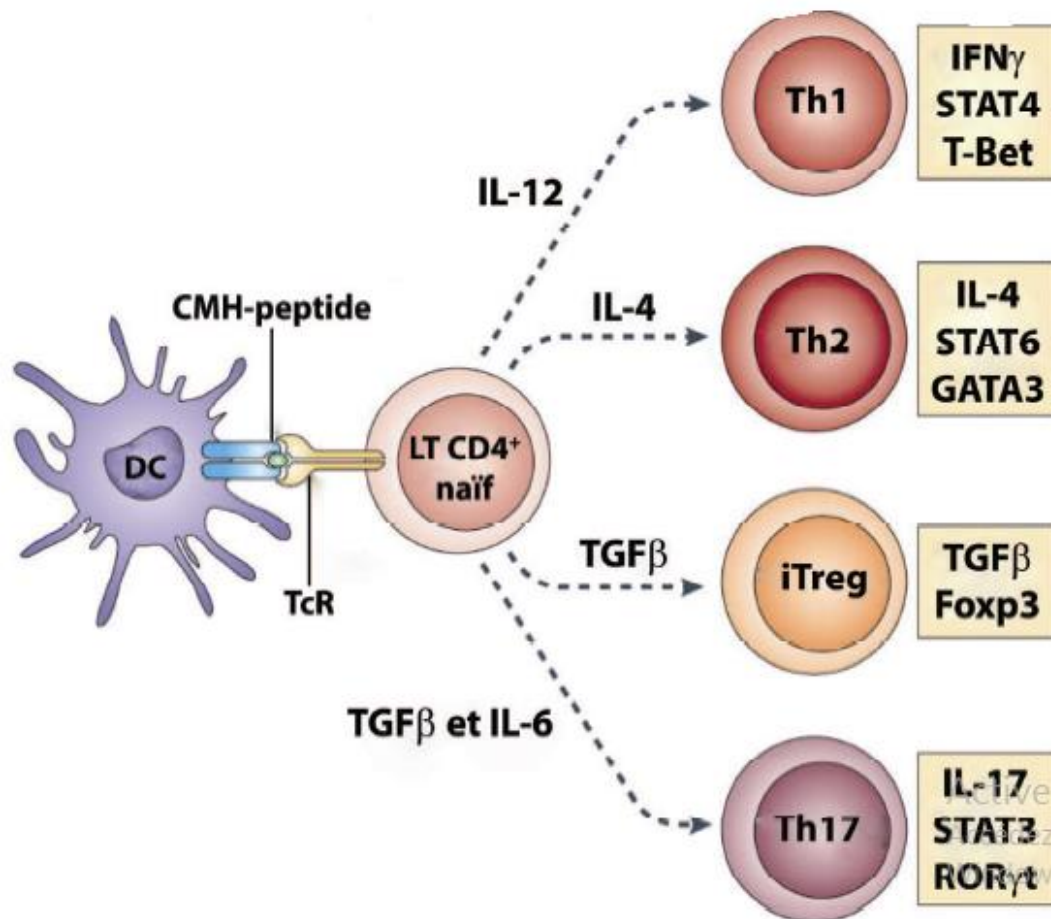
#### **Les lymphocytes T cytotoxiques (TCD8 ou T killer)**

Ils détruisent les cellules infectées. Ces cellules sont dites cytotoxiques car elles sont à elles-mêmes capables de détruire des cellules cibles qui présentent des antigènes spécifiques à travers le CMH de classe I. Elles portent à leur surface un marqueur CD8.

## **Les lymphocytes T auxiliaires (TCD4 ou T helper)**

Ils sont des intermédiaires de la réponse immunitaire et prolifèrent pour activer en quantité d'autres types de cellules qui agiront de manière plus directe sur la réponse. Les T auxiliaires régulent ou aident à la réalisation d'autres fonctions lymphocytaires. Elles portent à leur surface un marqueur CD4.

Lors d'une stimulation antigénique, les LT CD4<sup>+</sup> naïfs, ou Th0, ont la capacité de s'engager dans diverses voies de différenciation (Figure 3). La principale fonction des cellules Th1 est l'activation des macrophages, ce qui est essentiel pour l'élimination efficace des microbes ingérés. Cette réaction a été la base de la définition originale de l'immunité cellulaire, et reste peut-être la fonction la mieux comprise des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Les lymphocytes T effecteurs de la sous-population Th1 qui reconnaissent les antigènes associés aux macrophages activent ces cellules par des interactions entre le ligand de CD40 (CD40L) et CD40, et en sécrétant l'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). A l'inverse, les cellules Th2 se révèlent incapables de produire de l'IFN $\gamma$  mais sont caractérisées par leur production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL13 et favorisent la réponse humorale en aidant à la production d'anticorps par les LB. Les Th17 sont caractérisés par leur production d'IL17A, IL17F et IL22 et favorisent le recrutement de leucocytes dans le foyer infectieux. Enfin, deux populations régulatrices majeures dérivant des LT CD4<sup>+</sup> : les Tregs d'origine thymique (appelées naturelles, nTregs) et les Tregs induits à partir de LT CD4<sup>+</sup> naïfs (iTregs). Chacun de ces lignages de LT effecteurs est associé à des facteurs de transcriptions spécifiques. Ainsi, T-bet, GATA-3, Foxp3 et ROR $\gamma$ t ont, respectivement, un rôle majeur dans la différenciation et l'homéostasie des cellules Th1, Th2, Tregs et Th17. (41)



**FIGURE 6 : VOIES DE DIFFERENCIATION DES LT CD4+ NAÏFS.**

**SOURCE : ZOU ET AL NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY 2010.**

✓ **Lymphocytes T non conventionnels**

**Les lymphocytes T gamma delta ( $\gamma \delta$ )**

**Les LT- $\gamma\delta$  :** sont des lymphocytes T particuliers caractérisés par l'expression d'un TCR-1 associé à un CD3 mais ne présentant ni CD4, ni CD8. Ils sont beaucoup plus rares que les LT présentant un TCR-2. Ces LT ont un récepteur à l'antigène des LT (TcR) composé des chaînes  $\gamma$  et  $\delta$  (42). Ils reconnaissent les phospho-Ag exprimés à la surface des cellules tumorales et participent ainsi au contrôle immunitaire de ces dernières. Ils possèdent une activité cytotoxique importante utilisant la voie des granules cytotoxiques et des récepteurs de mort, mais aussi via leur production importante de TNF- $\gamma$  et IFN- $\delta$

✓ **Les lymphocytes NKT**

Ils sont un type de lymphocytes présentant des marqueurs de cellule T (CD3) et des marqueurs de cellules NK. Ils sont donc un lien entre le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif. Contrairement aux lymphocytes T conventionnels, dont le TCR reconnaît un peptide présenté dans une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), les NKT sont capables de reconnaître un glycolipide présenté dans une molécule appelé CD1, structurellement proche du CMH de classe I. Une fois activés, les NKT sont capables de lyser les cibles et de sécréter des cytokines.(41)

- ✓ **Les lymphocytes MAIT**, ou "lymphocytes T invariants associés aux muqueuses", disposant d'un TCR semi-invariant.

### 5.2.3. LES MARQUEURS PHENOTYPIQUES

- ✓ **CXCR5 Cellules T auxiliaires B (T<sub>FH</sub>) folliculaires** : Les cellules T atteignent la région paracorticale des ganglions lymphatiques *via* les veinules endothéliales élevées (sang) ou les vaisseaux lymphatiques afférents (tissus périphériques) en réponse aux chimiokines spécifiques CCR7 CCL19 et CCL21. Lors du contact avec les CD présentant l'antigène, les cellules T deviennent immunisées, ce qui inclut l'induction de l'expression de **CXCR5**. L'expression réduite de CCR7 permet aux cellules CXCR5<sup>+</sup> T (T<sub>FH</sub>) nouvellement générées de répondre au CXCL13 folliculaire et de se déplacer vers les follicules des cellules B où les interactions des cellules T<sub>FH</sub>-B impliquant une série de récepteurs de co-stimulation (CD40, ICOS, etc.) et les cytokines (IL-10, IL-21, etc.) initient la réaction du centre germinale et la formation de plasmocytes sécrétant des anticorps et de lymphocytes B mémoire. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exprimant le récepteur Chemokine CXCR5 ont été décrits pour la première fois dans le sang humain il y a plus de 20 ans (Forster et coll., 1994). Bien que ces cellules aient été initialement considérées comme des lymphocytes T récemment activés, des études récentes indiquent que les cellules T de sang CXCR5<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> contiennent des cellules de mémoire de longue durée qui partagent des propriétés fonctionnelles avec des cellules TFH. En conséquence, les cellules de sang CXCR5<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T sont actuellement appelées cellules de mémoire du sang (ou périphériques) TFH (43)
- ✓ **PD-1 : Protéine cellulaire de la mort programmée** : La PD1 ou CD279 est une protéine de la famille des CD28 qui comprend les récepteurs CD28, les antigènes

associés aux lymphocytes T cytotoxiques (CTLA-4), les co-stimulateurs inductibles (CISO) et les atténuateurs des lymphocytes B et T. Ces récepteurs jouent un rôle dans la réponse immunitaire cellulaire. Par exemple, le CD28 est un récepteur co-stimulateur qui améliore l'activation des cellules T, alors que le CTLA-4 est un inhibiteur de l'activation des cellules T. Le PD1 a également une fonction inhibitrice sur les cellules T et B, et joue un rôle important dans la tolérance périphérique. Le PD1 a au moins 2 ligands (le PD-L1 et PD-L2), son interaction avec ces ligands exprimée sur les cellules présentatrices d'antigènes (APCs) et les tumeurs envoie un signal négatif aux lymphocytes T, ce qui peut conduire à l'épuisement des lymphocytes T. Le CD28 est exprimé constitutivement sur la plupart ou la totalité des cellules T CD4+ et environ 50% des cellules T D8+, alors que le CTLA-4 n'est pas exprimé sur les cellules T au repos.

### **5.3. LES VACCINS ANTIPALUDIQUES ETAT DES LIEUX:**

Les vaccins agissent en préparant le système immunitaire humain à reconnaître, dépister et ensuite à affaiblir ou détruire les pathogènes (microbes à l'origine des maladies) lorsqu'ils envahissent le corps. En effet, l'organisme d'une personne qui est immune reconnaît les antigènes (parties spécifiques du pathogène) et ainsi le système immunitaire va paralyser le fonctionnement normal du pathogène. A chaque étape du cycle de vie du parasite du paludisme, de multiples antigènes se développent et interagissent avec le système immunitaire de l'hôte humain. Ainsi la mise au point du vaccin cible une ou plusieurs étapes du cycle de vie du parasite du paludisme. Cette cible détermine son effet sur l'infection, la maladie et la transmission du paludisme.

#### **5.3.1. VACCINS CONTRE LES STADES PRE ERYTHROCYTAIRES (VACCINS ANTISPOROZOITES)**

Les vaccins pré-érythrocytaires visent à empêcher le sporozoïte de pénétrer ou de se développer dans les cellules du foie. Ces vaccins permettraient d'éviter les conséquences graves et parfois mortelles du paludisme chez les sujets non immunisés.

Le mécanisme de cette immunité protectrice est encore mal connu, mais le rôle des lymphocytes T est évident dans la lyse des hépatocytes infectés par une réponse cellulaire de type Th1, notamment par la stimulation des lymphocytes TCD4+ et TCD8+ et aussi par la médiation des cytokines (IFN $\gamma$ ).

En effet une expérience de vaccination, chez les souris déficientes en lymphocytes T CD8 n'ont pas été protégées par cette forme d'immunisation [9].

La protéine la mieux caractérisée est le Circum Sporozoites Protein (CSP) qui est exprimée avant et pendant l'infection des hépatocytes [10]. Beaucoup d'efforts ont été focalisés sur l'épitope immunodominant composé par un tetrapeptide répétitif NANP (Asn-Ala-Asn-Pro) de cette protéine.

Jusqu'ici, environ 22 essais cliniques ont eu lieu chez l'homme, avec divers vaccins candidats de ce type préparés à partir de *Plasmodium*. Les candidats vaccins les plus prometteurs dans ce groupe sont :

- ✓ le RTS, S/AS01E un candidat vaccin qui est sur la voie d'avoir une licence. Ce vaccin a été un bon inducteur de la réponse cellulaire de type Th1 et a entraîné une forte réponse humorale avec production d'une forte concentration d'IgG dirigée contre la région répétitive du CSP [11], mais le niveau de l'immunité protectrice et la durée de protection reste une question importante à résoudre.
- ✓ PfSPZ est un candidat vaccin constitué de sporozoïtes entiers, atténués par irradiation, actifs d'un point de vue métabolique mais sans capacité de répliquer.

Le PfSPZ s'est bâti sur les expériences d'immunisation à l'aide des sporozoïtes entiers atténués par irradiation et ayant donné une protection complète dans les années 60-80.

Le promoteur de ce produit s'est dit qu'en fait un vaccin antipaludique existe et qu'il faut trouver le moyen de le produire. D'où le développement d'un processus de fabrication à échelle, répondant aux critères les plus stricts de Bonne Pratique de Fabrication et de la FDA par la firme Sanaria. Cela a abouti au produit PfSPZ, un vaccin basé sur le sporozoïte entier et maintenu dans l'azote liquide. Cette approche a constitué un défi technologique et devra répondre au défi opérationnel de son déploiement sur le terrain dans les pays endémiques si le candidat s'avère vaccin. Toutefois le potentiel d'une protection à plus de 90% des personnes non immunes ou naïves vaccinées en font une approche qui mérite une attention particulière. En plus de l'infection expérimentale à l'aide d'anophèles élevés en laboratoire (44), les investigateurs ont développé le modèle de l'infection palustre contrôlée de l'homme à l'aide de sporozoïtes vivants inoculés par injection intradermique ou intraveineuse (45). Dans un essai de phase 1/2a avec épreuve d'infection, le candidat vaccin PfSPZ a montré une protection de

plus de 90% (46), permettant un développement clinique accéléré du produit et la conduite d'essais cliniques dans les pays endémiques, dont le Mali à partir de 2014.

### **5.3.2. VACCINS CONTRE LES STADES ASEXUES ERYTHROCYTAIRES (VACCINS ANTIMEROZOÏTES)**

Les vaccins (anti-mérozoïtes) du parasite visent à réduire la densité parasitaire et à réduire la morbidité et la mortalité liées au paludisme en empêchant les mérozoïtes de pénétrer ou de se développer dans les globules rouges.

La schizogonie érythrocytaire étant responsable des manifestations cliniques, les vaccins contre ces stades érythrocytaires pourraient réduire la pathogénicité, la morbidité et la mortalité du paludisme donc permettrait d'éviter les complications telles que : le paludisme cérébral, l'anémie palustre, la défaillance rénale et d'autres formes graves du paludisme chez la femme enceinte en bloquant l'invasion des érythrocytes par les merozoïtes.

Les efforts de développement d'un tel vaccin se sont concentrés sur les antigènes intervenant dans l'invasion des érythrocytes.

Au moins six candidats vaccins de ce type contre le paludisme à *Plasmodium* ont fait l'objet d'essais cliniques chez l'homme - en Amérique du Nord et Amérique du Sud, en Afrique, en Asie du Sud-Est et en Australie et Papouasie-Nouvelle-Guinée.

Ils comprennent le SPf66, MSP-1, MSP-2 (plusieurs versions), RESA, et AMA-1.

- ✓ L'AMA1 (Apical Membrane Antigen1) est une protéine de 83 kDa synthétisée au cours du stade érythrocytaire par les formes matures de *Plasmodium*. Elle est initialement localisée dans les organelles apicales, subit un clivage protéolytique pour donner un fragment de 66kDa qui sera exprimé à la surface du mérozoïte durant la phase d'invasion des globules rouges (47). Cette protéine constitue un candidat majeur des vaccins du stade sanguin. Le gène AMA1 est relativement conservé. Les anticorps monoclonaux purifiés dirigés contre AMA1 ont entraîné une inhibition de l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes (48). Des essais de vaccination effectués dans le modèle *Plasmodium fragile*/singe et *Plasmodium chabaudi* adami/souris avec AMA1 exprimée sous forme de protéine recombinante dans le système *Baculovirus* a montré une protection chez le singe (14) et la souris (49).



Un essai clinique de phase I d'un candidat vaccin à base d'AMA1 (FMP2.1/AS02A) fut mené en 2004 à Donegoubougou au Mali et a montré une bonne tolérance et une bonne réponse immunitaire maintenue dans le temps quelle que soit la dose, mais cette réponse était souche dépendante (7)

### **5.3.3. LE VACCIN BLOQUANT LA TRANSMISSION (TRANSMISSION-BLOCKING VACCINE OU TBV)**

Ce vaccin se réfère aux antigènes des stades sexués exprimés chez le moustique contre lesquels des anticorps seraient induits chez l'homme. Le moustique ingère ces anticorps au moment de son repas sanguin et l'interaction antigène-anticorps a lieu chez le moustique, entraînant ainsi le blocage de la division sexuée du parasite avec arrêt de la production de sporozoïtes et de la transmission.

En effet, la plupart des antigènes exprimés à ce niveau ne sont pas exprimés chez l'homme et ne sont pas exposés à la pression de son système immunitaire.

Ces antigènes constituent une cible idéale d'une réponse immunitaire efficace. Ce type de vaccin serait un vaccin altruiste ne protégeant pas directement le récipiendaire, visant plutôt à protéger le voisin contre les parasites abrités éventuellement par le récipiendaire et transmis par lui au vecteur

Les antigènes candidats TBV actuellement en développement sont basés sur les antigènes exprimés au niveau des gamétocytes et des gamètes, antigènes dits de pré fertilisation (P48/45 et P230) ou au niveau du zygote ou de l'ookinète, antigènes dits de post fertilisation (P25 et P28)

P230, P25 et P28 ont fait l'objet de nombreuses études, ces études ont montré que ces protéines sont indispensables à la formation des sporozoïtes (7).

Des approches nouvelles de conjugaison chimique avec l'exo protéine A recombinante de *Pseudomona Aeruginosa* (EPA) ont permis d'obtenir des candidats vaccins Pfs25 et Pfs230 (*P. falciparum* sexual antigen 25 et 230).

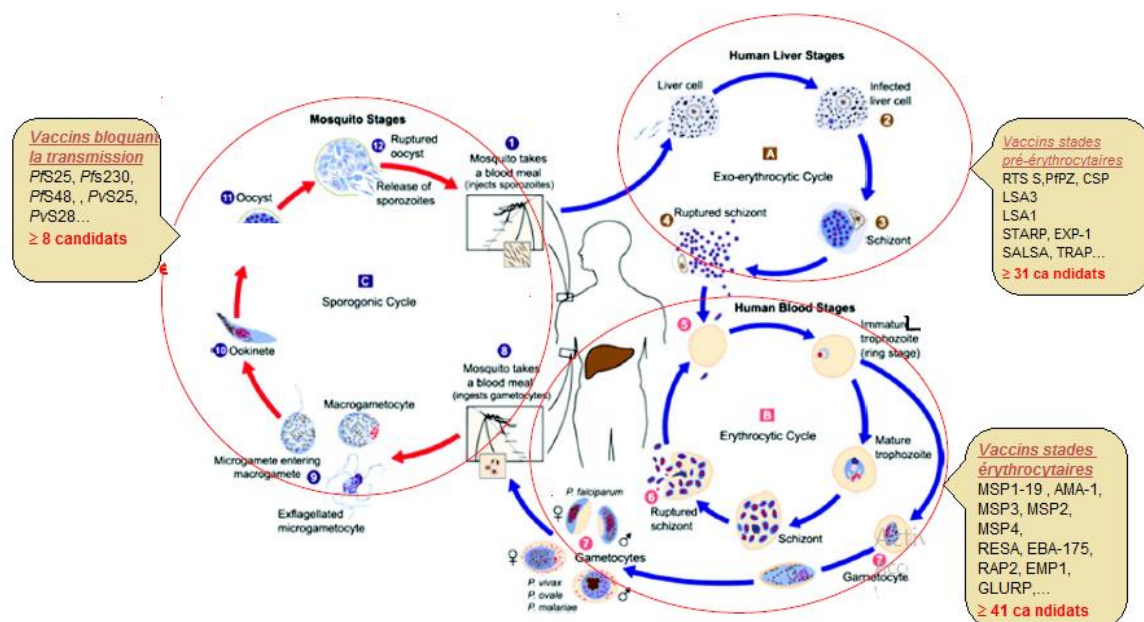
-Pfs25H-EPA, conjuguée à l'Alhydrogel®, a été évaluée dans une étude chez les adultes américains en phase 1 (2011 à 2014; NIAID Protocole n° 11-I-N237) et les adultes maliens



(2013 à 2014; NIAID Protocole n ° 13 -I-N109)<sup>77,78</sup>. En outre, Pfs25M-EPA, qui ne contient plus d'acides aminés hétérologues qui étaient présents dans Pfs25H pour faciliter la production à un stade précoce, a été évaluée récemment dans une étude de phase 1 chez les adultes aux États-Unis (2015) et adultes maliens (2015-2016) au titre du protocole NIAID # 15-I-0044. Tous deux ont été démontrés qu'il s'agit de vaccins tolérés, immunogènes ayant une activité de blocage de la transmission telle qu'évaluer par SMFA (Standard membran feeding assay). Des anticorps anti-Pfs25 spécifiques ont été détectés par ELISA dans le sérum de sujets ayant reçu 4 doses de Pfs25H-EPA/Alhydrogel® aux USA et au Mali. La réponse en anticorps à chaque dose de vaccin croît avec la dose subséquente de vaccin donné mais diminue très rapidement après la vaccination.

-Pfs230D1M-EPA conjugué à l'Alhydrogel® a été testé en phase I chez les adultes aux USA (2015) et au Mali (2015-2016) sous le numéro NIAID Protocol #15-I-0044 et a démontré une tolérance et une immunogénicité aussi bien chez les sujets neufs que chez adultes exposés au paludisme.

Ces trois types de vaccins permettent d'induire la production par l'organisme des anticorps, agents biologiques naturels de la défense du corps vis-à-vis de *Plasmodium falciparum*.



**FIGURE 7 : LES DIFFERENTS CANDIDATS VACCINS EN FONCTIONS DU CYCLE BIOLOGIQUE DU PLASMODIUM FALCIPARUM**

*Sources : Laboratoire de parasitologie et mycologie médicale Faculté de pharmacie,  
Montpellier Equipe "Recherche clinique - Infections fongiques et parasitaires" UMI 233  
"TransVIHMI" - INSERM U1175.*

#### **5.4. LES PRINCIPALES DIFFICULTES**

Beaucoup de facteurs font que le développement d'un vaccin contre le paludisme est difficile et se transforme en véritable défi.

##### **✓ La taille et la complexité génétique du parasite**

*Plasmodium falciparum* possède un grand génome de 23 Mo exprimant 5268 protéines putatives. Beaucoup de ces protéines exposent une variation allélique entre les espèces, ou un polymorphisme antigénique aux sites reconnus par l'anticorps ou par les lymphocytes T, cela constitue le principal obstacle dans la sélection des fractions antigéniques éventuellement utilisables à la mise au point du vaccin contre le paludisme. Jusqu'à présent, seulement moins de 0,3 % des 5300 antigènes cibles potentiels exprimés par *P. falciparum*, a été choisie comme cible vaccinale.

##### **✓ La complexité du cycle de vie de *P. falciparum***

Le parasite passe par plusieurs stades dans un même cycle de vie, et chez l'hôte humain, il présente un sous-ensemble de molécules différentes pour combattre le système immunitaire à chacune de ces étapes

##### **✓ Les adjuvants**

Le terme adjuvant dérive du latin « adjuvare » qui signifie aider, assister. Il désigne toute substance capable d'augmenter, stimuler, activer, renforcer, ou moduler la réaction immunitaire au niveau cellulaire ou humoral dirigée contre un antigène administré simultanément.

Les vaccins sont constitués de molécules antigéniques diluées dans un liquide, mais ces antigènes en solution n'induisent pas souvent de réponse immunitaire satisfaisante, surtout quand il s'agit de vaccins atténués et des vaccins sous-unitaires qui ne peuvent pas parfaitement imiter une infection naturelle.

L'utilisation des adjuvants dans la formulation des vaccins permet d'obtenir des taux plus élevés d'anticorps avec moins d'antigène.

S'ils sont efficaces, les adjuvants ne sont pas dépourvus d'effets secondaires car ils peuvent être responsables de fièvres, d'une allergie, voire même du déclenchement de maladies auto-immunes.

Les chercheurs s'emploient actuellement à utiliser des adjuvants efficaces avec moins d'effets secondaires

**- Alhydrogel® :**

L'Alhydrogel est composé de sels d'hydroxyde d'aluminium  $Al(OH)_3$ .

C'est un adjuvant couramment utilisé dans la recherche immunologique. La procédure consiste à adsorber l'antigène sur le gel d'hydroxyde d'aluminium à fin de permettre une présentation optimale des antigènes aux cellules présentatrice d'antigène et améliorer ainsi la réponse immunitaire aux vaccins.

Les sels d'aluminium induisent de bonnes réponses de l'immunité humorale (lymphocytes B et lymphocytes Th2 CD4+). En revanche, ils induisent peu ou pas de réponses d'immunité cellulaires (lymphocytes Th1 CD8 + cytotoxiques).

**-AS01:**

AS01 est un système adjuvant vaccinal à base de liposomes contenant deux immunostimulants: le 3- O -désacyl-4'-monophosphoryl lipide A (MPL) et la saponine QS-21.

Les effets de AS01 sont rapides et transitoires, localisés au muscle injecté et au ganglion lymphatique drainant.

AS01 est efficace pour promouvoir les réponses immunitaires à médiation par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et constitue un adjuvant candidat approprié pour l'inclusion dans des vaccins ciblant des virus ou des agents pathogènes intracellulaires [79].

## **5.5. DEVELOPPEMENT CLINIQUE D'UN VACCIN ANTIPALUDIQUE**

Le développement clinique d'un vaccin suit une série logique d'évaluations liées les unes aux autres dans un processus itératif qui vise à définir les caractéristiques du produit en termes de tolérance, de réponse immunitaire induite, de schéma de vaccination et d'efficacité.

Les candidats vaccins antipaludiques doivent être rigoureusement évalués. Cette évaluation comporte classiquement quatre (4) phases :

- ✓ **Les essais de Phase I** : Ils correspondent à la première administration du candidat vaccin chez l'homme.

Ces essais se font sur un nombre réduit de volontaires : environ 10-120 personnes, d'abord chez les adultes puis chez les enfants. Ces essais évaluent la tolérance et l'immunogénicité du candidat vaccin. Ils permettent aussi de tester les différentes doses et les différents schémas de vaccination.

Cette phase peut être subdivisée en : phase Ia portant sur des participants non exposés au paludisme et phase Ib les participants vivant en zone d'endémie et naturellement exposés au paludisme.

- ✓ **Les essais de Phase II** : Le but de ces essais est d'établir la preuve de la protection conférée par le candidat vaccin. Un effectif plus important est inclus (n=100-600), cette phase évalue l'efficacité, l'immunogénicité et continue d'évaluer la tolérance du vaccin.

On distingue :

-les essais de phase IIa, où la protection est évaluée suite à une épreuve d'infection expérimentale des participants

-les essais de phase IIb portent sur les populations réellement à risque et exposées à l'inoculum parasitaire naturel.

Dans le processus du développement clinique, la décision critique de poursuivre le développement du vaccin est prise suite aux résultats obtenus en phase II.

- ✓ **Les essais de Phase III**: Ils confirment l'efficacité du candidat vaccin qui a donné ses preuves en phase II. Ces essais portent sur un grand échantillon (n=1200-15000)

Les critères de jugement peuvent comprendre la mortalité liée au paludisme ou l'incidence des formes graves et compliquées. La phase III permet aussi d'évaluer le niveau et la durée de protection, l'importance des effets secondaires dans une plus large population. Les résultats de phase III sont critiques pour l'obtention de l'autorisation de mise sur le marché (AMM)

- ✓ **Les essais de phase IV:** Après l'enregistrement du vaccin, une phase IV ("post licensing monitoring") pourra être envisagée dans le but de l'évaluation continue de l'efficacité du vaccin, de l'amélioration des pratiques vaccinales, de la détection des effets secondaires rare, ou l'élaboration d'une stratégie d'utilisation du vaccin dans d'autres indications ou conditions.

#### **5.6. LES VACCINS ANTIPALUDIQUES EN COURS D'ETUDE**

Les vaccins antipaludiques sont considérés parmi les modalités les plus importantes pour la prévention potentielle et la réduction de la transmission du paludisme. La recherche et le développement dans ce domaine ont fait l'objet d'efforts intenses de la part de nombreux groupes au cours des dernières décennies.

Des chercheurs, des spécialistes des essais cliniques et des développeurs de vaccins ont travaillé sur nombreuses approches pour permettre en avant la disponibilité d'un vaccin contre le paludisme.

Ces feuilles de calcul ont été compilées par l'OMS avec l'aide de plusieurs organismes importants de financement des vaccins antipaludiques, des chercheurs individuels et de groupe, en fin de constituer un tableau représentant le résumé public le plus complet des projets de vaccins contre le paludisme à l'échelle mondiale.

# Global malaria vaccine pipeline

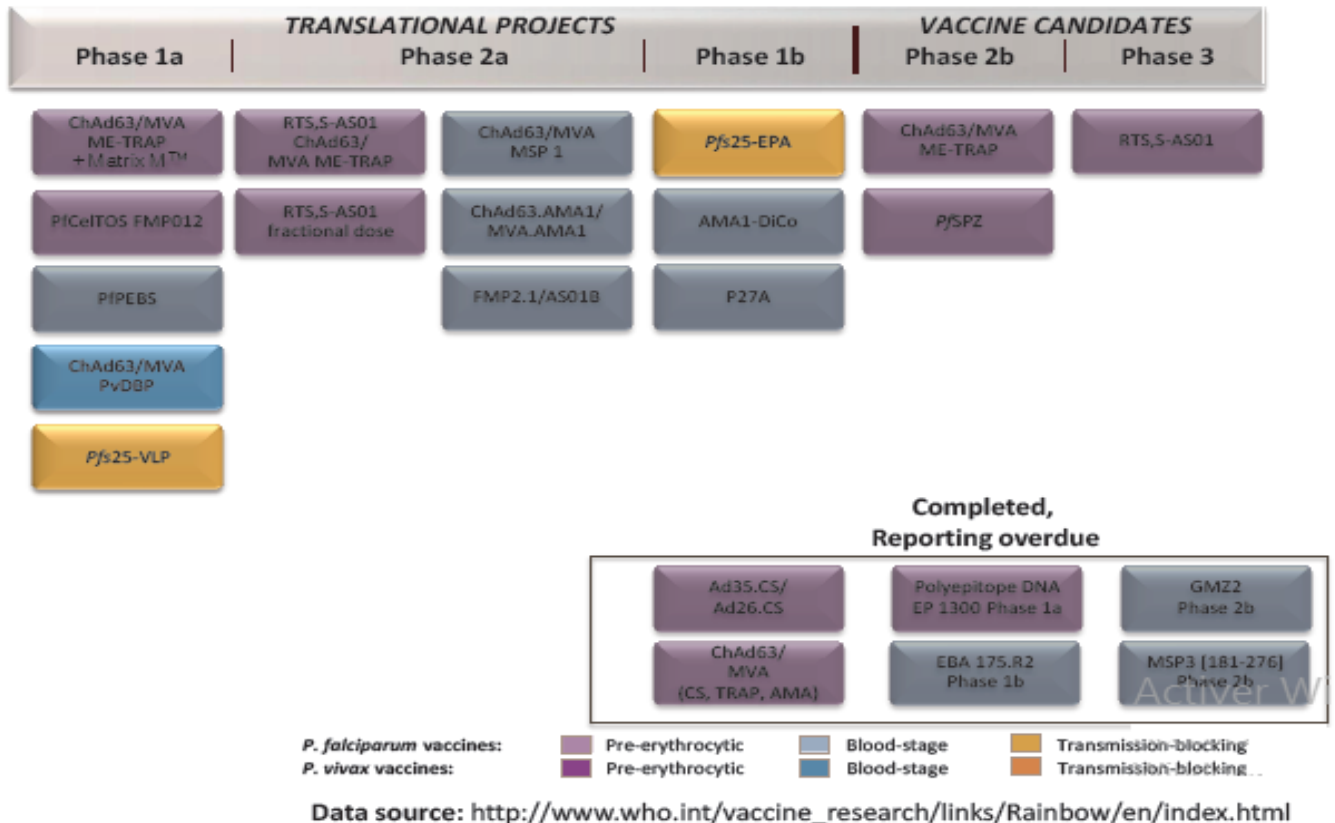


FIGURE 8 : LES DIFFERENTS VACCINS ANTIPALUDIQUE EN COURS D'ETUDE

## 5.7. LES PRODUITS DE L'ETUDE:

### 5.7.1. LES VACCINS BLOQUANT LA TRANSMISSION (Pfs25M-EPA/AS01, Pfs230D1M-EPA/AS01)

#### ✓ Pfs25M-EPA/AS01:

Les lots de PpPfs25M et EcEPA, tous deux fabriqués au centre Walter Reed Bioproduction (Silver Spring, Maryland) en conformité cGMP, ont été utilisés pour fabriquer le conjugué. PpPfs25M est un Pfs25 recombinant exprimé par *Pichia* ayant une masse moléculaire de 18,713 daltons. EcEPA est une protéine recombinante *E. coli*-exprimé avec une masse moléculaire de 66,975 Daltons. Le conjugué Pfs25M-EPA a été produit par réaction entre thiolé PpPfs25M et activée au maléimide EcEPA, suivie d'une purification par

chromatographie d'exclusion stérique. Le conjugué Pfs25M-EPA a été fabriqué à l'installation Walter Reed Bioproduction en conformité avec les cGMP en Janvier 2015.

Le Pfs25M-EPA a été formulé comme Pfs25M conjugué à 4 mM PBS à une dilution 2X de la forte dose (188µg / ml de volume 0,5 ml) en conformité avec cGMP au centre Walter Reed Bioproduction en Avril 2016 et sera fourni en flacon à usage unique. Adjuvant AS01B sera également fourni en flacon à usage unique par GSK, avec une concentration de 100 pg / ml MPL et 100 pg / ml QS21 dans une formulation liposomiale dans un volume de 0.625mL. Pour chaque dose de vaccin, les deux flacons à usage unique, l'un des Pfs25M conjugué dans 4 mM PBS, et l'un des AS01B, seront mélangés 1: 1 au chevet. Une dilution du conjugué dans Pfs25M 4 mM de PBS avec du sérum physiologique normal est effectué avant le mélange avec AS01B pour la dose de 16 pg. Pour la dose de 47µg, le AS01B est mélangé directement avec le conjugué Pfs25M ViaLED dans 4 mM de PBS. Pour la dose fractionnée 9µg, la AS01B sera mélangée à Pfs25M directement comme indiqué ci-dessus pour la dose de 47µg, mais seulement 1 / 5e (0,1 ml) du volume sera administré

Le dosage des volumes de 0,5 ml sera préparé pour la livraison soit 16µg conjugué Pfs25M, 15 pg conjugué EPA dans AS01B dilué (25 pg de MPL + QS21 25 pg(MPL + 25 pg QS21 formulation liposomale)); ou 47µg conjugué Pfs25M, 4 pg conjugué EPA dans AS01B dilué (MPL + 25 pg 25 pg formulation liposomale). le volume de dosage de 0,1 ml (dose fractionnée) sera préparé pour la livraison de 9µg conjugué Pfs25M, 9µg conjugué EPA dans AS01 (MPL + 5 ug 5 ug QS21 formulation liposomale). Le vaccin sera mélangé et établi dans les seringues directement avant injection

✓ **Pfs230D1M-EPA/AS01 :**

Les lots de PpPfs230D1M et EcEPA, ont également été à la fois fabriqués à Walter Reed Bioproduction installation (Silver Spring, Maryland) en conformité cGMP, ont été utilisés pour fabriquer le conjugué. PpPfs230D1M est un recombinant d'un sous-segment de Pichia exprimé (S542-G736) de Pfs230 ayant une masse moléculaire de 21 854 daltons. EcEPA est une protéine recombinante E. coli-exprimé avec une masse moléculaire de 66,975 Daltons. Le conjugué Pfs230D1M-EPA a été produit par réaction entre thiolé PpPfs230D1M et activée au maléimide EcEPA, suivie d'une purification par chromatographie d'exclusion stérique. Le

conjugué Pfs230D1M-EPA a été fabriqué à l'installation Walter Reed Bioproduction en conformité avec cGMP en Mai 2015.

Le Pfs230D1M-EPA a été formulé comme conjugué Pfs230D1M dans 4 mM PBS à une dilution 2X de la dose élevée (160µg / ml de volume de 0,5 mL) en conformité cGMP au centre Walter Reed Bioproduction en Avril 2016 et sera fourni en flacon à usage unique. AS01B adjuvant sera également fourni en flacon à usage unique par GSK, 100 pg / mL MPL et 100 pg / mL QS21 dans une formulation liposomale dans un volume de 0,625 ml. Pour chaque dose de vaccin, les deux flacons à usage unique, l'un des Conjugués Pfs230D1M dans 4 mM PBS, et l'un des AS01B, seront mélangés 1: 1 au chevet. Une dilution du conjugué dans Pfs230D1M 4 mM de PBS avec du sérum physiologique normal est effectuée avant le mélange avec AS01B pour la 13µg. Pour la dose de 40 pg, le AS01B est mélangé directement avec le conjugué Pfs230D1M ViaLED 4 mM dans du PBS. Pour la dose fractionnée 8 pg, la AS01B sera mélangée à Pfs230D1M directement comme indiqué ci-dessus pour la dose de 40 pg, mais seulement 1 / 5e (0,1 ml) du volume sera administrée.

Le dosage des volumes de 0,5 ml seront préparés pour la livraison soit 13µg conjugué Pfs230D1M, 10 pg conjugué EPA dans AS01B dilué (MPL + 25 pg 25 pg QS21 formulation liposomale); ou 40 pg conjugué Pfs230D1M, 31µg conjugué EPA AS01B dilué (25 pg de MPL + QS21 25 pg formulation liposomale). Le volume de dosage de 0,1 ml (dose fractionnée) sera préparé pour la livraison de 8 pg conjugué Pfs25M, 6 pg conjugué EPA dans AS01 (MPL + 5 ug 5 ug QS21 formulation liposomale). Le vaccin est mélangé et aspiré dans la seringue directement avant l'injection.

### **5.7.2. ENGERIX-B (VACCIN CONTRE L'HEPATITE B: RECOMBINANT):**

L'Engerix-B (Vaccin contre l'hépatite B [recombinant], GlaxoSmithKline) est une suspension stérile pour les administrations intramusculaires qui contient un antigène de surface du virus de l'hépatite B inactivé et non infectieux (HBsAg). L'HBsAg purifié est obtenu par culture de cellules de levure de *Saccharomyces cerevisiae* manipulées par génie génétique, qui portent le gène antigénique de surface du virus de l'hépatite B.

Le HBsAg est ensuite adsorbé séparément sur des sels d'aluminium. Une dose de 1 ml de vaccin contient 20 µg de protéine recombinante HBsAg, 0,5 mg d'aluminium sous forme d'hydroxyde d'aluminium.

Le vaccin est fabriqué par GlaxoSmithKline. ENGERIX-B est approuvé par la FDA pour l'immunisation active contre la maladie causée par tous les sous-types connus du virus de



l'hépatite B chez les nouveau-nés, les nourrissons, les enfants et les adultes non-accouchés administrés à 0, 1 et 6 mois.

# 6. MATERIELS ET METHODES

## 6.1. LIEU D'ETUDE

Notre étude a été menée au Mali : Sotuba / Bamako, (voir la figure 7).



FIGURE 9 : CARTE MONTRANT L'EMPLACEMENT DE BAMAKO, LA CAPITALE DU MALI

Source : Institut Géographique du Mali (IGM).



**FIGURE 10 : CARTE MONTRANT L'EMPLACEMENT DU SITE D'ETUDE DE SOTUBA, UNE ZONE PERIURBAINE DE BAMAKO**

*Source : Image Google Map, montrant l'emplacement de Sotuba*

Bamako est la capitale du Mali, située sur le fleuve Niger et a une population d'environ 3 007 122 habitants. Le district de Bamako est divisé en milieu urbain (hypoendémique) et périurbains (mésoendémique) zones et villages périphériques (hyperendémie). Sotuba est un quartier périurbain, situé en commune I du district de Bamako, en bordure du fleuve Niger et composé de ~ 6.500 habitants. La transmission du paludisme suit la même saisonnalité que dans les sites de MRTC de Bancoumana et Donéguébougou bien que les taux d'inoculation entomologique soient historiquement beaucoup plus faibles. Les précipitations annuelles varient entre 800 mm et 1000 mm et se produisent de juin à octobre. De nombreux essais cliniques (vaccins contre le paludisme et essais de médicaments), ainsi que des études épidémiologiques et entomologiques ont été réalisés à Sotuba. Comme le MRTC y entretient une clinique médicale et un laboratoire, il travaille sur ce site depuis 1993.

En 2014 le Malaria Research and Training Center (MRTC) en collaboration avec « European Developing Country Clinical Trial Partnerships » (EDCTP)/Malaria Médecine Venture (MMV) a construit un laboratoire annexe muni d'une salle d'attente, d'une pharmacie, d'une salle de prélèvement sanguin, de diagnostic parasitaire, d'analyse biochimique et hématologique, d'une salle de préparation de mélange réactionnel pour la Polymérase Chain Réaction (PCR), d'une salle d'extraction d'ADN, d'une salle d'amplification et de révélation.

## **6.2. TYPE D'ETUDE**

Nous avons effectué une étude longitudinale

## **6.3. PERIODE D'ETUDE**

Cette étude s'est déroulée de janvier 2017 à décembre 2017.

## **6.4. POPULATION D'ETUDE :**

La population d'étude était composée de volontaires d'hommes et de femmes en bonne santé, enrôlés dans le protocole N<sup>o</sup> 2016/133/CE/FMOS.

### **6.4.1. ÉCHANTILLONNAGE:**

Une annonce générale a été faite par un griot du village, une assemblée générale convoquée par les chercheurs de l'étude avec les leaders et les chefs de famille du quartier et les guides locaux, pour informer la population de l'étude au moment de la permission communautaire. Nous avons procédé au recrutement des volontaires. Par la suite sur 175 personnes dépistées, 65 volontaires répondant à tous les critères d'inclusion, ont été inclus dans l'étude et parmi ceux-ci nous nous sommes intéressés à 40 participants pour les travaux de cette thèse. Par prudence avec d'éventuels problèmes de tolérance des produits à leur première expérimentation chez l'homme, les essais cliniques de phase I utilisent une faible taille d'échantillon.

Les quarante (40) participants étaient répartis en quatre groupes :

**Groupe 1:** Pfs25M-EPA/AS01 1b (n=10), pour recevoir 47 µg Pfs25M-EPA/AS01 à J0 (janvier), J28 (février), J168 (juillet)

**Groupe 2:** Pfs230D1M-EPA/AS01 (n=10), pour recevoir 40 µg Pfs230D1M-EPA/AS01 à J0, J28, J168

**Groupe 3:** Pfs25M-EPA/AS01 et Pfs230D1M-EPA/AS01 (n=10), pour recevoir 47 µg Pfs25M-EPA/AS01 et 40 µg Pfs230D1M-EPA/AS01 à J0, J28, J168

**Groupe 4:** Comparateur (n=10), pour recevoir Engerix B<sup>®</sup> à J0, J28 and J168

### **6.4.2. CRITERES D'INCLUSION :**

Les critères d'inclusion étaient ceux du protocole N<sup>o</sup> 2016/133/CE/FMOS :

- ✓ Age  $\geq$  18 et  $\leq$  50 ans

- ✓ Disponible pendant la durée de l'étude.
- ✓ Capable de fournir une pièce d'identité.
- ✓ Bon état général de santé et sans histoire d'antécédent médical significatif.
- ✓ Les femmes en âge de procréer devaient utiliser une méthode de contraception fiable (définie comme suit) à partir de 21 Jours avant le Jour 0 de l'Etude à 3 mois après la dernière vaccination.
- ✓ Volontaire pour que ses échantillons de sang soient gardés pour des futures recherches.
- ✓ Résidant connu de Sotuba.

#### **6.4.3. CRITERES DE NON INCLUSION**

Les critères de non inclusion étaient ceux du protocole N<sup>o</sup> 2016/133/CE/FMOS :

- ✓ Grossesse déterminée par un test positif d'urines ou un test de sérum d'humain choriogonadotropine ( $\beta$ -hCG) (si c'est une femme).
- ✓ Allaitement en cours (si c'est une femme).
- ✓ Maladie comportementale, cognitive, ou psychiatrique qui, selon l'avis du chercheur, affecte la capacité de la volontaire à comprendre et à coopérer avec l'exécution du protocole de l'étude.
- ✓ Infection au virus de l'immunodéficience humaine (VIH), au virus de l'hépatite C (VHC), ou au virus de l'hépatite B (VHB).
- ✓ Antécédent d'administration de tout produit expérimental dans les 30 jours précédents.
- ✓ Volontaire ayant eu des problèmes médicaux, professionnels, ou familiaux par suite d'alcoolisme ou d'usage illicite de médicaments dans les 12 derniers mois.
- ✓ Antécédent d'allergie grave ou de choc anaphylactique.
- ✓ Asplénie connue ou asplénie fonctionnelle.
- ✓ Administration d'immunoglobulines ou de produits dérivés du sang lors des 6 derniers mois.
- ✓ Administration antérieure de vaccin antipaludique expérimental dans les cinq dernières années.
- ✓ Antécédent d'allergie à un des composants du vaccin (par exemple latex).
- ✓

## **6.5. CRITERES DE JUGEMENT DE L'ETUDE**

Les critères de jugement étaient :

- la proportion d'expression des cellules T CD4+
- la proportion d'expression des cellules T CD8+
- la proportion d'expression des cellules T CD4+PD1+CXCR5-

## **6.6. CONSIDERATIONS ETHIQUES**

Le formulaire de consentement éclairé, ainsi que le protocole ont été soumis et approuvés par les comités d'éthique du NIAID (17-I-N006), de la FMPOS (N°2016/133/CE/FMPOS).

## **6.7. ORGANISATION PRATIQUE DU TRAVAIL**

### **6.7.1. DEPISTAGE**

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

Les prélèvements consistaient à prélever le sang dans les tubes SST pour les tests biochimies (Créatinine et ALT), HIV, AgHBs, AgHCV,  $\beta$ -hCG pour les dames et dans le tube EDTA pour le test NFS (Numération Formule Sanguin).

L'analyse des échantillons a immédiatement suivi leur réception. En cas de résultat anormal d'un paramètre, le test était immédiatement répété une fois sur le même échantillon pour confirmer la valeur.

Aucun cas d'erreur technique n'a été noté, ni de panne de machine. Un contrôle de qualité des résultats était effectué après chaque report dans les dossiers individuels des volontaires à partir des documents sources que constituent les imprimés des appareils, pour minimiser les erreurs de transcriptions.

Le laboratoire de biologie clinique a bénéficié des contrôles de qualité interne, effectués sur les appareils deux fois par semaines. Le contrôle de qualité externe a été régulièrement fait tous les trois mois..

### **6.7.2. VACCINATION**

- ✓ **Poste d'identification** : Ce poste était composé d'un investigateur et d'un guide.

Le travail consistait à identifier chaque volontaire par le guide et aussi à travers le numéro d'identification (ID), puis vérifier l'obtention du consentement éclairé. Après cette vérification, le volontaire était dirigé, vers les postes cliniques.

- ✓ **Poste clinique** : Tenu par des médecins occupant chacun une salle de consultation médicale. L'examen clinique et l'examen physique complet ont été effectués. Les volontaires étaient ensuite orientés vers la salle de prélèvement.
- ✓ **Poste de prélèvement** : tenu par les biologistes, dont l'un s'occupait de l'étiquetage des tubes SST, EDTA, Héparine et Paxgene sur les quelles étaient inscrits: la date et l'heure du prélèvement, le numéro d'identification du volontaire et les initiales du biologiste, un autre biologiste était chargé du prélèvement du sang veineux sur ces tubes, la confection des confettis et des lames. Un échantillon d'urines de chaque volontaire féminin était collecté pour le test de grossesse. Puis un autre biologiste s'occupait du transport des échantillons sur un portoir approprié dans la salle d'analyse clinique.
- ✓ **salle d'analyse clinique** : Tenue par une partie des biologistes chargés des tests hématologiques, biochimiques, la coloration et lecture des lames, la préparation et l'envoi au Point G (MRTC) des échantillons destinés à l'étude immunologique dans les deux (2) heures qui suivent le prélèvement.

Après le prélèvement le participant était ensuite orienté vers la salle de vaccination.

- ✓ **Poste de vaccination** : Constitué de deux médecins repartis dans deux salles réservées à cet effet et de deux pharmaciens chargés de la préparation des vaccins dans une autre salle séparée, communiquant avec les premières par deux petites fenêtres coulissantes.

La randomisation était effectuée par les statisticiens de NIH par l'attribution du code de randomisation qui correspond à chaque numéro de screening.

Le pharmacien de l'étude disposait de la liste de randomisation pour attribuer le bras de vaccin séquentiellement en fonction de l'ordre d'enrôlement du participant.

Après une vérification supplémentaire de l'identité du participant, il reçoit une dose de vaccin par injection IM dans le muscle deltoïde.

- ✓ **Préparation des vaccins** : les deux pharmaciens étaient chargés de vérifier le numéro de screening du participant en vérifiant la liste de randomisation correspondant à ce numéro puis préparer le vaccin alloué au participant avec toutes les conditions requises, remplir le dossier des participants et passer la seringue étiquetée et le cahier d'observation aux vaccinateurs.

Les volontaires retournaient aux postes cliniques pour une évaluation générale

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

### **6.7.3. SUIVI:**

Composé d'un suivi actif qui consistait à faire des visites programmées pour les évaluations cliniques et biologiques aux jours 0, 3, 14, 28, 31, 42, 112, 168, 171, 175, 182, 196, 224, 280 et 336 et d'un suivi passif qui consistait à s'occuper des sujets à tout moment en cas de problème. Les 3 doses des vaccins administrées aux jours J0 (janvier), J28 (février) et J168 (juillet)

### **6.7.4. SALLE DE REANIMATION :**

Tenue par un médecin anesthésiste réanimateur, équipée de deux lits d'hospitalisation, deux bonbonnes d'oxygène de capacité, un lot de matériels et produits de réanimation.

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

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

### **6.7.5. ETUDE IMMUNOLOGIQUE**

Le but de l'unité d'immunologie était d'évaluer l'immunité cellulaire et humorale dans la population d'étude dans les conditions naturelles; et de suivre la réponse immunitaire de ces populations après administration de nos candidats vaccins : Pfs25M-EPA/ AS01 et Pfs230DM-EPA/AS01.



### **6.7.6. ANALYSES DES REPONSES CELLULAIRES**

Les études des réponses cellulaires ont été réalisées au MRTC en utilisant du sang total pour énumérer les différents sous-ensembles de cellules T (CD4, CD8, PD1+CXCR5-) avant et après chaque vaccination par la cytométrie en flux et au cours des suivis.

#### ✓ **Principe de la cytométrie en flux:**

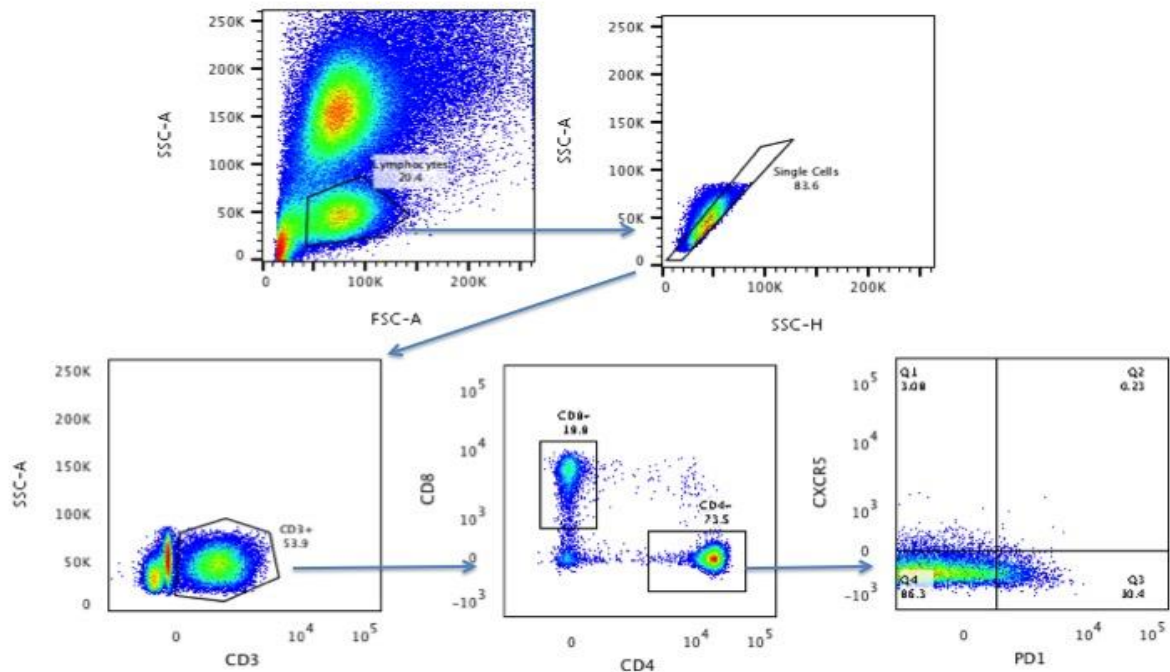
La cryométrie en flux est une technique multiparamétrique permettant l'étude de plusieurs caractéristiques (taille, complexité, et fluorescence) d'une cellule isolée entraînée par un flux liquide. Les cellules marquées aux fluorochromes sont d'abord propulsées une à une, à très grande vitesse dans un flux hydrostatique et passent devant une source lumineuse (Laser), la fluorescence issue de l'immuno marquage préalable est ensuite récupérée et mesurée grâce à un éventail de détecteurs ; et ces mesures obtenues sont utilisées pour générer des ensembles des données à paramètres multiples : les caractéristiques physiques des cellules et leurs propriétés fluorescentes, les caractéristiques de leur dispersion lumineuse frontale et latérale.

#### ✓ **Mode opératoire**

Elle consistait à effectuer un immuno marquage sur 150 µl du sang total par des anticorps fluorescents (anti- CD3-Alexa700, anti-CD8- APC H7, anti-CD4-PE-CY5, anti gd TCR-PE, anti-TCR CXCR5-FITC, anti-CD45RO-BV421, anti-OX40-PE-Cy7 et anti-PD1-APC,) à chaque point de temps selon le mode opératoire normalisé du laboratoire d'immunologie voir (Annexe).

#### ✓ **Interprétation des résultats**

Les lymphocytes T et leurs sous-ensembles étaient identifiés par l'expression différentielle de marqueurs de surface cellulaire comprenant CD3, CD4, CD8. La sous population de CD4+ a été utiliser pour énumérer l'expression de PD1 et CXCR5.



**FIGURE 11: STRATEGIE D'ANALYSE D'EXPRESSION DES CELLULES T-CD8+, T-CD4+ ET T-CD4+PD-1+ SUR LES CELLULES T.**

### **6.8. COLLECTE, SAISIE, ANALYSE DES DONNEES**

Les données ont été recueillies dans les cahiers d'observation individuels des participants, saisies et vérifiées dans une base de données Data fax version 2.1 puis exportées sur Excel et analysées par le logiciel Prism version 8.0.1.

Le dosage des cellules T (CD4+, CD8+, et CD4+ PD1+ CXCR5) ont été fait sur le cytomètre BD FORTESSA X20 ( voir annexe) et analysées sur le logiciel Flow Jo version 10.3.0 puis sur Prism version 8.0.1.

# 7 RESULTAT

## 7.1. LES CARACTERISTIQUES DE BASE

**TABLEAU 1: REPARTITION DES PARTICIPANTS SELON LE SEXE ET LE GROUPE**

Groupe \ Sexe	Pfs25-AS0I		Pfs230-AS0I		Pfs25+Pfs230AS0I		Engerix B	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>Masculin</b>	8	80	7	70	6	60	4	40
<b>Féminin</b>	2	20	3	30	4	40	6	60
<b>Total</b>	10	100	10	100	10	100	10	100

Les participants de sexe masculin étaient les plus représentés avec respectivement de 80 %, 70% et 60% dans le groupe Pfs25M-EPA/AS01, Pfs230D1M-EPA/AS01 et Pfs25M-EPA/AS01+Pfs230D1M-EPA/AS01, tandis que le sexe féminin était le plus représenté dans le groupe Engerix B avec 60%

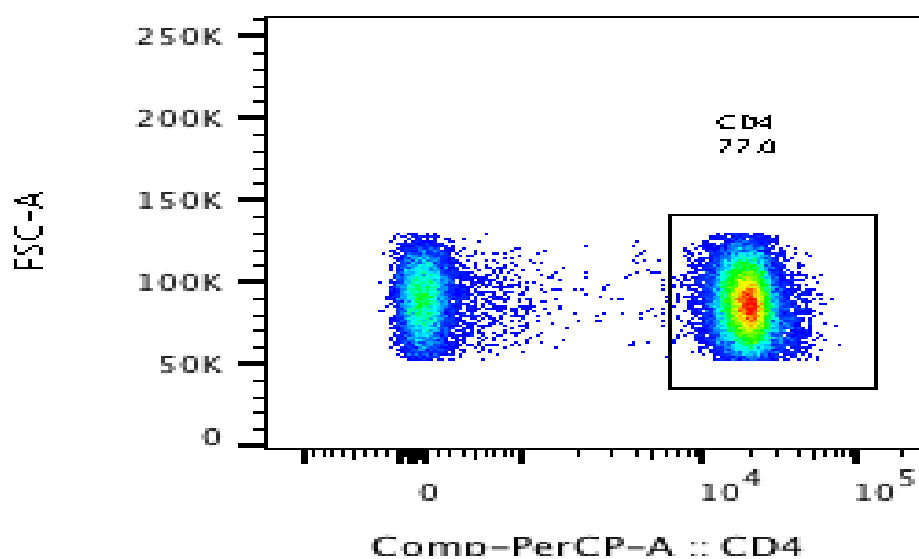
**TABLEAU 2: REPARTITION DES PARTICIPANTS SELON L'AGE ET LE GROUPE**

Age \ Groupe	Pfs25-AS0I	Pfs230-AS0I	Pfs25+Pfs230 AS0I	Engerix B
<b>Moyenne</b>	29,8	31,9	28,2	30,1
<b>Min-Max</b>	24 - 46	24 - 48	21 - 39	20 - 44

Les âges moyens étaient respectivement de 29,8 ans ; 31,9 ans ; 28,2 ans et 30,1 ans dans les groupes Pfs25M-EPA/AS01, Pfs230D1M-EPA/AS01, Pfs25M-EPA/AS01+Pfs230D1M-EPA/AS01 et Engerix B.

## 7.2. LES REPONSES CELLULAIRES AUX VACCINS

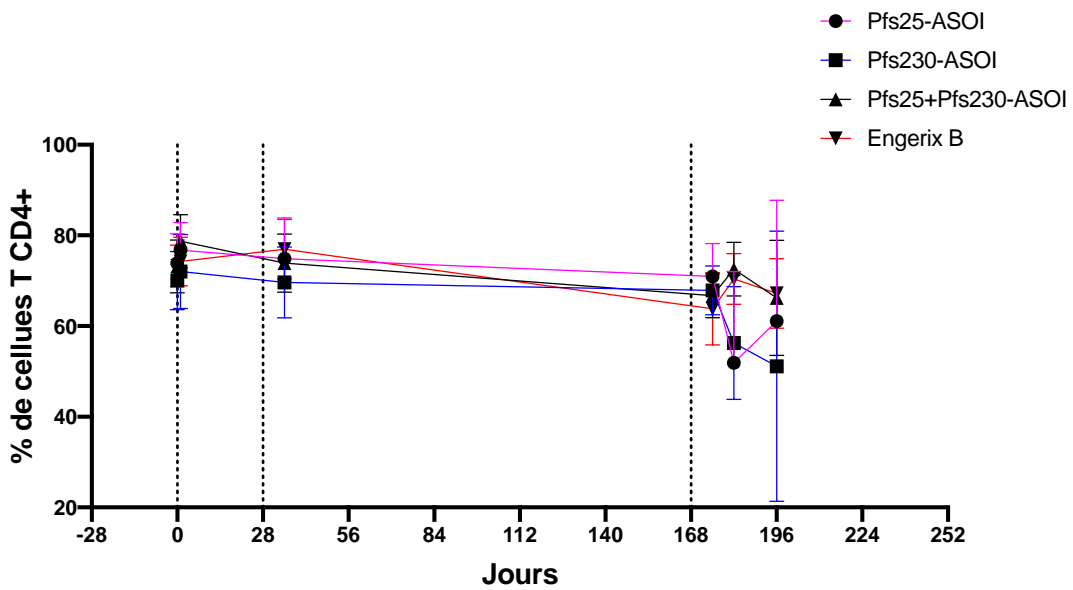
### 7.2.1. EXPRESSION DES CELLULES TCD4



**FIGURE 12 : STRATEGIE D'ANALYSE DE L'EXPRESSION DES CELLULES TCD4**

**TABLEAU 3 : EVOLUTION DU NIVEAU DES CELLULES T CD4+ CHEZ LES PARTICIPANTS APRES LES DOSES DES VACCINS**

Vaccins	Pfs25-EPA/ASO1		Pfs230-EPA/ ASO1		Pfs25+Pfs230 EPA/ASO1		Engerix B	
	Moyenne	Ecart Type	Moyenne	Ecart Type	Moyenne	Ecart Type	Moyenne	Ecart Type
<b>0</b>	73,910	6,460	70,020	6,434	73,180	5,836	73,280	4,583
<b>1</b>	76,770	6,075	72,040	8,158	78,710	5,861	74,250	5,316
<b>35</b>	74,844	9,015	69,633	7,806	73,880	6,426	76,989	6,611
<b>175</b>	70,950	7,273	67,860	5,412	66,689	4,849	63,840	7,951
<b>182</b>	51,922	20,124	56,300	12,456	72,567	5,893	70,420	5,610
<b>196</b>	61,125	26,639	51,133	29,803	66,244	12,701	67,230	7,681
<b>Total</b>	68,598	16,386	64,786	15,527	72,056	8,235	70,900	7,559

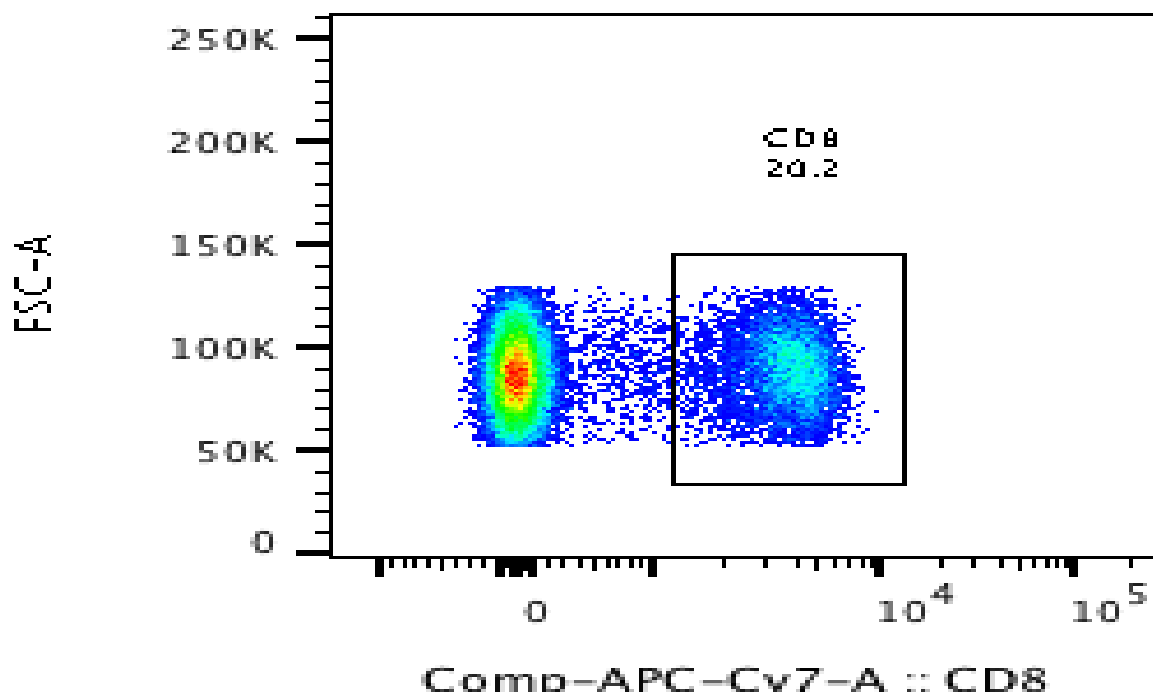


**FIGURE 13 : EXPRESSION DE CELLULES T CD4 + SELON LES GROUPES ET LES JOURS DE SUIVI.**

Le pourcentage d'expression des cellules T CD4+ au jour 0 (avant la première vaccination) dans les groupes Pfs25M-EPA/AS01 et Pfs230D1M-EPA/AS01 était similaire aux jours 1, 35, 175 et 196, par contre statistiquement plus bas aux jours 182 avec  $p=0,0030$  et  $0,0123$  respectivement.

Le pourcentage d'expression des cellules T CD4+ au jour 0 dans les groupes Pfs25M-EPA/AS01+Pfs230D1M-EPA/AS01 et Engerix était similaire aux jours 1, 35, 182 et 196, par contre statistiquement plus élevé aux jours 175 avec  $p=0,0141$  et  $0,0089$  respectivement.

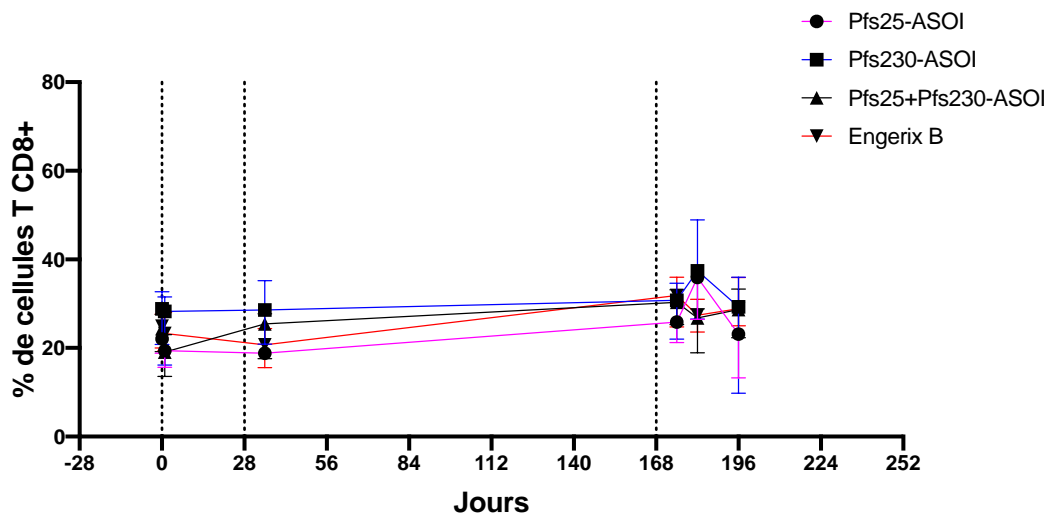
## 7.2.2. EXPRESSION DES CELLULES TCD8



**FIGURE 14:** STRATEGIE D'ANALYSE DE L'EXPRESSION DES CELLULES TCD8

**TABLEAU 4 :** EVOLUTION DU NIVEAU DES CELLULES T CD8+ CHEZ LES PARTICIPANTS APRES LES DOSES DES VACCINS

Vaccins	Pfs25-EPA/ASO1		Pfs230-EPA/ASO1		Pfs25+Pfs230-EPA/ASO1		Engerix B	
	Moyenne	Ecart Type	Moyenne	Ecart Type	Moyenne	Ecart Type	Moyenne	Ecart Type
<b>0</b>	23,180	6,214	27,590	7,068	23,240	5,657	24,070	4,407
<b>1</b>	20,480	5,692	25,140	8,678	18,267	5,502	23,480	5,079
<b>35</b>	22,989	8,796	28,044	8,424	23,138	6,305	20,811	6,194
<b>175</b>	27,250	6,923	29,640	6,243	28,789	5,408	30,460	7,016
<b>182</b>	42,444	17,984	38,767	12,657	24,200	6,100	26,930	5,528
<b>196</b>	23,838	13,801	23,956	15,178	30,256	12,339	29,510	7,026
<b>Total</b>	<b>26,559</b>	<b>12,624</b>	<b>28,782</b>	<b>10,721</b>	<b>24,485</b>	<b>7,968</b>	<b>25,963</b>	<b>6,631</b>

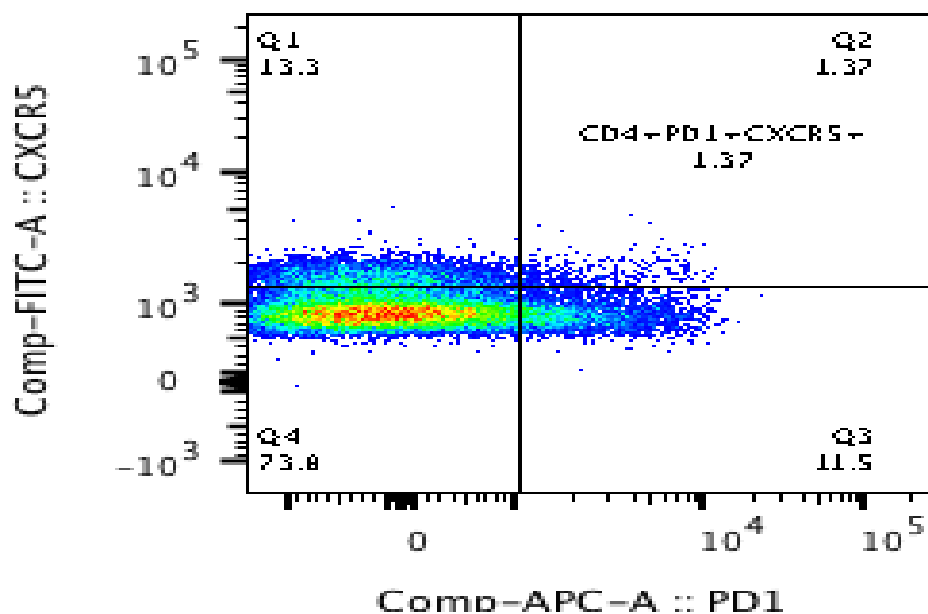


**FIGURE 15:** EXPRESSION DE CELLULES T CD8+ SELON LES BRAS ET LES JOURS DE SUIVI.

Le pourcentage d'expression des cellules T CD8+ au jour 0 dans le groupe Pfs25M-EPA/AS01 était similaire aux jours 1, 35, 175 et 196, par contre statistiquement plus élevé au jour 182 avec  $p=0,0030$ . Cependant pourcentage d'expression des cellules T CD8+ au jour 0 dans le bras Pfs230D1M-EPA/AS01 était resté similaire pendant toute la durée des suivis.

Le pourcentage d'expression des cellules T CD8+ au jour 0 dans les bras Pfs25M-EPA/AS01+Pfs230D1M-EPA/AS01 et Engerix était similaire aux jours 1, 35, 182 et 196, par contre statistiquement plus bas aux jours 175 avec  $p=0,0262$  et  $0,0288$  respectivement

### 7.2.3. EXPRESSION DE CELLULES TCD4+PD1+CXCR5-

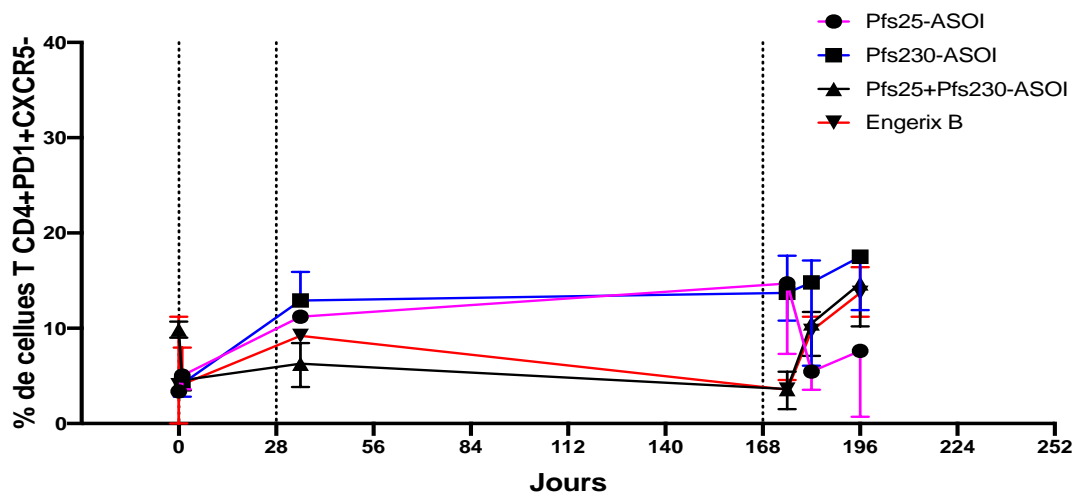


**FIGURE 16 :** STRATEGIE D'ANALYSE DE L'EXPRESSION DES CELLULES T CD4+PD1+CXCR5

**Tableau 5 :** Evolution de l'expression des cellules T CD4+PD1+CXCR5 chez les participants après les doses des vaccins.

Vaccins	Pfs25-EPA/ASO1		Pfs230-EPA/ASO1		Pfs25+Pfs23-EPA/ASO1		Engerix B	
Jour	Moyenne	Ecart Type	Moyenne	Ecart Type	Moyenne	Ecart Type	Moyenne	Ecart Type
<b>0</b>	3,117	1,304			11,022	2,085	9,683	5,246
<b>1</b>	4,561	1,296	4,819	1,541	4,626	1,067	4,137	1,891
<b>35</b>	12,627	3,580	13,398	2,194	7,948	2,337	7,949	2,667
<b>175</b>	12,501	10,014	16,376	6,810	2,903	2,331	4,865	6,310
<b>182</b>	7,267	3,406	10,569	5,274	6,774	4,576	10,982	12,418
<b>196</b>	8,810	8,540	11,492	7,839	9,479	5,064	12,235	10,687
<b>Total</b>	<b>7,895</b>	<b>6,383</b>	<b>11,300</b>	<b>6,450</b>	<b>7,164</b>	<b>4,112</b>	<b>8,315</b>	<b>7,932</b>





**FIGURE 17 : EXPRESSION DE CELLULES T CD4+PD1+CXCR5**

Le pourcentage d'expression des cellules T CD4+PD1+CXCR5- au jour 0 dans les groupes Pfs25M-EPA/AS01 et Pfs230D1M-EPA/AS01 était statistiquement plus élevé aux jours 1, 35 et 182 avec  $p=0,0232$  ;  $<0,0001$  et  $0,0133$  respectivement, par contre similaire aux jours 175 et 196 respectivement.

Le pourcentage d'expression des cellules T CD4+PD1+CXCR5- au jour 0 dans les bras Pfs25M-EPA/AS01+Pfs230D1M-EPA/AS01 était resté statistiquement plus bas aux jours 1, 35, 175 et 182 avec  $p <0,0001$  ;  $0,0095$  ;  $<0,0001$  et  $0,0435$  respectivement, par contre similaire au jour 196.

Le pourcentage d'expression des cellules T CD4+ au jour 0 dans les bras Engerix était statistiquement plus bas aux jours 1 et 175 avec  $p=0,0089$  et  $0,0288$  respectivement par contre similaire aux jours 35, 182 et 196 respectivement.

# 8 COMMENTAIRES ET DISCUSSION

---

## **Méthodologie:**

Dans ce travail nous avons étudié la cinétique des cellules T (CD4+, CD8+ et - CD4+PD1+CXCR5-) des deux candidats vaccins bloquant la transmission du paludisme en administration seule et en co-administration chez des adultes exposés au paludisme à Sotuba qui est une zone de faible transmission de paludisme en 2017.

Nous avons choisi d'effectuer cette étude à Sotuba car il est situé dans une zone hypo-endémique avec une faible transmission saisonnière d'environ 6 mois, allant de Juillet à Décembre et cela nous permettait aussi d'avoir plus facilement la taille des participants pour la phase d'activité du vaccin par SMFA et DSF en zone hyper endémique.

Ce site a fait l'objet de nombreuses études portant sur l'épidémiologie du paludisme, l'efficacité des médicaments et l'entomologie, menées par le MRTC/DEAP. L'équipe du MRTC/DEAP a établi un centre de santé et de recherche électrifié avec une connexion internet.

Il existe de très bons rapports de confiance mutuelle entre la population de ce village et l'équipe en place.

## **Le choix des Pfs230D1M et Pfs25M**

Pfs230D1M et Pfs25M ont été bien tolérés et ont montré une bonne immunogénicité dans des essais de phase I sur des sujets naïfs aux États-Unis et au Mali dans une zone de transmission intense du paludisme. Ces différents résultats encourageants ont permis de poursuivre la recherche vaccinale pour tester la tolérance clinique et l'immunogénicité de ces candidats vaccins au Mali.

Nous avons effectué un essai clinique randomisé ouvert avec groupe témoin. Le recours à un groupe témoin est utile en zone hypoendémique dans une étude de Phase I, car l'immunité acquise et l'exposition naturelle à la transmission du paludisme peuvent compliquer l'interprétation des données de l'immunogénicité. Une augmentation du titre des anticorps peut être attribuée à tort aux candidats vaccins ses effets étant méconnu et dans le cadre de ce présent travail, nous nous sommes uniquement intéressés à la réponse cellulaire à ces candidats vaccins.

### **Choix de L'ENGERIX B®:**

L'ENGERIX B® était utilisé comme vaccin témoin par rapport aux candidats vaccins bloquant la transmission.

Le recours à un groupe témoin est utile en zone d'endémie dans une étude de Phase I, car l'immunité acquise suite à l'exposition naturelle à la transmission du paludisme peut biaiser l'interprétation des données de l'immunité cellulaire conférée par le vaccin. Une augmentation de proportion des cellules T peut être attribuée à tort au vaccin en cours d'essai, alors cela pourrait être dû à la stimulation naturelle, l'effet du candidat vaccin étant méconnu. En plus des comparaisons immunologiques, c'est pour une évaluation plus objective des E I S dans les zones tropicale à multiples maladies notamment infectieuses

L'Engerix B apporte une protection contre l'hépatite B, ce vaccin ne guérit pas les porteurs chroniques, mais il est efficace de 90 à 95 % pour prévenir l'hépatite B. Le vaccin anti-VHB est aussi le premier vaccin susceptible de protéger contre un cancer et le premier vaccin contre une infection sexuellement transmissible (51) ;

### **Caractéristiques de base**

Les essais cliniques de phase pilote concernent en général quelques dizaines de participants. Notre étude de phase pilote a enrôlé 65 participants et parmi ceux-ci nous nous sommes intéressés à 40 participants pour les travaux de cette thèse. Dans notre population d'étude le sexe masculin était le plus représenté avec respectivement de 80 %, 70% et 60% dans les bras Pfs25M-EPA/AS01, Pfs230D1M-EPA/AS01 et Pfs25M-EPA/AS01+Pfs230D1M-EPA/AS01 tandis que le sexe féminin était le plus représenté dans le bras Engerix B avec 60% ; cette prédominance masculine s'explique par le fait que certains critères de non inclusion étaient

spécifiques aux femmes tels que décrits dans la méthodologie. Le seul critère relatif au besoin d'être sous contraception fiable 21 jours avant la première vaccination et 3 mois après la dernière dose de vaccin limitait suffisamment le recrutement des jeunes filles et femmes en âge de procréer.

Ce résultat est comparable à celui obtenu par DEMBELE B (52) qui était de 63% pour le sexe masculin

Les moyens d'âge étaient comparable dans les différents groupes et étaient respectivement de 29,8 ans ; 31,9 ans ; 28,2 ans et 30,1 ans dans le groupe Pfs25M-EPA/AS01, Pfs230D1M-EPA/AS01 ; Pfs25M-EPA/AS01+Pfs230D1M-EPA/AS01 et Engerix B. L'âge minimum était de 21 ans et l'âge maximum était de 48 ans. Ce résultat est comparable à celui obtenu par DEMBELE B (52) qui avait trouvé comme l'âge minimum 19 ans et maximum 50 ans.

Les réponses cellulaires

- L'expression de lymphocyte TCD4+

Au cours des suivis, le pourcentage des cellules TCD4+ était similaire dans le groupe de vaccin Pfs25M-EPA/AS01 aux jours avant la première vaccination (J0), après la première vaccination (J1), après la deuxième vaccination (J35), après la troisième vaccination (J175) et J196 avec respectivement  $p=0,4043$  ;  $0,6038$  ;  $0,5726$  et  $0,2115$  ; par contre plus bas au jour J182 avec  $p=0,0030$ .

Cependant nous avons observé une tendance d'élévation du pourcentage de TCD4+ dans ce groupe après la première vaccination, puis une diminution après la 3<sup>ème</sup> Vaccination mais qui n'était statistiquement significative. Ce résultat était comparable à celui de **Andrea J. Radtke1 et al en 2016** qui n'ont pas trouvé une réponse de cellule T-CD4+ détectable à *ex vivo* au Pfs25(53),

Dans le groupe de vaccin Pfs230D1M-EPA/AS01, on observe la même similarité du pourcentage de cellule TCD4+ aux jours J0, J1, J35, J175, J196 et une légère baisse après la 3<sup>ème</sup> vaccination au jour J175. Ce résultat pourrait s'expliquer d'une part par les périodes de vaccination correspondant à la période de faible transmission et d'autre part par la surveillance et le suivi dont ont fait l'objet les participants.

Dans les groupes de Pfs25M-EPA/AS01+Pfs230D1M-EPA/AS01 et le comparateur (Engerix B), il a fallu les trois doses de vaccins pour avoir des pourcentages d'expression des cellules T CD4+ significative comparé au jour 0. Nos résultats sont discordants avec ceux de **Salaheddine Mécheri et al** (54) qui ont trouvé une réponse immunitaire aux cellules TCD4+ efficace et durable chez un modèle murin un vaccin vivant génétiquement atténué contre *Plasmodium*. Cette différence de résultat pourrait être due au fait qu'ils ont utilisé le parasite entier avec presque tout son arsenal antigénique déjà reconnu par le système immunitaire de l'homme. Cette stabilité des cellules T CD4+ pourrait en partie être due au fait que tous les porteurs des maladies chroniques ont été exclus de l'étude au début et que les participants ont bénéficiés d'une surveillance accrue pendant toute la durée de l'étude.

- L'expression de lymphocyte T CD8+

Le pourcentage d'expression des cellules T CD8+ au jour 0 dans le groupe de Pfs25M-EPA/AS01 était similaire aux jours J1, J35, J175 et J196. Il faut cependant noter qu'une évolution légèrement croissante a été observée à partir du 7<sup>ème</sup> jour de la 2<sup>ème</sup> vaccination (J35), le pic était atteint au 14<sup>ème</sup> jour après la 3<sup>ème</sup> vaccination (J182) avec  $p=0,0030$ .

Dans le groupe Pfs230D1M-EPA/AS01 nous n'avons pas observé une différence statistiquement significative du pourcentage d'expression des cellules T CD8+ pendant toute la durée de l'étude excepté une légère augmentation au jour J182. Ce résultat pourrait être expliqué par la prévalence du paludisme durant l'étude et par une induction de la réponse naturelle antipaludique au début de la saison de haute transmission.

Dans le groupe de vaccin Pfs25M-EPA/AS01+Pfs230D1M-EPA/AS01 le pourcentage d'expression des cellules T CD8+ a augmenté à partir de la 1<sup>ère</sup> vaccination au jour J1. Ce pendant nous avons observé une diminution notable deux semaines après la 3<sup>ème</sup> vaccination qui peut être expliquée par un épuisement cellule sur T-CD8+.

Dans le groupe de l'Engerix B, c'est après la troisième vaccination que nous avons observés une diminution significative des pourcentages de T CD8+ comparés au jour 0.

Ces résultats pourraient être expliqués par la forte stabilité des cellules TCD8+ qui sont difficilement variés en absence des maladies chroniques et virale.

Nos résultats sont discordants avec ceux de Zhou J et al qui ont trouvé une forte expression des cellules TCD8+ au candidat vaccin Pfspz chez les animaux (55). Cette différence de résultat peut être dû d'une part au fait que le candidat vaccin Pfspz est un vaccin contre le stade pré-érythrocytaire qui possède un épitope reconnu directement par le TCR des cellules T-CD8+ et d'autre part le fait qu'ils sont utilisés le modèle animal.

- L'expression de TCD4+PD1+CXCR5-

Le PD-1+ a des récepteurs qui jouent un rôle très important dans la réponse immunitaire cellulaire, son récepteur CD28 est un co-stimulateur qui améliore l'activation des cellules T, alors que le CTLA-4 est un inhibiteur de l'activation des cellules T. Le PD1 a également une fonction inhibitrice sur les cellules T et B, et joue un rôle important dans la tolérance périphérique.

Dans les groupes de vaccins Pfs25M-EPA/AS01 et Pfs230D1M-EPA/AS01, nous avons observés une augmentation significative de l'expression des cellules T CD4+PD1+CXCR5- après chaque vaccination, avec un pic après la troisième vaccination (J175), puis diminue après pour être comparable au jour 0.

Ces observations pourraient être dues à une activation cellulaire induit par ces antigènes vaccinaux.

Nous avons observé dans les groupes de vaccins Pfs25M-EPA/AS01+Pfs230D1M-EPA/AS01, (Engerix B), une augmentation significative de l'expression de marqueur TCD4+PD1+CXCR5- après les deux premières doses de vaccin. Toute fois nos résultats suggèrent une nette diminution du taux d'expression de cellules T CD4+ PD1+CXCR5- entre la seconde et la troisième dose des vaccins. Cette réduction de l'expression de cellules T CD4+ PD1+CXCR5- pourrait être expliquée d'une par la prévalence du paludisme entre les deux périodes de vaccination et d'autre part par le temps relativement long qui sépare les doses des vaccins.

### **Limites de l'étude**

Notre étude a porté sur une quarantaine de participants adultes à Sotuba. D'autres études plus élargies sur les enfants qui restent plus sujets au paludisme que les adultes pourraient donner d'amples renseignements sur la réponse des cellules T ( CD4, CD8 et PD1+CXCR5-).

Nous n'avons pas exploré la parasitémie au fil de l'étude, qui pourrait avoir un impact sur ces cellules.

Le dosage d'autres marqueurs en plus tels que le T  $\gamma$   $\delta$ , T effectuer, et cellule B contribuerait à une meilleure compréhension des réponses aux candidats vaccins.

# 9 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

## CONCLUSION

Pris ensemble nos résultats indiquent que les candidats vaccins Pfs25M-EPA/AS01 et Pfs230D1M-EPA/AS01, bloquants la transmission du *Plasmodium falciparum* chez les adultes ne semblent pas être associés à des réponses cellulaires aux sous ensemble des cellules T CD4 et CD8. Par contre ces candidats vaccins semblent être associés à une induction des réponses à des cellules T CD4+PD1+CXCR5-

## RECOMMANDATIONS

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

- 1- poursuivre le développement clinique des candidats vaccins Pfs25M-EPA/AS01 et Pfs230D1M-EPA/AS01 chez les enfants sur un échantillon plus grand et dans plusieurs zones endémiques du Mali.
- 2- Renforcer les capacités du laboratoire d'immunologie du MRTC/DEAP pour permettre de tester des panels supplémentaires afin d'évaluer d'autres populations cellulaires telle que les lymphocytes B et les lymphocytes T fonctionnels)
- 3- Encourager la population à participer massivement aux études de recherche pour aider à faciliter l'éradication de ce fléau que constitue le paludisme.



# 10 REFERENCES

## BIBLIOGRAPHIQUES

---

1. Dzikowski R, Templeton TJ, Deitsch K. Variant antigen gene expression in malaria. *Cell Microbiol.* 2006;8(9):1371–81.
2. Chiodini J. the World Health Organization - The World Malaria Report. Geneve, 2018. *Travel Med Infect Dis.* 2018 Apr;22:82–4.
3. DNS (direction nationale de la santé). Annuaire statistique du système local d'information (SLIS) 2013. Mali; 2013. - [Internet]. [cited 2019 Jul 10]. Available from: <https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&q=DNS+%28direction+nationale+de+la+sant%C3%A9%29.+Annuaire+statistique+du+sy st%C3%A8me+local+d%E2%80%99information+%28SLIS%29+2013.+Mali%3B+2013>.
4. Système Local d'Information Sanitaire - SLIS [Internet]. [cited 2019 Jul 10]. Available from: <http://www.sante.gov.ml/index.php/annuaire/category/4-systeme-local-d-information-sanitaire-slis>
5. [cited 2019 Jul 10]. Available from: <http://microdata.worldbank.org/index.php/catalog/2688>
6. Elodie-Anne S. Un Vaccin contre le Paludisme : obstacles, espoirs et avancées 2009. UNIVERSITE Henri Poincaré - Nancy 1 FACULTE DE PHARMACIE;
7. Mahamadou A. Développement clinique d'un vaccin antipaludique de stade sanguin et diversité antigénique de Plasmodium Falciparum à Bandiagara, Mali. [Mali]: Microbiologie et Parasitologie. Institut Supérieur de Formation et de Recherche Appliquée, ISFRA-USJPB,; 2015.

8. Boudin C, Boudon D, Devoucoux R. Immunologie du paludisme : les relations hôte-parasite dans l'infection paludéenne. *Etudes Médicales*. 1984;(2):91–104.
9. Friedman MJ, Roth EF, Nagel RL, Trager W. The Role of Hemoglobins C, S, and NBalt in the Inhibition of Malaria Parasite Development in Vitro. *Am J Trop Med Hyg*. 1979 Sep 1;28(5):777–80.
10. Mahamadou D. Paludisme uptodate. Centre de Recherche et de Formation sur le Paludisme Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie Université de Bamako BP 1805, Bamako, Mali; 2012. (2e édition).
11. Guide d'intervention santé-voyage [Internet]. INSPQ. [cited 2019 Jul 10]. Available from: <https://www.inspq.qc.ca/sante-voyage/guide>
12. Coban C, Ishii KJ, Kawai T, Hemmi H, Sato S, Uematsu S, et al. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med*. 2005 Jan 3;201(1):19–25.
13. Kumaratilake LM, Ferrante A, Jaeger T, Rzepczyk CM. Effects of cytokines, complement, and antibody on the neutrophil respiratory burst and phagocytic response to *Plasmodium falciparum* merozoites. *Infect Immun*. 1992 Sep;60(9):3731–8.
14. Deans JA, Knight AM, Jean WC, Waters AP, Cohen S, Mitchell GH. Vaccination trials in rhesus monkeys with a minor, invariant, *Plasmodium knowlesi* 66 kD merozoite antigen. *Parasite Immunol*. 1988 Sep;10(5):535–52.
15. Kumaratilake LM, Ferrante A. Opsonization and Phagocytosis of *Plasmodium falciparum* Merozoites Measured by Flow Cytometry. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000 Jan;7(1):9–13.
16. Chapel H, Haeney M, Misbah S, Snowden N, Masson P. *Immunologie clinique : De la théorie à la pratique, avec cas cliniques*. Bruxelles: De Boeck; 2004. 358 p.
17. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:669–92.
18. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *J Exp Med*. 1995 Aug 1;182(2):409–18.

19. Wu L, Liu Y-J. Development of dendritic-cell lineages. *Immunity*. 2007 Jun;26(6):741–50.
20. Charles Arama. Novel Immunization strategies and interethnic differences in response to malaria infection. . [Stocholm]: Stocholm University; 2012.
21. 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 Baltim Md 1950*. 2002 Sep 15;169(6):2956–63.
22. Chillet Pascal, Espinosa Eric. *Immunologie*. 2010. 512 pages.
23. Adam C, Géniteau M, Gougerot-Pocidallo M, Verroust P, Lebras J, Gibert C, et al. Cryoglobulins, circulating immune complexes, and complement activation in cerebral malaria. *Infect Immun*. 1981 Feb;31(2):530–5.
24. Wenisch C, Spitzauer S, Florris-Linau K, Rumpold H, Vannaphan S, Parschalk B, et al. Complement activation in severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Immunol Immunopathol*. 1997 Nov;85(2):166–71.
25. Activation of complement by human hemoglobin and by mixtures of hemoglobin and bacterial endotoxin: Kaca W, Roth R. *Biochim Biophys Acta* 1245:49–56, 1995. *Transfus Med Rev*. 1996 Apr 1;10(2):156.
26. Hematin Promotes Complement Alternative Pathway-Mediated Deposition of C3 Activation Fragments on Human Erythrocytes: Potential Implications for the Pathogenesis of Anemia in Malaria | *The Journal of Immunology* [Internet]. [cited 2019 Jul 10]. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/179/8/5543>
27. Boldt ABW, Luty A, Grobusch MP, Dietz K, Dzeing A, Kombila M, et al. Association of a new mannose-binding lectin variant with severe malaria in Gabonese children. *Genes Immun*. 2006 Jul;7(5):393–400.
28. Luty AJ, Kun JF, Kremsner PG. Mannose-binding lectin plasma levels and gene polymorphisms in *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis*. 1998 Oct;178(4):1221–4.

29. Chen N-J, Mirtsos C, Suh D, Lu Y-C, Lin W-J, McKerlie C, et al. C5L2 is critical for the biological activities of the anaphylatoxins C5a and C3a. *Nature*. 2007 Mar 8;446(7132):203–7.
30. Celada A, Cruchaud A, Perrin LH. Phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes by human polymorphonuclear leukocytes. *J Parasitol*. 1983 Feb;69(1):49–53.
31. Sher A, Gazzinelli RT, Oswald IP, Clerici M, Kullberg M, Pearce EJ, et al. Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. *Immunol Rev*. 1992 Jun;127:183–204.
32. Effects of cytokines, complement, and antibody on the neutrophil respiratory burst and phagocytic response to *Plasmodium falciparum* merozoites. [Internet]. [cited 2019 Jul 10]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC257384/>
33. 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.
34. Kumaratilake LM, Ferrante A, Rzepczyk C. The role of T lymphocytes in immunity to *Plasmodium falciparum*. Enhancement of neutrophil-mediated parasite killing by lymphotoxin and IFN-gamma: comparisons with tumor necrosis factor effects. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1991 Jan 15;146(2):762–7.
35. Troye-Blomberg M, Riley EM, Kabilan L, Holmberg M, Perlmann H, Andersson U, et al. Production by activated human T cells of interleukin 4 but not interferon-gamma is associated with elevated levels of serum antibodies to activating malaria antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Jul;87(14):5484–8.
36. Riley EM, Allen SJ, Wheeler JG, Blackman MJ, Bennett S, Takacs B, et al. Naturally acquired cellular and humoral immune responses to the major merozoite surface antigen (PfMSP1) of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced malaria morbidity. *Parasite Immunol*. 1992 May;14(3):321–37.

37. Shi YP, Udhayakumar V, Oloo AJ, Nahlen BL, Lal AA. Differential effect and interaction of monocytes, hyperimmune sera, and immunoglobulin G on the growth of asexual stage *Plasmodium falciparum* parasites. *Am J Trop Med Hyg.* 1999 Jan;60(1):135–41.
38. 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. [Internet]. [cited 2019 Jul 10]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC413541/>
39. Cytotoxic T-lymphocyte epitopes for HLA-B53 and other HLA types in the malaria vaccine candidate liver-stage antigen 3. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2019 Jul 10]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10603392>
40. Silvie O, Franetich J-F, Charrin S, Mueller MS, Siau A, Bodescot M, et al. A Role for Apical Membrane Antigen 1 during Invasion of Hepatocytes by *Plasmodium falciparum* Sporozoites. *J Biol Chem.* 2004 May 3;279(10):9490–6.
41. Arnaud POMMIER. Rôle des lymphocytes T CD4+ régulateurs dans la suppression des réponses immunitaires anti-tumorales. UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES ÉCOLE DOCTORALE Gc2ID; 2012.
42. Perspectives of gammadelta T cells in tumor immunology. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2019 Jul 10]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17210676>
43. Moser B. CXCR5, the Defining Marker for Follicular B Helper T (TFH) Cells. *Front Immunol* [Internet]. 2015 Jun 8 [cited 2019 Jul 10];6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4459225/>
44. Laurens MB, Billingsley P, Richman A, Eappen AG, Adams M, Li T, et al. Successful human infection with *P. falciparum* using three aseptic *Anopheles stephensi* mosquitoes: a new model for controlled human malaria infection. *PloS One.* 2013;8(7):e68969.

45. Sheehy SH, Spencer AJ, Douglas AD, Sim BKL, Longley RJ, Edwards NJ, et al. Optimising Controlled Human Malaria Infection Studies Using Cryopreserved *P. falciparum* Parasites Administered by Needle and Syringe. *PloS One*. 2013;8(6):e65960.
46. Seder RA, Chang L-J, Enama ME, Zephir KL, Sarwar UN, Gordon IJ, et al. Protection against malaria by intravenous immunization with a nonreplicating sporozoite vaccine. *Science*. 2013 Sep 20;341(6152):1359–65.
47. Howell SA, Withers-Martinez C, Kocken CHM, Thomas AW, Blackman MJ. Proteolytic Processing and Primary Structure of *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen-1. *J Biol Chem*. 2001 Aug 17;276(33):31311–20.
48. Escalante AA, Grebert HM, Chaiyaroj SC, Magris M, Biswas S, Nahlen BL, et al. 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.
49. Anders RF, Crewther PE, Edwards S, Margetts M, Matthew ML, Pollock B, et al. Immunisation with recombinant AMA-1 protects mice against infection with *Plasmodium chabaudi*. *Vaccine*. 1998 Feb;16(2–3):240–7.
50. Didierlaurent AM, Laupèze B, Pasquale AD, Hergli N, Collignon C, Garçon N. Adjuvant system AS01: helping to overcome the challenges of modern vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2017 Jan 2;16(1):55–63.
51. Etzion O, Novack V, Perl Y, Abel O, Schwartz D, Munteanu D, et al. Sci-B-Vac™ Vs ENGERIX-B Vaccines for Hepatitis B Virus in Patients with Inflammatory Bowel Diseases: A Randomised Controlled Trial. *J Crohns Colitis*. 2016 Aug;10(8):905–12.
52. Dembele BOUBACAR. Evaluer l'effet du traitement antipaludique (ASAQ) sur l'infection palustre et la fréquence des cellules T gamma delta chez des adultes en bonne santé à Donéguébougou, Mali. [MALI]: USTTB FACULTE DE MEDECINE ET D'ODONTO-STOMATOLOGIE; 2018.

53. Radtke AJ, Anderson CF, Riteau N, Rausch K, Scaria P, Kelnhofer ER, et al. Adjuvant and carrier protein-dependent T-cell priming promotes a robust antibody response against the Plasmodium falciparum Pfs25 vaccine candidate. *Sci Rep* [Internet]. 2017 [cited 2019 Jul 12];7(1). Available from: <https://cyberleninka.org/article/n/1477022>
54. Paludisme : une réponse immunitaire efficace et durable grâce à un parasite muté [Internet]. Salle de presse | Inserm. 2016 [cited 2019 Jul 17]. Available from: <https://presse.inserm.fr/paludisme-une-reponse-immunitaire-efficace-et-durable-grace-a-un-parasite-mute/24533/>
55. Zhou J, Kaiser A, Ng C, Karcher R, McConnell T, Paczkowski P, et al. CD8+ T-cell mediated anti-malaria protection induced by malaria vaccines; assessment of hepatic CD8+ T cells by SCBC assay. *Hum Vaccines Immunother*. 2017 Mar 31;13(7):1625–9.

# 11 FICHE SIGNALÉTIQUE

## EN FRANÇAIS ET ANGLAIS

**Nom :** COULIBALY

**Prénom :** Barasse

**Nationalité :** Malienne

**Année de soutenance :** 2019

**Ville de soutenance :** Bamako

**Titre de thèse:** Evaluation des réponses cellulaires des vaccins Pfs25M-EPA/AS01 et Pfs230D1M-EPA/AS01, Bloquant la Transmission du *Plasmodium falciparum* chez les adultes à Sotuba Mali

**Lieu de dépôt :** Bibliothèque de la Faculté de Pharmacie.

**Secteur d'intérêt :** Santé publique, Épidémiologie, Parasitologie, immunologie

**Origine de la thèse :** Mali

### Résumé

#### Introduction

Le paludisme est une érythrocytopathie fébrile et hémolytante causée par le développement et la multiplication dans l'organisme d'un hématozoaire du genre *Plasmodium*.

Principale maladie parasitaire humaine, le paludisme est aujourd'hui un problème majeur de santé publique.

L'OMS estime que les données concernant les dernières années ne révèlent aucun progrès significatif vers une diminution du nombre de cas de paludisme dans le monde. D'où la nécessité de nouvelles approches pour le contrôle et l'éradication de la maladie.

Les vaccins constitueraient à cet effet les outils privilégiés de lutte contre ce fléau.

A l'heure actuelle les chercheurs travaillent sur trois types de candidats vaccins à savoir :

Le premier vise à prévenir l'entrée des sporozoïtes dans les hépatocytes,

Le second est dirigé contre les stades asexués érythrocytaires

Le troisième étant un candidat vaccin qui interrompt la transmission du paludisme (de VIMT) serait une ressource précieuse dans la lutte pour éliminer ou éradiquer cette maladie.

C'est dans cette optique que les candidats vaccins (Pfs25M-EPA/AS01 et Pfs230D1M-EPA/AS01) ont été testés à Sotuba; Mali.



## Méthodologie

Nous avons étudié la cinétique des cellules T (CD4+, CD8+ et T-CD4+PD1+) des deux candidats vaccins bloquant la transmission du paludisme en administration seule et en co-administration chez des adultes exposés au paludisme à Sotuba qui est une zone de faible transmission de paludisme en 2017.

## Résultats

Le taux de T CD4+ au jour J0 dans les groupes Pfs25-ASOI et Pfs230-ASOI était similaire aux jours 1, 35, 175 et 196, et plus bas aux jours 182 avec  $p=0,0030$  et  $0,0123$  respectivement.

Dans le groupe de vaccins combinés et Engerix B, l'expression au jour 0 était similaire aux jours 1, 35, 182 et 196, et plus élevée aux jours 175 avec  $p=0,0141$  et  $0,0089$  respectivement.

Le taux de T CD8+ au jour 0 dans le groupe Pfs25-ASOI et Pfs230-ASOI étaient similaires aux jours 1, 35, 175 et 196, et plus élevé au jour 182 avec  $p=0,0030$ . Nous avons observé une diminution dans le groupe de vaccin Pfs25M+Pfs230-ASOI et Engerix après la 3<sup>ème</sup> vaccination.

## Conclusion

Les candidats vaccins Pfs25M-EPA/AS01 et Pfs230D1M-EPA/AS01 et leur combinaison n'induisent pas des réponses cellulaires aux sous-ensembles des cellules T CD4 et CD8. Par contre nous avons observé une association de ces candidats vaccins à une induction des réponses de cellules T CD4+PD1+CXCR5-

**Mots clés ;** *Plasmodium falciparum*, Vaccin, cellules TCD4+, TCD8+, PD1+, CXCR5-, Pfs25M-EPA/AS01 et Pfs230D1M-EPA/AS01.

## **Abstract**

### **Introduction**

Malaria is a febrile and haemolytic erythrocytopathy caused by the development and multiplication in the body of a haematozoon of the genus *Plasmodium*. Considered as the main human parasitic disease, malaria is now a major public health problem.

According to World Health Organization (WHO) estimations, data collected from the recent years doesn't provide any significant progress towards the reduction of malaria cases worldwide.

Hence the need for new approaches in order to control and eradicate the disease.

Thus, to that end, vaccines will be used as the most preferred tools for fighting against this scourge.

Currently researchers are working on three types of vaccine candidates namely: The first aims to prevent the entry of sporozoites into hepatocytes, The second is directed against asexual erythrocyte stages The third being a vaccine candidate that interrupts the transmission of malaria (VIMT) would be a valuable resource in the fight to eliminate or eradicate this disease. With this in mind, vaccine candidates (Pfs25M-EPA / AS01 and Pfs230D1M-EPA / AS01) were tested in Sotuba; Mali.

### **Methodology**

In 2017 we studied the kinetics of T cells (CD4 +, CD8 + and T-CD4 + PD1 +) of the two candidate vaccines blocking the transmission of malaria by single administration and co-administration in adults with malaria in Sotuba, which is a weak Malaria transmission area.

### **Result**

The level of CD4 + T on Day 0 in the groups Pfs25-AS01 and Pfs230-AS01 was similar on days 1, 35, 175 and 196, and lower on days 182 with  $p = 0.0030$  and  $0.0123$  respectively. In the group of combined vaccines and Engerix B, the expression on day 0 was similar on days 1, 35, 182 and 196, and higher on days 175 with  $p = 0.0141$  and  $0.0089$  respectively. The level of CD8 + T on day 0 in the Pfs25-AS01 group and Pfs230-AS01 were similar on days 1, 35, 175 and 196, and higher on day 182 with  $p = 0.0030$ . We observed a decrease in the Pfs25M + Pfs230-AS01 and Engerix vaccine group after the 3rd vaccination.

### **Conclusion**

The vaccine candidates Pfs25M-EPA / AS01 and Pfs230D1M-EPA / AS01 and their combination do not induce cellular responses to the subset of CD4 and CD8 T cells. In contrast, we observed a combination of these vaccine candidates with induction of CD4 +

PD1 + CXCR5-T cell responses.

Keywords ; Plasmodium falciparum, Vaccine, TCD4 +, TCD8 +, PD1 +, CXCR5-, Pfs25M-EPA / AS01 and Pfs230D1M-EPA / AS01 cells.

# 12 ANNEXES

---

## **Mode opératoire d'immuno-marquage et étude des réponses cellulaires**

Elle consistait à effectuer en *ex vivo*, l'immuno-marquage du sang total par des anticorps fluorescents (**anti- CD3-Alexa700, anti-CD8- APC H7, anti-CD4-PE-CY5**, anti-gd TCR-PE, **anti-TCR CXCR5-FITC**, anti-CD45RO –BV421, anti-OX40-PE-Cy7, **anti-PD1-APC**,) à chaque point de temps selon la procédure ci-dessous.

### **Matériels :**

FACS tube,

Pipettes de 2 µl, 20µl et 200 µl

Pipette sérologique: 10 ml

Centrifugeuse

Vortex

Minuteriers

Tubes corning 50ml

### **Réactifs :**

Phosphate buffered saline (PBS),

Fix/Perm

Perm Buffer (1X)

Eau distillée

Anticorps-CD3/Alexa700

Anticorps-CD8/APCH7

Anticorps-CD4/PE-CY5

Anticorps-gdTCR/PE

Anticorps-CXCR5/FITC

Anticoprs-CD45RO/BV421

Anticorps-OX40/PE-CY7

Anticorps-PD1/APC

### **Procédure :**

Mettre 150 µl de sang total dans le FACS tube

Ajouter 1 µl des anticorps de surface (**anti- CD3-Alexa700, anti-CD8- APC H7, anti-CD4-PE-CY5, anti-gd TCR-PE, anti-TCR CXCR5-FITC, anti-CD45RO –BV421, anti-OX40-PE-Cy7, anti-PD1-APC**, et agiter

Incuber à la température ambiante en absence de la lumière pendant 20 mn.

Laver avec 2 ml de PBS, centrifuger à 1700 tours pendant 5 mn puis enlever le surnageant,

Ajouter 1 ml de solution de Fix/perm dans chaque tube, puis vortexer

Incuber pendant 15 mn à 4 °C.

Laver avec 2 ml de PBS, centrifuger à 1700 tours pendant 5mn et enlever le surnageant

Laver avec 2 ml de Perm Buffer (1X). Centrifuger à 1700 tours pendant 5mn et enlever le surnageant.

Resuspendre les cellules dans 200 µl de PBS. Stocker dans 4 °C jusqu'au moment de l'utilisation au FORTESSA

### **Préparation des tubes de compensation**

Préparer les tubes

Ajouter une goutte de beads de compensation (One Compbeads) dans chaque FACS tube

Ajouter la même quantité d'anticorps utilisée dans les échantillons

Incuber pendant 15 mn à la température ambiante en l'absence de la lumière

Laver avec 1 ml de PBS, centrifugé à 1700 tours pendant 5mn. Enlever le surnageant

Ajouter 300ul de PBS dans chaque tube et agiter.

Stocker dans 4° C jusqu'au moment de l'utilisation au cytomètre BD FORTESSA.

### **BD LSR FORTESSA X20 :**

#### **Matériels et réactifs :**

Facs tubes

Beads de contrôles

Solution d'eau d'ionisée

Solution rinçage (rinse)

Solution de lavage (clean)

Solution de fluide (sheath fluid)

#### **Procédure :**

Contrôler la solution fluide, le liquide intermédiaire et le réservoir de déchets

Allumer la machine BD-Fortessa et attendre les lasers s'échauffer pendant 30minutes

Ajouter une goutte de beads dans 350µl de la solution fluide dans un FACS tube

Vortexer bien et passer le contrôle

Passer les compensations en tenant compte des voltages

Associer le fluorochrome et anticorps correspondant

Passer les échantillons en tenant compte des voltages

---

Exporter les données sur le disc dur

Passer clean pendant 11minutes

Passer rinse pendant 11minutes

Passer l'eau pendant 11minutes

Mettre l'appareil en pause

Etteindre et couvrir l'appareil

Remplir le cahier d'utilisateur.



**FIGURE 15: BD LSR FORTESSA X-20 SPECIAL ORDER RESEARCH PRODUCT**

# 13 SERMENT DE GALIEN

---

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

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

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

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

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

*Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.*