

Ministère de l'enseignement supérieur
et de la recherche scientifique

République du Mali

Un Peuple-Un But-Une Foi

Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako
Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie
(FMOS)



Année universitaire 2022-2023

N° :

Titre:

**Réactivité des antigènes LR253, LR186, M4 et Pf27 du
Plasmodium falciparum avec les sérums de Dangassa et de
Koïla, deux zones rurales d'endémie palustre au Mali**

Présentée et soutenue publiquement le 29/07/2023 devant le jury de la Faculté de
Médecine et d'Odontostomatologie, Bamako, Mali

Par **M. Issoufi Y. MAIGA**

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

Jury

Président:	M. Sory Ibrahim	DIAWARA	Maître de recherche
Membres:	M. Abdoulaye K.	KONE	Maître de conférences
	M. Issa	DIARRA	Chargé de recherche
Co-directeur:	M. Saidou	BALAM	Maître-Assistant
Directeur:	M. Mahamadou	DIAKITE	Professeur Titulaire

Dédicaces

À ALLAH Le Tout Puissant,

L'omniscient, L'omnipotent et Le maître suprême de l'univers par la grâce de Qui j'ai vu ce jour.

Ce travail est dédié à mes parents

À mon père Boubacar Idrissa MAIGA

Cher père, tu as fait de notre éducation et de notre instruction ta priorité absolue. Tu restes un modèle pour ta rigueur, ta droiture et ton sens élevé de responsabilité. Ce travail est l'un des moyens pour nous de t'exprimer notre fierté de t'avoir comme père mais aussi de te remercier pour l'accompagnement ainsi que les innombrables sacrifices consentis pour moi. Ce travail est le fruit de tes encouragements et tes prières.

Puisse le tout puissant, le miséricordieux dans sa bonté infinie t'accorder une longévité et une santé à tout épreuve, Allahouma amine !

À mon grand frère, Abdoul-Haziz Yacouba MAIGA

À la fois grand frère, mon ami et mon conseiller au fil des années et des péripéties qui ont jalonné mon séjour à la faculté, ton soutien ne m'as pas fait défaut, reçois ici l'expressions de mes sincères remerciements et ma gratitude.

Si je suis ici c'est aussi grâce à toi, merci infiniment !

Qu'Allah te récompense et qu'il te comble de Ses bien faits, Allahouma amine !

Remerciements

À mes frères et sœurs,

Pour la fraternité et l'accompagnement que vous avez témoigné, qu'Allah perdure ce lien.

À mes mamans,

Merci pour les bénédictions et les soutiens, qu'Allah vous récompense.

À mes tontons et oncles,

Merci pour vos conseils, vos enseignements et l'éducation reçue, qu'Allah vous grade.

Au professeur Mahamadou DIAKITE,

Cher maître, je saisis cette opportunité pour vous témoigner ma profonde gratitude pour l'accueil que m'avez fait, merci cher maître pour votre humilité, votre disponibilité, votre simplicité et vos encouragements. Qu'Allah vous bénisse et vous accorde longévité et santé, Amen !

Aux Drs Saïdou Balam, Drissa Konaté, Salimata Kanté et Abdouramane Traoré,

Vous avoir comme encadreur, me procure un sentiment de fierté, oui de fierté on ne peut qu'être des rares personnes ayant des qualités humaines comme les vôtres l'humilité, la gentillesse, l'accessibilité, la courtoisie...j'en passe !

Votre rigueur dans le travail et votre pédagogie sont des qualités que j'ai beaucoup appréciées. Merci pour tout car je ne pourrai énumérer toutes vos qualités.

Qu'Allah vous récompense tout ce que vous avez fait pour moi.

Les mots me manquent pour exprimer ma profonde gratitude pour l'accompagnement et soutien à mon égard, merci sincèrement.

À l'équipe de l'Unité d'Immunogénétique et d'Hémoglobinopathie de l'ICER-Mali,

Pr Seidina A.S. DIAKITE, Pr Sory I DIAWARA, Dr Agnès M. GUINDO, Dr Karim TRAORE, Dr Bourama KEITA, Dr Bourama TRAORE, Dr Fatoumata KASSE, Dr Job KONE, Dr. Fanta SOGORE, Dr Mohamedou KATHRY, Dr Abdourahmane CISSE, Dr Larissa DENOU vos conseils et vos encouragements nous ont été d'une grande utilité. Merci pour vos apports et votre disponibilité. Je vous en suis très reconnaissant.

À mes Collègues de l'Unité d'Immunogénétique et Hémoglobinopathie de l'ICER-Mali,

M. Karamoko TANGARA, Dr Dramane SOGODOGO, M. Mathias KAMATE, M. Rouhou-lahi BAH, M. Issa TRAORE, Mme TRAORE Rahmatoullah YENA, Mme Korotoumou MALLE, Mme Sohoye TOURE. Ce travail n'aurait pu aboutir sans votre contribution. Merci pour tout.

À mes amis et frères

M. Mohamed Ag HAMOUTAPHA, Dr Youssouf Ag M'BAYE, Dr Almahmoud Ag HAINAHA, Dr Yehia, M. Mohamedoun Ag OZZARIF, M. Mohamedoun Ag HAME, M. Alkhalifa HAIDARA, Mme Fatimatou Zahara HAIDARA et tous ceux dont les noms ne figurent pas ici.

À la famille SAGARA

Vous m'avez accepté à bras ouverts et pris comme un fils, avec vous je me suis senti comme faisant un membre à part entier de votre famille.

À la famille de Souleymane Ag, pour votre soutien.

À tous les membres et sympathisants de la grande famille des Rassembleurs, des Secouristes et des Réformateurs RA.SE.RE, pour avoir été là pour moi.

À l'association des élèves et étudiants ressortissants du nord et sympathisants « GAAKASSINEY », pour votre aide.

À l'amical des étudiants ressortissants de Sikasso et sympathisants « ADERS »,
pour votre présence.

Aux personnels de la FMOS/FAPH, pour la formation de qualité reçue durant notre
cursus universitaire

Au centre international d'excellence en recherche sur le paludisme (ICEMR), pour
son aide durant la collecte des données pour ce travail.

À nos amis de l'Université de Lausanne, pour nous avoir fourni des antigènes.

HOMMAGES AUX HONORABLES MEMBRES DU JURY

À notre maître et président du jury : Pr. Sory Ibrahim DIAWARA

- **Médecin chercheur**
- **Maître de recherche en épidémiologie à la Faculté de Médecine et d'Odonto-Stomatologie/ Université des sciences techniques et technologiques de Bamako FMOS/USTTB**
- **Chercheur au Centre International d'Excellence en Recherche (ICER-Mali) de l'USTTB**

Cher maître,

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury. Votre désir de vouloir toujours l'excellence et votre rigueur dans le travail font de vous un modèle admiré de tous.

Cher maître, veuillez recevoir en toute modestie, le témoignage de notre sincère reconnaissance et notre profonde estime.

À notre maître et juge : Dr. Issa DIARRA

- **Chargé de recherche à la Faculté de Pharmacie**
- **Master en immunologie et infection**
- **PhD en maladies infectieuses à l'université d'AIX-Marseille**
- **Chef d'unité de Parasitologie au Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée (LBMA) de l'USTTB.**

Cher maître,

C'est un Privilège que vous nous accordez en acceptant de juger ce travail. Nous avons apprécié vos qualités tant humaines que scientifiques. Votre amour du travail bien fait nous a beaucoup impressionné. Merci pour vos corrections et suggestions très utiles qui ont permis d'améliorer ce travail.

Trouver ici l'expression de nos sincères remerciements.

À notre maître et juge : Pr. Abdoulaye Kassoum KONE

- **Docteur en médecine ;**
- **Maître de conférences Agrégé de Parasitologie-Mycologie à la faculté de médecine et d'OdontoStomatologie ;**
- **Enseignant-chercheur au Malaria Research and Training Center ;**
- **Responsable de l'unité de diagnostic des parasitoses au Malaria Research and training Center- Parasitologie.**

Cher maître,

Nous vous remercions d'avoir accepté de participer à l'amélioration de la qualité de ce travail.

Nous avons apprécié votre rigueur et votre souci du travail bien fait.

Permettez-nous cher maitre de vous adresser l'expression de notre immense gratitude et nos sincères remerciements.

À notre maître et co-directeur : Dr. Saïdou BALAM

- **Docteur en médecine**
- **PhD en immunologie à l'université de Lausanne, Suisse**
- **Maître-assistant en immunologie à la FMOS**

Très Cher maître,

Tout au long de ce travail, nous avons apprécié vos qualités humaines et scientifiques. Votre disponibilité constante, votre rigueur dans le travail, votre générosité, votre amour pour le travail bien fait font de vous un maître respecté et respectable.

Permettez-nous cher maître de vous adresser l'expression de notre profonde gratitude et de nos sincères remerciements.

À notre maître et Directeur de thèse : Pr. Mahamadou DIAKITE

- **PhD en immunogénétique à l'Université d'Oxford**
- **Professeur Titulaire d'immunologie et de Génétique**
- **Responsable du laboratoire Immunogénétique et parasitologie de l'ICER-Mali**
- **Vice-recteur de l'Université des sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB)**
- **Directeur Scientifique Adjoint du centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC)**
- **Secrétaire Permanent du comité d'éthique de la (FMOS/FAPH)**

Cher maître,

Vous nous avez fait un immense honneur en nous acceptant dans votre équipe de recherche. Tout au long de ce travail nous avons apprécié vos grandes qualités scientifiques et humaines, vos enseignements et surtout votre sens élevé de la responsabilité. Votre rigueur dans le travail, votre disponibilité et votre souci constant pour l'excellence font de vous un exemple à suivre.

Cher maître veuillez recevoir en toute modestie, l'expression de notre immense gratitude et de nos sincères remerciements.

Table des matières

1. INTRODUCTION	1
2. OBJECTIFS	3
2.1. Objectif général.....	3
2.2. Objectifs spécifiques.....	3
3. GENERALITES	4
3.1. Epidémiologie	4
3.2. Agents pathogènes.....	6
3.3. Vecteurs	7
3.4. Cycle biologique.....	7
3.5. Physiopathologie du paludisme.....	10
3.5.1. Accès palustre simple	11
3.5.2. Accès palustres graves et compliqués	12
3.5.3 La formation des rosettes.....	13
3.6.1. Immunité innée	15
3.6.2. Immunité adaptative.....	16
3.7. Antigènes du parasite	18
3.7.1. AMA-1 (Antigène- 1 Membranaire Apicale du mérozoïte).....	18
3.7.2. MSP2 (Proteine-2 à la surface du mérozoïte)	18
3.7.3. Antigène P27 (tableau 1)	18
3.7.5. LR253, LR186 et M4 (Tableau 1).....	20
3.8. Différents types de vaccins anti palustres	21
3.8.1 Vaccins contre les stades pré -érythrocytaires	21
3.8.2. Vaccins contre les stades sanguins	21
3.8.3. Vaccins contre les stades sexués	22
3.9. Diagnostic biologique	22
3.9.1. Tests de diagnostic rapide (TDR)	22
3.9.2. Goutte épaisse et le frottis mince.....	22
3.10. Prise en charge du paludisme.....	23
3.10.1. Actions préventives	23
3.10.2. Actions curatives	23
4. METHODOLOGIE	25
4.1. Cadre et sites d'étude	25

4.1.1. Dangassa.....	25
4.1.2. Koïla.....	28
4.1.3. Laboratoire d'Immunogénétique et de Parasitologie.....	31
4.2. Type et période d'étude.....	32
4.3. Population et échantillonnage.....	32
4.4. Critères d'inclusion.....	32
4.5. Critères de non-inclusion.....	32
4.6. Variables mesurées.....	32
4.7. Technique de laboratoire utilisée -ELISA.....	33
4.8. Identification et synthèses des antigènes.....	34
4.9. Gestion et analyses des données.....	34
4.10. Définitions opératoires.....	35
4.11. Déroulement de l'étude.....	35
4.12. Considérations éthiques.....	35
5. RESULTATS.....	37
5.1. Résultats globaux.....	37
5.2. Résultats descriptifs.....	38
5.3. Résultats Analytiques.....	41
6. COMMENTAIRES ET DISCUSSION.....	53
LIMITES.....	56
7. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....	57
7.1. Conclusion.....	57
7.2. Recommandations.....	57
8. REFERENCES.....	58
9. ANNEXES.....	64
9.1. Technique de la goutte épaisse.....	64
9.2. Technique ELISA.....	68
10. FICHE SIGNALÉTIQUE.....	70
SERMENT D'HIPPOCRATES.....	72

Liste des tableaux

Tableau 1. Les séquences des peptides représentant les domaines de MSP2, et de P27	20
Tableau 2. Répartition des participants selon les sites d'étude	38
Tableau 3. Répartition des participants en fonction du genre et des sites.....	39
Tableau 4. Répartition des enfants de 5-14 ans en fonction des classes d'âge et des sites	40
Tableau 5. Prévalence de l'anémie chez les enfants de 5-14 ans en décembre 2021 à Dangassa et à Koïla	41
Tableau 6. Prévalence de l'infection palustre chez les enfants de 5-14 ans en décembre 2021 dans les sites d'étude	42
Tableau 7. Portage des gamétocytes chez les enfants de 5-14 ans en décembre 2021 dans les sites.....	43
Tableau 8. Séroprévalence des antigènes LR253, LR186, M4 et Pf27 chez les enfants de 5-14 ans à Dangassa et Koïla en décembre 2021.....	44
Tableau 9. Séroprévalence des antigènes LR253, LR186, M4 et Pf27 chez les enfants de 5-14 ans selon les classes d'âges	45
Tableau 10. Séroprévalence des anticorps anti-LR253, anti-LR186, anti-M4 et anti-Pf27 en fonction du résultat de la goutte épaisse	46

Liste des figures

Figure 1. Cycle biologique du <i>Plasmodium</i> [26]	10
Figure 2. Titre moyen d'anticorps anti-LR253, anti-LR186, anti-Pf27, anti-M4 chez les enfants de 5-14 ans à Dangassa et à Koïla en décembre 2021	47
Figure 3. Titre moyen d'anticorps anti-LR253, anti-LR186, anti-Pf27, anti-M4 selon les classes d'âge à Dangassa et à Koïla en décembre 2021	48
Figure 4. Titre moyen global d'anticorps en fonction de l'infection palustre en décembre 2021.....	49
Figure 5. Titre moyen global d'anticorps en fonction du nombre d'épisodes palustres en décembre 2021.....	50
Figure 6. Titre moyen d'anticorps en fonction du nombre d'épisode palustre à Dangassa et à Koïla en décembre 2021.....	51
Figure 7. Titre moyen d'anticorps en fonction du sexe à Dangassa et à Koïla en décembre 2021.....	52

Sigles et abréviations

	Antibody-Dependent cellular inhibition (Inhibition Cellulaire Dépendante des Anticorps)
ADCI	
AMA-1	Apicale Membrane Antigène-1 (antigène 1 de la membrane apicale)
CLAG	Cytoadherence Linked Asexual Gene
CPS	Chimioprévention du Paludisme Saisonnier
CRP	C-reactive protéine (Protéine C réactive)
CSCoM	Centre de Santé Communautaire
CSP	Circumsporozoite protein (protéine circumsporozoïte)
CTA	Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine
	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (Technique d'immuno-absorption liée à l'enzyme)
ELISA	
FAPH	Faculté de Pharmacie
FMOS	Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie
GE	Goutte épaisse
GRp	Globule Rouge parasite
ICEMR	Centre International d'Excellence en Recherche sur le Paludisme International Centre for Excellence in Research (Centre International pour l'Excellence dans la Recherche)
ICER-Mali	
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
INF	Interferon
MSP1	Merozoite surface protein-1 (Protéine 1 à la surface des mérozoïtes)
MSP2	Merozoite surface protein-2 (Protéine 2 à la surface des mérozoïtes)
	National Institutes of Health (Instituts Nationaux de Santé des États-Unis d'Amérique)
NIH	
NK	Naturel Killer (Cellule tueuse naturelle)
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule (Molécule d'adhésion des cellules endothéliales plaquetaires-1)
PECAM-1	

Pf HRP-1	<i>P. falciparum</i> Histidine Rich Protein-1
PfEMP-1	<i>P. falciparum</i> Erythrocyte Membrane Proteine-1
PNLP	Programme National de Lutte contre le Paludisme Pattern Recognition Receptors (Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires)
PRR	
TDR	Test de Diagnostic Rapide
Th	T helper
TLR	Toll-like receptor (Récepteur de type Toll)
TNF- α	Tumor-Necrosis Factor-alpha (Facteur de nécrose tumorale alpha)
TPI	Traitement Préventif Intermittent
USTTB	Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako University Clinical Research Center (Centre Universitaire de Recherche Clinique)
UCRC	
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine

1. INTRODUCTION

Le paludisme demeure toujours une préoccupation majeure de santé publique, particulièrement en Afrique subsaharienne, où il représente 95 % de tous les cas de paludisme et 96 % des décès dans le monde [1]. De toutes les espèces inféodées à l'homme, *Plasmodium (P.) falciparum* est le plus létal et le plus répandu en Afrique subsaharienne [2]. Au Mali, le paludisme représente 39% des motifs de consultation dans les structures sanitaires, avec une prévalence nationale de 19% chez les enfants de moins de 5 ans [3].

Les actions de lutte telles que la lutte antivectorielle, la chimioprophylaxie et la prise en charge correcte et rapide des cas ont permis de réduire considérablement l'incidence du paludisme. Malgré ces résultats encourageants, l'évolution du nombre des cas de paludisme reste stationnaire ces dernières années [2]. Des études récentes soulignent également la résistance croissante des parasites aux médicaments et celle des vecteurs aux insecticides [4]. En outre, le développement de vaccins efficaces capable de renforcer les mesures de lutte existantes est rendue difficile par la complexité du cycle de développement du parasite [5]. En même temps, cette complexité du cycle permet d'identifier et de tester divers antigènes parasitaires d'importance variable à différents stades du cycle biologique [6].

Plusieurs protéines érythrocytaires ont été évaluées dans le cadre du développement de candidats vaccins contre le paludisme, dont le RTS,S/AS01 (RTS,S), qui s'est révélé capable de réduire l'infection par le paludisme jusqu'à 50% [7, 8]. En effet, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) recommande son utilisation chez les enfants d'Afrique subsaharienne et d'autres régions où la transmission est modérée ou élevée [9]. D'autres efforts sont en cours afin de développer d'autres vaccins pouvant avoir une efficacité supérieure, comme le vaccin candidat R21/Matrix-M, de l'Université d'Oxford dont les résultats sont prometteurs [10]. Le MSP-2 (protéine 2 de surface du mérozoïte) de *P. falciparum* est aussi considéré comme un candidat vaccin prometteur au stade sanguin, étant donné qu'il comporte un certain nombre de domaines faiblement polymorphes (domaines dimorphiques ou D et domaines C-terminaux et constants ou C), pouvant être facilement mimés par des peptides synthétiques ou des protéines [11, 12].

Par ailleurs, l'approche bio-informatique offre la possibilité d'explorer les bases de données du génome/protéome des parasites et d'identifier des protéines avec des domaines fonctionnels importants pour la recherche vaccinale [12]. Ici, des séquences de peptides LR186, M4 et LR253 (MR140) couvrant divers fragments des domaines D et C de la MSP2 (type 3D7) de *P. falciparum* et celui de Pf27 ont été sélectionnées pour servir d'antigènes.

Cette étude a donc été initiée afin d'étudier la réaction de ces différents antigènes avec les sérums de volontaires vivant dans deux zones éco-climatiques et d'endémicité palustre différentes au Mali. Les résultats de cette étude participent ainsi aux efforts entrepris pour identifier et caractériser de nouveaux potentiels antigènes candidats pour un vaccin contre le paludisme, ainsi que leurs combinaisons et l'évaluation des réponses immunitaires.

2. OBJECTIFS

2.1. Objectif général

Évaluer la séroréactivité des antigènes LR253, LR186, M4 et Pf27 de *P. falciparum* chez des individus vivant dans deux zones d'endémie palustre, à Dangassa et à Koïla en décembre 2021.

2.2. Objectifs spécifiques

- Déterminer la séroprévalence des antigènes LR253, LR186, M4 et Pf27 du *P. falciparum* en décembre 2021 ;
- Comparer la séroprévalence des antigènes LR253, LR186, M4 et Pf27 du *P. falciparum* en fonction des classes d'âge et des sites d'étude ;
- Comparer le titre moyen d'anticorps anti-LR253, anti-LR186, anti-M4 et anti-Pf27 en fonction des sites d'étude.

3. GENERALITES

3.1. Epidémiologie

Le paludisme est une érythrocytopathie fébrile et hémolysante, causé par un hématozoaire du genre *Plasmodium*, transmis à l'homme par la piqure infectante du moustique femelle du genre *Anopheles* [13].

Sur le plan taxonomique, le *Plasmodium* appartient au phylum des *Apicomplexa*, à la classe des sporozoaires et à l'ordre des *Eucoccidae*. Les espèces classiquement responsables du paludisme chez l'homme sont : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale curtisi*, *P. ovale wallikeri*, *P. malariae*, *P. knowlesi*, *P. cynomolgi*, mais *P. falciparum* est de loin le plus redoutable car il provoque les cas les plus sévères et plus compliqués de paludisme et est responsable des décès liés à cette maladie. Une cinquième espèce, *Plasmodium Knowlesi* a été récemment décrit chez l'homme en Asie posant ainsi l'existence d'une 5^e espèce de *Plasmodium* infectant naturellement l'homme. L'agent vecteur responsable de la transmission du paludisme à l'homme appartient à l'ordre des diptères, à la famille des *Culicidae*, à la sous famille des *Anophelinae* et au genre *Anopheles* [13].

L'Afrique subsaharienne est la région la plus touchée par le paludisme. La région afrotropicale, qui ne compte que 8% de la population mondiale, supporte le plus lourd fardeau du paludisme avec 85 à 90% des cas (200 à 280 millions des cas dont 90% sont dus à *P. falciparum*). On y comptabilise environ 800 000 décès annuels. Deux complexes de vecteurs sont les responsables majeurs de la transmission du paludisme en Afrique : *Anopheles gambiae* (*arabiensis*, *bwambae*, *gambiae*, *melas*, *merus* et *quadriannulatu*) et *Anopheles funestus* [13].

L'indice de stabilité, déterminé par Mac Donald caractérise l'enracinement du paludisme et permet de distinguer :

- ❖ **les zones de paludisme stable où la forte transmission** entraîne une prémunition. Celle-ci n'empêche pas les habitants d'être parasités mais limite les manifestations pathologiques aux classes d'âge les plus jeunes alors que les adultes sont peu touchés.
- ❖ **les zones de paludisme instable** où le caractère épisodique de la transmission ne permet pas le développement de la prémunition. La maladie sévit alors sous forme d'épidémie touchant toutes les classes d'âges.

L'Afrique australe, qui répond à ce faciès épidémiologique, est encore la région la plus touchée par l'infection par le virus VIH. La comorbidité dans ces zones aggrave le poids de la prise en charge avec un risque d'augmentation des formes graves de paludisme chez les adultes autochtones.

Au Mali, sur la base de la classification de l'OMS dans le cadre de l'élimination du paludisme (OMS 2017), quatre modalités épidémiologiques de transmission du paludisme ont été décrits :

- ✓ **zone de forte transmission** : incidence parasitaire 450 cas ou plus pour 1000 personnes-année ou prévalence parasitaire de *P. falciparum/vivax* 35% ou plus ;
- ✓ **zone de transmission modérée** : incidence parasitaire 250-450 cas pour 1000 personnes-année ou prévalence parasitaire de *P. falciparum/vivax* 10-35 % ;
- ✓ **zone de transmission faible** : incidence parasitaire 100-250 cas pour 1000 personnes-année ou prévalence parasitaire de *P. falciparum/vivax* 1-10 % ;
- ✓ **zone de transmission très faible** : incidence parasitaire inférieure à 100 cas pour 1000 personnes-année ou prévalence parasitaire de *P. falciparum/vivax* moins de 1%. (Source PNLP).

3.2. Agents pathogènes

Les agents du paludisme constituent un groupe de parasites intracellulaires obligatoires capables d'infecter divers hôtes. Ils appartiennent au phylum des *Apicomplexa*, à la classe des *Sporozoa*, à l'ordre des *Haemosporida*, à la famille des *Plasmodiidae* et au genre *Plasmodium*. Sur plus d'une centaine d'espèces pathogènes, seules cinq sont capables d'infecter l'homme et sont responsables des cas cliniques de formes plus ou moins graves. Il s'agit de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi*. Ce dernier est un parasite zoonotique de singe largement répandu en Asie du Sud-Est. *P. knowlesi* est connu récemment pour être à l'origine d'un nombre important d'infections humaines en Asie du Sud-Est [14].

Seule espèce capable d'entraîner le paludisme sévère, *P. falciparum* est le plus mortel. Du fait de sa forte prédominance en Afrique subsaharienne, il est responsable de plus de 80 à 90% des cas de paludisme enregistrés. Il provoque la fièvre tierce maligne.

Très répandu dans le monde, *P. vivax* infecte plus de personnes mais il est cependant rarement létal. Les trois autres espèces (*P. malariae*, *P. ovale* et *P. knowlesi*) sont moins répandues et n'entraînent pas d'accès palustre graves [15]. Tous ces agents pathogènes sont présents en Afrique à l'exception de *P. knowlesi*. Il a été récemment montré grâce aux outils de la biologie moléculaire qu'en réalité *P. ovale* comprend deux sous espèces que sont *P. ovale wallikeri* et *P. ovale curtisi* [16].

3.3. Vecteurs

Anopheles spp

Selon la taxonomie, les vecteurs des plasmodies sont des insectes diptères appartenant à la famille des *Culicidae* et à la sous-famille des *Anophelinae*. On dénombre environ 500 espèces d'anophèles dans le monde, parmi lesquelles une cinquantaine est capable de transmettre le paludisme à l'homme [17].

En Afrique tropicale ils sont repartis en complexe et divers grands groupes :

- le complexe *gambiae* avec sept espèces dont trois seulement sont vectrices : *An. gambiae s.s*, *An. culuzzi* et *An. arabiensis* ;
- le groupe *funestus* qui renferme neuf espèces dont deux vectrices : *An. funestus s. s* et *An. rivulorum* assurent la transmission du paludisme ;
- le groupe *nili* contenant quatre espèces dont trois vectrices : *An. nili s.s.*, *An. carnevalei* et *An. ovengensis* [18, 19].

Ces trois grands groupes de vecteurs sont impliqués dans la transmission palustre en Afrique.

Chacune de ces espèces a des préférences pour des biotopes particuliers. Ces espèces présentent une grande capacité vectorielle, expliquant la forte endémicité palustre en Afrique [20].

Seule l'anophèle femelle est hématophage. Elle a une activité nocturne, son vol est silencieux et sa piqûre est décrite comme indolore par opposition aux piqûres plus prurigineuses des autres genres de moustiques [21].

3.4. Cycle biologique

Le cycle biologique du *Plasmodium* est un cycle complexe qui comprend un hôte intermédiaire (l'homme) où il se trouve sous une forme haploïde et se multiplie de manière asexuée et un hôte définitif, l'anophèle femelle (chez le moustique) dans lequel se déroule la reproduction sexuée (Sporogonie) (**figure 1**)[22].

❖ Cycle chez le moustique (Sporogonie)

Lors d'un repas sanguin sur un individu infecté, l'anophèle femelle ingère des formes sexuées du *Plasmodium* ainsi que les gamétocytes mâles (micro-gamétocytes) et femelles (macro-gamétocytes). Ces derniers parviennent dans l'estomac du moustique et se transforment en gamètes.

Le gamète mâle subit un processus d'ex-flagellation à la suite duquel les gamètes femelles sont fécondés. Il en résulte un zygote appelé ookinète ; celui-ci s'implante sous la paroi stomacale en formant l'oocyste. Cette brève phase diploïde s'achève par une division méiotique suivie par plusieurs milliers de méiose qui conduit à la production de sporozoïtes. L'éclatement de l'oocyste libère des éléments mobiles et haploïde dans l'hémolymphe. Les sporozoïtes gagnent préférentiellement les glandes salivaires du moustique d'où ils pourront être injectés à la salive lors d'une pique infectante. Chez le moustique, l'ensemble de ce cycle se déroule entre 10 à 40 jours, suivant la température extérieure et l'espèce en cause [23].

❖ Cycle chez l'homme (schizogonie)

- Cycle exo-érythrocytaire

Au cours de la piqûre, l'anophèle femelle infectée injecte dans un capillaire des sporozoïtes. Les sporozoïtes transitent dans la circulation générale et, en quelques minutes, ils envahissent les hépatocytes grâce à une interaction spécifique entre la protéine majeure de surface du sporozoïte (CSP) et un récepteur spécifique situé sur la membrane plasmique de l'hépatocyte du côté de l'espace disse, espace directement en contact avec le sang circulant. Le sporozoïte entre alors dans une phase de réplication au sein de la vacuole parasitophore et de prolifération intracellulaire qui repousse en périphérie le noyau de la cellule. Il finit par constituer une masse multinucléée appelée schizonte (schizonte hépatocytaire) qui conduit à la libération de plusieurs dizaines de milliers de mérozoïte dans la circulation sanguine.

Cette phase de multiplication est asymptomatique et dure 8 à 15 jours selon les espèces.

- **Cycle intra-érythrocytaire**

C'est la seule phase symptomatique du cycle et est d'intensité variable selon le statut immunitaire de la personne infectée. Les mérozoïtes libérés lors de la rupture de l'hépatocyte vont débiter le cycle sanguin asexué de prolifération de *P. falciparum* en infectant les érythrocytes [24].

Le mérozoïte pénètre l'érythrocyte grâce à un processus parasitaire actif et se différencie en anneau (trophozoïte jeune), puis en trophozoïte mature, stade à partir duquel une intense phase replicative commence. Il donne alors naissance au schizonte (schizonte hépatocytaire), celui-ci après segmentation, montre une forme caractéristique de rosace, puis libère 8 à 32 mérozoïtes lesquels rapidement réinfectent des érythrocytes sains.

L'ensemble de ce cycle dure 48 heures chez *P. falciparum*. L'apparition des gamétocytes se déroule en général à la deuxième semaine qui suit l'infection et ces formes peuvent persister plusieurs semaines après la guérison [13, 25].

À la suite d'une nouvelle piqûre par l'anophèle femelle, les gamétocytes mâles et femelles sont ingérés lors d'un repas sanguin de moustiques femelles pour un nouveau cycle. Il est à noter que la proportion de moustiques femelles infectés dépend de la gamétocytémie à *P. falciparum* en zone endémique [23].

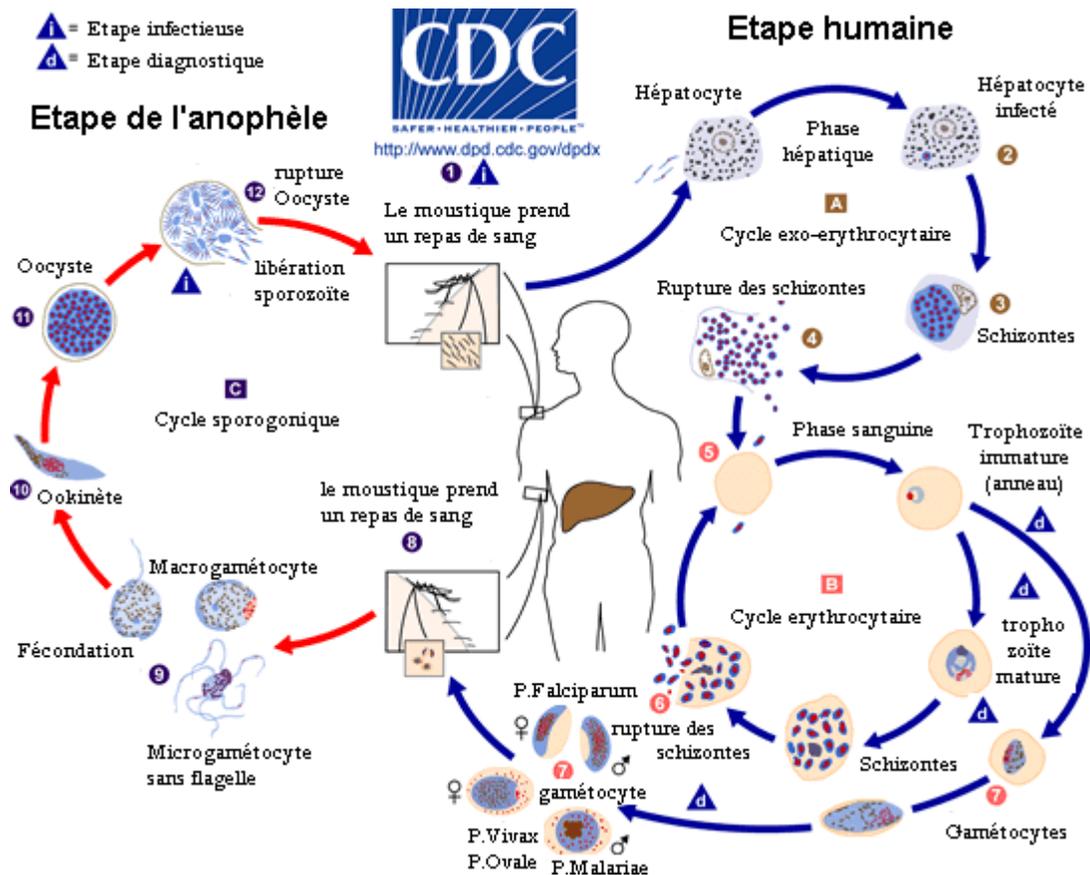


Figure 1. Cycle biologique du *Plasmodium* [26]

3.5. Physiopathologie du paludisme

Le paludisme et ses complications sont la résultante d'une cascade d'évènements physiopathologiques influencés à la fois par le parasite et les facteurs liés à l'hôte (y compris l'immunité et les facteurs de susceptibilité génétiques) [27].

3.5.1. Accès palustre simple

Les symptômes du paludisme commencent à se prononcer à partir du stade intra-érythrocytaire du cycle de développement du parasite. La fièvre, lors de l'accès simple survient au moment de la lyse des hématies qui libère les mérozoïtes, l'hémine (pigment malarique), et d'autres antigènes parasitaires.

Pendant longtemps on a cru que le pigment malarique se comportait comme un pyrogène stimulant les centres hypothalamique thermorégulateurs. Actuellement, il apparait que la fièvre n'est pas propre au parasite lui-même, mais est due à des cytokines libérées par les macrophages et les cellules endothéliales de l'hôte [28]. Toute une série de cytokines peuvent avoir un effet pyrogène, telles que l'IL-1, l'IL-6 et la lymphotoxine bêta, mais c'est le TNF-alpha dont le lien avec la fièvre a été le mieux établi [29]. Ces cytokines se comportent comme des pyrogène endogènes en stimulant les centres thermorégulateurs hypothalamiques. La fièvre n'apparait que lorsque la parasitémie atteint un seuil critique (appelé seuil pyrogène), variable d'un sujet à l'autre et d'une souche parasitaire à l'autre. L'allure de la fièvre est aussi variable. Au cours des accès de primo invasion le cycle érythrocytaire est généralement non synchronisé, la fièvre prend alors une allure continue ou irrégulière selon la parasitémie. Lorsque les cycles se synchronisent progressivement, la fièvre revêt alors son caractère de type de fièvre intermittente, tierce ou quarte [30]. Pendant l'infection, le système phagocytaire débarrasse l'organisme non seulement des pigments malariques mais aussi des débris érythrocytaires, ce qui provoque l'hépatosplénomégalie [31].

3.5.2. Accès palustres graves et compliqués

Seule l'espèce *P. falciparum* et dans certains cas *P. vivax* sont responsables du paludisme grave et compliqué. Ce paludisme grave s'observe chez les sujets non immuns (jeunes enfants, femmes enceintes, expatriés, sujets vivants en zone hypo-endémique) [6]. Les concepts physiopathologiques du paludisme grave font intervenir deux phénomènes interdépendants :

a) la séquestration des hématies parasitées : phénomènes liés aux interactions entre les hématies parasitées et l'endothélium des vaisseaux capillaires et le phénomène immunologique. La séquestration peut schématiquement se décomposer en 3 mécanismes : la cytoadhérence, la formation de rosettes et l'auto-agglutination.

b) la cytoadhérence : la cytoadhérence est le mécanisme prépondérant et correspond à l'adhérence des hématies parasitées (HP) aux cellules endothéliales.

Au niveau moléculaire, la cytoadhérence implique de multiples interactions entre les ligands de l'hématie et les ligands de l'endothélium [32]. Les principaux ligands de la paroi des HP sont *P. falciparum* Erythrocyte Membrane Protéine-1, -2 et -3 (PfEMP-1, -2 et -3) et *P. falciparum* Histidine Rich Protein-1 et -2 (Pf HRP-1 et -2). Les PfEMP-1 sont exprimées en surface et semble être les plus importantes. Les protéines PfHRP-1, PfEMP-2, PfEMP-3 ne sont pas exprimées à la surface des HP mais localisées à la face interne de sa membrane d'où elles interagissent entre elles et avec les protéines du squelette membranaire [27]. Cinq récepteurs membranaires ont été identifiés : la thrombospondine, les récepteurs CD6, ICAM-1 (Intracellular Cell Adhesion Molecule-110) et E-selectine (ou ELAM1, Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1) [33]. Les globules rouges parasités cyto-adhérents peuvent obstruer les petits vaisseaux et déclencher le recrutement des plaquettes et des monocytes, l'ensemble activant les cellules endothéliales et la production de cytokines.

3.5.3 La formation des rosettes

Le phénomène « rosetting » est la capacité des hématies parasitées d'adhérer entre elles mais également des hématies non parasitées. Le phénomène de rosetting résulte de la virulence du parasite associée à la capacité de l'érythrocyte infecté à accéder aux cellules endothéliales. Cela entraîne une diminution de l'apport local en oxygène pouvant aboutir au décès [34]. Des études ont montré que la protéine PfEMP-1 interagissent avec le récepteur-1 du complément (CR-1), les antigènes de groupe ABO ou avec le sulfate d'héparane pour la formation de rosette [35, 36]. En outre, les IgM et IgG jouent un rôle dans le rosetting [37]. Ce processus de séquestration est essentiel à la bonne évolution et à la survie du parasite contrairement aux espèces non *falciparum*, mais a un effet délétère sur son hôte en obstruant les micro-vaisseaux [38].

- ❖ **L'auto-agglutination** : l'auto-agglutination des hématies parasitées a été observée sur de nombreuses souches de *P. falciparum* étudiées en culture au laboratoire. Il s'agit d'un regroupement des érythrocytes infectés entre eux pour former des micro-agrégats susceptibles d'obstruer les capillaires profonds. Ce phénomène a été observé chez les patients porteurs de forte parasitémie en dehors de tout phénotype d'adhésion. Les mécanismes moléculaires qui prédisposent à sa survenue sont encore mal connus [39].
- ❖ **Le phénomène immunologique** : le système à médiation cellulaire impliquant les lymphocytes CD4+ et les macrophages joue un rôle très important dans la pathogenèse du neuro-paludisme. Les antigènes plasmodiaux facilitent le recrutement des macrophages et la libération de nombreuses cytokines pro-inflammatoires dont l'interféron gamma, le TNF- α , l'IL-1 et l'IL-6. Parmi les médiateurs macrophagiques, le TNF- α est un acteur important. Expérimentalement, l'injection du TNF- α chez les souris reproduit la plupart des manifestations cliniques et biologiques du paludisme grave. On pense aussi que la libération du TNF- α stimulerait l'expression des récepteurs des *knobs* au niveau endothélial, donc la séquestration.

Il faut rappeler que les fièvres observées au cours des accès palustre seraient dues à la libération dans le sang de l'hématozoïne (substance pyrogène résultant de la dégradation de l'hémoglobine par le *Plasmodium*) après éclatement des schizontes. Cette fièvre peut également être due aux cytokines pro inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 et l'IL-6 [40].

3.6. Immunité anti-palustre

L'infection due à *Plasmodium* induit des réponses immunitaires de l'hôte. Lesquelles sont régulées à la fois par le système immunitaire innée autrement nommé système immunitaire non spécifique, et par le système immunitaire spécifique ou acquis, que par des facteurs environnementaux. Les systèmes immunitaires précédemment nommés sont complémentaires. L'immunité innée se met en place dès les premières heures de l'infection. Elle est indépendante de toute infection en attendant la mise en place de l'immunité dite « acquise » qui elle serait fonctionnelle une dizaine de jours plus tard. L'immunité acquise est tout autant spécifique des stades de développement du parasite que des espèces parasitaires. Cette immunité est rarement complètement protectrice, et le cas du paludisme sait qu'elle est partielle et non stérilisante [41].

L'acquisition par les populations humaines exposées d'une immunité anti-palustre progressive, éphémère et incomplète, dite « de prémunition » est caractéristique de la relation « homme /parasite /vecteur ».

Il s'agit en réalité d'un état d'immunité, un équilibre entre hôte-parasite après plusieurs années d'exposition si la transmission est constante et relativement élevée. Elle protège d'abord contre la mortalité et les formes graves palustres, puis contre les accès palustres simples en diminuant leur incidence plutôt que leur gravité et enfin en réduisant la durée ou le niveau des infections par les stades sanguins. Cet équilibre est labile et disparaît en 12-24 mois chez le sujet immun qui quitte la zone d'endémie [42]. Le développement de cette immunité de prémunition est dépendant du contexte épidémiologique, de la saisonnalité et de l'intensité de la transmission au niveau de la zone géographique. Elle apparaît d'autant plus rapidement que la transmission est importante et permanente. Cependant le développement de la prémunition n'empêche pas le portage de parasites faisant des sujets semi-immuns d'excellents « réservoirs » de parasites.

Dans certaines régions sèches, de paludisme instable, la transmission fluctue considérablement d'une saison et d'une année à l'autre, cela retardant l'acquisition de l'immunité [43].

3.6.1. Immunité innée

Elle est activée dès le début de l'infection et repose sur l'intervention de plusieurs cellules parmi lesquelles les granulocytes, les monocytes macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes « Naturel killer » (NK) et les lymphocytes T $\gamma\delta$. Les granulocytes comme les neutrophiles peuvent phagocyter les formes parasitaires avec la participation d'opsonines telles que des protéines du complément, la C-reactive protéine (CRP) et des anticorps [44]. Ces cellules produisent également des cytokines comme le TNF- α , IFN- γ , GM-CSF et IL1- β qui amplifient la phagocytose des mérozoïtes [45]. Il a été démontré que les neutrophiles peuvent inhiber la multiplication du parasite en produisant ces cytokines [46].

Les cellules NK ont également la capacité de produire certaines cytokines comme celles précédemment décrites en réponse à différents stimulus [47]. Leur sécrétion d'IL-8 en réponse à une stimulation in vitro par un extrait de globule rouge parasite (GRp) a été rapportée et la présence du parasite permet l'activation de leurs fonctions cytotoxiques et une surexpression de marqueurs d'activation comme CD69 à leurs surface [48].

Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes [49]. Elles sont activées via des récepteurs appelés PRR (Pattern Recognition Receptors) comme le TLR9 et produisent de l'IFN- γ en réponse à une stimulation par des lysats de GRp. Comme les cellules dendritiques, les monocytes/macrophages sont des cellules présentatrices d'antigènes ; ils sont actifs par la présence de *Plasmodium* et produisent aussi des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α . Le rôle des cellules phagocytaires et leur implication dans la clairance parasitaire ont été largement rapportés. Leur récepteurs CD36 semble jouer un rôle important dans la phagocytose des érythrocytes infectés et des mérozoïtes libres [50]. Aussi, le rôle majeur des monocytes/macrophages dans la production d'INF- γ par les cellules NK a été démontré. La voie de production d'IL-18 par ces macrophages a été aussi signalée [51].

Les cellules $T\gamma\delta$ sont capables de reconnaître des molécules produites par *P falciparum*. Ces cellules sont activées par des phospho-antigènes non peptidiques du parasite. Elles sont capables de produire de l'IFN- γ et deviennent des cellules cytotoxiques pour les globules rouges parasités [52].

3.6.2. Immunité adaptative

Elle repose sur l'intervention des lymphocytes T et B qui sont spécifiquement dirigés contre le parasite. Cette réponse immunitaire adaptative se divise en deux composantes essentielles : l'immunité à médiation cellulaire et l'immunité humorale.

3.6.2.1. Immunité à médiation cellulaire

L'immunité à médiation cellulaire a été mise en évidence à la suite d'un transfert adoptif de ses cellules en absence de réponse humorale détectable. Elle est surtout l'œuvre des cellules TCD4+ et TCD8+ spécifiques au parasite et protégerait l'hôte contre les stades hépatocytaires et érythrocytaires car les parasites γ sont intracellulaires et difficilement accessibles par les anticorps. Les lymphocytes TCD4 sont classés en plusieurs sous-groupes qui agissent différemment selon le type de cytokines produites. Les cellules Th1 produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'INF- γ et l'IL-2 intervenant dans la réponse cytotoxique alors que les Th2 produisent des cytokines anti-inflammatoires comme IL-4 et IL-13 qui régulent la réponse humorale [53]. Une forte prolifération cellulaire TCD4+ et TCD8+ liée à une réponse cytokinique Th1 (INF- γ et IL-2) a été associée à la protection contre le paludisme, indépendamment de la production d'anticorps [54].

3.6.2.2. Immunité à médiation humorale

La réponse humorale repose surtout sur l'intervention des cellules B qui après stimulation antigénique puis différenciation en plasmocytes, produisent les anticorps. Le rôle des anticorps dans l'immunité anti-palustre est démontré par les anticorps capables de bloquer l'invasion des hépatocytes par le parasite. En effet, les fragments Fab d'anticorps monoclonaux spécifiques des séquences répétées de la CSP inhibent l'infectivité des sporozoïtes *in vivo* et *in vitro*. Les anticorps protecteurs sont principalement de type IgG1 et IgG3. Ils peuvent activer le complément et induire une lyse des sporozoïtes par le mécanisme d'inhibition cellulaire dépendante de l'anticorps ou ADCI (antibody-dependent cellular inhibition) ou par la phagocytose [55]. Les IgG2 et IgG4 seraient non protecteurs ; et des études ont montré qu'il existe une relation entre les taux d'IgG non cytophiles et la gravité de la maladie [56].

Les études séro-épidémiologiques contribuent à fournir des informations sur l'immunité au niveau de la population et indirectement sur le niveau de l'exposition [57].

Lorsque la transmission diminue ainsi que l'immunité décroît, les communautés ou sous-groupes devenus vulnérables aux risques accrus de maladies pourraient être identifiés afin d'adapter des interventions de protection supplémentaires. À ce jour, les mécanismes expliquant le rôle de l'immunité anti-palustre dans la transmission du paludisme ne sont pas bien élucidés [58]. Probablement parce que la recherche sur l'immunité anti palustre est focalisée à un certain nombre d'antigènes du paludisme, nombre de ces études ne mesurant que les niveaux d'anticorps, mais pas la réponse fonctionnelle [59-61]. Récemment, des nouveaux antigènes ont été identifiés dont les anticorps spécifiques étaient associés à la protection [62, 63]. Les données ont montré que les anticorps contre les antigènes recombinants du mérozoïte sont des biomarqueurs de l'immunité [57, 60].

De nombreux travaux ont également été réalisés ces dernières années pour identifier les mécanismes de fonctionnement de l'immunité et son association à la protection [62, 64]. Les anticorps avec la fonction de reconnaissance de l'antigène du parasite n'ont pas toujours été prédictive de l'immunité protectrice, tandis que les données récentes suggèrent que la phagocytose opsonique des mérozoïtes peut être un solide corrélat de

l'immunité [65]. Cependant, des études prospectives supplémentaires reliant les réponses d'anticorps fonctionnels a des résultats cliniques sont nécessaires.

3.7. Antigènes du parasite

3.7.1. AMA-1 (Antigène- 1 Membranaire Apicale du mérozoïte)

AMA-1 est une protéine membranaire intégrale de type 1 avec un segment cytoplasmique de 55 acides aminés et une région extracellulaire de 550 acides aminés qui peut être divisée en trois domaines sur la base de liaisons disulfures intra-domaines [66]. Sa fonction biologique n'est pas clairement élucidée mais son expression et sa localisation au stade sanguin suggère que la protéine pourrait jouer un rôle crucial dans l'invasion érythrocytaire et hépatocytaires par les parasites du paludisme [67]. La protéine AMA-1 de *P. falciparum* est très polymorphe [68].

L'immunisation avec l'AMA-1 peut produire des anticorps pour inhiber de façon efficace l'invasion érythrocytaire par le parasite et conférer une immunité protectrice. AMA-1 est l'un des principaux candidats vaccins au stade sanguin pour la lutte contre le paludisme.

3.7.2. MSP2 (Proteine-2 à la surface du mérozoïte)

La protéine 2 de surface du mérozoïte (MSP2) est une glycoprotéine de 23 kDas et est plus abondants à la surface du stade mérozoïte de *P. falciparum* codée par le *msh2* gène situé sur le chromosome 2 et composé de cinq blocs dont le bloc central est le plus polymorphe [69]. Ils sont impliqués dans l'invasion érythrocytaire et sont ciblés par les réponses immunitaire [70]. Des études *in vitro* ont montré que les anticorps humains anti-MSP2 ont une activité fonctionnelle en ADCI [71].

3.7.3. Antigène P27 (tableau 1)

L'antigène P27 est une séquence de 27 acides aminés contenu dans la protéine d'exportation de trophozoïte 1103 acides aminés (la protéine PFF0165c). En effet, l'exploration des domaines structurels présents dans la protéine a permis d'identifier le P27 comme une boucle hélicoïdale avec plusieurs segments à faible teneur en acides aminés hydrophobes. Ces segments se sont avérés fonctionnels et se replient lorsqu'ils

se lient à leurs cibles [72]. Deux régions de Tex1 ont été synthétisées chimiquement. L'un des peptides synthétiques est le P27 et couvre la région alpha hélicoïdale (K845 à T871), l'autre est le P27A correspondant à la région N-terminale intrinsèquement non structurée (H223 à S326). Les deux fragments de Tex1 (P27 et P27A) sont considérés comme de nouveaux candidats vaccins prometteurs pour le paludisme au stade sanguin. Les propriétés immunogènes du P27A, associées à son faible polymorphisme et son association avec une protection clinique contre le paludisme chez l'homme justifient son développement ultérieur en tant que vaccin candidat contre le paludisme. Le P27 est la cible des anticorps humains inhibant la croissance des parasites [73]. En outre, l'analyse bio-informatique du génome du parasite (via Salvador 1 (PlasmoDB)) a permis la découverte de plusieurs protéines orthologues pour *P. falciparum* et *P. vivax*, dont le couple orthologue Pf27/Pv27 [74, 75].

Ces antigènes orthologues sont en effet de plus en plus investigués comme des potentiels candidats pour des vaccins multi-espèces [76, 77]. Par exemple, jusqu'à cinquante orthologues de *P. vivax* présentant une homologie d'au moins 30% parmi les 170 protéines alpha hélicoïdales de *P. falciparum* ont été identifiées précédemment. Parmi ces orthologues, les paires Pf27/Pv27, Pf43/Pv43 et Pf45/Pv45 se sont révélées être les candidats les plus prometteurs pour un vaccin à protection croisée, car ils ont montré un degré élevé de reconnaissance dans les tests ELISA direct et de compétition ainsi qu'une réactivité croisée avec leurs orthologues respectifs [78].

3.7.5. LR253, LR186 et M4 (Tableau 1)

Le MSP2 ("Merozoite surface protein 2") comporte des domaines faiblement polymorphes (le domaine dimorphique D et la partie C-terminale C) qui peuvent induire des anticorps spécifiques associés à la clairance du *P. falciparum* et à la protection contre le paludisme. Les régions dimorphiques définissant les deux formes alléliques de *P. falciparum* (Pf3D7 et PfFC27) et leur partie constante, C (commune à 3D7 et FC27) [11], peuvent donc être imitées par des peptides synthétiques ("LR235", "LR186" et "M4") couvrant différents fragments du D et du C de la MSP2. Le choix de ces différentes séquences vise à mieux caractériser les différentes régions immunodominantes caractérisant les domaines D et C de la MSP2, dans le but ultime est d'évaluer la MSP 2 comme un candidat-vaccin potentiel.

Tableau 1. Les séquences des peptides représentant les domaines de MSP2, et de P27

Nom des peptides (nombre d'acides aminés, aa)	Nom de la protéine, <i>P. falciparum</i>	Séquence des peptides
LR253 =MR140 (40 aa)	MSP-2 (3D7 et FC27)	APENKGTGQHGHHMHSRNNHPQNT SDSQKECTDGNKENCG
LR186 (96 aa)	MSP-2 3D7	<u>AEASTSTSSENPNHKNAETNPKGKG</u> <u>EVQEPNQANKETQNNNSNVQQDSQT</u> <u>KSNVPPTQDADTKSPTAQPEQAENS</u> <u>APTAEQTESPELQS</u> APENKGTG
M4 (73 aa)	MSP2-3D7	NAETNPKGKGGEVQEPNQANKETQN NSNVQQDSQTKSNVPPTQDADTKSP TAQPEQAENSAPTAEQTESPELQS
Pf27 (27 aa)	PF3D7_0603 400,1 (TEX1)	KKRNVEEELHSLRKNYNIINEEIEEIT

Le peptide LR253 (MR140, en rouge) est une séquence de 40 aa couvrant la partie constante et commune aux deux formes alléliques de MSP2, 3D7 et FC27 de *P. falciparum*. La séquence LR186 (soulignée) couvre le domaine D dimorphique (y compris la séquence M4 en vert) de MSP2 (3D7) et les 8 premiers acides aminés de la portion C. La séquence M4 est une séquence plus courte (en vert) dans le domaine D.

3.8. Différents types de vaccins anti palustres

3.8.1 Vaccins contre les stades pré -érythrocytaires

Les vaccins contre les stades pré-érythrocytaires doivent induire des réponses immunes visant les sporozoïtes ou les schizontes hépatiques. Le but est pour prévenir l'infection ou d'empêcher toute libération de mérozoïtes dans le sang.

Le vaccin RTS/S (Mosquirix®) est constitué d'un composant de la protéine circumsporozoïte à *P. falciparum* (CSP) couplé à l'antigène de surface du virus de l'hépatite B et d'un adjuvant complexe, l'AS02A [79]. Parmi plus de 30 candidats vaccins antipaludiques [80], RTS, S/AS01 est le seul ayant atteint un stade d'évaluation clinique avancé, et réalisé conformément aux directives de l'OMS qui garantissent la qualité, l'innocuité et l'efficacité des vaccins recombinants ciblant les parasites plasmodiaux aux stades pré-érythrocytaire et sanguin [81]. Ledit vaccin a été recommandé chez les enfants dans les zones à transmission modérée à forte du paludisme à *P. falciparum* [9].

En Gambie, le RTS, S/AS02 a réduit de 34% le risque de nouvelle infection chez les adultes sur une période de 15 semaines [82]. RTS, S/AS01 réduirait de 46% le risque de développer un accès palustre et de 35,5% celui de contracter une forme sévère du paludisme chez des nourrissons de 5 à 17 mois. Il permettrait aussi de diminuer de 41,5% le nombre d'hospitalisations liées au paludisme [83].

3.8.2. Vaccins contre les stades sanguins

Le vaccin contre les stades érythrocytaires asexués viserait soit à empêcher l'invasion des hématies et donc à contrôler la parasitémie circulantes, soit à empêcher l'évolution des infections vers les formes cliniques et potentiellement graves de la maladie. La principale cible du vaccin contre les stades sanguins asexués est le mérozoïte, la forme du parasite qui est libérée par les schizoses hépatocytaires ou érythrocytaires et qui envahie les hématies. Les efforts de développement d'un tel vaccin se sont concentré sur les antigènes intervenant dans l'invasion des érythrocytes [84].

3.8.3. Vaccins contre les stades sexués

La phase sexuée vise à interrompre le cycle de transmission et limiter la propagation de la maladie. L'objectif de tels vaccins est d'induire des anticorps dirigés contre des antigènes des stades sexués du parasite qui peuvent empêcher la fécondation dans l'estomac de l'anophèle et bloquer le développement du parasite. Ces vaccins ne viseraient pas à protéger l'individu vacciné mais à limiter la transmission des parasites de l'homme au vecteur, et du vecteur à l'homme. Ces derniers sont ainsi appelés vaccins bloquant la transmission. Les antigènes candidats vaccins sont entre autres : *Pfs25*, *Pfs28*, *Pf230*, *Pf45/48* [85, 86].

3.9. Diagnostic biologique

3.9.1. Tests de diagnostic rapide (TDR)

Il existe plusieurs méthodes de diagnostic du paludisme, mais les plus utilisées sont : Les tests de diagnostic rapide (TDR) sont basés sur la détection d'histidine riche protéine 2 (HRP-2), du parasite lactate déshydrogénase et de l'aldolase. Ces tests ont une sensibilité entre 88 et 99% pour le *P. falciparum* mais ont une mauvaise sensibilité pour les autres espèces du *Plasmodium*, particulièrement le *P. ovale* et *P. malariae* [87]. Ils doivent toujours faire l'objet d'une confirmation par un frottis sanguin.

3.9.2. Goutte épaisse et le frottis mince

La goutte épaisse détecte la présence ou non du parasite dans le sang, quant au frottis mince, il permet de voir la morphologie et faire le diagnostic différentiel d'espèce. Les deux méthodes sont utilisées pour estimer la parasitémie.

3.10. Prise en charge du paludisme

3.10.1. Actions préventives

Les mesures préventives ont été mises en place pour la protection contre l'infection palustre. Il n'existe actuellement aucun vaccin contre *P. falciparum* seul le vaccin RTS, S/AS01 a pu atteindre la phase 3.

L'OMS a confirmé en 2016 que le vaccin RTS, S/AS01 sera déployé en Afrique subsaharienne, dans le cadre de projets pilotes dès 2018. Toutefois, ce vaccin n'étant que partiellement efficace viendra renforcer les mesures de prévention, de diagnostic et de traitement recommandées par l'OMS, auxquelles il ne se substituera pas [88].

Les différentes stratégies de prévention mise en œuvre au Mali selon les recommandations de l'OMS et du Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) sont : la lutte antivectorielle (utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides, l'utilisation de bio larvicides pour la destruction des gîtes larvaires ; la pulvérisation intra domiciliaire), le Traitement Préventif Intermittent (TPI) avec la sulfadoxine-pyriméthamine au cours des consultations prénatales ; la Chimio prévention du Paludisme Saisonnier (CPS) chez les enfants de 3 à 59 mois [89].

3.10.2. Actions curatives

L'OMS recommande pour la prise en charge du paludisme simple, les Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA) depuis 2004 en fonction des zones. Le traitement du paludisme grave se fait par les sels de quinine en perfusion intraveineuse ou par les dérivés de l'Artémisinine injectables.

Au Mali, le PNLN recommande les combinaisons à base de dérivés d'artémisinine en comprimé (Artéméther-Lumefantrine, dihydroartémisinine-pipéraquline, artésunate amodiaquine) pour le traitement des cas du paludisme non compliqué après confirmation par la microscopie (goutte épaisse) et /ou le TDR. Pour les cas graves et compliqués, l'artésunate ou l'artéméther ou la quinine injectable sont retenus. Ces trois molécules injectables et l'artésunate suppositoires sont utilisées pour le pré-transfert.

Le traitement du paludisme chez la femme enceinte se fait avec la quinine (injectable ou comprimé) au cours du premier trimestre et les Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA) à partir du deuxième trimestre [90].

4. METHODOLOGIE

4.1. Cadre et sites d'étude

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche du centre international d'excellence en recherche sur le paludisme (ICEMR) de l'Université des sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB) du Mali en collaboration avec l'Université de Lausanne en Suisse. Ce projet vise à identifier un potentiel candidat vaccin contre le paludisme par l'approche bio-informatique.

Les échantillons ont été collectés à Dangassa et à Koïla Bambana, deux sites d'étude du programme ICEMR et éco-climatiques différents au Mali.

4.1.1. Dangassa

❖ Historique et situation géographique

Le village de Dangassa est une zone de longue et d'intense transmission du paludisme situé à 82 km au sud-ouest de Bamako sur la route nationale 7 (RN7), dans la commune rurale de Niagadina, dans le district sanitaire de Ouélessébougou, région de Koulikoro. Autrefois Dangassa s'appelait Tintinbile (plateau rouge), le village fût fondé vers le 13ième siècle par Manssa Dan Camara qui s'installa sur un plateau où poussait une herbe appelée en malinké Ngasan. Quand son frère Kamadjan lui rendit visite et dit « nous viendrons nous installer à dan ka Ngasanfiera » ce qui signifie en (le plateau ou pousse l'herbe Ngasan) d'où le village tire son nom actuel Dangassa. Ce village compte 11000 habitants composés essentiellement par les malinkés mais on y retrouve aussi les bambara, les peuhls, les somonos, les dogons etc. (CSCCom de Dangassa). Il est limité à l'est par le village de Balala, au nord-est par le village de Niagadina, au nord par le fleuve Niger et au sud par le village de Faraba.

❖ Climat et végétation

Le climat est de type soudano-guinéen avec deux grandes saisons : une saison pluvieuse de juin à octobre et une saison sèche de décembre à mai. Les vents dominants sont la mousson (en saison de pluie) et l'harmattan (en saison sèche). La végétation est faite de savane arborée qui est menacée de disparition à cause des coupes abusives du bois et des feux de brousse. Parmi les plantes rencontrées, on y trouve le karité, le tamarinier, le néré, le Cai cédrat, le kundie etc...

L'habitat est de type traditionnel, fait de cases rondes et rectangulaires en terre battue et aux toitures en chaumes conique constituent un lieu propice de repos des moustiques favorisant ainsi l'agressivité anophélienne. L'environnement physique du village est propice à la prolifération des moustiques tels que l'anophèle gambiae qui assure la transmission du paludisme. Pendant la saison des pluies, il existe des cultures intra domiciliaires qui favorisent la prolifération d'herbes sauvages et contribuent aussi à l'augmentation de la densité et l'agressivité des moustiques. La température la plus élevée se situe à environ 40°C au mois de mai et la température la plus basse avoisine les 18°C aux mois de décembre-janvier. La température moyenne annuelle est autour de 29°C. D'une manière générale, le climat et la végétation sont propices à la faune entomologique constituée invertébrée et d'arthropodes. *Anophèles gambiae* abondent dans le village où ils assurent la transmission du paludisme constitue le vecteur majeur du paludisme dans la zone.

❖ Infrastructures socio-sanitaires

Le village dispose d'un représentant de l'office de la haute vallée du Niger (OHVN) qui apporte son appui technique au monde paysan dans la production du coton et des cultures céréalières. Une station FM locale (Dangassa kukan) assure la diffusion des informations dans la localité. Le village dispose d'une école fondamentale et une medersa. Il dispose également d'un centre de santé communautaire (CSCoM) composé de cinq salles (salle de consultation, une salle de soins, une salle de repos, une salle de dépôt médicament dénomination commerciale internationale (DCI) et d'un dortoir pour le chef de poste).

La maternité est composée d'une salle de consultation prénatale, d'une salle de vaccination et d'accueil, d'une salle d'accouchement, d'une salle de repos et d'une salle de grade. Le personnel du centre salle se compose d'une technicienne supérieure de santé, un vaccinateur, une sagefemme, une matrone, une aide-soignante et une gérante du dépôt pharmaceutique. Les Organisations Non Gouvernementales (ONG) fonctionnant dans le village, en plus de l'ICEMR, sont le Plan Mali et Blue Start.

Les activités économiques sont dominées principalement par l'agriculture mais on y pratique aussi l'élevage, la pêche, le commerce et l'artisanat. La plaine de Dangassa est propice aux cultures vivrières comme le sorgho, le mil, le maïs, le haricot, de l'arachide, de l'orange, de la papaye, le piment, la tomate etc..., ces produits constituent d'importantes sources de revenus pour les populations riveraines. La taille des exploitations est très variable et dépend du potentiel de la famille ainsi que le patrimoine foncier. L'élevage est basé sur les volailles, les ovins, les caprins et les bovins qui constitue l'économie secondaire. On trouve également quelques équidés (ânes et chevaux) utilisés comme des animaux de trait. La plupart des villageois investissent leurs revenus dans l'élevage et dans les cultures industrielles. La pêche est également pratiquée principalement dans les hameaux par les bozos et Somono. L'artisanat local est pratiqué principalement par les forgerons (la cordonnerie, la forgerie, la poterie). L'orpaillage ordinaire est devenu dans ces derniers temps une source importante de revenus des familles. Cependant, il entraîne des conséquences non seulement sur l'activité agricole pendant l'hivernage mais aussi sur la pêche, l'environnement et sur la

santé de la population environnante. Une foire hebdomadaire à lieu à Dangassa chaque mercredi favorisant les échanges commerciaux. L'islam représente la religion la plus pratiquée mais les religions traditionnelles sont aussi présentes.

4.1.2. Koïla

❖ Historique et situation géographique

Situé dans la commune rurale de Dioro, Koïla Bambaran fait partie de l'aire de santé de Koïla du district sanitaire de Markala dans la région de Ségou. Il est à 45 Km du centre de santé de référence de Markala et à 14 km de Dioro. L'aire de santé de Koïla est composée de 7 villages à savoir : Koïla Bamanan village abritant le CSCom, Koïla Markala, Marka Tintin, Fakourou Were, Kolomy, Karabougou et Kontomo Were. Elle est limitée au nord par l'aire de santé de Dioro, au sud-ouest par l'aire de santé de Tibi, au sud-est par l'aire de santé de Yolo et à l'est par l'aire de santé de Babougou.

Le village fut fondé il y a environ 400 ans (vers 1613) par les frères Bouarés, Préalablement installé à Tiendeguetomo, entre Koïla actuel et Sama (village dans l'aire de santé de Babougou), les frères jumeaux Tientegue Bouaré et Yari Bouaré découvrirent un espace au cours d'une partie de chasse qui selon eux était propice pour y vivre. C'est ainsi qu'ils décidèrent d'y déménager. Certains habitants, comme les Konaté, qui se trouvaient un peu au sud-ouest décident eux aussi de venir s'associer aux Bouarés. C'est à la suite de pouvoir de vaincre pour un si nouveau village, que les habitants des villages environnants martelaient en Bambara « Ni ye koye yan » qui signifie qu'on a du pain sur la planche d'où le nom Koïla.

Le village de Koïla Bambaran à une population estimée à 2944 habitants dont 312 enfants de moins de 5 ans (source : recensement GIS/UCRC, 2017).

❖ Climat et végétation

Le relief de Koïla est composé essentiellement de plaines argilo-sablonneuses et de bas-fonds, les canaux d'irrigations du village proviennent du barrage de Markala. Ils sont utilisés pour la riziculture et la pêche. La faune sauvage est pauvre à cause des aménagements de casiers rizicoles. Néanmoins. On retrouve quelques animaux comme les lièvres (*Pedetes capensis*) et les écureuils (*Sciurus vulgaris*). La végétation est composée de d'herbes et d'arbustes.

On rencontre aussi des arbres de type soudanien comme le néré (*Parkia Biglobosa*), le Karité (*vitellaria paradoxa*), l'acacia (*acacia tortilis*) et le Balanzan (*Faidherbia albida, syn. Acacia albida*).

❖ Infrastructures socio-sanitaires

L'aire de santé de Koïla est composée de 7 villages avec une population de 12302 habitants majoritairement bambaras et peulhs (source CSCom de Koïla). Le village possède une école fondamentale 1^{er} cycle. Les sociétés secrètes (Komo, N'ya, N'tomo) qui existaient jadis ont disparu de nos jours, mais cela n'empêche pas la traditionnelle fête de l'année qui a lieu après la campagne de riziculture. L'économie locale repose sur l'agriculture, l'élevage et la pêche. L'élevage des ovins, des caprins et des bovins y est pratiqué comme une activité économique secondaire. On y retrouve aussi quelques équidés (ânes et chevaux) utilisés comme animaux de trait.

La plupart des villageois épargnent leurs revenus dans l'élevage et dans les cultures industrielles. Une foire hebdomadaire a lieu chaque jeudi à laquelle les habitants des villages environnants participent. Elle facilite les échanges commerciaux et booste ainsi l'économie locale. L'islam est la religion dominante à Koïla.

Le village dispose d'un CSCom depuis 2008 mise en œuvre par le projet village du millénaire, projet ayant pris fin en 2014. Il est composé de deux blocs à savoir un dispensaire et une maternité. Les Organisations Non Gouvernementales (ONG) fonctionnant dans le village, en plus de l'ICEMR, sont l'UNICEF qui intervint dans la communauté et la Terre des Hommes dans l'alimentation des enfants et la prise en

charge des cas de malnutrition dans la localité. Le programme de l'ICEMR intervient dans le village en suivant une cohorte d'étude de 1400 participants de tout âge.

4.1.3. Laboratoire d'Immunogénétique et de Parasitologie

Le laboratoire d'immunogénétique et de parasitologie du Centre International pour l'Excellence dans la Recherche (ICER-Mali) a été créé en 2008 au sein du Département d'Entomologie et des Maladies à Transmission Vectorielle de la FMOS/FAPH/USTTB. C'est le fruit d'une collaboration entre l'USTTB et le Laboratoire de Recherche sur le Paludisme et les Vecteurs (LMVR) des Instituts Nationaux de santé des Etats-Unis d'Amérique (NIH). Plusieurs études ont été menées au sein dudit laboratoire comme l'immunité innée et acquise contre le paludisme chez les enfants, l'étude sur les gamétocytes et la résistance aux antipaludiques etc.... Le laboratoire collabore avec les autres unités de l'ICER-Mali dans la lutte contre le paludisme et les autres maladies infectieuses au Mali. L'unité apporte son soutien aux différents programmes nationaux notamment le PNLP dans la mise en œuvre de interventions de lutte chez les enfants et les femmes enceintes, apporte son aide à la FMOS et FAPH dans la formation continue des étudiants et jeunes chercheurs, et l'encadrement des étudiants dans le cadre de leur thèse. Les sites d'activité sont : Kéniéroba, Dangassa, Koïla, Nioro du Sahel et Bamako.

Le laboratoire d'immunogénétique dispose d'équipements variés et adaptés à ses activités tels que des équipements de biologie moléculaire, d'immunologie, de génétique et de parasitologie, le tout soutenu par un réseau informatique et une chaîne de froid adaptée au stockage des données et à la conservation de différents échantillons. Le laboratoire dispose d'un personnel qualifié et diversifié pour la réalisation des activités de recherche et de formation. Le laboratoire a également publié des articles scientifiques dans des revues nationales et internationales.

4.2. Type et période d'étude

Il s'agissait d'une étude transversale déroulée en décembre 2021 et consistait à collecter des données chez les participants sur le paludisme puis effectuer des prélèvements sanguins pour tester la réactivité des antigènes LR253, LR186, Pf27 et M4 de *P. falciparum* aux échantillons de sérum de ces participants.

4.3. Population et échantillonnage

La population d'étude était constituée des enfants de 5 à 14 ans du programme ICEMR des deux villages d'étude. L'échantillonnage était aléatoire à partir de la base cohorte de l'ICEMR et a permis de sélectionner 211 participants chez qui les données ont été collectées.

4.4. Critères d'inclusion

Nous avons inclus dans cette étude tout participant ayant répondu aux critères suivants :

- résider à Dangassa ou à Koïla
- avoir un âge compris entre 5-14 ans
- avoir le consentement libre et éclairé des parents ou tuteurs d'enfant et l'assentiment des enfants âgés de 12 à 14 ans
- avoir un taux d'hémoglobine $\geq 8\text{mg/L}$.

4.5. Critères de non-inclusion

N'ont pas été inclus, tout enfant ayant une maladie qui contre indique un prélèvement sanguin.

4.6. Variables mesurées

Les variables suivantes ont été mesurées :

- Variables socio-démographiques : l'âge et le sexe ;
- Variable biologique : le taux d'hémoglobine (HEMOCUE[®] Hb301), la parasitémie et le titre d'anticorps anti-LR253, anti-LR186, anti-M4 et anti-Pf27.

4.7. Technique de laboratoire utilisée -ELISA

Au cours de notre étude, nous avons utilisé la technique d'ELISA indirecte (« *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay* »). Le test ELISA a été réalisé selon la procédure standard opératoire (SOP) de l'Université de Lausanne (cf. annexe 1) et réadapté dans notre laboratoire [91]. Le principe de cette technique est basé sur la détection et la qualification de la réaction antigène-anticorps dans un échantillon biologique. Les étapes de l'ELISA indirect pour la détermination du taux d'anticorps dans les échantillons de sérum lors de cette étude sont :

- sensibiliser la plaque d'ELISA (plaque 96 puits) avec les antigènes (LR253, LR186, M4 et Pf27) à une concentration de 5µg/ml et incubé à +4C pendant la nuit ;
- laver la plaque à 4 reprises avec la solution de lavage PBS-T (Phosphate Buffered Saline with tween®20) ;
- bloquer la plaque avec la solution PBS-T+5% de lait (200µl/puit) puis incubé pendant 2 heures à température ambiante ;
- vider les puits et ajouter 50µl des échantillons de sérum dilués à 1/50 dans une solution de PBS-T + 2,5% de lait puis incubé la plaque pendant 1 heure à température ambiante;
- laver la plaque à 4 reprises et ajouter dans les puits 50µl d'anticorps secondaire dilué à 1/1000 dans la solution de PBS-T+ 2,5% de lait puis incubé la plaque pendant 1 heure à température ambiante ;
- laver à quatre reprises les plaques et ajouter 50µl du substrat (peroxydase) dans chaque puits pendant 15 minutes à l'abri de la lumière. Ajouter ensuite 50µl de solution stop de peroxydase pour stopper la réaction (Dodecyl sulfate de sodium(seracare™)) ;
- la lecture de la réaction était ensuite effectuée avec ELISA SoftMax®Pro software à une Densité Optique (DO) 405nm.

4.8. Identification et synthèses des antigènes

Dans des études précédentes, des protéines du stade asexué érythrocytaire de *P. falciparum* contenant des motifs alpha-hélicoïdaux (coiled coil) dans leur structure ont été identifiés *in silico*, et les peptides correspondants ont été synthétisés chimiquement [79]. Les peptides ont été synthétisés par la méthode de chimie en phase solide F-moc (fluorenylmethoxycarbonyl) à l'aide d'un synthétiseur bio-analytique (Intavis AG). Les peptides obtenus ont été purifiés par HPLC (ou chromatographie en phase liquide haute performance ou haute pression). La pureté (>80%) a été confirmée par l'analyse HPLC C18 et par la spectrométrie de masse (MALDI-TOF). Ces peptides ont été fournis par nos partenaires de l'Université de Lausanne en Suisse.

4.9. Gestion et analyses des données

Les données ont été collectées à l'aide des tablettes dans le logiciel REDCap. Les questionnaires vérifiaient la base pour détecter les erreurs possibles pour les corrections. Les résultats de l'ELISA ont été exportés directement dans Microsoft Excel 2021. La fusion des deux bases (ELISA et clinique), les codages et les analyses étaient faits avec STATA 14. Les résultats ont été présentés sous forme de tableaux et figures. Les figures ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism®.

Une analyse descriptive a été d'abord faite pour déterminer la fréquence des caractéristiques des participants. Une analyse bivariée a été ensuite réalisée pour chercher les associations possibles. Le test de Student a été utilisé pour comparer les titres moyens d'anticorps en fonctions caractéristiques des participants. Le Chi2 a été utilisé pour la comparaison des variables catégorielles entre elles et la corrélation de Pearson pour étudier la relation entre les différents titres moyens d'anticorps entre eux avec un seuil de signification statistique à 5%. Les titres moyens d'anticorps ont été exprimés en densité optique (DO).

4.10. Définitions opératoires

- **Séropositivité** : a été définie comme tout échantillon avec une moyenne DO supérieure ou égale à la moyenne DO plus 3 Déviation Standard (SD) des contrôles négatifs.
- **Infection palustre** : a été définie comme la présence d'au moins une forme asexuée du parasite dans le sang examiné par la microscopie (Goutte épaisse). La parasitemie a été calculée par la formule suivante : nombre de parasites comptés/par le nombre de leucocytes comptés*8000.
- **Episode palustre** : a été défini comme tout participant reçu en consultation avec au moins un signe du paludisme confirmé par la goutte épaisse.
- **Portage gamétocytaire** : c'est le pourcentage de patients examinés présentant les formes sexuées du parasite dans le sang par la technique de la goutte épaisse.
- **Anémie** : tout cas de taux d'hémoglobine inférieur à 11g/dl.

4.11. Déroulement de l'étude

Au début du projet, le protocole a été expliqué aux autorités communautaires, administratives et sanitaires pour obtenir leur adhésion. Le consentement libre et éclairé a été obtenu de chaque participant à l'enrôlement. Les données ont été collectées sur les caractéristiques sociodémographiques lors de l'examen clinique, suivi d'un prélèvement capillaire au bout du doigt pour déterminer le taux d'hémoglobine et la goutte épaisse puis un prélèvement veineux était effectué dans un tube. Les échantillons ont été ensuite centrifugés pour l'extraction du sérum. Les sérums ont été conservés à +4°C avant de les transporter à Bamako dans les bonnes conditions de conservation. Les sérums étaient conservés à -20°C au laboratoire d'Immunogénétique et de Parasitologie de l'ICER-Mali avant la réalisation du test d'ELISA.

4.12. Considérations éthiques

Le protocole de cette étude du programme ICEMR a été déjà approuvé par le comité éthique de la FMOS/FAPH de l'USTTB (cf. Lettre N°2019/04/CE/FMPOS). L'autorisation communautaire a été obtenue auprès des autorités administratives et sanitaires ainsi que

les notabilités coutumières des deux villages. Le consentement individuel a été obtenu auprès des parents/tuteurs d'enfants. Les investigateurs ont été tous formés sur les bonnes pratiques cliniques et de laboratoire et ont assuré la confidentialité et la sécurité des données durant toute la période de l'étude.

5. RESULTATS

5.1. Résultats globaux

Au total, 211 participants ont été inclus dans cette étude dont 108 à Koïla et 103 à Dangassa. Le sexe masculin était majoritaire à Dangassa et à Koïla avec respectivement 66,0% et 58,3%. La tranche d'âge 10-14 ans était la plus représentée dans les deux villages avec 59,2% (âge moyen : 11 ± 4) à Dangassa et 64,8% (âge moyen : 11 ± 7) à Koïla. Les séroprévalences des anticorps anti-LR253 (91,3% vs 63,9%, $p=0,0001$), anti-M4 (84,5% vs 72,2%, $p=0,031$) et anti-Pf27 (64,1% vs 17,6%, $p=0,0001$) étaient significativement plus élevées à Dangassa qu'à Koïla. Cependant cette prévalence était comparable pour l'antigène LR186 ($p=0,111$) dans les deux sites.

5.2. Résultats descriptifs

Tableau 2. Répartition des participants selon les sites d'étude

Sites	Effectifs	Pourcentage (sexe ratio)
Dangassa	103	48,8 (1,9)
Koïla	108	51,2 (1,5)
Total	211	100,0

Un peu plus de la moitié des participants était de Koïla, soit 51,2% vs 48,8% pour Dangassa avec un sex ratio de 1,9 à Dangassa et 1,5 à Koïla.

Tableau 3. Répartition des participants en fonction du genre et des sites

Sites	Genre	
	Masculin n (%)	Féminin n (%)
Dangassa	68 (66,0)	35 (34,0)
Koïla	63 (58,3)	45 (41,7)
Total	131 (62,1)	80 (37,9)

Le sexe masculin était majoritaire dans les deux sites avec 66,0% et 58,3%, respectivement à Dangassa et à Koïla

Tableau 4. Répartition des enfants de 5-14 ans en fonction des classes d'âge et des sites

Sites	Classe d'âge		p
	5 -9 ans n (%)	10-14 ans n (%)	
Dangassa	42 (40,8)	61 (59,2)	0,40
Koïla	38 (35,2)	70 (64,8)	
Total	80 (37,9)	131 (62,1)	

La répartition des participants en fonction des tranches d'âge était similaire dans les deux villages, soit de 59,2% et de 64,8% pour les 10-14 ans, respectivement à Dangassa et à Koïla.

5.3. Résultats Analytiques

Tableau 5. Prévalence de l'anémie chez les enfants de 5-14 ans en décembre 2021 à Dangassa et à Koïla

Sites	Anémie		<i>p</i>
	Non n (%)	Oui n (%)	
Dangassa	77 (74,8)	26 (25,2)	
Koïla	87 (80,6)	21 (19,4)	0,312
Total	164 (77,7)	47 (22,3)	

La prévalence globale de l'anémie était de 22,3%. Cette prévalence de l'anémie ne variait pas significativement entre Dangassa (25,2%) et Koïla (19,4%, $p=0,312$).

Tableau 6. Prévalence de l'infection palustre chez les enfants de 5-14 ans en décembre 2021 dans les sites d'étude

Sites	Goutte épaisse		p
	Négative n (%)	Positive n (%)	
Dangassa	87 (84,5)	16 (15,5)	
Koïla	61 (56,5)	47 (43,5)	<i>0,0001</i>
Total	148 (70,1)	63 (29,9)	

La prévalence de l'infection palustre était significativement plus élevée à Koïla (43,5%) qu'à Dangassa (15,5%, $p=0,0001$).

Tableau 7. Portage des gamétocytes chez les enfants de 5-14 ans en décembre 2021 dans les sites

Sites	Gamétocytes		p
	Non n (%)	Oui n (%)	
Dangassa	102 (99,0)	1 (1)	0,33
Koïla	105 (97,2)	3 (2,8)	
Total	207 (98,1)	4 (1,9)	

Nous n'avons pas observé de différence significative du portage des gamétocytes entre les deux villages ($p = 0,336$).

Tableau 8. Séroprévalence des antigènes LR253, LR186, M4 et Pf27 chez les enfants de 5-14 ans à Dangassa et Koïla en décembre 2021

Sites	LR253	LR186	M4	Pf27
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Dangassa	94 (91,3)	78 (75,7)	87 (84,5)	66 (64,1)
Koïla	69 (63,9)	71 (65,7)	78 (72,2)	19 (17,6)
Total	163 (77,3)	149 (70,6)	165 (78,2)	85 (40,3)
<i>P</i>	<i>0,0001</i>	<i>0,111</i>	<i>0.031</i>	<i>0,0001</i>

La séroprévalence était statistiquement plus élevée à Dangassa qu'à Koïla pour les antigènes LR253 (91,3% vs 63,9%, $p=0,0001$), M4 (84,5% vs 72,2%, $p=0,031$ et Pf27 (64,1% vs 17,6%, $p= 0,0001$)). Cependant nous n'avons pas observé de différence significative pour l'antigène LR186 ($p=0,111$).

Tableau 9. Séroprévalence des antigènes LR253, LR186, M4 et Pf27 chez les enfants de 5-14 ans selon les classes d'âges

Classe d'âge	LR253 n (%)	LR186 n (%)	M4 n (%)	Pf27 n (%)
5-9 ans	59 (73,8)	54 (67,5)	59 (73,8)	36 (45,0)
10-14 ans	104 (79,4)	95 (72,5)	106 (80,9)	49 (37,4)
Total	163 (77,3)	149 (70,6)	165 (78,2)	85 (40,3)
<i>p</i>	<i>0,343</i>	<i>0,437</i>	<i>0,221</i>	<i>0,275</i>

La séroprévalence de tous antigènes testés ne variait pas significativement selon les classes d'âge.

Tableau 10. Séroprévalence des anticorps anti-LR253, anti-LR186, anti-M4 et anti-Pf27 en fonction du résultat de la goutte épaisse

Antigènes	Dangassa			Koïla		
	GE+	GE-	p	GE+	GE-	p
	(N=16)	(N=87)		(N=47)	(N=61)	
	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
LR253	15 (93,8)	79 (90,8)	0,701	31 (65,9)	38 (62,3)	<i>0,694</i>
LR186	14 (87,5)	64 (73,6)	0,232	36 (76,6)	35 (57,4)	0,037
M4	14 (87,5)	73 (83,9)	0,715	39 (82,9)	39 (63,9)	0,028
Pf27	10 (62,5)	56 (64,4)	0,886	7 (14,9)	12 (19,7)	<i>0,518</i>

Les enfants infectés par le *P. falciparum* en fin de saison avaient une séroprévalence plus élevée pour les antigènes LR186(p=0,037) et M4 (p=0,028) à Koïla. En revanche, la séroprévalence pour les antigènes LR253 et Pf27 ne variait pas significativement en fonction du statut de l'infection palustre.

À Dangassa, la séroprévalence ne variait pas significativement selon le statut de l'infection palustre quel que soit l'antigène testé.

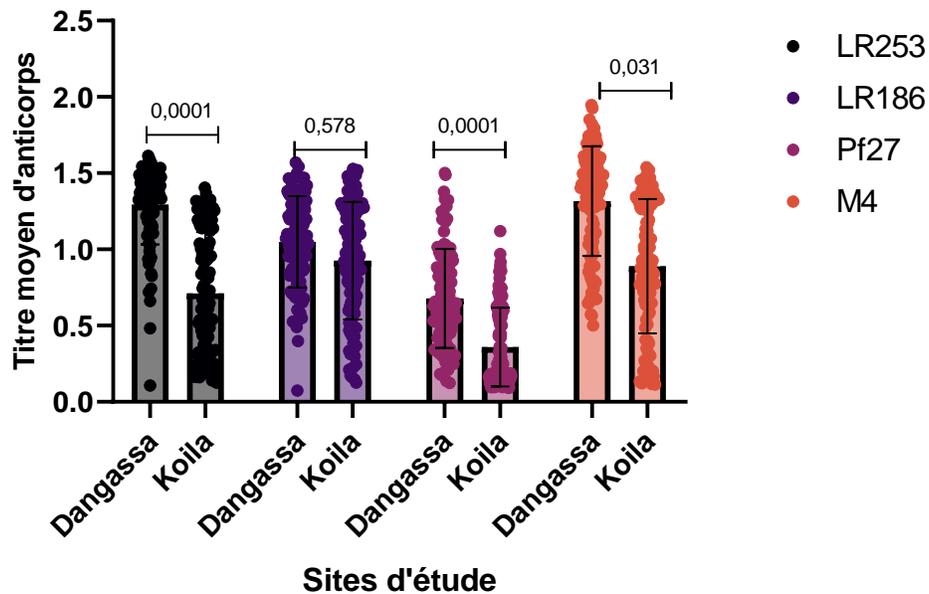


Figure 2. Titre moyen d'anticorps anti-LR253, anti-LR186, anti-Pf27, anti-M4 chez les enfants de 5-14 ans à Dangassa et à Koïla en décembre 2021

Les titres moyens d'anticorps anti-LR253 ($p=0,0001$), anti-Pf27 ($p=0,0001$) et anti-M4 ($p=0,031$) étaient significativement plus élevés chez les enfants vivant à Dangassa que ceux vivant à Koïla.

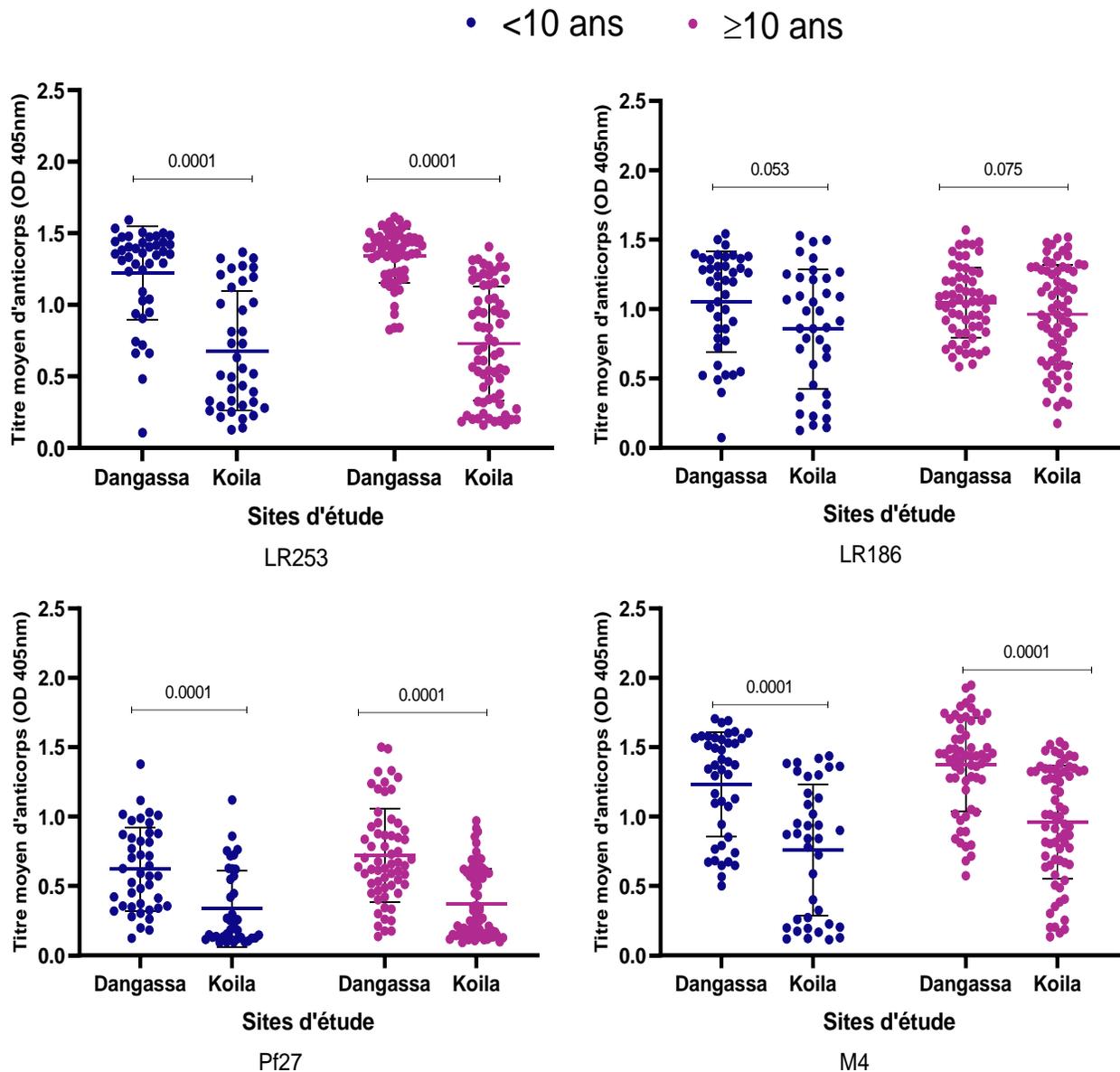


Figure 3. Titre moyen d'anticorps anti-LR253, anti-LR186, anti-Pf27, anti-M4 selon les classes d'âge à Dangassa et à Koïla en décembre 2021

Le titre moyen d'anticorps anti- LR253, Pf27 et M4 était significativement plus élevé à Dangassa qu'à Koïla quelles que soient les tranches d'âge. Par contre, il n'y a pas de variation significative pour l'antigène LR186 entre les tranches d'âge dans les deux sites.

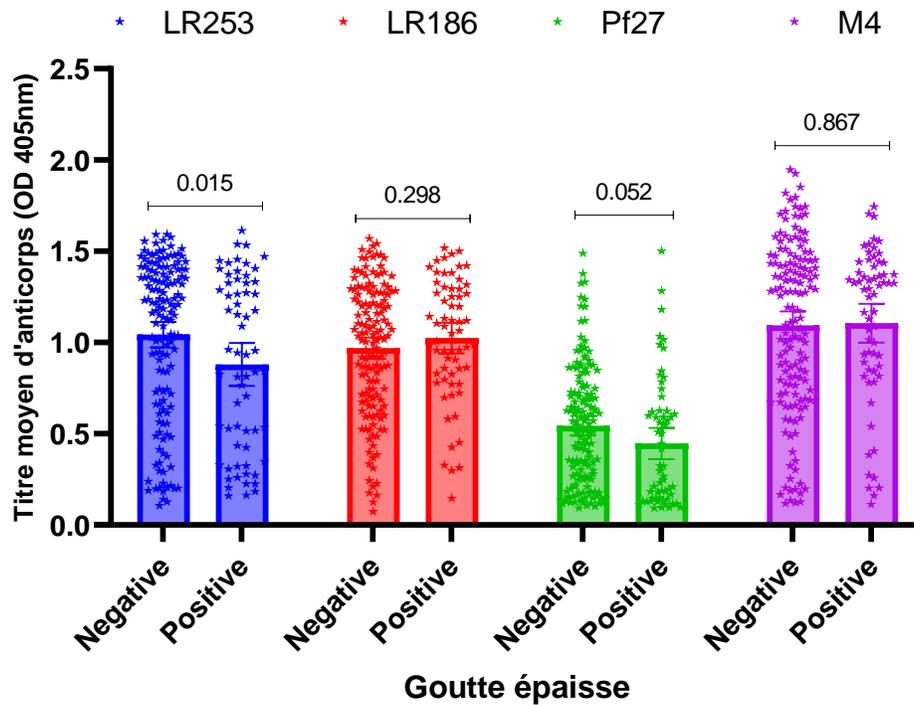


Figure 4. Titre moyen global d'anticorps en fonction de l'infection palustre en décembre 2021

Seul le titre moyen d'anticorps anti-LR253 ($p=0,015$) était significativement élevé chez les enfants non infectés en fin de saison de transmission. En revanche, il n'y avait pas de variation significative entre le titre moyen d'anticorps anti-LR186, anti-Pf27, anti-M4 et l'infection palustre.

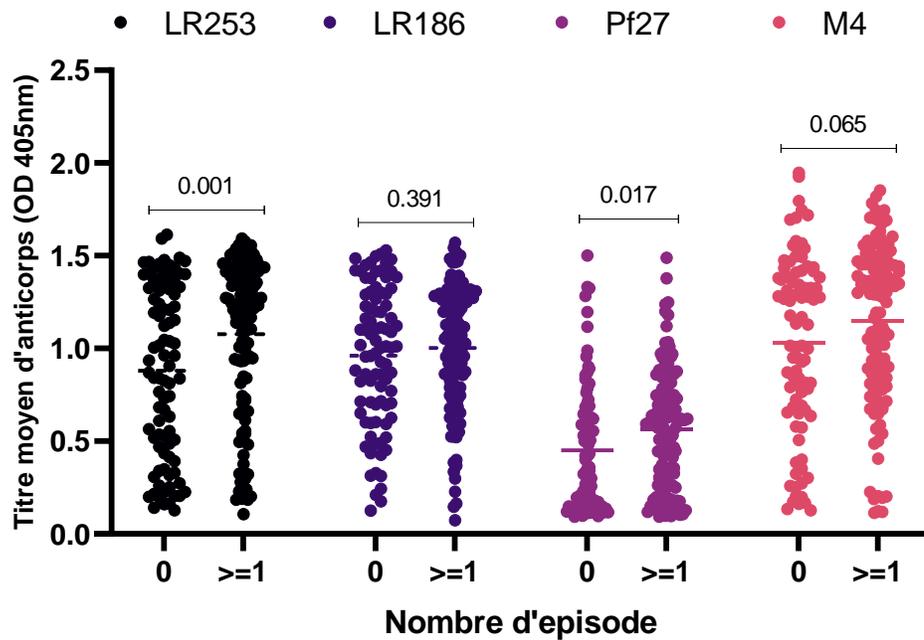


Figure 5. Titre moyen global d'anticorps en fonction du nombre d'épisodes palustres en décembre 2021

Globalement, le titre moyen d'anticorps anti-LR253 ($p=0,001$) et anti-Pf27 ($p=0,017$) était significativement plus élevé chez les enfants qui ont fait au moins un épisode palustre durant la saison de transmission.

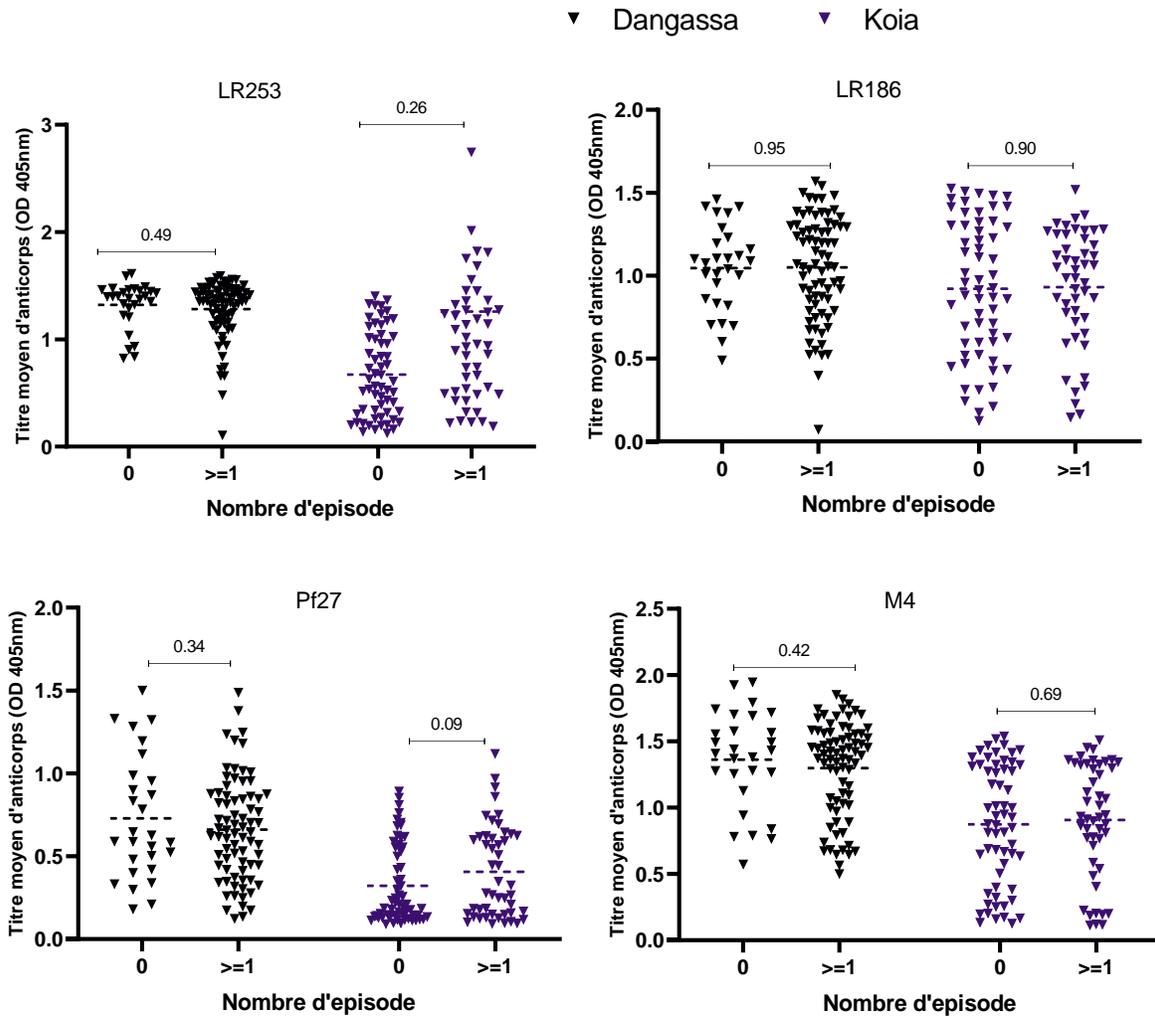


Figure 6. Titre moyen d'anticorps en fonction du nombre d'épisode palustre à Dangassa et à Koïla en décembre 2021

Une variation significative n'était pas observée entre le titre moyen d'anticorps anti-LR253, anti-LR186, anti-Pf27 et anti-M4 et le nombre d'épisode palustre dans les sites.

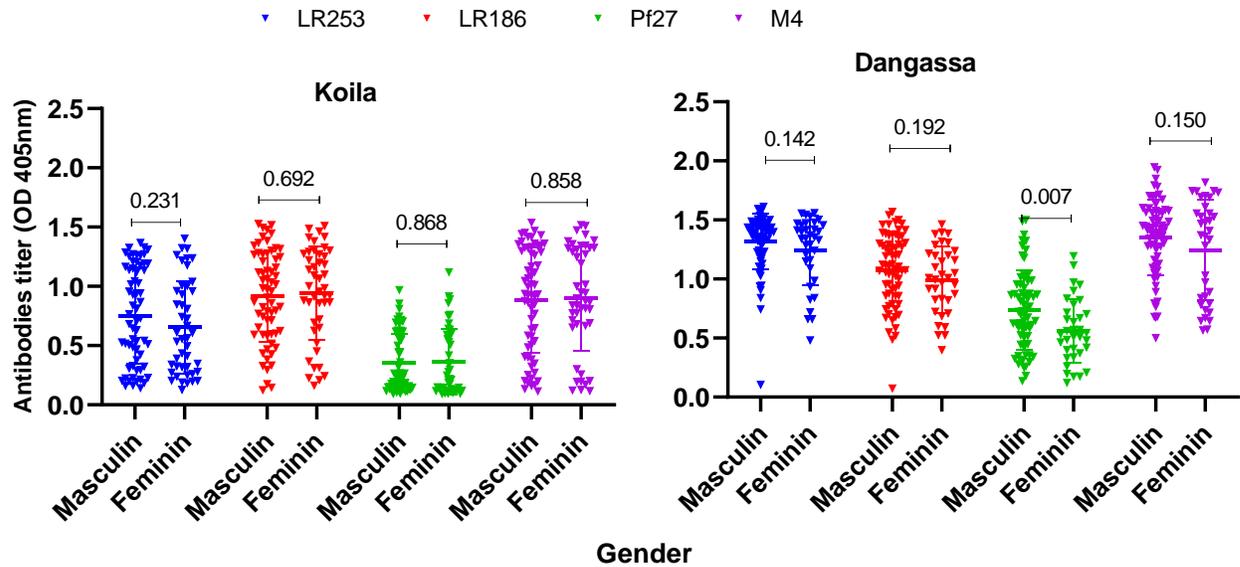


Figure 7. Titre moyen d'anticorps en fonction du sexe à Dangassa et à Koila en décembre 2021

Seul le titre moyen d'anticorps anti-Pf27 était significativement plus élevé à Dangassa chez les masculins ($p=0,007$), contrairement aux autres antigènes où la variation n'était pas significative. À Koïla, aucune variation significative n'a été observée pour tous les antigènes testés.

6. COMMENTAIRES ET DISCUSSION

Cette étude avait pour but de déterminer la réactivité et la séroprévalence des antigènes du stade sanguin (LR253, LR186, Pf27 et M4) du *P. falciparum* (Tableau 1) avec les sérums des participants vivant à Dangassa et à Koïla, deux zones d'endémicité différente au Mali. Le taux moyen d'anticorps ainsi que la prévalence de chacun des antigènes ont été évalués dans les deux sites, tout en déterminant les facteurs sociodémographiques et cliniques associés. Au total, 211 participants ont été inclus dans cette étude dont 108 à Koïla et 103 à Dangassa (Tableau 2). Le sexe masculin était le plus représenté avec un ratio de 1,9 à Dangassa et 1,5 à Koïla, et la tranche d'âge 10-14 ans était la plus représentée aussi bien à Dangassa qu'à Koïla (Tableaux 3 et 4). La représentativité des enfants de 10 à 14 ans pourrait être liée à la sélection des participants dans la base de recensement du programme ICEMR qui a été faite de façon aléatoire.

Globalement, la prévalence globale de l'anémie était de 22,3% mais elle ne variait pas significativement entre les deux sites ($p=0,312$; Tableau 5). La prévalence de l'infection palustre globale était de 29,9%, et était significativement plus élevée à Koïla qu'à Dangassa ($p=0,0001$; Tableau 6). De même, seulement 1,9% des participants (des deux sites d'étude) étaient porteurs des gamétocytes, laquelle (prévalence) ne variait pas entre les deux sites d'étude ($p=0,336$; Tableau 7). Malgré une endémie palustre plus forte dans la zone de Dangassa qu'à Koïla, la prévalence de l'infection palustre était plus élevée à Koïla. Cela pourrait être dû à la couverture des enfants jusqu'à l'âge de 14 ans par les interventions de lutte contre le paludisme telles que la chimioprévention à Dangassa, alors qu'à Koïla, les interventions de la CPS ne couvrent que les enfants de moins de 5 ans. En effet, la mise en œuvre de la CPS à Dangassa a significativement réduit l'incidence du paludisme et le portage asymptomatique, comme rapporté par Konate et col. en 2020 chez les enfants de moins de 5 ans [92] et ceux de 5 à 14 ans en 2021 [93] dans la même localité. Bien que l'anémie représente un phénotype clinique fréquent du paludisme dans les zones endémiques et que les enfants soient plus infectés à Koïla qu'à Dangassa, la prévalence de l'anémie n'est pas différente dans les deux localités. Des études plus approfondies sont à présent nécessaires pour mieux estimer les causes de cette forte prévalence de l'anémie dans les sites étudiés, lesquelles peuvent être multifactorielles

(nutritionnelles, infections concomitantes, anomalies de la production ou destruction massive d'érythrocytes, etc.) [94], .

Les sérums des participants des deux sites d'étude ont globalement réagi aux antigènes testés avec des niveaux de réactivité différente selon l'endémicité de la zone. En effet, nous avons observé que les sérums provenant de Dangassa ont significativement mieux réagi aux 4 des 5 antigènes LR253 (91,3% vs 63,9%, $p=0,0001$), Pf27 (64,1% vs 17,6%, $p=0,0001$) et M4 (84,5% vs 72,2%, $p=0,031$) que ceux vivant à Koïla (Tableau 8). Ces taux d'anticorps plus élevés à Dangassa pourraient être attribués au fait que la région de Dangassa est une zone de forte et longue transmission [95] où les enfants sont en contact permanent avec les parasites du paludisme. L'association du taux élevé d'anticorps et une longue exposition a été rapporté dans des études précédentes par d'autres [96, 97].

La séroprévalence de tous les antigènes testés ne variait pas significativement en fonction des classes d'âge même si la tendance était un peu à la hausse chez les enfants de 10 à 14 ans (Tableau 8). Des études menées ont rapporté que la réponse humorale adaptative s'acquiert progressivement en fonction de l'exposition et de l'âge dans les zones d'endémie palustre [98, 99] ; cette réponse peut dépendre aussi de la qualité de l'antigène en question [100].

De façon globale, les enfants infectés par le *P. falciparum* avaient un niveau d'anticorps plus élevé contre les antigènes LR186 ($p=0,037$) et M4 ($p=0,028$) à Koïla. En revanche, la séroprévalence pour les antigènes LR253 et Pf27 ne variait pas significativement en fonction de l'infection palustre en fin de saison de transmission tout comme à Dangassa où l'infection palustre n'influçait pas significativement la production d'anticorps contre aucun des quatre antigènes testés (Tableau 10). Ces résultats suggèrent que les anticorps induits lors de l'infection par le parasite du paludisme sont susceptibles de reconnaître ces antigènes, lesquels pourraient donc faire l'objet d'une étude plus approfondie comme potentiels candidats vaccins.

Les titres moyens d'anticorps contre les antigènes LR253, Pf27 et M4 étaient significativement plus élevés à Dangassa qu'à Koïla (Figure 2), et cela particulièrement chez les enfants de 10 à 14 ans (Figure 3). En effet, l'exposition répétée et continue des

individus habitant dans des zones de moyenne à forte transmission du *Plasmodium* est associée par l'induction d'anticorps au fil du temps et avec l'âge, comme cela a été rapporté par Rogier et col. en 1996 [101] et par Yacouba et col. en 2022 au Burkina Faso [102].

Les enfants non infectés par le *P. falciparum* avaient un titre moyen d'anticorps anti-LR253 significativement élevé dans les deux sites en fin de saison de transmission, en revanche pour les antigènes LR186, M4 ou Pf27, ce taux était comparable à la même période (Figure 4). Globalement, les enfants qui ont fait un épisode palustre durant la saison de transmission avaient des titres moyens d'anticorps anti-LR253 ($p=0,001$) et anti-Pf27 ($p=0,017$) significativement plus élevés en fin de transmission (Figure 4), suggérant un contact fréquent avec les parasites boostant la réponse immunitaire [103]. Dans les deux cas (infection ou épisode de paludisme), la prévalence des anticorps anti-L253 (l'antigène représentant la partie C constante de MSP2) a été significative. Cette région constante de MSP2 a été suggérée comme antigénique et immunogène dans les sérums d'animaux immunisés et d'individus naturellement exposés [10, 11, 104].

Toutefois, après stratification par site d'étude, la variation du taux moyen d'anticorps anti-LR253, anti-LR186, anti-Pf27 ou anti-M4, ainsi que celle du nombre d'épisodes, n'ont pas été significatives (Figure 6). Donc, le titre moyen global élevé chez les enfants qui ont fait un épisode palustre durant la saison de transmission pourrait être dû à l'effet cumulatif des taux d'anticorps des deux sites.

En outre, seul le titre moyen d'anticorps anti-Pf27 était significativement plus élevé à Dangassa chez les masculins ($p=0,007$), contrairement à Koïla où aucune variation significative du taux d'anticorps n'était observée entre les antigènes (Figure 7). L'association entre le genre et la réponse humorale contre le paludisme est différemment rapportée par les auteurs. Kwenti et col. ont trouvé que le titre moyen d'anticorps était significativement plus élevé chez les féminins que les masculins pour AMA1 mais était similaire pour le MSP-1 [105]. Cependant, les féminins étaient plus infectés que les masculins dans leur étude contrairement à notre étude où les masculins étaient légèrement infectés (17,6% vs 11,4%, $p = 0,41$) mais ceux-ci étaient majoritaires avec un

ratio de 1,9 à Dangassa. Par contre, Wang et col n'ont pas trouvé d'association entre le genre et la réponse humorale pour l'antigène MSP-1 [106].

Dans les zones d'endémie palustre comme les nôtres où l'exposition aux parasites est longue peut entraîner la production d'anticorps dont le niveau de production est corrélé aux pics et à l'intensité de la transmission [107]. Globalement, cette étude a permis de prouver que les sérums des individus vivant dans les zones d'endémie palustre différentes reconnaissent les peptides LR253, LR189, Pf27 et M4 comme antigènes potentiels. Nos résultats indiquent clairement que les segments LR253 (C-terminal) de MSP-2 et de Pf27 possèdent les épitopes les plus prometteurs en vue du développement d'un candidat-vaccin potentiel. Cependant, des tests supplémentaires sont nécessaires pour renforcer ces premiers résultats.

LIMITES

Cette étude, dont l'objectif était d'évaluer la réactivité de ces peptides comme antigènes potentiels dans les sérums d'individus vivant dans deux zones d'endémie palustre, n'a pas permis en revanche de démontrer la spécificité ni les classes d'anticorps présents dans les sérums. Elle n'a pas non plus permis de démontrer l'activité biologique de ces anticorps avec des tests d'inhibition sur le développement *in vitro* de Plasmodium. Une autre des limites de cette étude est également l'absence de tests de ces antigènes réalisés sur des échantillons prélevés en début de saison, permettant d'estimer au préalable la présence d'anticorps, notamment pour mieux appréhender la dynamique. De plus amples études sont donc nécessaires, tout en tenant compte de ces limites, afin de renforcer ces résultats, lesquels pourraient contribuer à l'identification de nouveaux potentiels candidats vaccins contre le paludisme.

7. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

7.1. Conclusion

Les résultats de cette étude suggèrent que les antigènes LR253, M4 et Pf27 de *P. falciparum* sont largement prédominants dans les sérums des individus des deux zones d'endémie palustre. Toutefois, cette réactivité était plus marquée chez les enfants âgés de 10 à 14 ans ainsi que dans la zone de forte transmission de Dangassa. En outre, les titres moyens d'anticorps anti-LR253 et anti-Pf27 étaient les plus élevés chez les enfants à la fin de la saison, suggérant lesdits antigènes comme potentiels nouveaux candidats à explorer.

7.2. Recommandations

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

Aux autorités sanitaires et administratives

- D'encourager et de financer d'avantage la recherche biomédicale fondamentale sur le paludisme, particulièrement dans la recherche pour le développement de vaccin efficace contre le paludisme.

Aux chercheurs

- Mener d'autres études en vue de mieux caractériser ces antigènes
- Caractériser les anticorps contre ces antigènes pour leur spécificité et association avec la protection contre le paludisme.

À la population

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

8. REFERENCES

1. WHO. *Paludisme*. 2021; Available from: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/malaria> (consulte le 09/05/2023).
2. OMS, *World malaria report 2022*. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 2022.
3. EDSM-VI. *Sixième Enquête Démographique et de Santé au Mali (EDSM-VI)2018*. 2019; Available from: https://www.instat-mali.org/laravel-filemanager/files/shares/pub/eds6-18-ind-cle_pub.pdf (consulte le 10/05/2023).
4. Alout, H., et al., *Interactive cost of Plasmodium infection and insecticide resistance in the malaria vector Anopheles gambiae*. Sci Rep, 2016. **6**(29755).
5. Takala, S.L. and C.V. Plowe, *Genetic diversity and malaria vaccine design, testing and efficacy: preventing and overcoming 'vaccine resistant malaria'*. Parasite Immunol, 2009. **31**(9): p. 560-73.
6. Dechavanne, C. *Construction de la réponse anticorps spécifique du paludisme chez le jeune enfant : étude combinée de l'hôte, du parasite et de leur environnement*. 2013; Available from: <https://theses.hal.science/tel-00856581/document> (consulte le 09/05/2023).
7. Laurens, M.B., *RTS,S/AS01 vaccine (Mosquirix™): an overview*. Hum Vaccin Immunother, 2020. **16**(3): p. 480-489.
8. Björkman, A., et al., *RTS,S/AS01 malaria vaccine-proven safe and effective?* Lancet Infect Dis, 2023.
9. OMS. *Paludisme*. 2023; Available from: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/malaria> (consulte le 09/05/2023).
10. Flueck, C., et al., *Evaluation of two long synthetic merozoite surface protein 2 peptides as malaria vaccine candidates*. Vaccine, 2009. **27**(20): p. 2653-61.
11. Balam, S., et al., *Plasmodium falciparum merozoite surface protein 2: epitope mapping and fine specificity of human antibody response against non-polymorphic domains*. Malar J, 2014. **13**: p. 510.
12. Stubbs, J., et al., *Strain-Transcending Fc-Dependent Killing of Plasmodium falciparum by Merozoite Surface Protein 2 Allele-Specific Human Antibodies*. Infection and Immunity, 2011. **79**(3): p. 1143-1152.
13. ligne, A.e. *Généralités sur le paludisme*. Available from: <https://www.clicours.com/generalites-sur-le-paludisme/> (consulte le 09/05/2023).
14. Cox-Singh, J., et al., *Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening*. Clin Infect Dis, 2008. **46**(2): p. 165-71.
15. OMS, *Paludisme : résistance partielle à l'artémisinine*. 2022.
16. Sutherland, W.J., et al., *A horizon scan of global conservation issues for 2010*. Trends Ecol Evol, 2010. **25**(1): p. 1-7.
17. Baruch, D.I., et al., *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(8): p. 3497-502.
18. Fontenille, D., et al., *[Systematics and biology of Anopheles vectors of Plasmodium in Africa, recent data]*. Med Trop, 2003. **63**(3): p. 247-53.
19. Coetzee, M. and D. Fontenille, *Advances in the study of Anopheles funestus, a major vector of malaria in Africa*. Insect Biochem Mol Biol, 2004. **34**(7): p. 599-605.
20. M, J.C., Pierre; C, Marc; J, J.; M, Sylvie; R-L, D; S, Jacque. *Biodiversité du paludisme dans le monde*. 2004; Paris : J. Libbey, 2004, 428 p. ISBN 2-7420-0452-1:[Available from:

https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/divers20-07/010035112.pdf

(consulte le 10/05/2023).

21. Pages, F., E. Orlandi-Pradines, and V. Corbel, [*Vectors of malaria: biology, diversity, prevention, and individual protection*]. *Med Mal Infect*, 2007. **37**(3): p. 153-61.
22. Venugopal, K., et al., *Plasmodium asexual growth and sexual development in the haematopoietic niche of the host*. *Nature Reviews Microbiology*, 2020. **18**(3): p. 177-189.
23. Ahmad, A., et al., *Infectivity of patent Plasmodium falciparum gametocyte carriers to mosquitoes: establishing capacity to investigate the infectious reservoir of malaria in a low-transmission setting in The Gambia*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2021. **115**(12): p. 1462-1467.
24. Maier, A.G., et al., *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol*, 2019. **35**(6): p. 481-482.
25. Soulard, V., et al., *Plasmodium falciparum full life cycle and Plasmodium ovale liver stages in humanized mice*. *Nature Communications*, 2015. **6**(1): p. 7690.
26. CDC. *Lifecycle*. 2020; Available from: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html> (consulte le 09/05/2023).
27. Laurent, V., et al. *Physiopathologie du paludisme à Plasmodium falciparum: principaux mécanismes et avancées récentes*. 2012.
28. Aderem, A. and R.J. Ulevitch, *Toll-like receptors in the induction of the innate immune response*. *Nature*, 2000. **406**(6797): p. 782-7.
29. Kwiatkowski, D., *Tumour necrosis factor, fever and fatality in falciparum malaria*. *Immunol Lett*, 1990. **25**(1-3): p. 213-6.
30. Torreggiani, S., G. Filocamo, and S. Esposito, *Recurrent Fever in Children*. *Int J Mol Sci*, 2016. **17**(4).
31. Couper, K.N., et al., *Macrophage-mediated but gamma interferon-independent innate immune responses control the primary wave of Plasmodium yoelii parasitemia*. *Infect Immun*, 2007. **75**(12): p. 5806-18.
32. Craig, A. and A. Scherf, *Molecules on the surface of the Plasmodium falciparum infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion*. *Mol Biochem Parasitol*, 2001. **115**(2): p. 129-43.
33. Ho, M. and N.J. White, *Molecular mechanisms of cytoadherence in malaria*. *Am J Physiol*, 1999. **276**(6): p. C1231-42.
34. Dondorp, A.M., et al., *Abnormal blood flow and red blood cell deformability in severe malaria*. *Parasitol Today*, 2000. **16**(6): p. 228-32.
35. McQuaid, F. and J.A. Rowe, *Rosetting revisited: a critical look at the evidence for host erythrocyte receptors in Plasmodium falciparum rosetting*. *Parasitology*, 2020. **147**(1): p. 1-11.
36. Chen, Q., et al., *Identification of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) as the rosetting ligand of the malaria parasite P. falciparum*. *J Exp Med*, 1998. **187**(1): p. 15-23.
37. Scholander, C., et al., *Novel fibrillar structure confers adhesive property to malaria-infected erythrocytes*. *Nat Med*, 1996. **2**(2): p. 204-8.
38. Roetyneck, S., et al., [*NK cells and innate immunity to malaria*]. *Med Sci (Paris)*, 2006. **22**(8-9): p. 739-44.
39. Lansche, C., et al., *The sickle cell trait affects contact dynamics and endothelial cell activation in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes*. *Commun Biol*, 2018. **1**: p. 211.
40. Gene Mayer, D.H. *IMMUNOLOGIE – CHAPITRE TREIZE CYTOKINES ET IMMUNOREGULATION*. 2013; Available from: <https://microbiologybook.org/French-immuno/immchapter13.htm> consulte le 26/06/2023.

41. NIH. *Malaria vaccines provide strong and lasting immunity*. 2021; Available from: <https://www.nih.gov/news-events/nih-research-matters/malaria-vaccines-provide-strong-lasting-immunity> (consulte le 09/05/2023).
42. Deloron, P. and C. Chougnnet, *Is immunity to malaria really short-lived?* Parasitol Today, 1992. **8**(11): p. 375-8.
43. Trape, J.F., et al., *The Dielmo project: a longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal*. Am J Trop Med Hyg, 1994. **51**(2): p. 123-37.
44. Kumaratilake, L.M., et al., *Effects of cytokines, complement, and antibody on the neutrophil respiratory burst and phagocytic response to Plasmodium falciparum merozoites*. Infect Immun, 1992. **60**(9): p. 3731-8.
45. Osier, F.H., et al., *Opsonic phagocytosis of Plasmodium falciparum merozoites: mechanism in human immunity and a correlate of protection against malaria*. BMC Med, 2014. **12**(108): p. 1741-7015.
46. Auffray Charles , C.Z.a.H.L. *Systems medicine: the future of medical genomics and healthcare*. 2009; Available from: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1186/gm2.pdf> (consulte le 09/05/2023).
47. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets*. Trends Immunol, 2001. **22**(11): p. 633-40.
48. Artavanis-Tsakonas, K., J.E. Tongren, and E.M. Riley, *The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology*. Clin Exp Immunol, 2003. **133**(2): p. 145-52.
49. Kodama, S., et al., *Nasal immunization with plasmid DNA encoding P6 protein and immunostimulatory complexes elicits nontypeable Haemophilus influenzae-specific long-term mucosal immune responses in the nasopharynx*. Vaccine, 2011. **29**(10): p. 1881-90.
50. Schofield, L. and G.E. Grau, *Immunological processes in malaria pathogenesis*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(9): p. 722-35.
51. Cramer, J.A., et al., *Medication compliance and persistence: terminology and definitions*. Value Health, 2008. **11**(1): p. 44-7.
52. Farouk, S.E., et al., *Gamma delta T cells inhibit in vitro growth of the asexual blood stages of Plasmodium falciparum by a granule exocytosis-dependent cytotoxic pathway that requires granulysin*. Eur J Immunol, 2004. **34**(8): p. 2248-56.
53. Taylor-Robinson, A.W., et al., *Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells*. Eur J Immunol, 1994. **24**(4): p. 980-4.
54. Pombo, D.J., et al., *Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with Plasmodium falciparum*. Lancet, 2002. **360**(9333): p. 610-7.
55. Perlmann, P. and M. Troye-Blomberg, *Malaria blood-stage infection and its control by the immune system*. Folia Biol, 2000. **46**(6): p. 210-8.
56. Schreiber, V., et al., *Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(7): p. 517-28.
57. Richards, J.S., et al., *Identification and prioritization of merozoite antigens as targets of protective human immunity to Plasmodium falciparum malaria for vaccine and biomarker development*. J Immunol, 2013. **191**(2): p. 795-809.
58. Cutts, J.C., et al., *Immunological markers of Plasmodium vivax exposure and immunity: a systematic review and meta-analysis*. BMC Med, 2014. **12**(150): p. 014-0150.
59. Beeson, J.G., F.H. Osier, and C.R. Engwerda, *Recent insights into humoral and cellular immune responses against malaria*. Trends Parasitol, 2008. **24**(12): p. 578-84.

60. Fowkes, F.J., et al., *The relationship between anti-merozoite antibodies and incidence of Plasmodium falciparum malaria: A systematic review and meta-analysis*. PLoS Med, 2010. **7**(1): p. 1000218.
61. Chan, J.A., et al., *Targets of antibodies against Plasmodium falciparum-infected erythrocytes in malaria immunity*. J Clin Invest, 2012. **122**(9): p. 3227-38.
62. Crompton, P.D., et al., *Sickle cell trait is associated with a delayed onset of malaria: implications for time-to-event analysis in clinical studies of malaria*. J Infect Dis, 2008. **198**(9): p. 1265-75.
63. Chan, J.A., F.J. Fowkes, and J.G. Beeson, *Surface antigens of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes as immune targets and malaria vaccine candidates*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(19): p. 3633-57.
64. Tran, E., et al., *Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer*. Science, 2014. **344**(6184): p. 641-5.
65. Joos, C., et al., *Clinical protection from falciparum malaria correlates with neutrophil respiratory bursts induced by merozoites opsonized with human serum antibodies*. PLoS One, 2010. **5**(3): p. 0009871.
66. Hodder, A.N., et al., *The disulfide bond structure of Plasmodium apical membrane antigen-1*. J Biol Chem, 1996. **271**(46): p. 29446-52.
67. Yap, A., et al., *Conditional expression of apical membrane antigen 1 in Plasmodium falciparum shows it is required for erythrocyte invasion by merozoites*. Cell Microbiol, 2014. **16**(5): p. 642-56.
68. Escalante, A.A., 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. **113**(2): p. 279-87.
69. Smythe, J.A., et al., *Structural diversity in the Plasmodium falciparum merozoite surface antigen 2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(5): p. 1751-5.
70. Holder, A.A., et al., *A malaria merozoite surface protein (MSP1)-structure, processing and function*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1992. **3**: p. 37-42.
71. McCarthy, J.S., et al., *A phase 1 trial of MSP2-C1, a blood-stage malaria vaccine containing 2 isoforms of MSP2 formulated with Montanide® ISA 720*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. 19.
72. Villard, V., et al., *Rapid Identification of Malaria Vaccine Candidates Based on α -Helical Coiled Coil Protein Motif*. PLOS ONE, 2007. **2**(7): p. e645.
73. Olugbile, S., et al., *Vaccine potentials of an intrinsically unstructured fragment derived from the blood stage-associated Plasmodium falciparum protein PFF0165c*. Infect Immun, 2009. **77**(12): p. 5701-9.
74. Céspedes, N., et al., *Plasmodium vivax antigen discovery based on alpha-helical coiled coil protein motif*. PLoS One, 2014. **9**(6).
75. Lupas, A., M. Van Dyke, and J. Stock, *Predicting coiled coils from protein sequences*. Science, 1991. **252**(5009): p. 1162-4.
76. Céspedes, N., et al., *Natural immune response to Plasmodium vivax alpha-helical coiled coil protein motifs and its association with the risk of P. vivax malaria*. PLoS One, 2017. **12**(6).
77. Kulangara, C., et al., *Sequence conservation in Plasmodium falciparum alpha-helical coiled coil domains proposed for vaccine development*. PLoS One, 2009. **4**(5): p. 0005419.
78. Ayadi, I., et al., *P. falciparum and P. vivax Orthologous Coiled-Coil Candidates for a Potential Cross-Protective Vaccine*. Front Immunol, 2020. **11**(574330).
79. Stoute, J.A., et al., *A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against Plasmodium falciparum malaria*. RTS,S Malaria Vaccine Evaluation Group. N Engl J Med, 1997. **336**(2): p. 86-91.

80. Birkett, A.J., *Status of vaccine research and development of vaccines for malaria*. *Vaccine*, 2016. **34**(26): p. 2915-2920.
81. WHO, *Guidelines on the quality, safety and efficacy of recombinant malaria vaccines targeting the pre-erythrocytic and blood stages of Plasmodium falciparum, Annex 3, TRS No 980*. 2014.
82. Bojang, K.A., et al., *Efficacy of RTS,S/AS02 malaria vaccine against Plasmodium falciparum infection in semi-immune adult men in The Gambia: a randomised trial*. *Lancet*, 2001. **358**(9297): p. 1927-34.
83. Abdulla, S., et al., *Randomized, controlled trial of the long term safety, immunogenicity and efficacy of RTS,S/AS02(D) malaria vaccine in infants living in a malaria-endemic region*. *Malar J*, 2013. **12**(11): p. 1475-2875.
84. Richards, J.S. and J.G. Beeson, *The future for blood-stage vaccines against malaria*. *Immunol Cell Biol*, 2009. **87**(5): p. 377-90.
85. Duffy, P.E. and D.C. Kaslow, *A novel malaria protein, Pfs28, and Pfs25 are genetically linked and synergistic as falciparum malaria transmission-blocking vaccines*. *Infect Immun*, 1997. **65**(3): p. 1109-13.
86. Cao, Y., et al., *Immunological Cross-Reactivity between Malaria Vaccine Target Antigen P48/45 in Plasmodium vivax and P. falciparum and Cross-Boosting of Immune Responses*. *PLoS One*, 2016. **11**(7).
87. J.C. Yombi (1), U.N.O. LA MALARIA : ASPECT CLINIQUE ET THÉRAPEUTIQUE. Available from: https://www.louvainmedical.be/sites/default/files/content/article/pdf/yombiijc_0.pdf (consulte le 09/05/2023).
88. Vandoolaeghe, P. and L. Schuerman, *[The RTS,S/AS01 malaria vaccine in children aged 5-17 months at first vaccination]*. *Pan Afr Med J*, 2018. **30**(142).
89. OMS. *Rapport mondial sur le paludisme 2018*. 2018; Available from: <https://www.who.int/fr/news-room/questions-and-answers/item/world-malaria-report-2018>.
90. PNLP. *PLAN STRATEGIQUE DE LUTTE CONTRE LE PALUDISME 2013-2017*. 2017; Available from: https://www.severemalaria.org/sites/mmv-smo/files/content/attachments/2017-07-25/Mali%20malaria%20PStrag%202013-17PNLP_0.pdf.
91. Kante, S., *Réactivité croisée des antigènes Pf27, Pf43 et Pf45 de P. falciparum avec leurs orthologues Pv27, Pv43 et Pv45 de P. vivax aux sera des volontaires vivant à Kéniéroba, Mali*. 2021, These Pharmacie. p. 80.
92. Konaté, D., et al., *Effect of routine seasonal malaria chemoprevention on malaria trends in children under 5 years in Dangassa, Mali*. *Malar J*, 2020. **19**(1): p. 137.
93. Konaté, D., et al., *Effectiveness and Community Acceptance of Extending Seasonal Malaria Chemoprevention to Children 5 to 14 Years of Age in Dangassa, Mali*. *Am J Trop Med Hyg*, 2021. **106**(2): p. 648-654.
94. Nacher, M., et al., *Association of helminth infection with decreased reticulocyte counts and hemoglobin concentration in Thai falciparum malaria*. *Am J Trop Med Hyg*, 2001. **65**(4): p. 335-7.
95. Ateba, F.F., et al., *Spatio-Temporal Dynamic of Malaria Incidence: A Comparison of Two Ecological Zones in Mali*. *Int J Environ Res Public Health*, 2020. **17**(13).
96. Barry, A. and D. Hansen, *Naturally acquired immunity to malaria*. *Parasitology*, 2016. **143**(2): p. 125-128.
97. Doolan, D.L., C. Dobaño, and J.K. Baird, *Acquired immunity to malaria*. *Clin Microbiol Rev*, 2009. **22**(1): p. 13-36, Table of Contents.
98. von Fricken, M.E., et al., *Age-specific malaria seroprevalence rates: a cross-sectional analysis of malaria transmission in the Ouest and Sud-Est departments of Haiti*. *Malar J*, 2014. **13**: p. 361.

99. Doodoo, D., et al., *Cohort study of the association of antibody levels to AMA1, MSP119, MSP3 and GLURP with protection from clinical malaria in Ghanaian children*. Malaria Journal, 2008. **7**(1): p. 142.
100. Denis, J., et al., *[Exploration of vaccine immunogenicity]*. Rev Francoph Lab, 2022. **2022**(540): p. 40-52.
101. Rogier, C., D. Commenges, and J.F. Trape, *Evidence for an age-dependent pyrogenic threshold of Plasmodium falciparum parasitemia in highly endemic populations*. Am J Trop Med Hyg, 1996. **54**(6): p. 613-9.
102. Sourabié, Y., et al., *[Humoral response to Plasmodium falciparum antigenic peptides (MSP1, MSP2, and SR-11.1) in subjects living in endemic areas]*. Pan Afr Med J, 2022. **41**: p. 250.
103. Leoratti, F.M., et al., *Pattern of humoral immune response to Plasmodium falciparum blood stages in individuals presenting different clinical expressions of malaria*. Malar J, 2008. **7**: p. 186.
104. Balam, S., et al., *Immunogenicity of dimorphic and C-terminal fragments of Plasmodium falciparum MSP2 formulated with different adjuvants in mice*. Vaccine, 2016. **34**(13): p. 1566-1574.
105. Kwenti, T.E., et al., *Variation in the immune responses against Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 and apical membrane antigen-1 in children residing in the different epidemiological strata of malaria in Cameroon*. Malaria Journal, 2017. **16**(1): p. 453.
106. Wang, Q., et al., *Naturally Acquired Antibody Responses to Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum Merozoite Surface Protein 1 (MSP1) C-Terminal 19 kDa Domains in an Area of Unstable Malaria Transmission in Southeast Asia*. PLOS ONE, 2016. **11**(3): p. e0151900.
107. Kyei-Baafour, E., et al., *Suitability of IgG responses to multiple Plasmodium falciparum antigens as markers of transmission intensity and pattern*. PLoS One, 2021. **16**(4): p. e0249936.

9. ANNEXES

9.1. Technique de la goutte épaisse

➤ Principe

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

➤ Matériel

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

Lieu du prélèvement

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

➤ Réalisation de la goutte épaisse

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

- en tenant la main gauche du malade la paume tournée vers le haut, choisir le troisième doigt après le pouce (le gros orteil peut être utilisé chez les nourrissons. le pouce ne doit jamais être utilisé chez les enfants ou chez les adultes).
- avec un tampon de coton légèrement imbibé d'alcool, nettoyer le doigt en appuyant fermement pour enlever la saleté et la graisse du bout du doigt ;
- avec un chiffon de coton propre, essuyer le doigt en appuyant fermement stimuler la circulation du sang ;
- avec un vaccinostyle stérile, piquer le bout du doigt d'un seul geste ;

- Essuyer la première goutte de sang avec du coton sec. S'assurer qu'il ne reste pas de fibres de coton sur le doigt, qui pourraient se mélanger avec du sang ;
- appuyer doucement sur le doigt et recueillir une petite goutte de sang au milieu de la lame
- essuyer le sang restant sur le bout du doigt avec un tampon de coton ;
- tenir la lame supérieure par les bords ;
- placer le coin de l'autre lame au centre de la goutte de sang ;
- étendre légèrement la surface de la goutte par des mouvements spiralés
- appuyés de la lame
- assurer cette défibrination mécanique pendant quelques secondes et étendre la goutte environ 1 cm de diamètre ;
- laisser la préparation à plat, à l'abri de la poussière, de la chaleur et des mouches pendant deux heures en zone sahélienne. Respecter ce long temps de séchage sinon il y a risque de décollement de la préparation lors de la coloration

➤ **Coloration au Giemsa**

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

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

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

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

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

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

Les lames sont ensuite rincées et séchées sur un râtelier.

➤ **Aspect**

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

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

Les noyaux des leucocytes sont en violet foncé ;

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

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

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

1. un compteur manuel à 4 chiffres est nécessaire pour dénombrer séparément les parasites et les leucocytes.
2. si, après avoir compté 300 leucocytes, on identifie 10 parasites ou plus, on note les résultats sur le formulaire de notification, en indiquant le nombre de parasites par 500 leucocytes.

3. dans chaque cas, le nombre de parasites par rapport au nombre de leucocytes peut être converti en nombre de parasites par micro par la simple formule mathématique suivante :

Nombre de parasites X 7500/nombre de leucocytes = parasites par μ l

9.2. Technique ELISA

➤ Réactifs

Protéines LR253, LR186, Pf27 et M4

PBS 1X

Sérums à tester (anticorps Primaire)

IgG anti-humaine de chevre (anticorps secondaire)

Lait

Substrat TMB (BD OptEIA cat 555214)

Solution de blocage à base d'acide sulfurique 1M (Merck, 1.00731.1000)

Eau distillée

Matériels

Microplaque ELISA à fond plat

Plaque de dilution de 1.8 ml ou 2 ml

Pipettes de 10µl, 20µl

Pipette multicanale de 50-300µl

Embouts de 10, 20, 200 et 1000µl

Gants

Minuteur

Papier hygiénique

Machine de lavage adaptée aux plaques ELISA

Un lecteur de plaque ELISA (Spectrophometre TECAN Nano Quant Inifinit M200 PRO)

➤ Procédures

1^{er} jour

Diluer les peptides à 5µg/ml dans du PBS 1X

Distribuer 50µl de cette solution dans chaque puit d'une plaque de polystyrène à 96 puits

Couvrir la plaque de para-film

Et faire incuber la plaque pendant une nuit à 4°C.

2^{eme} jour

Laver les plaques à l'aide de la machine de lavage des plaques ELISA

Bloquer avec du lait 5% PBS 1X et incuber pendant 2 heures à température ambiante

Dilué les sérums à tester à 1 :50

Distribuer 50 µl dans chaque puit et faire incuber pendant une heure à température ambiante

Laver les plaques à l'aide de la machine de lavage des plaques ELISA

Diluer l'anticorps secondaire à 1 :2000

Distribuer 50µl du substrat TMB et laisser agir pendant 15 minutes dans l'obscurité

Lire les plaques à l'aide d'un spectrophotomètre TECAN Nano Quant Infnit M200 PRO à une densité optique (DO) de 450nm/630nm

Enregistrer les données.

10. FICHE SIGNALÉTIQUE

Nom : MAIGA **Prénom :** Issoufi Yacouba

Téléphone : (+223) 74 40 27 91, **E-mail :** issoufiy.maiga@icermali.org / issoufmaiga007@gmail.com

Pays d'origine : MALI, **Ville de soutenance :** Bamako

Titre de la thèse : Réactivité des antigènes LR253, LR186, Pf27 et M4 du *P. falciparum* aux sera provenant de Dangassa et à de Koïla, deux zones d'endémie palustre au Mali

Année universitaire : 2022-2023

Lieu de dépôt : bibliothèque de la FMOS/FAPH de Bamako

Sources d'intérêt : Immunologie, Parasitologie, Santé Publique

Résumé

La Protéine 2 à la surface des mérozoïtes (MSP-2) est un candidat vaccin prometteur pour le stade sanguin du *Plasmodium*. Les peptides LR186, M4, LR253=MR140 mimant les différents (fragments D et C) du MSP-2 ainsi que Pf27 obtenus par l'outil bio-informatique peuvent être des potentiels candidats vaccins contre le paludisme. Cette étude avait pour but d'évaluer la réactivité de ces antigènes aux sera provenant des zones d'endémie au Mali. Les sera ont été collectés lors d'un passage transversal en décembre 2021 chez 211 personnes et testés en utilisant la technique d'ELISA. La séroprévalence était élevée à Dangassa qu'à Koïla pour les antigènes LR253 (91,3% vs 63,9%, $p=0,0001$), Pf27 (64,1% vs 17,6%, $p=0,0001$) et M4 (84,5% vs 72,2%, $p=0,031$). Le titre moyen des anticorps était significativement plus élevé chez les grands enfants et particulièrement à Dangassa. Les antigènes LR253, Pf27 et M4 ont montré une forte réactivité aux sera des individus vivant à Dangassa et à Koïla en fin de saison de transmission palustre et semblent être de nouveaux candidats vaccins contre le paludisme. D'autres études seront nécessaires pour bien caractériser ces antigènes.

Mots clés : Réactivité, Antigènes, *P. falciparum*, Enfants, Mali

Summary

Merozoite surface protein 2 (MSP-2) is a promising blood-stage vaccine candidate with weakly polymorphic domains. The peptides LR186, M4, LR253=MR140 mimicking the different (fragments D and C) of MSP-2 as well as Pf27 obtained by the bioinformatics tool may be potential malaria vaccine candidates. The aim of this study was to assess the reactivity of these antigens to sera from endemic areas in Mali. Sera were collected during a cross-sectional run in December 2021 from 211 individuals and tested using the ELISA technique. Seroprevalence was higher in Dangassa than in Koïla for LR253 (91.3% vs 63.9%, $p=0.0001$), Pf27 (64.1% vs 17.6%, $p=0.0001$) and M4 (84.5% vs 72.2%, $p=0.031$) antigens. Mean titers were significantly higher in older children, particularly in Dangassa. The LR253, Pf27 and M4 antigens showed strong reactivity to sera from individuals living in Dangassa and Koïla at the end of the malaria transmission season, with the potential to be selected as new malaria vaccine candidates. Further studies are required to fully characterize antigens.

Key words: Reactivity, Antigens, *P. falciparum*, Children, Mali

SERMENT D'HIPPOCRATES

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

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

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

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

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

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

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

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

Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.

Je le jure!