



\*\*\*\*\*



# Université des Sciences, Techniques et Technologiques de Bamako

\*\*\*\*\*

FACULTE DE PHARMACIE



## Titre

Réponse IgG contre la protéine majeure de la surface du mérozoïte (MSP1D) de *Plasmodium falciparum* chez des enfants de 0 à 15 ans à Samako, Mali.

Présentée et soutenue publiquement le 07/12/2015 devant le jury de la  
Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie du Mali  
par

**M. Amatigué Zeguimé**

Pour obtenir le grade de Docteur en pharmacie (diplôme d'Etat).

**Thèse N°:**

## Jury

**Président: Pr. Ogobara K. DOUMBO**

**Membres: Pr. Amagana DOLO**

**Dr. Issaka SAGARA**

**Co-directeur: Dr. Charles ARAMA**

**Directeur: Maitre de conférence agrégé Bourèma KOURIBA**

*Ce travail a été financé par le Partenariat Europe-Pays en Développement pour les Essais Cliniques  
(EDCTP)*

## DEDICACES

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

Je dédie ce travail:

A mon père, Anyéssa Zeguimé avec ta rigueur dans le travail et ta générosité, tu nous as suivi dans notre enseignement et notre éducation. Malgré tes multiples occupations tu as été toujours présent à nos côtés. Qu'**ALLAH** le **tout Puissant** t'accorde une longue vie comblée de bonheur, de santé.

A ma mère, Yassama Zeguimé tu nous as toujours assisté avec tes enseignements d'une mère de famille exemplaire. Tu nous as soutenu sans cesse avec grand amour. Que **DIEU** le **Clément** t'accorde santé, longévité et bonheur.

A mon frère et mes sœurs: Abdoulaye, Alimata, Aïchata, Mariam, Habibatou, Aminata, Fatoumata et Maïmouna. Vous m'avez entouré de chaleur familiale, je ne saurais jamais vous remercier assez pour vos soutiens. Que **DIEU** vous donne la chance et le courage de faire toujours mieux que moi.

A mon Tonton Anou .A. Zeguimé et à ma Tante Ramata Sénou pour m'avoir assisté avec patience et altruisme. Recevez ici toute notre gratitude et soyez rassurés de mon fidèle attachement.

A Dr Hachimi, Dr Traoré dit Batcho, Prosper, Hawa, Assan, Monique, Fatim, Maxim, Mariam, Hamidou, Illiace, Remy, Mohamed, Adama.

A l'ensemble de mes frères et mes sœurs pour leurs conseils et soutiens incommensurables. C'est avec vous que je partage la réussite de ce travail. Veuillez croire à mon attachement fraternel très profond. Que **Dieu** nous accorde la bonne santé et la longue vie pour vivre ensemble dans l'entente et la cohésion.

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

## REMERCIEMENTS

A tous les Professeurs responsables de cours à la FAPH (faculté de Pharmacie) et à la FMOS (faculté de Médecine et d'Odontostomatologie), pour la qualité de l'enseignement que nous avons reçu d'eux.

A mes maîtres: Dr Mahamadou Sissoko, Dr Doumbo Safi Niaré, Dr Abdoulaye Katilé, au Pr Abdoulaye Dabo, Pr Abdoulaye Djimdé, Dr Abdoulaye Koné, Dr Yamoussa Keita, Dr Seydou Arama, Dr Souleymane Dama, Dr Amadou Niangaly, Dr Antoine Dara, Dr Amadou Tapily, Dr Hamidou Niangaly, Dr Youssouf Tolo, Dr Bouba Niaré, Dr Raymon A Douyon, Dr Yacouba Samaké, Dr Drissa Coulibaly, Dr Karamoko Niaré  
Je ne pourrais jamais vous remercier assez pour votre bienveillance, votre disponibilité et votre sens élevé de l'humanité.

A Dr Issa Diarra sans qui je ne serai pas arrivé jusque-là. Vous avez guidé mes premiers pas au sein de l'unité. Vous m'avez initié aux différentes activités de terrain et de laboratoire. Vous avez été mon maître; mon confident; mon conseiller. Merci infiniment cher aîné, votre simplicité, votre courtoisie et votre amabilité m'ont permis d'intégrer très vite la vie d'équipe de chercheurs.

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

A toute ma promotion au sein du MRTC/DEAP: Mme Kayentao Nana Cissé, Cheick Oumar Guindo, Bourama Tangara, Boureima Guindo, Fatim Ballo, Sékou Sissoko, Dr Traoré Aminata Camara, Fatalmoudou Tandina, pour leurs conseils et soutiens incommensurables. C'est avec vous que je partage la réussite de ce travail. Veuillez croire à mon attachement fraternel très profond.

A tout le personnel du MRTC/DEAP.

A toutes et à tous, vous qui de près ou de loin m'avez soutenu, les mots me manquent pour vous exprimer toute ma joie et ma reconnaissance.

## Hommages au jury

A notre Maître et Président de Jury: **Professeur Ogobara K. DOUMBO**

- *Professeur Titulaire de Parasitologie-Mycologie à la FMOS et à la FAPH/USTTB,*
- *Président du Conseil de l'Université de Ségou,*
- *Médecin-chef du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires (DEAP),*
- *Directeur du Pôle d'Excellence de Recherche (PER) sur le Paludisme, Malaria Research and Training Center (MRTC),*
- *Membre correspondant de l'Académie Nationale de Médecine de France,*
- *Membre honoraire «Alpha Omega Alpha Honor Medical Society» des Etats-Unis,*
- *Chevalier des palmes académiques du CAMES.*
- *Chevalier de l'ordre national du Mali.*

Cher Maître, nous sommes fiers et très honorés d'être parmi vos élèves. L'immensité de vos qualités scientifiques fait de vous une référence internationale. Malgré vos multiples occupations nationales et internationales, votre disponibilité et votre encadrement rigoureux ne nous ont pas fait défaut. Par ailleurs, nous ne cesserons jamais de vous remercier pour tous les efforts que vous déployez en faveur de notre formation en parasitologie-mycologie.

Nous vous prions d'accepter cher Maître, le témoignage de nos sentiments les plus distingués et les plus respectueux.

A notre Maître et juge: **Professeur Amagana Dolo**

- Professeur de parasitologie-Mycologie à la FAPH/FMOS,
- Directeur de la première école doctorale du Mali.

Malgré vos multiples occupations, vous avez accepté de juger notre travail. Homme de grande simplicité, nous avons beaucoup admiré vos qualités pédagogiques et humaines. Votre disponibilité constante fait de vous un maître idéal admiré de tous. Vos qualités humaines, votre rigueur dans la démarche scientifique et surtout votre sens élevé de la responsabilité font de vous un maître exemplaire.

Veillez accepter, cher maître le témoignage de notre profonde gratitude et nos plus hautes considérations.

A notre Maître et Juge: **Docteur Issaka SAGARA**

- Médecin PhD en biostatistique,
- Chargé de recherche au MRTC/DEAP/FMOS.

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de siéger dans ce jury, malgré vos multiples occupations. Nous avons été marqué par votre accueil combien chaleureux et votre disponibilité à analyser les données de ce travail. Cher maître, votre sympathie, votre ouverture, votre disponibilité, votre souci du travail bien fait, font de vous une personne qu'on ne peut s'empêcher d'admirer. Vos critiques et suggestions ont été d'un apport inestimable dans la réalisation de ce document.

Veillez retrouver ici cher maître toute notre reconnaissance.

A notre maitre et co-directeur de thèse: **Docteur Charles ARAMA**

- Pharmacien et immunologiste,
- Chargé de recherche au MRTC/DEAP,

Cher maitre, nous sommes très honorés que vous codiriez les travaux de notre thèse, ce qui nous offre l'opportunité de vous exprimer notre profonde admiration et notre profonde gratitude. Votre générosité, votre disponibilité, votre rigueur scientifique et vos qualités d'encadreur sont admirées de tous. Vos conseils et suggestions nous ont permis d'améliorer la qualité de ce travail. Recevez ici cher maitre l'expression de notre profonde reconnaissance.

A notre Maître et Directeur de thèse: **Professeur Agrégé Bourèma KOURIBA**

- Maître de Conférences Agrégé d'Immunologie,
- Responsable de l'Unité d'Immunologie Cellulaire et Moléculaire des Parasites du MRTC/DEAP,
- Directeur Scientifique du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux du Mali,
- Président de la Société Malienne d'Immunologie.

Nous avons été émerveillés par la qualité de vos cours d'immunologie en troisième année de pharmacie. Votre courage, votre rigueur scientifique, votre disponibilité, votre compréhension, votre sens élevé pour le respect de la dignité humaine sont entre autres des qualités enviées de tous.

Vous resterez pour nous un exemple à suivre. Vous avez accepté de diriger ce travail malgré vos multiples occupations.

Nous vous prions d'accepter cher Maître, le témoignage de nos sentiments les plus distingués et les plus respectueux.



## Liste des figures et des tableaux

### Figures

<b>Figure 1:</b> Séquence en acides aminés de MSP1 chez; 3D7 et Wellcome .....	17
<b>Figure 2:</b> Assemblage et processing du complexe MSP1 .....	18
<b>Figure 4:</b> Distribution des taux d'IgG anti-MSP1D selon la parasitémie.....	33
<b>Figure 5:</b> Distribution du taux d'IgG anti-MSP1D selon le groupe d'âge chez les enfants de Samako pendant la saison de transmission.....	34
<b>Figure 6:</b> Distribution du taux naturel d'IgG anti-MSP1D selon le passage chez les enfants de 0-15ans vivant à Samako en 2011.....	33
<b>Figure 7:</b> Distribution des taux d'IgG anti-MSP1D selon le passage chez les classes d'âge des enfants de 0-15ans vivant à Samako.....	34
<b>Figure 8:</b> Distribution des taux d'IgG anti-MSP1D selon le passage d'une même classe d'âge des enfants de 0-15ans vivant à Samako.....	34
<b>Figure 9:</b> Courbe de survie en fonction de la séroposivité en IgG anti-MSP1D chez les enfants de 0-15ans à Samako en 2011.....	35

### Tableaux

<b>Tableau I:</b> Répartition des enfants de 0-15ans à Samako selon le sexe.....	30
<b>Tableau II:</b> Répartition des enfants de 0-15ans selon la classe d'âge.....	30
<b>Tableau III:</b> Prévalence de l'accès palustre au cours des trois passages chez des enfants de 0-15ans à Samako en 2011.....	30
<b>Tableau IV:</b> Incidence du paludisme selon la classe d'âge chez les enfants .....	31
<b>Tableau V:</b> Prévalence de l'infection palustre selon la classe d'âge ... ..	31
<b>Tableau VI:</b> Séroprévalence en IgG anti-MSP1D selon le passage chez les enfants de 0-15ans à Samako .....	32
<b>Tableau VII:</b> Séroprévalence en IgG anti-MSP1D selon les classes d'âge chez les enfants de 0-15ans à Samako .....	32

## LISTE DES ABREVIATIONS

**AA:** Acide Aminé

**ADCC:** Antibody Dependent Cell mediated Cytotoxicity

**ADCI:** Inhibition Cellulaire Dépendante des Anticorps

**CMH:** Complexe Majeur d'Histocompatibilité

**ADN:** Acide Désoxyribonucléique

**C3:** Fraction 3 du Complement

**CD:** Cluster of Differentiation

**Cp:** Comprimé

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

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

**EDSM-V:** Enquête Démographique et de Santé du Mali-V

**ELISA:** Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

**Fc:** Fragment Cristallisable

**GE:** Goutte Epaisse

**GM-CSF:** Granulocyte Macrophage-Colony-Stimulating Factor

**GPI:** Glycosyl Phosphatidyl Inositol

**IFN- $\gamma$ :** Interferon gamma

**IgG:** Immunoglobuline G

**IL:** Interleukine

**kDa:** kilo Dalton

**MII:** Moustiquaires Imprégnées d'Insecticide

**MRTC:** Malaria Research and Training Center

**MSP1:** Merozoite Surface Protein1

**NK:** Natural Killer cells

**OMS:** Organisation Mondiale de la Santé

**NO:** Oxyde Nitrique

**PBMC:** Mononuclear Cells from human Peripheral Blood

**PfEMP 1:** *Plasmodium falciparum* Erythrocytes Membrane Protein 1

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

**RESA:** Antigène de Surface de l'Erythrocyte infecté par les formes «Ring» de *Plasmodium*

**SUB:** Subtilisine enzyme

**TDR:** Test de Diagnostic Rapide

**Th:** Lymphocyte T helper

**TNF:** Tumor Necrosis Factor

## Table des matières

1. Introduction.....	13
2. Objectifs.....	16
2.1. Objectif général .....	13
2.2. Objectifs spécifiques.....	13
3. Généralités .....	17
3.1. Description de l'antigène de surface du merozoite1(MSP1).....	17
3.1.1 Biosynthèse, structure et fonction de MSP1.....	17
3.1.2. Expression de la protéine recombinante .....	19
3.2 Immunité dirigée contre MSP1 et ses fragments.....	19
3.2.1 Immunité cellulaire dirigée contre MSP1 et ses fragments .....	19
3.2.2 Immunité humorale dirigée contre MSP1 et ses fragments.....	20
3.3 Modification visant à améliorer MSP1.....	21
3.4 Essais cliniques de vaccinations.....	22
3.5 Immuno-Protection.....	22
4 Matériels et méthodes.....	24
4.1 Lieu d'étude .....	24
4.2 Type et période de l'étude .....	25
4.2.1 Population d'étude.....	25
4.4 Variables mesurées.....	26
4.5 Collecte des données .....	26
4.6 Considérations éthiques .....	27
4.7 Méthodes d'étude .....	27
5. Saisie et analyse des données.....	29
6. Résultats.....	28
6.1 Données socio-démographiques.....	28
6.2 Données parasitologiques et immunologiques.....	30
7. Discussion .....	39
8. Conclusion et recommandations .....	44
10. Références .....	45

## 1. Introduction

Le paludisme est une érythrocytopathie fébrile, hémolysante due à la présence et à la multiplication dans les hépatocytes puis dans les érythrocytes d'un hématozoaire du genre *Plasmodium*, transmis à un hôte vertébré par la piqûre de l'anophèle femelle infectée. Cinq espèces de Plasmodies: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* et *P. knowlesi* infectent *Homo sapiens*. Cette cinquième espèce est simienne pour laquelle des cas d'infections humaines ont été rapportées <sup>1</sup>.

La liste des espèces pouvant infecter l'homme risque de s'allonger car récemment un premier cas de paludisme à *P. cynomolgi*, naturellement acquis chez l'homme a été décrit <sup>2</sup>.

Parmi les cinq espèces citées, *P. falciparum* est la plus virulente et est responsable de la quasi-totalité des décès dus au paludisme due à sa capacité de variation antigénique, il peut échapper à la réponse immunitaire protectrice de l'hôte. Ce parasite est responsable des formes graves compliquées, létales du paludisme (neuro-paludisme, anémie sévère...) <sup>3</sup>. Sa virulence est due en partie à la capacité des érythrocytes parasités à former des rosettes et à cytoadhérer dans les capillaires des organes comme le cerveau, les poumons, l'intestin et le placenta <sup>4</sup>. Les globules rouges infectés adhèrent aux cellules endothéliales et à d'autres cellules sanguines par l'intermédiaire de la protéine variable «*P. falciparum* Erythrocytes Membrane Protein-1 » (PfEMP 1) codée par une famille de gènes dits «*var*» <sup>5</sup>.

Malgré des efforts immenses de lutte, le paludisme demeure toujours un problème de santé publique en Afrique Subsaharienne. En effet il continue de tuer; essentiellement ceux de moins de cinq ans et des femmes enceintes. Ces dernières particulièrement, les primigestes sont plus sensibles aux conséquences d'une impaludation; avec un risque d'accouchement prématuré et un faible poids à la naissance des bébés <sup>6</sup>. Du fait de la complexité de son cycle de vie, de sa résistance aux antipaludiques, des échecs observés dans les luttes anti-vectorielles et aussi d'une compréhension incomplète des paramètres immunitaires assurant la protection contre la maladie.

Globalement, on estime à 3,2 milliards le nombre de personnes à risque d'être infectées par le paludisme à travers le monde. Selon les dernières estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 198 millions de cas de paludisme ont été enregistrés dans le monde en 2014 avec 584.000 décès <sup>7</sup>.

Au Mali, selon l'annuaire des statistiques du Ministère de la santé, le paludisme demeure l'endémie majeure et la première cause de morbidité et de mortalité particulièrement chez les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes. Malgré les progrès accomplis dans le domaine de la prévention et du traitement, le paludisme est l'affection la plus fréquente et représente 42% des motifs de recours aux soins dans la population générale (**EDSM-V**).

Face à ce fléau qui pèse lourdement sur les économies des pays d'endémie, plusieurs stratégies ont été développées avec comme objectif ultime l'élimination/éradication du paludisme. Le développement d'un vaccin antipaludique efficace et de coût abordable est le moyen idéal d'atteindre cet objectif. Depuis des décennies le développement d'un vaccin efficace se heurte à des difficultés telles que la complexité du parasite, son polymorphisme génétique avec comme conséquence la variabilité antigénique et la mauvaise connaissance des mécanismes immunitaires de protection de l'organisme contre l'infection et la maladie <sup>8</sup>. Cependant le développement de vaccin antipaludique reste possible.

En effet il est bien évident que les sujets vivant en zones d'endémies palustres, développent avec l'âge une certaine résistance, ou prémunition au paludisme. Cette prémunition est le résultat d'une exposition répétée et continue aux piqûres infestantes d'anophèles pendant plusieurs années. Ce qui fait que les adultes en zone d'endémie sont mieux protégés que les enfants au paludisme. L'exploration de la réponse immunitaire anti-palustre a permis d'identifier plusieurs antigènes potentiels candidats vaccins dont la protéine majeure de surface du merozoite-1 (MSP1). Il est l'un des premiers à avoir été testé sur le terrain au Mali <sup>9</sup>. Cet antigène peut être scindé en plusieurs fragments distincts dont deux fragments de 19 kDa et de 42kDa: MSP1<sub>19</sub> et MSP1<sub>42</sub>.

Le «Malaria Research and Training Center» (MTRC), s'est engagé depuis plus de 15 ans dans la voie de développement de vaccins anti-paludiques. C'est ainsi qu'il a conduit plus d'une quinzaine d'essais cliniques de phase I et II de candidats vaccins antipaludiques principalement MSP1<sub>19</sub>, AMA-1, MSP-3-LSP, *PfSPZ*, *Pfs25* et *Pfs230*.

Bujard et collaborateurs ont décrit que la protéine entière MSP1D de 190kDa est plus immunogène, ciblant à la fois le stade hépatique et érythrocytaire contrairement à ses fragments de 42 et 19kDa (Bujard H. Communication personnelle, 2012).

Nous avons voulu tester cette hypothèse en évaluant la réponse Immunoglobuline G (IgG) contre la protéine MSP1D chez des enfants exposés naturellement à l'infection palustre au Mali.

## **2. Objectifs**

### **2.1. Objectif général**

Evaluer la réponse IgG contre la protéine MSP1D au cours d'une saison de transmission chez des enfants de 0 à 15 ans à Samako.

### **2.2. Objectifs spécifiques**

- 1) Déterminer la prévalence ainsi que l'incidence du paludisme chez les enfants de 0 à 15 ans à Samako.
- 2) Mesurer la réponse IgG anti-MSP1D au cours des différents passages transversaux chez enfants de 0 à 15 ans à Samako.
- 3) Etablir une association entre le taux d'IgG anti-MSP1D et la protection contre l'infection et l'accès palustre.



### 3. Généralités

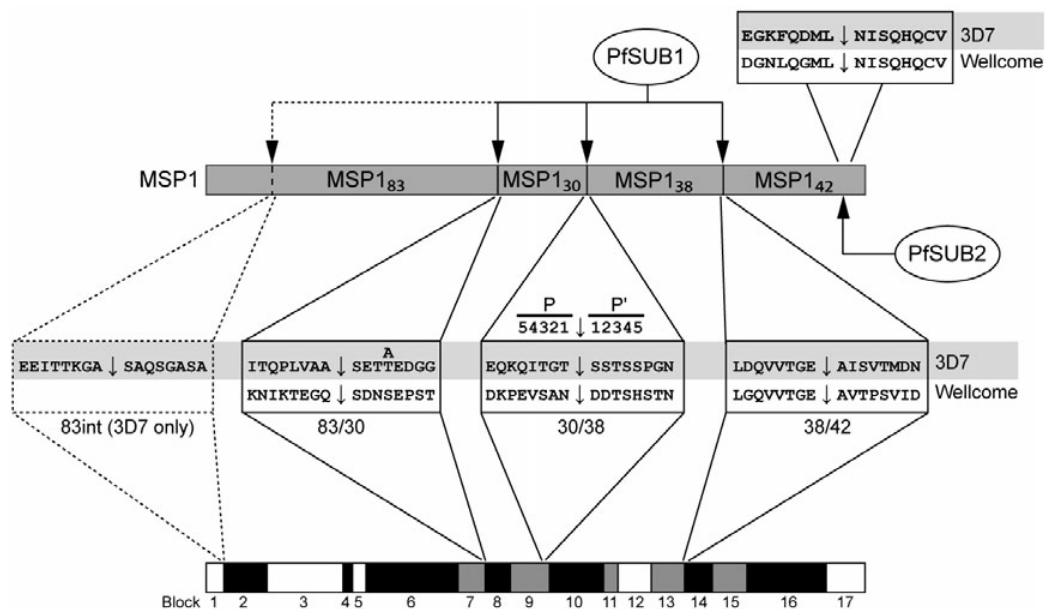
#### 3.1 Description de la protéine majeure de surface du mérozoïte

##### 3.1.1 Biosynthèse, structure et fonctions de MSP1

MSP1 est une grande glycoprotéine d'environ 190kDa nécessaire dans l'invasion des érythrocytes par le mérozoïte. Elle varie en taille et en séquence d'acides aminés selon les lignées parasitaires. Toutes les espèces de *Plasmodium* possèdent le génotype orthologue de MSP1 et la protéine est soumise à un clivage semblable chez toutes les espèces où le phénomène a été étudié<sup>10</sup>. Elle est synthétisée au cours de la schizogonie (hépatique et érythrocytaire) comme un polypeptide précurseur unique couplé à MSP6 et 7 et exprimée à la surface du mérozoïte sur lequel elle est ancrée par un glycolipide (Glycosyl Phosphatidyl Inositol; GPI).

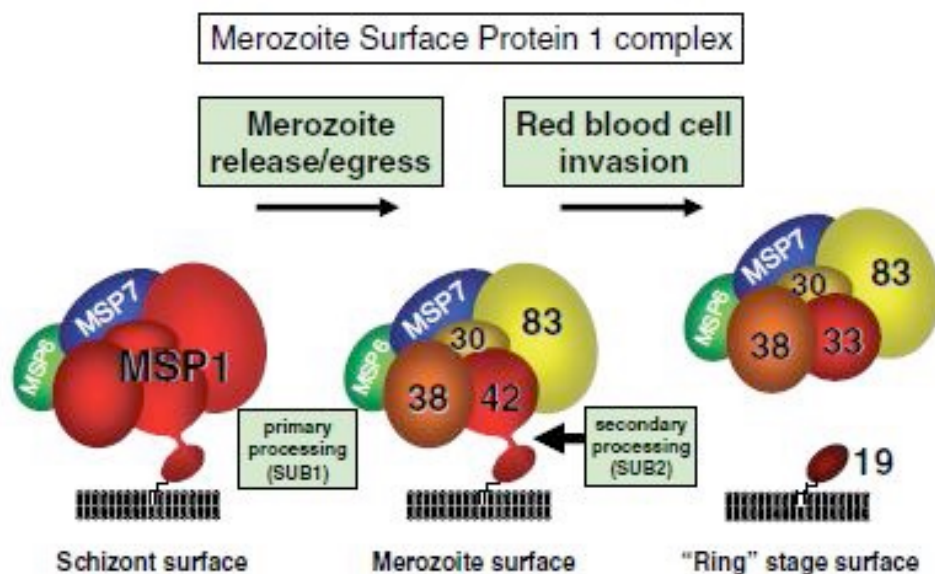
MSP1 est codée par un gène localisé sur le chromosome 9 du *Plasmodium*.

La structure primaire de la protéine a été déduite de l'analyse des séquences des gènes de plusieurs clones de *Plasmodium*<sup>10</sup>. La séquence de la protéine est divisée en blocs numérotés de 1 à 17. Il existe trois types de blocs: conservés, semi-conservés et variables. (Figure 1).



**Figure1: Séquence en acides aminés de MSP1<sub>190</sub> chez deux souches; 3D7 et Wellcome** (Withers-Martinez *et al*, 2002; Yeoh *et al*, 2007; Koussis *et al*, 2009).

Après sa synthèse, MSP1<sub>190</sub> subit un premier clivage juste avant la rupture des schizontes par une enzyme (protéase) appelé subtilisine 1 (SUB1). Ce clivage de MSP1 par SUB1 est un processus ordonné, dans lequel le site de clivage primaire le plus proche de l'extrémité C-terminale (le site de 38/42) est clivé en dernier, quel que soit le polymorphisme dans le reste de la protéine. La protéase SUB1 est sécrétée à partir d'une organelle spécialisée qui est l'exonème; et clive MSP1<sub>190</sub> en quatre fragments, 83kDa (MSP1<sub>83</sub>), 30kDa (MSP1<sub>30</sub>), 38kDa (MSP1<sub>38</sub>) et 42kDa (MSP1<sub>42</sub>) ce dernier qui reste lié de façon non covalente en un complexe à la surface du mérozoïte <sup>10</sup>. Lorsque le mérozoïte envahit un globule rouge, un second clivage, initié par la subtilisine 2 (SUB2) sécrétée par le micronème et clive le fragment 42 kDa de en deux fragments de 33 et 19 kDa <sup>10</sup>. En conséquence, le fragment MSP-1<sub>33</sub> est libéré de la surface du parasite et le reste du complexe MSP1<sub>19</sub> est retenu par son ancrage GPI <sup>11</sup>. (Figure 2).



**Figure2: Assemblage et clivage du complexe MSP1<sub>190</sub> d'après Holder, 2009.**

### **3.1.2 Expression de la protéine recombinante**

Devant la difficulté de cultiver *in vitro* les parasites et d'obtenir ainsi des quantités importantes de MSP1<sub>190</sub>, il est devenu évident que le seul moyen pour produire un candidat vaccin nécessite un recours aux techniques permettant l'utilisation des peptides ou protéines recombinantes. Cependant MSP1<sub>190</sub> est très difficile à produire en entier à cause de sa grande taille. Ce qui a conduit les chercheurs à s'intéresser à MSP1<sub>19</sub> qui se situe dans la partie C-terminale de la protéine particulièrement conservée. Ainsi par génie génétique des fragments recombinants de MSP1<sub>190</sub> ont été produits. Cette technique utilise la transfection de cellules hôtes (*E. coli*, levures, et baculovirus...) avec les gènes codant pour les fragments d'antigènes désirés lesquels seront exprimés sous la forme d'une protéine recombinante. Après l'expression et purification des fragments, ils peuvent être reliés entre eux par des liaisons chimiques pour former la protéine MSP1<sub>190</sub><sup>38</sup>.

## **3.2 Immunité dirigée contre MSP1<sub>190</sub> et ses fragments**

La protéine MSP1<sub>190</sub> est une cible de la réponse immunitaire cellulaire et humorale.

### **3.2.1 Immunité cellulaire**

MSP1<sub>190</sub> est un candidat vaccin, qui se distingue des autres candidats en particulier parce qu'il est exprimé à la fois au stade hépatique et érythrocytaire. En outre, il contient de nombreux épitopes des cellules T et B. La multitude des épitopes potentiellement immunogènes constitue un avantage particulier pour l'élaboration d'un vaccin qui pourrait prendre en compte l'hétérogénéité génétique des populations cibles (Bujard H. Communication personnelle, 2012). Ainsi le vaccin basé sur MSP1D peut donc induire une réponse cellulaire et ou humorale au niveau hépatique ainsi qu'érythrocytaire.

Une étude a montré que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> peuvent conférer une protection partielle contre le stade hépatique avancé de *P. yoelii* et que les Lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifiques de MSP1<sub>33</sub> assurent une protection contre le parasite au stade sanguin chez la souris en l'absence d'anticorps<sup>12</sup>. Le fragment MSP1<sub>33</sub>, contient des épitopes reconnus par les lymphocytes T. Ce qui pourrait contribuer à améliorer la réponse immunitaire contre MSP1<sub>19</sub>.

Une étude menée au Brésil a montré que MSP1<sub>19</sub> de *P. vivax* est capable d'induire une réponse cellulaire T (lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>) et produire du TNF, IL-10 et l'IFN- $\gamma$  <sup>13</sup>.

De façon indirecte, MSP1 induit la production des cytokines telles que le TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , le GM-CSF et IL-1 $\beta$  qui activent les cellules phagocytaires telles que les monocytes et les neutrophiles qui augmentent significativement leur capacité phagocytaire des mérozoïtes <sup>14</sup>. Les monocytes peuvent aussi inhiber la croissance des parasites par le mécanisme d'inhibition cellulaire dépendante des anticorps (ADCI) <sup>15</sup>.

### 3.2.2 Immunité Humorale

Les travaux de **Bujard.H** ont montré qu'un vaccin basé sur MSP1<sub>190</sub> pourrait induire un large répertoire de lymphocytes B qui produiront des anticorps cytophiliques (IgG1 et 3) protecteurs contre le parasite du stade sanguin. Les anticorps spécifiques à MSP1<sub>190</sub> empêchent non seulement l'invasion des érythrocytes, mais aussi le développement intracellulaire du parasite. La réponse dirigée contre MSP1<sub>190</sub> induit trois types différents d'anticorps monoclonaux et polyclonaux: des anticorps inhibiteurs de l'invasion des globules rouges, des anticorps bloquants qui favorisent l'invasion des globules en compétissant avec les premiers cités et des anticorps neutres qui n'ont aucun effet <sup>16</sup>.

Les résultats d'une étude effectuée au Mali suggèrent que la susceptibilité réduite des Peulhs au paludisme pourrait être liée à une réponse humorale spécifique anti-MSP1 plus élevée que celle des Dogons <sup>33</sup>.

Une étude effectuée en Iran en 2015 a décrit que les anticorps anti-MSP1<sub>19</sub> étaient les IgG cytophiliques (IgG1 et IgG3) <sup>17</sup>. Des études antérieures ,examinant le potentiel d'inhibition de la croissance du parasite par les anticorps de lapin contre des protéines recombinantes de MSP1 ont non seulement révélé que les anticorps ciblant les épitopes de MSP1 peuvent interférer efficacement avec la multiplication *in vitro* du parasite, mais aussi que les quatre fragments de MSP1 diffèrent considérablement dans leur immunogénicité, telle que reflétée par les titres d'anticorps dans le sérum des animaux immunisés et des personnes vivant dans des régions où le paludisme est endémique en l'Afrique de l'Ouest et l'Inde. Parmi les fragments issus de MSP1; MSP142 est le fragment le plus immunogène.

Ces travaux montrent aussi que les anticorps ciblant chacun des composants distincts du complexe MSP1/6/7 peuvent en effet inhiber l'action de SUB2 et sont donc capables d'interrompre cette étape importante dans la voie de maturation du parasite <sup>18</sup>.

### **3.3 Modifications visant à améliorer l'antigène MSP1<sub>190</sub>**

Il existe différentes approches pour améliorer l'immunogénicité de MSP1<sub>190</sub>. Une de ces approches serait d'enlever de la protéine les épitopes qui induisent les anticorps bloquants sans affecter les épitopes des anticorps inhibiteurs; en limitant la taille de la protéine par mutagenèse dirigée. Les substitutions d'acides aminés affectant l'apprêtement et la présentation de l'antigène sont importantes. Dans un modèle rongeur, il a été montré que la protéine native MSP1<sub>190</sub> est un mauvais substrat pour les protéases dans l'apprêtement de l'antigène dans les lysosomes des cellules dendritiques.

En outre une autre approche serait la formation et le renforcement des ponts disulfures de la protéine. En effet les protéines réduites ou alkylées (ayant perdues leurs ponts disulfures) induisent une réponse immunitaire non protectrice liée en l'absence d'anticorps dirigés contre les épitopes conformationnels de la protéine <sup>19</sup>. Une étude a permis de mettre en évidence l'importance des ponts disulfures dans l'existence d'épitopes des cellules T et B de la protéine <sup>20</sup>.

Une autre approche possible pour améliorer l'immunogénicité de MSP1<sub>190</sub> serait l'introduction d'acides aminés qui favorisent le clivage sans avoir un effet considérable sur la séquence structurale de la protéine ou sur la présence d'épitopes des cellules B et T. En effet, l'insertion d'asparagines supplémentaires reconnues par l'asparagine endoprotéinase des lysosomes des cellules dendritiques pourrait accélérer le clivage de MSP1<sub>190</sub> <sup>19</sup>.

Le fragment N-terminal de MSP1<sub>42</sub> qui est MSP1<sub>33</sub>; il a été démontré qu'elles possèdent des épitopes T auxiliaires qui influencent la réponse anticorps protecteurs contre MSP1<sub>19</sub> <sup>21</sup>.

### 3.4 Essais cliniques de vaccinations

Les études de phase Ib effectuées au Mali ont montré que FMP1/AS02A (MSP1<sub>42</sub>) a été bien toléré et hautement immunogène chez les adultes exposés à la transmission du paludisme saisonnière intense et a induit des réponses immunitaires contre des clones de parasites génétiquement différents <sup>22</sup>.

Alors qu'une autre étude a montré que le polymorphisme de MSP1<sub>19</sub> peut compromettre l'efficacité d'un vaccin à base de cet antigène <sup>23</sup>. Au Kenya une étude en phase Ib a montré que le vaccin FMP1/AS02A était toléré et immunogène chez les enfants exposés au paludisme et que la réponse immunitaire était dose-dépendante <sup>24</sup>.

Une combinaison de MSP1, MSP-2 et RESA (Antigène de surface de l'érythrocyte infecté par les formes «ring» de *Plasmodium*) en phase IIb mené en Papouasie nouvelle Guinée a montré son efficacité mais aussi sa capacité à agir sur les parasites ne portant pas l'allèle présent dans le vaccin <sup>25</sup>. Bien que la région C-terminale de MSP1 soit la cible d'une réponse immunitaire protectrice, les résultats d'un essai vaccinal en phase IIb utilisant FMP1/ASO2, ont été décevants, car les titres d'anticorps des sujets vaccinés n'étaient pas corrélés avec la protection contre la maladie <sup>26</sup>. Il est possible que les anticorps produits chez les sujets vaccinés fussent des anticorps neutres ou bloquants.

### 3.5 Immuno-Protection

De nombreuses études ont montré que la région C-terminale de MSP1<sub>190</sub> est la cible des réponses immunes protectrices. Ces réponses sont médiées par des anticorps. En effet, les expériences d'immunisation dans le modèle murin utilisant *P. yoelii* ont montré le rôle de certains anticorps monoclonaux et polyclonaux dirigés contre l'extrémité C-terminal de MSP1<sub>190</sub><sup>27</sup>. En effet, de nombreuses études séro-épidémiologiques ont mis en évidence des associations entre une sensibilité réduite au paludisme clinique et la réponse humorale contre divers fragments de la protéine. Une protection complète dans le modèle de primate a été également signalée pour diverses préparations de protéines recombinantes dérivées du MSP1.

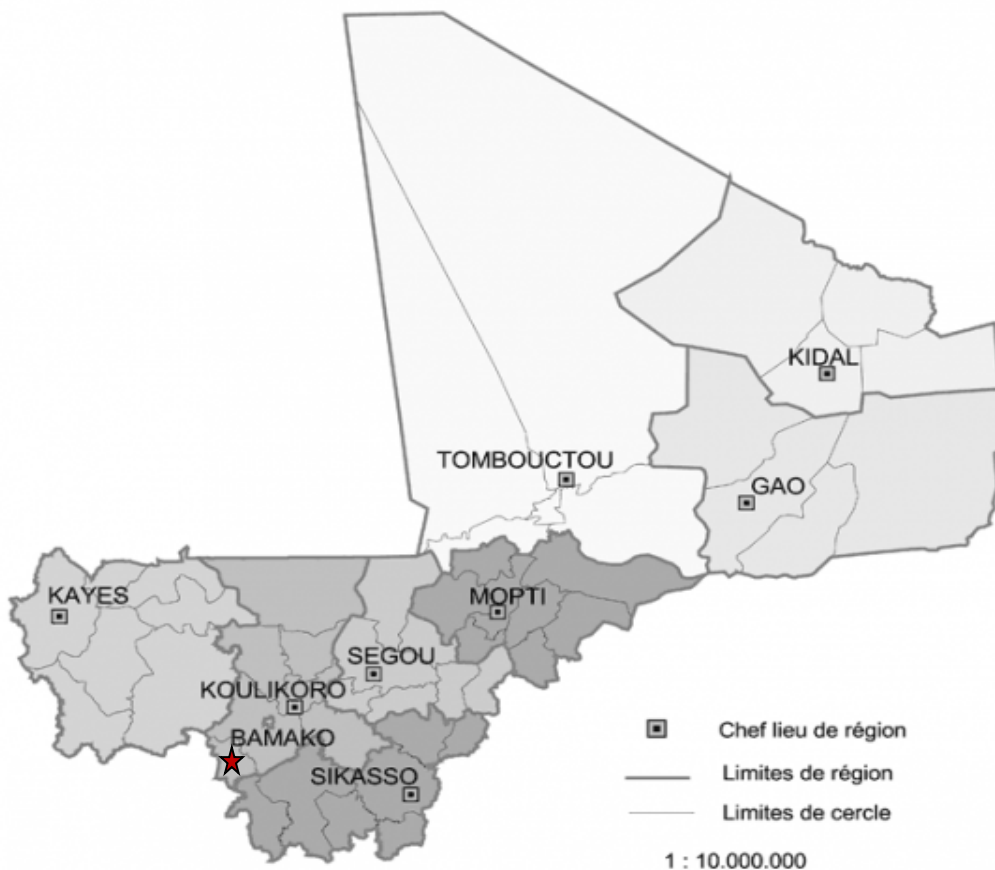
La vaccination avec MSP1 native et la protéine recombinante confèrent non seulement une protection, mais aussi un transfert passif entre souris des anticorps monoclonaux <sup>28</sup>. Comme l'antigénicité globale de MSP1 chez les lapins, les singes et les humains sont très proches, les résultats de cette étude devraient être d'un grand intérêt pour le développement de vaccins contre le paludisme basé sur MSP1.

Dans une étude au Kenya, les IgG dirigées contre MSP1<sub>19</sub> native étaient corrélées à la protection alors que celles contre MSP1<sub>19</sub> recombinante n'étaient pas protectrices. Cependant, des études dans d'autres populations des zones d'endémie d'Afrique, les anticorps anti-MSP1<sub>19</sub> recombinante produits avec *E. Coli* ont été associés à la protection contre le paludisme clinique. En outre, les anticorps anti-MSP1<sub>19</sub> recombinante produits avec les levures ont été associés à la protection contre la parasitémie et l'accès fébrile <sup>29</sup>. Cela suggère que du point de vue de l'immunogénicité, les épitopes protecteurs de la protéine native peuvent être mal représentés dans au moins certaines des constructions de MSP1 recombinantes.

## 4. Matériels et Méthodes

### 4.1 Lieu d'étude

Cette étude a été effectuée à Samako un village d'environ 2000 habitants situé à 5km de Bancoumana (l'un des sites d'essai vaccinal du MRTC) sur la route de Siby. La transmission du paludisme est essentiellement saisonnière, de juin à décembre. Le climat comprend une saison sèche (novembre à mai) et une saison pluvieuse (juin à octobre). La végétation est de type savane arborée. La principale activité économique est l'agriculture. L'élevage et la pêche sont également pratiqués dans le village. Il est situé dans la haute vallée du fleuve Niger à 60km au sud-ouest de Bamako. Les habitants sont essentiellement Malinké. (Figure3).



**Figure3: Situation géographique de Samako.** Source: [aspd.revues.org](http://aspd.revues.org)

★Samako.



## **4.2 Type, période et population de l'étude**

Nous avons effectué une étude de cohorte de juillet à décembre 2011. Elle était composée des enfants de 0 à 15 ans vivant à Samako. Un recensement de la population d'étude a été effectué au mois de Mai 2011. La population était composée de 2056 habitants majoritairement des malinkés. Elle était essentiellement composée de 1070 hommes et 986 femmes soit un sex ratio de 1.08.

### **Critère d'inclusion**

- Etre âgé de 0 à 15 années au moment du dépistage en juillet 2011,
- Etre un habitant permanent de Samako,
- Avoir un état général bon,
- Avoir obtenu le consentement éclairé écrit du parent ou du tuteur
- Etre disponible à participer au suivi pendant la période d'étude.

### **Critère de non inclusion**

- Avoir participé à un essai d'intervention clinique,
- Etre sous un traitement au long cours avec des médicaments ayant une activité antipaludique connue.

## **4.3 Echantillonnage**

La taille de l'échantillon a été déterminée en se basant sur la valeur d'un taux d'IgG estimé à 11 Unité arbitraire (UA) dans la population d'étude de 0 à 15 ans à Samako. En assumant un risque d'erreur alpha à 5% et une puissance 90% et aussi assumant une différence possible de taux d'IgG en fin d'enquête jusqu'à 5 UA possible pour un écart type de 17 UA et une précision voulue de 2,5, nous aurons besoins d' enrôler 178 enfants âgés de 0 à 15 ans dans cette étude de cohorte d'une saison de transmission de paludisme en 2011.

Assumant un taux de perdu de vue de 10% et de données non exploitable de 5%, nous aurons donc besoin d' enrôler au total 210 enfants âgés de 0 à 15 ans.

#### **4.4 Variables mesurées**

- Sexe
- Age en année
- Parasitémie
- Accès et l'infection palustres
- IgG anti-MSP1D

#### **4.5 Collecte des données**

Les cas de paludisme ont été dépistés de façon passive et active

##### **Passage transversaux:**

Trois enquêtes transversales en 2011 ont été effectuées. Ces passages transversaux ont été organisés au mois de juillet, septembre, et décembre de la saison de transmission. Après le consentement éclairé, les volontaires ont fait l'objet d'un examen physique et des frottis minces et gouttes épaisses. Le sang veineux a été prélevé pour les évaluations immunologiques.

##### **Passages longitudinaux:**

De juillet à fin Décembre 2011 les cas de paludisme simple et grave ont été enregistrés. Une équipe composée d'un médecin assisté par 2 étudiants (un médecin et un en pharmacie) et un technicien étaient installés dans le village d'étude ce qui a permis de dépister et de suivre les cas de paludisme. Chaque enfant de Samako âgés de 0 à 15 ans qui venait à la clinique avec de la fièvre (température axillaire > 37,5 ° C) ou des signes d'épisode de paludisme ont été inclus et suivis. De chaque personne sélectionnée, 3 à 10 ml de sang périphérique ont été prises. PBMC et sérums ont été séparés. Les sérums ont été stockées dans un congélateur à -20 °C et les PBMC ont été stockés dans l'azote liquide à la salle de stockage du MRTC.

## **4.6 Considérations éthiques**

Le protocole a été soumis et approuvé par le comité d'éthique de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie. L'étude qui a été conduite suivant les règles de bonnes pratiques cliniques et de laboratoires. La participation à l'étude a été volontaire. Le consentement éclairé d'un parent ou tuteur de chaque enfant a été demandé avant toute inclusion dans l'étude. Les participants étaient libres d'arrêter à tout moment leur participation à l'étude sans conséquence pour eux. Tous les enfants ont subi un examen physique et les cas de paludisme a été traités selon les recommandations du Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP). Un médecin a été installé dans le village pendant la période d'étude et il a assuré le suivi des enfants de la cohorte sous la supervision des médecins expérimentés (investigateurs cliniques). Un biologiste a été aussi installé au centre de santé de Samako afin de pratiquer les examens biologiques (Gouttes épaisses et frottis mince, taux d'hémoglobine). Les enfants ont gratuitement reçus le traitement contre le paludisme et d'autres maladies. Les accès simples ont été traités par les combinaisons thérapeutiques comme recommandé par le PNL. Les cas sévères de paludisme étaient hospitalisés au centre de santé et suivi par le médecin. Les prélèvements de sang ont été effectués dans des conditions stériles en utilisant du matériel stérile (aiguilles, tubes, microlances et gants). Les noms, prénoms et pseudonymes d'aucun volontaire n'ont été mentionnés dans aucuns rapports.

## **4.7 Méthodes d'étude**

### **4.7.1 Dépistage clinique du paludisme et suivi**

Les cas de paludisme ont été dépistés de façon passive et active. Le dépistage actif était effectué pendant les passages transversaux. Un examen clinique et une goutte épaisse et frottis mince étaient réalisés chez chaque enfant au cours de ces passages. Le dépistage passif consistait à l'examen de tout enfant de la cohorte venant pour une visite irrégulière au centre de santé de référence pendant la durée de l'étude. Les parents des enfants et les guides étaient sensibilisés pour emmener tout enfant présentant des signes de maladie à l'équipe sur place. L'enfant était ainsi examiné, une goutte épaisse et un frottis mince étaient effectués en cas de fièvre.

## 4.7.2 Définition des cas de paludisme

Le paludisme simple a été défini par la présence de formes asexuées de *Plasmodium* dans le sang, associées à un ou plusieurs symptômes suivants: fièvre, les frissons, céphalées, vomissements, courbature, douleur abdominale, diarrhée.

## 4.7.3 Diagnostique biologique du paludisme

### 4.7.3.1 La technique de la goutte épaisse (GE)

**Principe:** C'est une technique de micro concentration sur lame. La goutte épaisse consiste à réaliser un étalement épais de sang circonscrit dans un cercle d'environ un centimètre de diamètre sur une lame porte-objet dégraissée. L'examen au microscope optique à l'objectif 100 en immersion de l'étalement coloré au Giemsa permet de mettre en évidence la présence des Plasmodies.

**Mode opératoire** (voir annexe)

### 4.7.3.2 Le Frottis mince (FM)

Il consiste à prélever une goutte de sang au bout du 3<sup>ème</sup> ou 4<sup>ème</sup> doigt que l'on étale en couche fine sur une lame porte-objet et que l'on examine après fixation au méthanol puis coloration au Giemsa à 3% ou 10%.

**Principe: Mode opératoire** (voir annexes)

## 4.7.4 Dosage des anticorps spécifiques de MSP1D du *P. falciparum*: Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA).

**Principe:** Il consiste à fixer sur un support solide les antigènes de *P. falciparum* sur lequel les anticorps contenus dans le sérum ou plasma se fixent. Ces anticorps sont ensuite détectés à l'aide d'un second anticorps marqué par une enzyme. Le complexe antigène-anticorps-anticorps conjugué à l'enzyme sera révélé par addition d'un substrat spécifique. **Mode opératoire** (voir annexes)

## **5. Saisie et analyse des données**

Les données ont été collectées sur des cahiers d'observation individuels et ont fait l'objet d'un control de qualité. Elles ont ensuite été double saisies et réconciliées avec le avec le logiciel MS Accès puis analysées avec le logiciel SPSS version 16, Stata 12 et Prism graphpad. Les différents tests statistiques utilisés sont: Test de chi2, Kruskal Wallis Test, Log-Rank (Mantel-cox) Test.

## 6. Résultats

### 6.1 Données socio-démographiques

**Tableau-I: Répartition des enfants de la cohorte à Samako selon le sexe.**

Sexe	Fréquence	%
Masculin	112	53,3
Féminin	98	46,7
Total	210	100

Le sex-ratio était de 1.14 en faveur des garçons.

**Tableau-II: Répartition des enfants de 0-15 ans de la cohorte selon la classe d'âge à Samako.**

Classe d'âges	Fréquence	%
0-5 ans	95	45,2
6-10 ans	70	33,3
11-15 ans	45	21,5
Total	210	100

Les enfants de 0-5 ans représentaient 45.2% ; ceux de 6-10 ans étaient de 33.3% et ceux de 11-15ans, 21.5%. L'âge moyen était 6,9 ans avec un écart type de 4,1.

### 6.2 Données parasitologiques et immunologiques

**Tableau-III: Prévalence de l'accès palustre au cours des trois passages chez des enfants de 0-15 ans à Samako de juillet à décembre 2011.**

Passages	Accès palustres		Prévalence (%)
	Positif(N)	Négatif(N)	
Juillet	82	125	39
Septembre	78	118	39,8
Décembre	22	170	11

Pearson chi<sup>2</sup>= 46,7 et  $p < 0,0001$

La prévalence du paludisme clinique était de 39% au passage1 (juillet); 39,8% au passage2 (Septembre) et 11% au passage3 (Décembre).

**Tableau-IV: Incidence du paludisme selon la classe d'âge chez les enfants de 0-15 ans à Samako de juillet à décembre 2011.**

Classe d'âge	Accès palustres		Incidence
	Positif(N)	Négatif (N)	
<b>0-5 ans</b>	70	231	0,3
<b>6-10 ans</b>	79	238	0,3
<b>11-15 ans</b>	41	94	0,4
<b>Total</b>	190	563	0,3

L'incidence du paludisme à Samako de juillet à décembre 2011 était de 0,3 épisode par enfant/six mois.

**Tableau-V: Prévalence de l'infection palustre selon la classe d'âge à Samako de juillet à décembre 2011.**

Classe âge	Infection palustre		Total
	Positif (%)	Négatif	
<b>0-5 ans</b>	58(22,6)	199	257
<b>6-10 ans</b>	78(39,2)	121	199
<b>11-15 ans</b>	46(33,1)	93	139

Pearson  $\chi^2=15,1$   $p=0,001$

La prévalence de l'infection palustre était de 23% chez les enfants de 0-5 ans, 39% chez les 6-10 ans et 33% chez les 11-15 ans. Nous n'avons pas observé une différence statistiquement significative entre les grands enfants et ceux de 0-5 ans.  $p=0,001$ .

**Tableau-VI: Séroprévalence en IgG anti-MSP1D selon le passage chez des enfants de 0-15 ans à Samako de juillet à décembre 2011.**

Passage	IgG anti-MSP1D		Total
	Positif(%)	Négatif	
Juillet	63(33,7)	124	187
Septembre	74(39,8)	112	186
Décembre	44(25,3)	130	174

Pearson chi<sup>2</sup>= 8,5  $p = 0,01$

Environ 34% des enfants avaient des IgG anti-MSP1D au passage 1, 40% les avaient au passage 2 et 25% étaient porteurs d'anticorps au passage 3. La séroprévalence était plus élevée aux passages 2 et plus faibles au passage 3. Nous avons observé une différence statistiquement significative de la Séroprévalence en IgG anti-MSP1D aux différents passages.

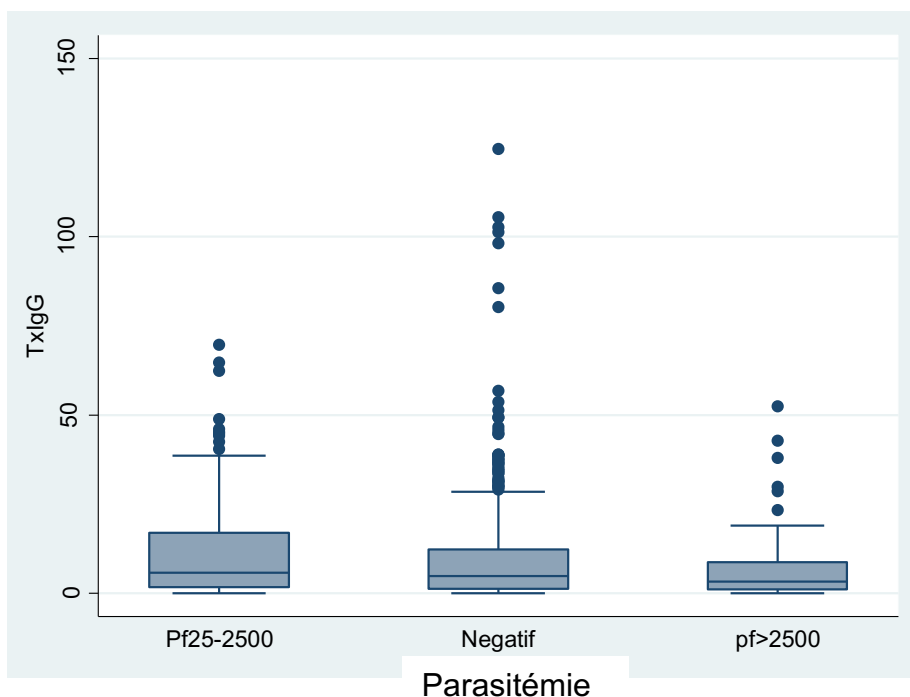
**Tableau-VII: Séroprévalence en IgG anti-MSP1D selon la classe d'âge chez les enfants de 0-15 ans à Samako de juillet à décembre 2011.**

Classe d'âge	IgG anti-MSP1D		Total
	Positif (%)	Négatif	
0-5 ans	77(32,2)	162	239
6-10 ans	60(34,5)	114	174
11-15 ans	44(32,8)	90	134

Pearson chi<sup>2</sup>= 0.2  $p=0.8$

La séroprévalence en IgG naturel anti-MSP1D était de 32%, 34% et 33% respectivement chez les enfants de 0-15 ans, 6-10 ans et 11-15 ans. Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les trois groupes d'âge quant au portage des IgG anti-MSP1D.



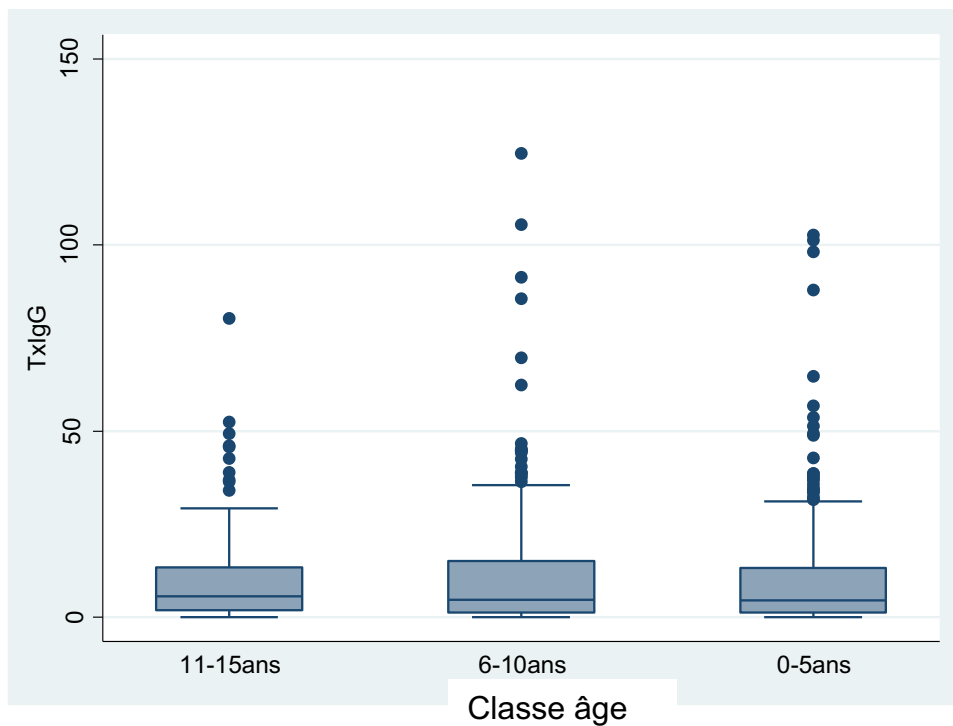


**Figure 4: Taux médian d'IgG anti-MSP1D en fonction de la classe de parasitémie chez les enfants de Samako de juillet à décembre 2011.**

Les taux médians d'IgG anti-MSP1D étaient de 4,72UA chez les enfants ayant une parasitémie nulle; 7,53UA chez ceux ayant une parasitémie faible et 0,53UA chez ceux avec forte parasitémie.

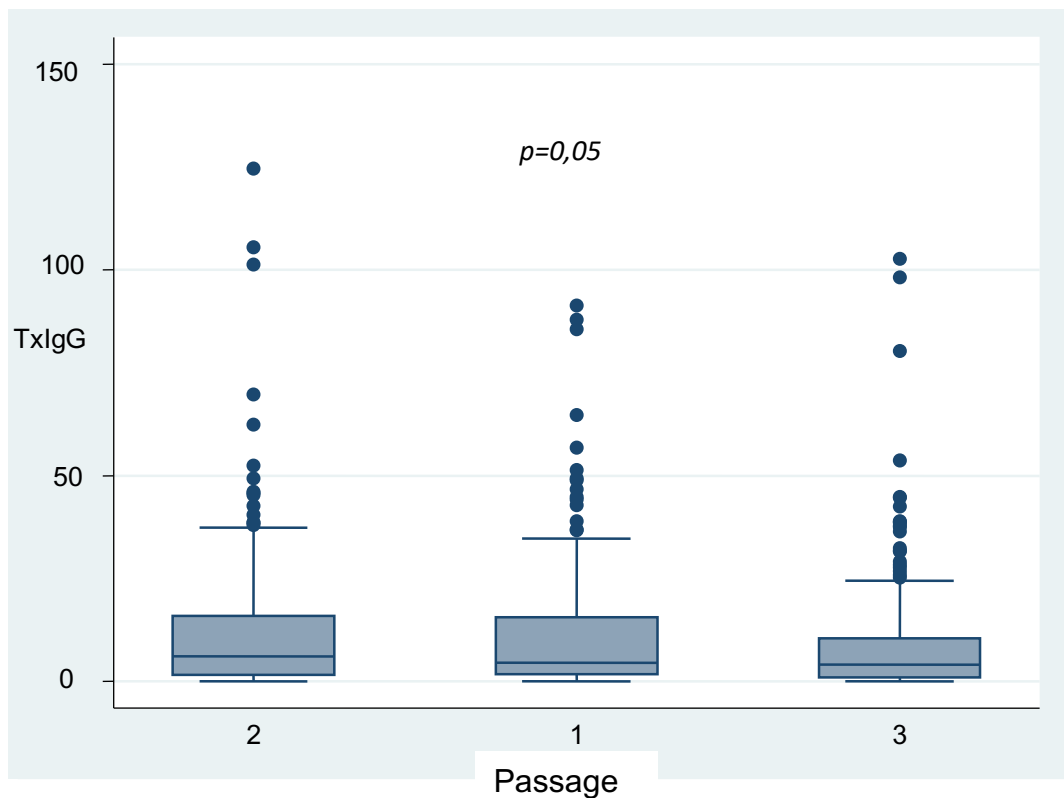
Négatif= Absence de *Plasmodium*. Pf25-2500= Parasitémie comprise entre 25 et 2500Trophozoites/ $\mu$ l.  $pf \geq 2500$ = Parasitémie supérieur ou égale à 2500 trophozoïtes / $\mu$ l de sang examiné.

Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les taux médian IgG anti-MSP1D quel que soit le niveau de la parasitémie chez les enfants de 0-15 ans à Samako de juillet à décembre 2011. Test de  $\chi^2 = 3,2$   $p = 0,1$ .



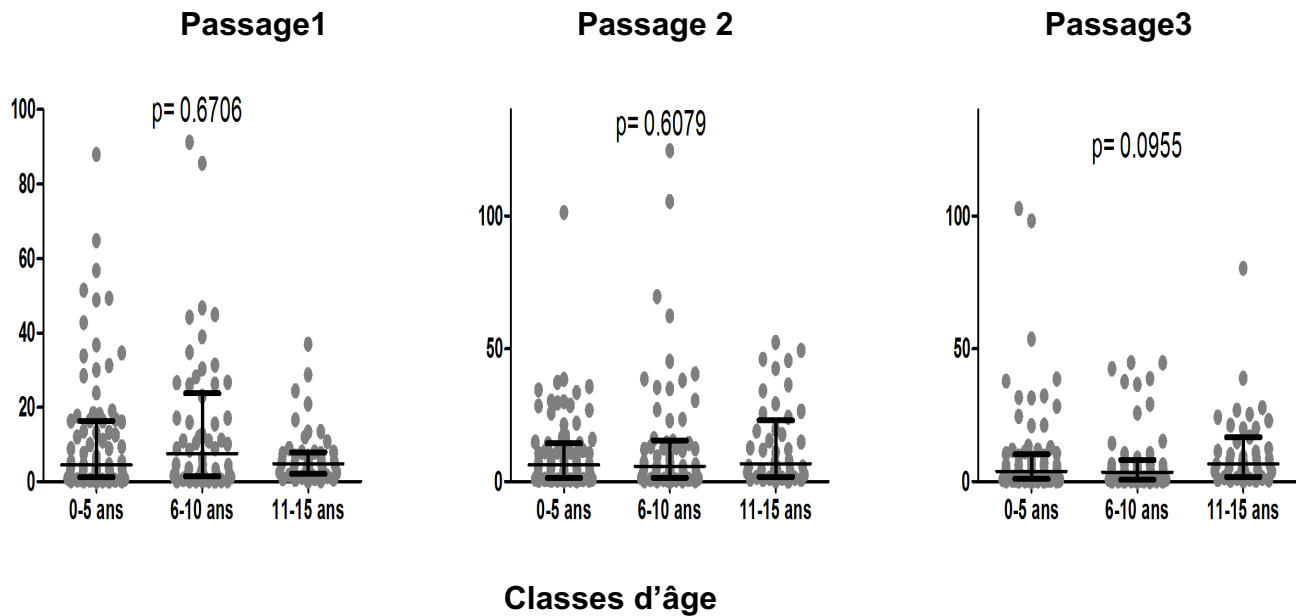
**Figure 5: Distribution du taux d'IgG anti-MSP1D selon le groupe d'âge chez les enfants de Samako de juillet à décembre 2011**

Les taux médians d'IgG anti-MSP1D étaient de 4,51UA pour les 0-5 ans, de 4,77UA pour les 6-10 ans et de 5,73UA pour les 11-15 ans. Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre ces taux selon la classe d'âge; et  $p=0,5$ . Test de Kruskal Wallis. Taux IgG en unité arbitraire (UA).



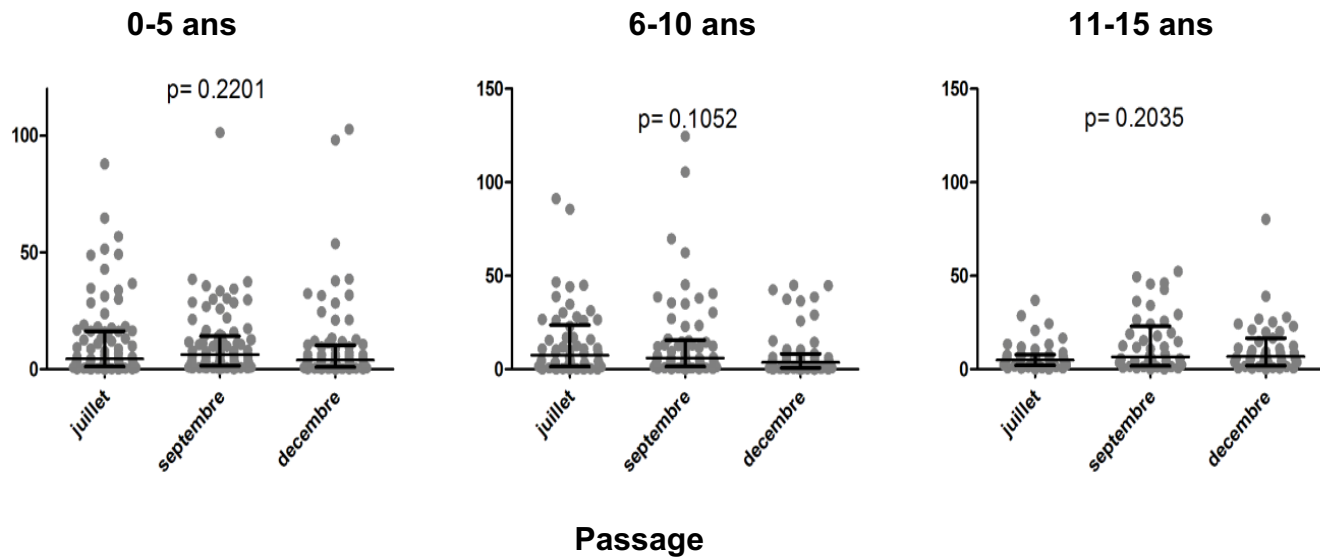
**Figure 6: Distribution du taux d'IgG anti-MSP-1D selon le passage chez les enfants de 0-15ans vivant à Samako de juillet à décembre 2011.**

Le taux médian d'IgG anti-MSP1D était de 4,63UA au passage 1, de 6,11UA au passage 2 et de 4,12UA au passage 3. Nous n'avons pas observé de différence statistiquement significative entre ces trois passages quant à la médiane du taux IgG anti-MSP1D  $p=0,05$ . Test de Kruskal Wallis .Taux d'IgG en unité arbitraire(UA).



**Figure 7: Distribution des taux d'IgG anti-MSP1D selon le passage chez les classes d'âge des enfants de 0-15 ans vivant à Samako.**

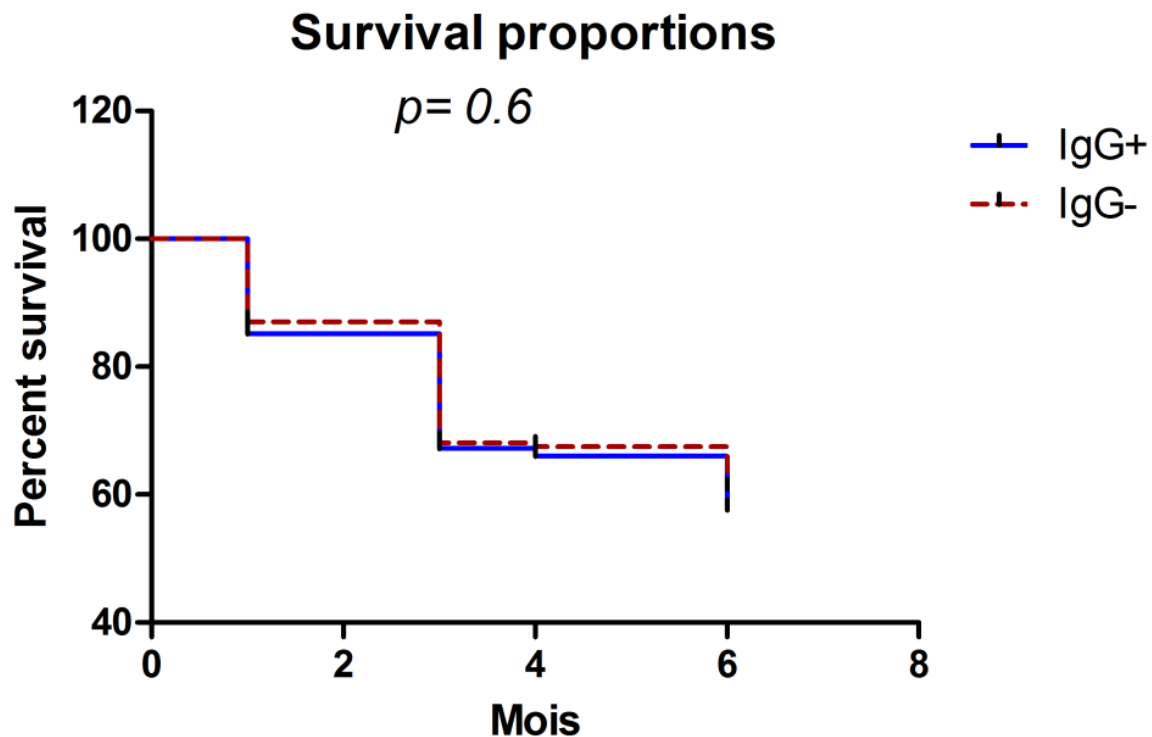
Dans les classes d'âge et aux différents passages, nous n'avons pas observé de différence statistiquement significative de la médiane des taux IgG anti-MSP1D. Mais au passage 3 on observe une tendance significative chez les 11-15 ans par rapport aux autres.  $p=0.09$ . Test de Kruskal Wallis. TxIgG en unité arbitraire.



**Figure 8: Distribution des taux d'IgG anti-MSP1D selon le passage d'une même classe d'âge des enfants de 0-15 ans vivant à Samako.**

Les médianes des taux d'IgG étaient 0,9UA ; 5,9UA ; 28,5UA respectivement aux passages 1, 2 et 3 chez les enfants âgés de 0-5 ans. Ils étaient de 0,9UA, 8UA et 37,8UA respectivement au passage 1, 2, et 3.chez ceux âgés de 6-10 ans. Ils étaient de 1,6UA, 7,5UA, 26,1UA respectivement au passage: 1, 2 et 3 chez les grands adolescents de 11-15 ans. Ces taux médians d'IgG anti-MSP1D augmentaient de juillet à décembre. Nous n'avons pas observé une différence statistiquement significative des médianes du taux d'IgG anti-MSP1D aux trois passages. Test de Kruskal Wallis. Taux IgG en unité arbitraire.

### 6.3 Courbes de survie



**Figure 9: Courbe de survie en fonction de la séropositivité en IgG anti-MSP1D chez les enfants de 0-15 ans à Samako de juillet à décembre 2011.**

En rouge la courbe pour les enfants séronégatifs en IgG anti-MSP1D et en bleu la courbe des enfants séropositifs en IgG anti-MSP1D en juillet.

Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les séropositifs et les séronégatifs en IgG anti-MSP1D quant à la survenue d'accès de paludisme survenus.  $p=0.6$  Log-Rank (Mantel-cox) Test.

## 7. Discussion

Le but de ce travail était d'évaluer la réponse anticorps spécifique de MSP1D, antigène du stade sanguin et hépatique de *P. falciparum* chez les enfants vivants en zone d'endémie. Nous avons effectué une étude de cohorte composée de 210 enfants âgés de 0 à 15 ans à Samako, au Mali. Nous avons choisi d'effectuer cette étude à Samako car il est situé dans une zone hyperendémique avec une forte transmission saisonnière d'environ 7 mois, allant de Juin à Décembre et aussi en raison de la proximité avec Bancoumana où le MRTC a mis en place un centre d'essai clinique. Au plan méthodologique nous n'avons pas enregistré un nombre important de perdus de vue au cours du suivi pendant l'année. La technique ELISA indirect que nous avons utilisée a permis de mesurer les anticorps IgG spécifiques de l'antigène MSP1D.

L'étude de la réponse anticorps contre la protéine entière MSP1 n'est pas nouvelle, car depuis les années 1990 une telle étude avait été conduite par le MRTC/DEAP en collaboration avec l'équipe du Pr H. Bujard à Safo un village situé à 15km au nord-est de Bamako au Mali. Cette étude avait montré que la réponse anticorps naturelle contre MSP1 était spécifique de souche et de courte durée <sup>9</sup>.

Nous nous sommes intéressés à nouveau à cet antigène suite à une visite du Pr H. Bujard au Mali en 2012 qui souhaitait développer un vaccin à base de MSP1. En effet une nouvelle formulation de MSP1 a été réalisée et le Pr. Bujard l'a décrite comme ayant une meilleure immunogénicité. C'est ainsi que nous avons décidé d'évaluer la réponse anticorps chez les enfants de Samako.

## 7.1 Situation du paludisme dans la cohorte

La détection des cas de paludisme a été effectuée de façon active et passive et nous avons dépisté le maximum d'épisodes de paludisme. L'équipe a su créer avec la population de Samako une relation de confiance, ce qui a permis de suivre régulièrement les enfants de la cohorte.

L'incidence du paludisme observée dans la cohorte d'enfants de notre étude était de 0,34 épisode par enfant/six mois et elle était plus élevée chez les enfants de 11-15 ans par rapport aux moins de 5 ans qui représentent le groupe à risque du paludisme. Cette incidence était bien plus faible que celle attendue dans cette population. Nous avons déterminé la taille de l'échantillon en tenant compte de cet effet de l'âge sur l'incidence du paludisme. Un résultat similaire a été observé dans une étude à Bandiagara en 2009 où l'incidence du paludisme était moins élevée chez les enfants de moins de deux ans par rapport ceux plus âgés d'aux moins cinq ans <sup>30</sup>.

Cela pourrait être dû au fait que les enfants de 6-10ans aurait eu une perte de prémunition du fait de la protection quand ils étaient dans la tranche 0-5ans. Avec la distribution de moustiquaires imprégnées d'insecticide aux femmes enceintes il se pourrait que les jeunes enfants dorment plus souvent avec leurs mamans sous les moustiquaires alors que les plus âgés étant plus autonomes dormiraient à part sans protection. Cette hypothèse de niveau d'exposition différent pourrait être testée avec une mesure des anticorps contre les antigènes des glandes salivaires qui n'ont pas été mesurés dans cette étude.

La prévalence de l'accès palustre à Samako a considérablement baissée de juillet à décembre passant de 39% à 11%. Cela pourrait s'expliquer par le fait que juillet et décembre correspondent respectivement à peu près au début et fin de la saison de transmission au Mali. Par ailleurs un effet de suivi de la cohorte n'est pas à exclure car chaque épisode de paludisme était correctement traité par l'équipe. Ceci pourrait avoir modifié l'incidence naturelle du paludisme dans cette population. Nous avons également observé que la prévalence de l'infection palustre était significativement plus élevée chez les grands enfants comparés aux 0-5 ans. Les résultats similaires ont été rapportés par **EDSM-V** au Mali en 2012-2013.



## 7.2 Réponse IgG anti-MSP-1D chez les enfants de Samako

Nous avons évalué la réponse IgG contre MSP1D car les anticorps sont les marqueurs immunologiques décrits comme directement associés à la protection contre le paludisme. En effet le transfert passif de gammaglobuline provenant d'adultes vivant en zone d'endémie palustre accélère de façon drastique la clairance parasitaire chez les enfants infectées <sup>31</sup>. Plusieurs études ont décrit MSP1 comme fortement immunogénique et que cette protéine contient des épitopes B et T. Nous avons au cours de cette étude collecté des cellules mononuclées du sang périphérique et des sérums. Mais des problèmes de conservation de ces cellules n'ont pas permis d'analyser la réponse cellulaire. Donc nous nous sommes limités à la mesure de la réponse anticorps IgG.

La séroprévalence en IgG anti-MSP1D était plus élevée au passage2 (septembre) comparée à celles des passages 1 et 3 (Juillet et Décembre). Cette différence était significative. Cette situation était attendue car la production d'anticorps contre les antigènes du *Plasmodium* est dépendante de l'exposition. En juillet où la transmission avait commencée, 33% des enfants avaient des anticorps anti-MSP1D. Au passage 2 où la transmission est la plus élevée, le nombre de porteurs d'anticorps avait légèrement augmenté. Puis au passage 3 en décembre lorsque la transmission baisse la séroprévalence avait baissé (Tableau-VI). Ceci indique que le portage des anticorps anti-MSP1D chez les enfants de la cohorte était probablement lié à la présence des parasites dans le sang. Un résultat similaire a été trouvé en 2002 au Brésil où la fréquence de la réponse positive et le niveau moyen des IgG étaient plus élevés dans les zones où la prévalence du paludisme était plus intense <sup>32</sup>.

Cependant le taux médian en IgG anti-MSP1D était légèrement plus élevé chez les enfants ayant une faible parasitémie ou nulle comparés à ceux ayant une forte parasitémie (Figure4). Cette observation est semblable aux résultats obtenus chez des adultes au Sénégal en 2015 <sup>29</sup>. Cela pourrait traduire un effet des anticorps sur la parasitémie.

Les taux médians d'IgG anti-MSP1D étaient plus élevés au deuxième passage (septembre) comparés à ceux du premier et troisième passage (juillet et décembre). Dans une même classe d'âge, ces taux médians d'IgG anti-MSP1D augmentaient de juillet à décembre 2011.

Il y avait une augmentation des taux d'IgG dépendante de l'âge. En effet le taux médian était plus élevé chez les enfants de 11-15 ans par rapport aux enfants de 0-5 ans et 6-10 ans. Ce qui traduit l'acquisition graduelle dépendante de l'âge de l'immunité anti-palustre en zone d'endémie. Une étude effectuée au Mali a trouvé un résultat similaire, dans laquelle le taux d'anticorps était positivement corrélé à l'âge <sup>34</sup>.

Les temps de survenu du paludisme chez les enfants séropositifs en IgG anti-MSP1D au passage1 (juillet) et ceux qui étaient séronégatifs étaient similaires. Cela pourrait signifier que la séropositivité en anticorps anti-MSP1D ne protège pas forcément contre la survenue des accès palustres chez les enfants en zone endémique. Dans une étude effectuée en Afrique de l'Ouest il n'y avait pas de corrélation positive entre le titre d'anticorps anti-MSP1<sub>190</sub> et la survenue d'accès palustre <sup>35</sup>. Cette situation pourrait être due au fait que les anticorps produits seraient peut être actifs contre les souches de parasites qui les ont induits mais inefficaces contre les souches hétérologues du *Plasmodium*. Il est bien connu que l'immunité anti-palustre est spécifique d'espèces, de souche et de stade. Le polymorphisme antigénique du *Plasmodium* est l'un des défis majeurs au développement de vaccin antipaludique efficace.

Ces résultats de cette étude n'ont pas montré de relation significative entre la présence des anticorps anti-MSP1D et l'absence de survenu d'accès palustre dans la cohorte. Il faut signaler que cette cohorte a été constituée pour étudier le rôle des macrophages dans le contrôle de l'accès palustre. La taille de l'échantillon n'est peut-être pas suffisante pour détecter une relation entre la réponse IgG anti-MSP1D et la protection contre le paludisme. Cependant des études épidémiologiques et des essais de vaccins ont montré l'immunogénicité de l'antigène MSP1 mais pas son rôle protecteur.

L'étude effectuée à Safo vers les années 1990 avait montré que les niveaux d'IgG étaient faibles chez les enfants en début de saison de transmission les exposant plus à une infection par le *plasmodium* que les adultes. Aussi la réponse IgG était spécifique de la souche principalement le MAD20 qui était majoritaire à cette époque dans la localité <sup>9</sup>.

MSP1 est l'un des premiers candidats vaccins testés en essai clinique chez l'homme en général et au Mali en particulier. Notre équipe a effectuée en effet le premier essai vaccinal anti-palustre au Mali et le candidat vaccin FMP1 était à base de MSP1<sup>19</sup>. Cet essai de phase I mené à Bandiagara a montré des productions de taux élevés d'anticorps dans le groupe d'enfants ayant reçu des doses du vaccin de l'étude par rapport au groupe de contrôle<sup>33</sup>.

L'absence de corrélation entre le taux d'IgG anti-MSP1D et la protection contre le paludisme suggère que ces anticorps ne seraient pas de bons marqueurs de protection. Osier et al ont montré dans une étude longitudinale que les IgG opsonisants chez les enfants infectés ou l'ayant été récemment était fortement corrélés avec un risque réduit d'accès palustre. Ces IgG sont ceux cytophiliques IgG1 et IgG3 spécifiques de MSPs. Ces auteurs ont argumenté que les IgG mesurés par ELISA ou par l'inhibition de croissance (GIA) ne serait pas les bons marqueurs de protection et que les IgG cytophiliques inducteurs de phagocytose par d'opsonisation seraient peut-être des marqueurs d'immunité anti-palustre plus valables <sup>15</sup>. Malheureusement faute de moyens, nous n'avons pas pu mesurer les sous classes d'IgG dans notre cohorte.

Enfin la faible incidence du paludisme dans notre cohorte était due probablement au suivi régulier des enfants et au traitement systématique des infections et à l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides qui a peut être influencé notre résultat ; ces différents facteurs n'ayant pas été pris en compte dans notre analyse.

## **8. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS**

### **8.1. Conclusion**

Dans la cohorte d'enfants étudiée à Samako de juillet à décembre, le titre d'anticorps IgG anti-MSP1D augmentait considérablement au cours de la saison de transmission mais cette réponse IgG contre la protéine entière MSP1D de la souche 3D7 n'était pas corrélée avec la protection contre l'infection et l'accès palustre.

### **8.2. Recommandations**

- Poursuivre cette étude en incluant l'évaluation correcte de la transmission du paludisme et en mesurant les sous classes d'IgG.
- Améliorer l'analyse en tenant compte de l'effet du traitement contre le paludisme.
- Effectuer une étude similaire en comparant plusieurs zones éco-climatiques différentes et sur une plus longue durée.
- Entreprendre une étude pour voir le répertoire de la réactivité d'autres antigènes ainsi que l'exploration des cellules B mémoires.

## Références

- (1) **White NJ.** *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. *Clin Infect Dis* 2008;46:172-173.
- (2) **Ta TH, Hisam S, Lanza M, Jiram AI, Ismail N, Rubio JM.** First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. *Malar J* 2014;13:68.
- (3) **Dzikowski R, Templeton TJ, Deitsch K.** Variant antigen gene expression in malaria. *Cell Microbiol* 2006;8:1371-1381.
- (4) **White NJ, Ho M.** The pathophysiology of malaria. *Adv Parasitol* 1992;31:83-173.
- (5) **Fernandez V, Hommel M, Chen Q, Hagblom P, Wahlgren M.** Small, clonally variant antigens expressed on the surface of the *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte are encoded by the rif gene family and are the target of human immune responses. *J Exp Med* 1999;190:1393-1404.
- (6) **Brabin BJ, Hakimi M, Pelletier D.** An analysis of anemia and pregnancy-related maternal mortality. *J Nutr* 2001;131:604S-614S.
- (7) **WHO. World Malaria Report 2014.**
- (8) **Arama C, Troye-Blomberg M.** The path of malaria vaccine development: challenges and perspectives. *J Intern Med* 2014;275:456-466.
- (9) **Fruh K, Doumbo O, Muller HM et al.** Human antibody response to the major merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum* is strain specific and short-lived. *Infect Immun* 1991;59:1319-1324.
- (10) **Child MA, Epp C, Bujard H, Blackman MJ.** Regulated maturation of malaria merozoite surface protein-1 is essential for parasite growth. *Mol Microbiol* 2010;78:187-202.
- (11) **Blackman MJ, Heidrich HG, Donachie S, McBride JS, Holder AA.** A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during

red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. *J Exp Med* 1990;172:379-382.

- (12) **Douglas AD, de Cassan SC, Dicks MD, Gilbert SC, Hill AV, Draper SJ.** Tailoring subunit vaccine immunogenicity: maximizing antibody and T cell responses by using combinations of adenovirus, poxvirus and protein-adjuvant vaccines against *Plasmodium falciparum* MSP1. *Vaccine* 2010;28:7167-7178.
- (13) **Riccio EK, Totino PR, Pratt-Riccio LR et al.** Cellular and humoral immune responses against the *Plasmodium vivax* MSP-1(1)(9) malaria vaccine candidate in individuals living in an endemic area in north-eastern Amazon region of Brazil. *Malar J* 2013;12:326.
- (14) **Kumaratilake LM, Ferrante A.** Opsonization and phagocytosis of *Plasmodium falciparum* merozoites measured by flow cytometry. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7:9-13.
- (15) **Osier FH, Feng G, Boyle MJ et al.** Opsonic phagocytosis of *Plasmodium falciparum* merozoites: mechanism in human immunity and a correlate of protection against malaria. *BMC Med* 2014;12:108.
- (16) **Guevara Patino JA, Holder AA, McBride JS, Blackman MJ.** Antibodies that inhibit malaria merozoite surface protein-1 processing and erythrocyte invasion are blocked by naturally acquired human antibodies. *J Exp Med* 1997;186:1689-1699.
- (17) **Mirahmadi H, Fallahi S, Fallah O, V, Kazemi B, Haghighi A, Seyyed Tabaei SJ.** High-Level Expression of Immunogenic Recombinant *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein (Pvmsp-142 kDa) in pGEX 6P1 Vector. *Iran J Public Health* 2015;44:89-99.
- (18) **Woehlbier U, Epp C, Hackett F, Blackman MJ, Bujard H.** Antibodies against multiple merozoite surface antigens of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* inhibit parasite maturation and red blood cell invasion. *Malar J* 2010;9:77.

- (19) **Hensmann M, Li C, Moss C et al.** Disulfide bonds in merozoite surface protein 1 of the malaria parasite impede efficient antigen processing and affect the in vivo antibody response. *Eur J Immunol* 2004;34:639-648.
- (20) **Egan A, Waterfall M, Pinder M, Holder A, Riley E.** Characterization of human T- and B-cell epitopes in the C terminus of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1: evidence for poor T-cell recognition of polypeptides with numerous disulfide bonds. *Infect Immun* 1997;65:3024-3031.
- (21) **Pusic K, Clements D, Kobuch S, Hui G.** Antibody and T cell responses in reciprocal prime-boost studies with full-length and truncated merozoite surface protein 1-42 vaccines. *PLoS One* 2013;8:e75939.
- (22) **Thera MA, Doumbo OK, Coulibaly D et al.** Safety and allele-specific immunogenicity of a malaria vaccine in Malian adults: results of a phase I randomized trial. *PLoS Clin Trials* 2006;1:e34.
- (23) **Takala SL, Coulibaly D, Thera MA et al.** Dynamics of polymorphism in a malaria vaccine antigen at a vaccine-testing site in Mali. *PLoS Med* 2007;4:e93.
- (24) **Withers MR, McKinney D, Ogutu BR et al.** Safety and reactogenicity of an MSP-1 malaria vaccine candidate: a randomized phase Ib dose-escalation trial in Kenyan children. *PLoS Clin Trials* 2006;1:e32.
- (25) **Genton B, Al-Yaman F, Betuela I et al.** Safety and immunogenicity of a three-component blood-stage malaria vaccine (MSP1, MSP2, RESA) against *Plasmodium falciparum* in Papua New Guinean children. *Vaccine* 2003;22:30-41.
- (26) **Ogutu BR, Apollo OJ, McKinney D et al.** Blood stage malaria vaccine eliciting high antigen-specific antibody concentrations confers no protection to young children in Western Kenya. *PLoS One* 2009;4:e4708.
- (27) **Spencer Valero LM, Ogun SA, Fleck SL et al.** Passive immunization with antibodies against three distinct epitopes on *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein 1 suppresses parasitemia. *Infect Immun* 1998;66:3925-3930.

- (28) **Woehlbier U, Epp C, Kauth CW et al.** Analysis of antibodies directed against merozoite surface protein 1 of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* 2006;74:1313-1322.
- (29) **Mbengue B, Sylla NM, Ndiaye DR et al.** [IgG responses to candidate malaria vaccine antigens in the urban area of Dakar (Senegal): evolution according to age and parasitemia in patients with mild symptoms]. *Bull Soc Pathol Exot* 2015;108:94-101.
- (30) **Coulibaly D, Travassos MA, Kone AK et al.** Stable malaria incidence despite scaling up control strategies in a malaria vaccine-testing site in Mali. *Malar J* 2014;13:374.
- (31) **COHEN S, McGREGOR IA, CARRINGTON S.** Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature* 1961;192:733-737.
- (32) **Braga EM, Barros RM, Reis TA et al.** Association of the IgG response to *Plasmodium falciparum* merozoite protein (C-terminal 19 kD) with clinical immunity to malaria in the Brazilian Amazon region. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66:461-466.
- (33) Dolo.A M. Coulibaly B. Maïga M. Daou C. Arama M. Troye-Blomberg O. Doumbo. Humoral immune anti- *Plasmodium falciparum* AMA1 and MSP1 response in two ethnic groups living in sympatry in Mali. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* DOI 10.1007/s13149-012-0262-9
- (34) **Ismaila Coulibaly, Mahamadou Diakitè.** Réponse Humorale Aux Antigènes Candidats Vaccins à *P. falciparum*. *Tapa banda– 4* ene 2012.
- (35) **Chandy C. John Rebecca A. O'Donnell, Peter O. Sumba Ann M. Moormann, Tania F. de Koning-Ward, Christopher L. King, James W. Kazura and Brendan S. Crabb.** Evidence That Invasion-Inhibitory Antibodies Specific for the 19-kDa Fragment of Merozoite Surface Protein-1 (MSP-1<sub>19</sub>) Can Play a Protective Role against Blood-Stage *Plasmodium falciparum* Infection in Individuals in a Malaria Endemic Area of Africa. *J Immunol* 2004 Jul;173(1):666-72



(36) **OMS Genève 1994.**Techniques de base pour le diagnostic biologique du paludisme. Partie I. Guide du stagiaire. *ISBN 92 4254430 2* (Classification NLM. WC 25).

(37) **Christian Epp, University of Heidelberg.** ELISA-Protocol.

(38) **Sheikh IH, Kaushal DC, Singh V, Kumar N, Chandra D, Kaushal NA.** Cloning, overexpression and characterization of soluble 42kDa fragment of merozoite surface protein-1 of *Plasmodium vivax*. *Protein Expr Purif.* 2014 Nov;103:64-74.

## **Annexes**

### **1. Protocole mode opératoire de la goutte épaisse (GE)**

#### **1.1. Principe**

La goutte épaisse est une technique de concentration des hématies, donc des *Plasmodium*, en vue de la recherche de paludisme dans le sang.

#### **1.2. Mode opératoire**

Prélever une grosse goutte de sang capillaire (environ 5-10 $\mu$ l) en la déposant directement à l'extrémité d'une lame (l'autre extrémité étant généralement réservée au frottis). A l'aide du coin de la deuxième lame, étaler la goutte sur 1 cm de diamètre en tournant pendant quelques secondes. Laisser sécher avec soin, ne jamais fixer (cela altère la coloration).

#### **1.3. Matériels:**

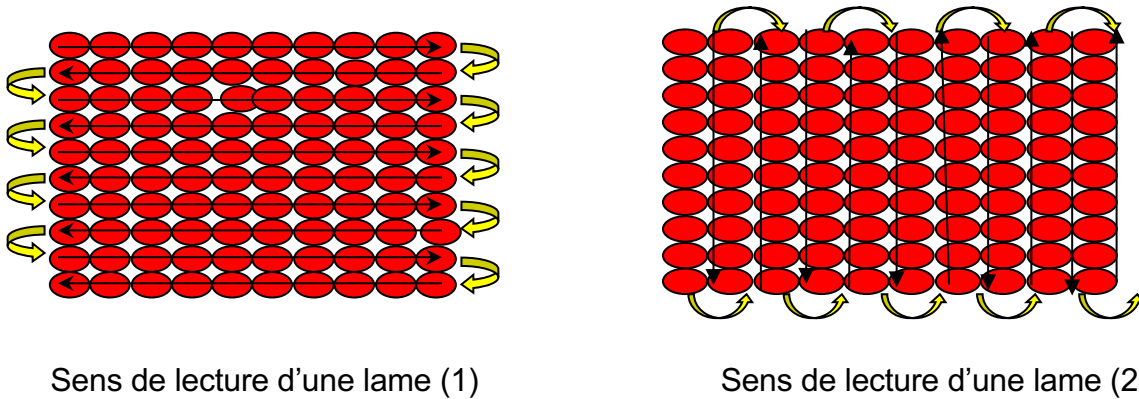
- Lames et vaccinostyle
- Des gants de protection en latex de bonne qualité
- Lames nettoyées et emballées (en quantité supérieure aux besoins)
- Des lancettes stériles, de l'éthanol à 70 %
- Du coton hydrophile
- Un collecteur d'aiguilles
- Une boîte ou un plateau pour le séchage des lames à l'horizontale en les protégeant des mouches et de la poussière;
- Des formulaires ou un registre;
- Un stylo à bille pour les formulaires ou registres;
- Un crayon à mine pour écrire sur le frottis mince et un petit taille-crayon

#### **1.4. Coloration**

Il y a deux méthodes de coloration avec le Giemsa: la méthode rapide (colorant à 10 %) et la méthode lente (colorant à 3 %). On emploie la méthode lente pour colorer un plus grand nombre de lames, comme c'est le cas dans les enquêtes transversales ou épidémiologiques et pour les travaux de recherche sur le terrain. Méthode rapide (10 %) C'est la méthode la plus courante pour colorer simultanément de 1 à 15 lames.

## 1.5 Lecture et quantification

Une goutte d'huile à immersion est placée sur la GE. Les parasites sont recherchés en utilisant l'objectif à immersion (x100) du microscope. Pour le comptage des parasites, la lame est examinée de gauche à droite ou de haut en bas comme indiqué ci-dessous afin d'identifier les parties de la GE où la répartition des leucocytes est distribuée de façon homogène.



**Figure 10:** Technique lecture d'une lame

Les formes asexuées (trophozoïtes) et les formes sexuées (gamétocytes) de chaque espèce plasmodiale observée sont comptées en notant simultanément les leucocytes. Le comptage se faisait 300 leucocytes. Une lame n'est déclarée négative qu'après lecture d'au moins 100 champs la GE sans détecter une forme plasmodiale. La densité parasitaire par  $\mu\text{L}$  de sang est calculée en divisant le nombre de parasites comptés, par le nombre de leucocytes comptés (300 ou plus) multiplié par 7500.

## 1.6. Avantages et inconvénients

- **Avantages:** La GE est sensible et donne une concentration parasitaire d'environ 20 fois plus que celle d'un frottis et peut détecter des parasites au taux extrêmement faible (5 parasites/ $\mu\text{l}$ ) soit une parasitémie de 0.0001%
- **Inconvénients:** lente et diagnostic d'espèce difficile <sup>36</sup>.

## **2. Protocol mode opératoire du frottis mince (FM)**

### **2.1. Principe :**

Le frottis minces est utilisé pour l'examen morphologique plus détaillée et pour déterminer les espèces de parasites. Etalement de sang sur une lame porte objet, prélevé à partir de prélèvement de sang capillaire ou de sang veineux.

### **2.2. Matériels:**

- Lancette stérile à usage unique
- Sous paillasse
- Coton alcoolisé
- Gant à usage unique
- Lame porte objet dégraissée
- Sac poubelle
- Etiquettes ou crayon

### **2.3. Mode Opératoire-Coloration-Lecture et Quantification**

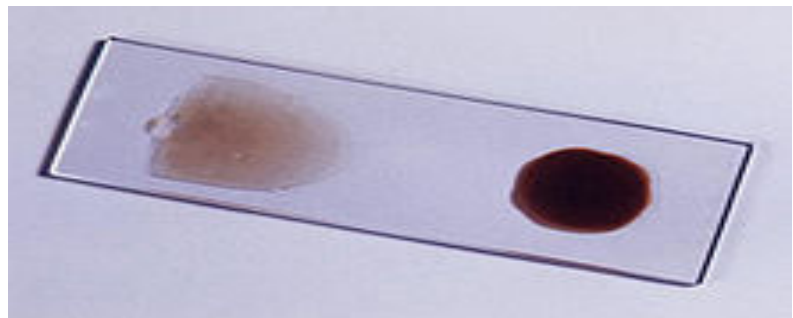
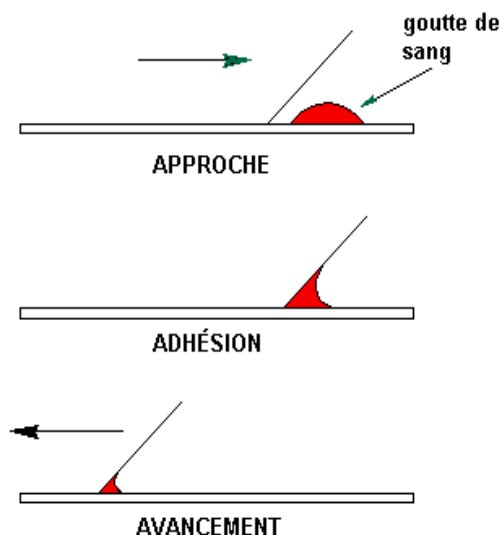
#### **Mode Opératoire:**

##### **Prélèvement**

- Piqûre au niveau du 3<sup>ème</sup> ou 4<sup>ème</sup> doigt de la main
- Chez les nourrissons de moins de 6 mois, la piqûre se fait au niveau du talon ou du gros orteil.
- Nettoyer l'endroit choisi avec l'alcool
- Piquer d'un coup sec et rapide
- Essuyer la première goutte de sang avec un tampon de coton sec
- Presser le doigt piqué pour faire sortir une goutte de sang.
- Confectionner les frottis sanguins, sur une surface dure et plane
- Déposer 2,5-5µl de sang sur la lame.

## Confection frottis mince (FM)

- Glisser le bord du frottoir jusqu'à ce qu'elle touche la goutte de sang (laisser fuser)
- Étaler d'un coup sec et régulier en respectant un angle de 45° Tout le sang doit être étalé avant d'atteindre l'autre extrémité de la lame.
- La queue du FM à couche monocellulaire: régulière, non striée.



## Fixation et Séchage des frottis sanguins

- Après séchage, fixer les frottis minces au méthanol
- Plonger le frottis mince au méthanol pendant 3 à 5 secondes
- Laisser sécher les frottis sur une surface plane

### Coloration:

- Recouvrir le frottis de colorant à 10% pendant 10-15 min: coloration rapide.
- 3% pendant 30 min: coloration lente
- Rincer sous un filet d'eau distillée ou du robinet dans l'évier
- Laisser sécher le frottis à l'air libre au moins pendant 1h au minimum ou utiliser un séchoir.
- Le pH du colorant doit être légèrement alcalin/ (7.2- 7.4). Une coloration acide pourrait empêcher la mise en évidence des parasites.

**Lecture:**

-Placer une goutte d'huile d'immersion sur le frottis mince (Vers la queue) puis lire avec l'objectif  $\times 100$ . Sélectionner une zone dans laquelle les globules rouges ne se chevauchent pas.

-Examiner la queue ou les bords du frottis et identifier les espèces de parasites en notant les caractéristiques suivantes :

- La forme du trophozoïte
- Le nombre du trophozoïte dans le globule rouge
- La taille du globule rouge infecté
- Le nombre de merozoïte par schizonte
- La forme du gamétocyte
- Et autres inclusions dans les globules rouges infecté.

-Compter tous les globules rouges puis les globules rouges infectés dans au moins cinq champs. Calculer le pourcentage de globules rouges infectés.

-Une fois le comptage terminé, on calcule le nombre relatif de parasites par rapport au nombre de leucocytes et l'on exprime le résultat en « parasites par microlitre de sang», à partir d'une simple formule de mathématique :  
$$\text{Nombre de parasites} \times 7500 / \text{Nombre de leucocytes} = \text{parasites par microlitre}$$

**Avantages**

-Technique rapide (diagnostic d'urgence)

-Diagnostic d'espèce

**Inconvénients**

-Peu sensible (problème pour les parasitémies faibles Seuil)<sup>36</sup>.

### **3. ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay)**

#### **3.1. Principe:**

La technique **ELISA** est une technique immuno-enzymatique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps.

#### **3.2. Matériels et Mode opératoire**

##### **3.2.1. Préparation des solutions de travail**

###### **Préparation du coating buffer**

Volume= 100 ml

17 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0.2M)

8 ml de  $\text{NaHCO}_3$  (0.2M) complété à 100ml avec de l'eau distillée puis ajuster le  $\text{P}^{\text{H}}$  à 10.6

###### **Préparation du bloking buffer**

Volume= 500 ml

15g de lait

250 $\mu\text{l}$  de tween 20 complété à 500ml avec de l'eau distillée

###### **Préparation de la solution de dilution des sérums**

Les sérums étaient dilués dans le bloking buffer

###### **Préparation du washing buffer**

Volume= 10 L

20 cp de PBS (GIBCO) dans 10 L d'eau distillée puis 10ml de Tween 20

###### **Préparation du substrat buffer**

Volume= 500ml

4.8ml de Diéthanolamine

250  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  (2M) et complété avec 500 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  distillée puis ajuster le  $\text{P}^{\text{H}}$  à 9.5 avec du HCL ou NaOH

## **Substrate**

### **P-Nitrophenyl Phosphate (pNPP) tablets (Sigma, N-2765)**

(Dissolve 1 tablet in 20ml substrate buffer = 1mg/ml)

**La solution d'arrêt : 0.2 M NaOH (100µl/well)**

### **3.2.2. Modes opératoires**

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

### **Dosage des IgG spécifiques à MSP1D**

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

- D'abord l'initiale du technicien et la date de réalisation sont inscrites sur la plaque.
- Sensibiliser les puits des colonnes 1 à 12 avec 100 µl de l'antigène MSP1D.
- Couvrez la plaque avec la feuille de plastique adhésive.
- Incuber la plaque pendant une nuit à 2-8°C (la plaque ainsi sensibilisée peut être conservée pendant 21 jours dans le réfrigérateur à 2 à 8°C).
- Laver la plaque 4 fois avec le tampon de lavage et essorer en tapant contre un papier absorbant.
- Distribuer 200µl de la solution de blocage dans tous les puits.
- Incuber pendant 1 heure, la plaque à la température du laboratoire dans une chambre humide et en agitation lente.
- Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et essorer. Pendant la période d'incubation du blocage, diluer les sérums témoins positif et négatifs et les plasmas de volontaires dans le tampon de dilution.
- Distribuer 100µl des sérums et plasmas dilués dans les puits conformément au schéma de plaque.
- Incuber pendant 1h 30mn la plaque à la température du laboratoire dans une chambre humide en agitation lente.
- Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et essorer.



- Distribuer dans les puits 100µl du conjugué Goat anti Humann IgG Alkalin Phosphatase dilué à 1/10000 dans le tampon de dilution.
- Incuber pendant 1heure la plaque à la température du laboratoire dans une chambre humide en agitation lente.
- Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et bien essorer.
- Distribuer 100 µl de substrat dans chaque puits.
- Incuber pendant 1h à l'abri de la lumière.
- Arrêter la réaction en ajoutant 100µl d'une solution NaOH 0.2M dans chaque puits.
- Lecture 5mn après et expression des résultats
- Mesurer les densités optiques des puits à l'aide d'un spectrophotomètre à 450 nm avec un filtre de référence de 620 nm en utilisant le logiciel SOFTmaxPRO 5.0.
- Analyser les résultats avec le logiciel ADAMSEL®.

### 3.3. Feuilles de paillasse

#### Protocole de travail ELISA IgG naturel anti MSP1D

Date: N° de série : Initiales :	Objectif: quantification d'anticorps IgG spécifiques à l'antigène <i>PfMSP1D</i>		Cocher les étapes faites
<b>Sensibilisation</b>	Distribuer 100 µl par puits (192µl de <i>PfMSP1D</i> /10ml du coating buffer)	Date de sensibilisation	
<b>Lavage</b> <b>Blocage</b>	Tampon de lavage 200µl par puits du tampon de blocage	4 x 1 min. 1 h en agitation	
<b>Lavage</b> <b>Incubation avec le premier anticorps</b>	Tampon de lavage Distribuer 100µl par puits a) du standard dans les colonnes 1 et 2 et b) le négatif (NC) et le blanc c) les échantillons de sérum sont dilués distribuer comme ci-dessous.	4 x 1 min. 1 h 30 en agitation	
<b>Lavage</b> <b>Incubation avec le second anticorps.</b> <b>Lavage</b>  <b>Réaction de coloration</b>	Tampon de lavage Goat anti Humann IgG Alkalin Phosphatase dilué à 1/10000 dans le tampon de dilution.  100µl de la solution (substrat buffer+p-NPP)	4 x 1 min. 1 h en agitation  4 x 1 min.  1h à la température du labo à l'obscurité	
<b>Arrêt</b>	100 l de 0.2 M NaOH puis Lecture à 405 nm		

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	STD 1/10000	STD 1/10000	S1-P1 1/5000	S1-P1 1/5000	S3-P3 1/5000	S3- P3 1/500 0	S6- P2 1/50 00	S6- P2 1/50 00	S9- P1 1/50 00	S9- P1 1/50 00	S11- P3 1/50 00	S11- P3 1/50 00
<b>B</b>	STD 1/20000	STD 1/20000	S1-P2 1/5000	S1-P2 1/5000	S4-P1 1/5000	S4- P1 1/500 0	S6- P3 1/50 00	S6- P3 1/50 00	S9- P2 1/50 00	S9- P2 1/50 00	S12- P1 1/50 00	S12- P1 1/50 00
<b>C</b>	STD 1/40000	STD 1/40000	S1-P3 1/5000	S1-P3 1/5000	S4-P2 1/5000	S4- P2 1/500 0	S7- P1 1/50 00	S7- P1 1/50 00	S9- P3 1/50 00	S9- P3 1/50 00	S12- P2 1/50 00	S12- P2 1/50 00
<b>D</b>	STD 1/80000	STD 1/80000	S2-P1 1/5000	S2-P1 1/5000	S4-P3 1/5000	S4- P3 1/500 0	S7- P2 1/50 00	S7- P2 1/50 00	S10- P1 1/50 00	S10- P1 1/50 00	S12- P3 1/50 00	S12- P3 1/50 00
<b>E</b>	STD 1/1160. 000	STD 1/1160. 000	S2-P2 1/5000	S2-P2 1/5000	S5-P1 1/5000	S5- P1 1/500 0	S7- P3 1/50 00	S7- P3 1/50 00	S10- P2 1/50 00	S10- P2 1/50 00	NC 1/20 0	NC 1/20 0
<b>F</b>	STD 1/320.0 00	STD 1/320.0 00	S2-P3 1/5000	S2-P3 1/5000	S5-P2 1/5000	S5- P2 1/500 0	S8- P1 1/50 00	S8- P1 1/50 00	S10- P3 1/50 00	S10- P3 1/50 00	PBS 1X	PBS 1X
<b>G</b>	STD 1/640.0 00	STD 1/640.0 00	S3-P1 1/5000	S3-P-1 1/5000	S5-P3 1/5000	S5- P3 1/500 0	S8- P2 1/50 00	S8- P2 1/50 00	S11- P1 1/50 00	S11- P1 1/50 00	PBS 1X	PBS 1X
<b>H</b>	STD 1/1.280. 000	STD 1/1.280. 000	S3-P2 1/5000	S3-P2 1/5000	S6-P1 1/5000	S6- P1 1/500 0	S8- P3 1/50 00	S8- P3 1/50 00	S11- P2 1/50 00	S11- P2 1/50 00	PBS 1X	PBS 1X

**Avantages de la technique:**

- L'utilisation d'anticorps monoclonaux rend la détection spécifique.
- L'utilisation d'anticorps secondaires rend la technique sensible.
- Technique accessible à tous les biologistes.
- La détection du signal ne nécessite pas la présence d'appareillage spécialisé

**Inconvénients de la technique:**

- La limite de détection est moins bonne que la technique RIA.
- La réaction enzymatique rend cette technique dépendante de la température, du pH et de l'éclairement <sup>37</sup>.

## Fiche signalétique

**Nom:** Zeguimé

**Prénom:** Amatigué

**Nationalité:** Malienne

**Date et lieu de naissance:** Le 05/06/1986 à Dillan (Bafoulabé)

**Titre:** Réponse anticorps IgG contre la protéine entière de la surface du mérozoïte (MSP1D) de *Plasmodium falciparum* chez des enfants de 0 à 15 ans à Samako, Mali.

**Date de soutenance:** 07/ 12/2015

**Ville de soutenance:** Bamako

**Lieu de dépôt:** Bibliothèque des Facultés de Médecine et d'Odonto-Stomatologie.

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

## Résumé:

La présente étude a évalué la réponse IgG contre MSP1D au cours d'une saison de transmission dans une cohorte des enfants de 0 à 15 ans vivant à Samako en 2011. Le dépistage du paludisme était réalisé par goutte épaisse au cours de trois passages transversaux et d'un suivi longitudinal de 6 mois. Les accès palustres étaient à la fois passivement et activement dépistés. Les IgG sériques spécifiques de l'antigène MSP1D ont été mesurés par ELISA.

L'incidence du paludisme était de 0,9 épisode par enfant/six mois, plus faible que celle attendue dans la zone éco-climatique. La séroprévalence en IgG anti-MSP1D était plus élevée en septembre qu'en début et fin de transmission respectivement en juillet et en décembre. Les taux médians IgG anti-MSP1D étaient quasiment semblables quel que soit la période. Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les taux médian IgG anti-MSP1D quel que soit le niveau de la parasitémie chez les enfants de 0-15ans. Cependant ce taux médian tendait à être légèrement plus élevé chez les enfants ayant une faible parasitémie ou nulle comparés à ceux ayant une parasitémie élevée.

Les temps de survenu des premiers accès de paludisme était comparables entre les enfants porteurs d'IgG anti-MSP1D en début de saison de transmission et ceux non porteurs de ces anticorps.

En conclusion chez les enfants étudiés à Samako en 2011, le titre d'anticorps IgG anti-MSP1D augmentait significativement au cours de la saison de transmission mais cette réponse IgG n'était pas corrélée avec la protection contre l'infection et l'accès palustre.

**Mots clés:** IgG, MSP1D, *P.falciparum*, Samako, Mali

## **Abstract**

We carried out this study to assess the IgG response against MSP1D protein during a malaria transmission season in naturally exposed children aged 0-15 years living in Samako in 2011.

This was a cohort study from July to December 2011 during which the malaria cases were detected passively and actively. Three cross-sectional surveys were performed at enrollment, at the peak and the end of the transmission season. After informed consent, volunteers have undergone a physical examination and thick blood smears were done. IgG were measured in sera by ELISA.

The IgG anti-MSP1D seroprevalence was higher in September at the pick of transmission compared to July and December respectively the beginning and the end of transmission season in the area. The median levels anti-MSP1D IgG were higher in the September compared to July and December. There was no statistically significant difference between the median IgG anti-MSP1D whatever the level of parasitaemia in children 0-15 years in 2011 but the median level of anti-MSP1D IgG was slightly higher among children with low or no parasitaemia than those with high parasitaemia. The Kaplan Mayer curves of malaria episode in children bearing anti-MSP-1D IgG in July and those negative for the antibody were similar.

**Conclusion:** In the cohort of children in Samako in 2011, the IgG response against the whole protein MSP1D from the 3D7 strain did not correlate with protection against infection and malaria episode.

**Keywords:** IgG, MSP1D, *P.falciparum*, Samako, Mali

## **SERMENT DE GALIEN**

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

***D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ; d'exercer dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement;***

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

***En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels. Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.***

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

***Je le jure!***