

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



FACULTE DE PHARMACIE

Année Universitaire 2020-2021

N° ....

## Titre de la Thèse

**REACTIVITE CROISEE DES ANTIGENES Pf27, Pf43, Pf45 de *P. FALCIPARUM* AVEC LEURS ORTHOLOGUES Pv27, Pv43, Pv45 de *P. VIVAX* AUX SERA DES VOLONTAIRES VIVANT A KENIEROBA, MALI**

Présentée et soutenue publiquement le 01/12/21 devant la Faculté de Pharmacie  
de Bamako

**Par Mme Salimata KANTE**

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

## JURY

Président : Pr Mahamadou Ali THERA

Membres : Dr Seidina A.S. DIAKITE

Dr Antoine DARA

Co-Directeur : Dr Saïdou BALAM

Directeur : Pr Mahamadou DIAKITE

## **DEDICACES**

### **Je dédie ce travail**

#### **A mon père, Tidiani Kanté**

Papa, je ne cesserai de te remercier pour m'avoir appris le sens de l'honneur, du respect, de la dignité, de l'amour du prochain, le bon chemin.

Ta confiance en moi, ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force, de bonheur pour affronter les différents obstacles. Les mots me manquent pour t'exprimer tout ce que je ressens au fond de moi.

Je prie Dieu, qu'il te donne une longue vie, pleine de santé et de bonheur, que tu puisses profiter de ma réussite.

#### **A ma mère, Feue Djélika Traoré**

Maman, j'aurais tant voulu que tu sois à mes côtés en ce jour merveilleux de ma vie pour voir la réussite de ta fille chérie, mais Dieu en a décidé autrement. Je ne peux passer une journée sans penser à toi, tu resteras toujours gravée dans ma mémoire, je t'aimerai toujours. Que ton âme repose en paix. Amen.

#### **A ma tante, Fatoumata Konaté**

Ma chère tante, ma 2<sup>ème</sup> maman, quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Tu m'as comblée d'amour, d'affection ; j'ai toujours pu compter sur toi. Tu faisais tout pour que je ne manque de rien.

Merci pour la bonne éducation que tu as su m'inculquer, et aussi de m'avoir appris les vraies valeurs de la vie et m'apporté le soutien moral et financier ! Qu'Allah t'accorde une longue vie.

## REMERCIEMENTS

**Aux défunts** Broulaye Kanté, Sambou Traoré et Fanta Chérif Diarra, merci pour votre amour. Qu'Allah vous accueille dans son paradis !

**A ma grand-mère**, Fatoumata Compaoré qui n'a jamais cessé de prier, de me soutenir et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs. Que Dieu te donne une longue vie.

**A mes parents** Moussa Kanté, Chiaka Kanté, Tièkoura Kanté, Karim Kanté, Madou Traoré, Adama Traoré, Issou Traoré, Drissa Traoré, Belco Traoré, Abdoulaye Traoré, Amara Traoré, Malado Kanté, Sata Kanté, Kadiatou Diarra, N'Dongo Sow, Fanta Traoré, Kadidiatou Sambou Traoré, merci pour vos bénédictions et votre soutien moral et financier. Que Dieu vous donne une longue vie.

**Mes sœurs et frères**, Sata Kanté, Fatoumata Kanté, Djénèba Kanté, Kadiatou Kanté, Aminata Kanté, Djélika Kanté, Issa Kanté, Adama Kanté, merci pour votre accompagnement. Que Dieu renforce nos liens.

**Au Pr Mahamadou Diakité**, de m'avoir accueilli les bras ouverts dans votre unité. Je vous remercie également pour votre humanisme et vos encouragements. Puisse Dieu vous protéger et vous accorder la longévité.

**Au Dr Drissa Konaté**, pour vos encouragements, votre soutien et votre sympathie. Je tiens à vous dire que vous m'avez beaucoup appris. Je vous remercie pour tout.

**Au Dr Saïdou BALAM**, pour votre générosité, votre dévouement et l'attention particulière avec laquelle vous nous avez traités, et les connaissances que vous nous avez transmises lors de votre séjour au laboratoire, nous n'oublierons jamais. Merci.

**Au Dr Seidina A.S. Diakité**, pour votre simplicité, votre gentillesse et votre disponibilité, vous m'avez appris à avoir une passion pour la recherche. C'est Dieu qui vous récompensera.

**A mes ami(e)s**, Koudeidia Amar Maiga, Mariam Bagayogo, Fatoumata Niéba Konaté, Founè Faskoye, Aissata Gueda Camara, Mamadou Lassine Keita, Magni Dembélé qui ont été toujours là pour me soutenir, qu'Allah fortifie nos liens.

**A toute l'équipe de l'Unité Immunogénétique et Hémoglobinopathie du MRTC**

Dr Seidina A.S. Diakité, Dr Sory I. Diawara, Dr Drissa Konaté, Dr Agnès Guindo, Dr Karim Traoré, Dr Ibrahim Sanogo, Dr Mory Doumbouya, Dr Bourama Keita, Dr Fousseyni Doucouré, Dr Oumou Coulibaly, Dr Aboubacar Fomba, Dr Fatoumata Kassé, Dr Larissa Denou, Dr Cheick Traoré, Dr Bakaina Diarra, Dr Kadidia Koné, Dr Fayçal Mahamadou, Dr Job Koné, Mr Abdouramane Traoré, Mr Abdourhamane Cissé, Mr Kathrino Mouhamedou, Mme Assitan Dembélé, Mme Fatoumata Diarra. Sans vous, cette thèse ne serait pas ce qu'elle est car vous avez tous participé à sa réalisation de par vos conseils et vos encouragements. Merci pour votre disponibilité et votre gentillesse. Recevez ici mes sincères salutations ainsi que ma reconnaissance.

**A tout le personnel du MRTC**

**A tous les membres de l'état-major les PAREIN**

**A tous mes camarades de la 12<sup>e</sup> promotion du numerus clausus**

**A tous les enseignants et étudiants de la Faculté de Pharmacie et de la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie de Bamako.**

**Aux Instituts Nationaux de la santé des Etats-Unis d'Amérique**

**A la population de Kéniéroba, pour leur adhésion à ce protocole de recherche**

**A toute les familles Kanté et Traoré**

**A toutes mes ami(e)s**

Enfin, mes remerciements vont à l'endroit de tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail de thèse.

## **HOMMAGE AUX HONORABLES MEMBRES DU JURY**

### **A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DU JURY**

#### **Pr Mahamadou Ali THERA**

- Professeur Titulaire de Parasitologie-Mycologie à la FMOS/USTTB
- Directeur Scientifique du BMP/MRTC/DEAP
- Membre de l'Académie des Sciences du Mali
- Chevalier de l'Ordre National du Mali

Cher Maître,

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

Que ce travail soit le témoignage de notre sincère reconnaissance et de notre profonde estime.

## **A NOTRE MAITRE ET JUGE**

**Dr Seidina A.S. DIAKITE**

- Docteur en Pharmacie
- PhD en Immunologie à l'Université Pierre et Marie Curie
- Maître-assistant en Immunologie à la FAPH/USTTB

Cher Maître,

C'est un privilège que vous nous accordez en acceptant de juger cette thèse, nous en sommes très honorés.

Votre apport tout au long de ce travail a considérablement contribué à l'amélioration de la qualité de ce document.

Veillez recevoir cher Maître, l'expression de nos sincères remerciements.

## **A NOTRE MAITRE ET JUGE**

### **Dr Antoine DARA**

- Docteur en Pharmacie
- PhD en Microbiologie Moléculaire et Immunologie
- Maître-assistant en Biologie Moléculaire à la FAPH/USTTB

Cher Maître,

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail malgré vos multiples occupations.

Vos qualités intellectuelles et votre disponibilité nous laisse le souvenir d'un maître exemplaire et modeste.

Trouvez ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

## **A NOTRE MAITRE ET CO-DIRECTEUR**

### **Dr Saïdou BALAM**

- Docteur en Médecine
- PhD en Immunologie
- Maître-assistant en Immunologie à la FMOS/USTTB

Cher Maître,

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

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



## **A NOTRE MAITRE ET DIRECTEUR DE THESE**

### **Pr Mahamadou DIAKITE**

- Professeur titulaire d'Immunologie-Génétique à la FAPH
- Vice-recteur de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB)
- Responsable de l'Unité d'Immunogénétique et de Parasitologie de l'ICER-Mali
- Directeur Scientifique Adjoint du Centre Universitaire de Recherche Clinique
- Secrétaire Permanent du Comité d'Ethique de l'USTTB

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, votre rigueur dans le travail, vos enseignements et surtout votre sens élevé de la responsabilité qui font de vous un exemple à suivre.

Cher Maître, veuillez recevoir l'expression de notre immense gratitude.

## Tables des matières

<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>2. QUESTION ET HYPOTHESE DE RECHERCHE.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Question de recherche .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Hypothèse de recherche .....</b>	<b>3</b>
<b>3. OBJECTIFS.....</b>	<b>4</b>
<b>3.1. Objectif général .....</b>	<b>4</b>
<b>3.2. Objectifs spécifiques.....</b>	<b>4</b>
<b>4. GENERALITES .....</b>	<b>5</b>
<b>4.1. Epidémiologie.....</b>	<b>5</b>
<b>4.2. Vecteurs .....</b>	<b>6</b>
<b>4.3. Agents pathogènes.....</b>	<b>6</b>
4.3.1. <i>Plasmodium falciparum</i> .....	7
4.3.2. <i>Plasmodium vivax</i> .....	7
4.3.3. <i>Plasmodium ovale</i> .....	7
4.3.4. <i>Plasmodium malariae</i> .....	8
4.3.5. <i>Plasmodium knowlesi</i> .....	8
4.3.6. <i>Plasmodium cynomolgi</i> .....	8
<b>4.4. Cycle biologique du paludisme.....</b>	<b>8</b>
<b>4.5. Physiopathologie du paludisme.....</b>	<b>10</b>
4.5.1. Accès palustre non compliqué .....	10
4.5.2. Accès palustre grave et compliqué .....	10
<b>4.6. Immunité anti-palustre .....</b>	<b>12</b>
4.6.1. Immunité innée ou naturelle .....	13
4.6.2. Immunité acquise ou adaptative .....	14
4.6.3. Antigènes du parasite .....	16
<b>4.7. Différents types de vaccins anti palustres .....</b>	<b>20</b>
4.7.1. Vaccins contre les stades pré-érythrocytaires.....	20
4.7.2. Vaccins contre les stades sanguins.....	20
4.7.3. Vaccins contre les stades sexués.....	21
<b>4.8. Diagnostic biologique .....</b>	<b>21</b>
4.8.1. Tests de diagnostic rapide (TDR) .....	21
4.8.2. Goutte épaisse et le frottis mince.....	21
<b>4.9. Prise en charge du paludisme.....</b>	<b>22</b>
4.9.1. Actions préventives .....	22
4.9.2. Actions curatives.....	22

<b>5. METHODOLOGIE .....</b>	<b>24</b>
<b>5.1. Cadre de l'étude .....</b>	<b>24</b>
<b>5.2. Lieu d'étude .....</b>	<b>24</b>
5.2.1. Description du village de Kéniéroba .....	24
5.2.2. Laboratoire Immunogénétique et Parasitologie du MRTC/FMOS-FAPH/ USTTB.....	30
<b>5.3. Type et période d'étude.....</b>	<b>31</b>
<b>5.4. Echantillonnage .....</b>	<b>31</b>
5.4.1. Critères d'inclusion .....	31
5.4.2. Critères de non-inclusion .....	31
<b>5.5. Variables mesurées .....</b>	<b>31</b>
<b>5.6. Technique de laboratoire utilisée (ELISA) .....</b>	<b>32</b>
<b>5.7. Indentification et synthèse des antigènes .....</b>	<b>33</b>
<b>5.8. Gestion et l'analyse des données .....</b>	<b>33</b>
<b>5.9. Déroulement de l'étude .....</b>	<b>34</b>
<b>5.10. Définition opératoire.....</b>	<b>34</b>
<b>5.11. Considérations éthiques .....</b>	<b>34</b>
<b>6. RESULTATS .....</b>	<b>36</b>
<b>6.1. Résultats globaux .....</b>	<b>36</b>
<b>6.2. Résultats descriptifs.....</b>	<b>37</b>
<b>6.3. Résultats analytiques .....</b>	<b>40</b>
<b>7. COMMENTAIRES ET DISCUSSION.....</b>	<b>47</b>
<b>8. LIMITES DE L'ETUDE .....</b>	<b>50</b>
<b>9. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....</b>	<b>51</b>
<b>9.1. Conclusion.....</b>	<b>51</b>
<b>9.2. Recommandations .....</b>	<b>51</b>
<b>10. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>52</b>
<b>12. FICHE SIGNALÉTIQUE.....</b>	<b>64</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1. Séquence et homologie entre les peptides orthologues de <i>P. falciparum</i> et de <i>P. vivax</i> .....	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 2. Répartition des groupes d'âge selon le sexe dans le village de Kéniéroba .	37
Tableau 3. Séroprévalence des anticorps contre les antigènes du <i>P. falciparum</i> et leurs orthologues de <i>P. vivax</i> dans les sera provenant de Kéniéroba en 2012 et 2018 ..	38
Tableau 4. Séroprévalence des anticorps contre les antigènes en fonction des groupes d'âge dans le village de Kéniéroba .....	39
Tableau 5. Corrélation multiple entre les anticorps contre les antigènes de <i>P. falciparum</i> et leurs orthologues de <i>P. vivax</i> dans les échantillons des enfants en 2012 .....	40
Tableau 6. Corrélation multiple entre les anticorps contre les antigènes de <i>P. falciparum</i> et leurs orthologues de <i>P. vivax</i> dans les échantillons des adultes en 2018 .....	41

## Liste des figures

Figure 1. Cycle de développement du <i>Plasmodium</i> .....	9
Figure 2. Carte du Mali avec la localisation de la commune rurale de Bancoumana, chef lieu du village de Kéniéroba.....	28
Figure 3. Plan de masse du village de Kéniéroba dans la commune rurale de Bancoumana .....	29
Figure 4. Titre moyen d'anticorps contre les antigènes <i>Pf27</i> , <i>Pf43</i> , <i>Pf45</i> et leurs orthologues de <i>P. vivax</i> dans les échantillons des enfants et adultes .....	42
Figure 5. Titre moyen d'anticorps contre les antigènes <i>Pv27</i> et <i>Pf27</i> en fonction des groupes d'âge.....	43
Figure 6. Titre moyen d'anticorps contre les antigènes <i>Pv43</i> et <i>Pf43</i> en fonction des groupes d'âge.....	44
Figure 7. Titre moyen d'anticorps contre les antigènes <i>Pv45</i> et <i>Pf45</i> en fonction des groupes d'âge.....	45
Figure 8. Titre moyen d'anticorps contre les antigènes <i>Pf27</i> , <i>Pf43</i> , <i>Pf45</i> et leurs orthologues de <i>P. vivax</i> en fonction du sexe.....	46

## Liste des abréviations

<b>ADCI</b>	<i>Antibody Dependent Cellular Inhibition</i> (Inhibition Cellulaire Dépendante des Anticorps)
<b>CD</b>	<i>Cluster of Differentiation</i> (Classe de Différenciation)
<b>CMH</b>	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
<b>CR1</b>	Complement Receptor 1 (Récepteur du complément 1)
<b>CSP</b>	<i>Circum Sporozoite Protein</i> (protéine Circumsporozoïte)
<b>CTA</b>	Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine
<b>DC</b>	Cellule Dendritique
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay (Technique d'immuno-absorption liée à l'enzyme)
<b>FAPH</b>	Faculté de Pharmacie
<b>GIS</b>	Geographic Information System (système d'information géographique)
<b>GM-CSF</b>	<i>Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor</i> (Facteur de Stimulation des Colonies de Granulocytes et de Macrophages)
<b>GPI</b>	Glycosyl phosphatidyl inositol
<b>Hb</b>	Hémoglobine
<b>IFAT</b>	<i>Indirect Fluorescence Antibody Test</i> (Test d'immunofluorescence Indirecte)
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interféron $\gamma$
<b>Ig</b>	Immunoglobuline
<b>IL</b>	Interleukine
<b>Kda</b>	Kilo Dalton
<b>MRTC</b>	<i>Malaria Research and Training Center</i> (Centre de Recherche et de Formation sur le Paludisme)
<b>MSP-1</b>	<i>Merozoite Surface Protein</i> (Protéine 1 à la surface du mérozoïte)
<b>NK</b>	<i>Natural Killer</i> (Cellule tueuse naturelle)
<b>NO</b>	Oxyde nitrique ou monoxyde d'azote
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>Pf</b>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<b>PfEMP-1</b>	<i>Plasmodium faciparum Erythrocyte Membrane Protein-1</i> (Protéine membranaire de <i>Plasmodium falciparum</i> à la surface de l'érythrocyte)

<b>Pv</b>	<i>Plasmodium vivax</i>
<b>RTS, S</b>	Repeat T cell HBS antigen (Antigène fusionné avec la protéine S du virus de l'hépatite)
<b>SP</b>	Sulfadoxine-Pyriméthamine
<b>Th1</b>	<i>T helper-1</i> (Lymphocyte auxiliaire T-1)
<b>Th2</b>	<i>T helper-2</i> (Lymphocyte auxiliaire T-2)
<b>TLR</b>	<i>Toll Like Receptor</i> (Récepteur de Type Toll)
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i> (Facteur nécrosant tissulaire)
<b>USTTB</b>	Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako

## 1. INTRODUCTION

Le paludisme est une parasitose due à un protozoaire du genre *Plasmodium*, transmis à l'homme par la pique infectante de l'anophèle femelle. Il demeure toujours une préoccupation majeure dans les pays tropicaux, particulièrement en Afrique Subsaharienne [1], où plus de 90% des cas et décès sont enregistrés [2]. Au Mali, le paludisme représente 39% des motifs de consultation dans les structures sanitaires avec une prévalence parasitaire à 19% chez les enfants de moins de 5 ans [3]. Parmi les espèces plasmodiales rencontrées dans la pathologie humaine, *Plasmodium falciparum* est l'espèce prédominante en Afrique subsaharienne, contrairement au *Plasmodium vivax* qui est dominante en Asie et en Amériques de l'OMS [4].

Beaucoup d'efforts ont été consentis pour le contrôle et l'élimination du paludisme à travers le monde par le biais de la prise en charge correcte des cas, la chimioprophylaxie et la lutte antivectorielle. L'impact réel de ces interventions est continuellement remis en question et menacé notamment par l'apparition et l'augmentation des parasites résistants aux médicaments et des vecteurs résistants aux insecticides [5, 6]. Pour appuyer les efforts d'élimination du paludisme dans le monde, la recherche s'est orientée vers le développement des potentiels candidats vaccins [7]. A cet effet, l'OMS recommande l'utilisation du vaccin RTS,S/AS01 chez les enfants en Afrique subsaharienne et dans d'autres régions où la transmission du paludisme à *P. falciparum* est modérée ou forte [8]. Globalement, la recherche d'un vaccin plus efficace contre *Plasmodium* se heurte non seulement à la complexité du parasite notamment sa variation antigénique, mais aussi à la complexité des interactions entre le parasite et le système immunitaire de l'hôte [9].

La variation antigénique du *Plasmodium* représente un réel défi pour la mise en place d'un vaccin sûr et efficace sur une longue période [10]. Cette variation antigénique offre aussi la possibilité de tester différents antigènes parasitaires d'importance variable en fonction du stade de développement du parasite (le stade pré-érythrocytaire, le stade érythrocytaire et le stade sexué). Plusieurs protéines érythrocytaires ont été testées dans le cadre du développement des potentiels candidats vaccin contre le paludisme. Le

niveau de protection conférée par ces protéines varie en fonction de l'âge, de l'antigène testé et de l'endémicité de la zone [11].

Des efforts sont en cours pour explorer d'autres approches afin de mettre au point des nouveaux candidats vaccins potentiels. L'utilisation d'outils bio-informatiques rentre dans ce cadre, et elle a permis d'explorer des bases de données du génome/protéome du parasite et d'identifier des protéines parasitaires contenant des domaines spécifiques ayant une importance fonctionnelle tels que des motifs des protéines  $\alpha$ -hélicoïdales ou les superhélices [12]. Les protéines  $\alpha$ -hélicoïdales ont des structures stables capables d'induire des anticorps associés avec la protection dans plusieurs maladies comme le VIH [13], la méningite [14], la grippe [15] et le paludisme [16].

Plusieurs domaines  $\alpha$ -hélicoïdaux spiralés, orthologues entre *P. vivax* et *P. falciparum*, ont été identifiés et suggérés comme de nouveaux antigènes putatifs pour le vaccin [17-19]. En effet, ces domaines qui présentent une grande homologie dans leur séquence [12, 18, 19], étaient hautement immunogènes, dont les anticorps spécifiques étaient fonctionnels dans de nombreux tests *in vitro* [17-21].

Précédemment, parmi un panel de 38 couples orthologues de *Plasmodium falciparum* et de *Plasmodium vivax* présentant divers degrés de similarité de séquence et de forte séroréactivité, 5 couples orthologues ont été sélectionnés et testés pour leur réactivité croisée avec le plasma de donneurs africains [12]. Dans la présente étude, une sélection supplémentaire a conduit à 3 couples orthologues pour leur grande homologie et forte séroréactivité. Ces couples ont été testés au moyen de sera prélevés chez les populations enfants et adultes de Kéniéroba au Mali, une zone d'endémie à *Plasmodium falciparum*. Cette étude entre dans le cadre d'un projet plus large qui vise à concevoir une stratégie de vaccin à base d'antigènes polyépitopiques capables d'induire une protection croisée entre les deux espèces plasmodiales les plus courantes (*Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax*).



## **2. QUESTION ET HYPOTHESE DE RECHERCHE**

### **2.1. Question de recherche**

Quel est le degré de réactivité croisée entre les antigènes *Pf27*, *Pf43*, *Pf45* de *P. falciparum* avec leurs orthologues *Pv27*, *Pv43*, *Pv45* de *P. vivax* dans une zone d'endémie à *P. falciparum* ?

### **2.2. Hypothèse de recherche**

Les antigènes orthologues des deux espèces de *Plasmodium* suscitent des anticorps de réactivité croisée, pouvant conduire à la sélection d'un ensemble de peptides antigéniques à combiner dans un antigène polyépitope et multi-espèces.

### **3. OBJECTIFS**

#### **3.1. Objectif général**

Etudier la séroréactivité des antigènes de *Plasmodium falciparum* Pf27, Pf43 et Pf45 et de leurs orthologues de *Plasmodium vivax* Pv27, Pv43 et Pv45 aux sera des volontaires vivant à Kéniéroba.

#### **3.2. Objectifs spécifiques**

- Déterminer la séroprévalence des anticorps anti-Pf27, Pf43 et Pf45 de *P. falciparum* et leurs orthologues Pv27, Pv43 et Pv45 de *P. vivax* chez les adultes et chez les enfants à Kéniéroba ;
- Déterminer la corrélation entre les titres d'anticorps anti-Pf27, Pf43 et Pf45 de *P. falciparum* avec ceux de leurs orthologues Pv27, Pv43 et Pv45 de *P. vivax* à Kéniéroba ;
- Comparer le titre moyen d'anticorps contre ces antigènes orthologues en fonction des groupes d'âge et du sexe à Kéniéroba.

## 4. GENERALITES

### 4.1. Epidémiologie

Le paludisme est une maladie parasitaire causée par un protozoaire du genre *Plasmodium*, transmis à l'homme par la piqûre infectante de moustiques femelles du genre *Anopheles* lors de son repas sanguin.

Le paludisme est répandu dans les régions tropicales et subtropicales et notamment en Afrique subsaharienne, en Pacifique, et en Asie. Plusieurs espèces sont responsables de la maladie chez l'homme, parmi lesquels : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale curtisi*, *P. ovale wallikeri*, *P. malariae*, *P. knowlesi*, *P. cynomolgi* [22]. Le *P. falciparum* est l'espèce du paludisme la plus dominante dans la région africaine de l'OMS (99,7% des cas de paludisme estimés en 2018), tout comme dans les régions Asie du sud-est (50%), Méditerranée orientale (71%) et du Pacifique occidental (65%) tandis que le *P. vivax* est beaucoup plus représenté au niveau mondial avec 53% des cas dans la région Asie du sud-est de l'OMS, 47% en Inde. Dans la région d'Amérique de l'OMS, le *P. vivax* représente 75% des cas de paludisme [23].

La distribution du paludisme est extrêmement variable d'une zone géographique à une autre. Cette variabilité est sous la dépendance de facteurs liés au vecteur, à l'hôte, au parasite et à l'environnement [24]. L'indice de stabilité déterminé par Macdonald permet de classer l'enracinement du paludisme en deux zones :

- ❖ les zones de paludisme stable ou endémique : la transmission du paludisme est longue et intense entraînant une prémunition permettant de limiter les manifestations cliniques graves chez les jeunes enfants ;
- ❖ les zones de paludisme instable ou épidémique : la transmission du paludisme est très courte et il sévit sous forme épidémique. Ce caractère épisodique de la transmission ne permet pas le développement de la prémunition. Tous les individus sont à risque de développer la maladie [25].

Au Mali, il y a une extrême variabilité de la situation épidémiologique du paludisme en fonction des faciès géo-climatiques. Il existe cinq modalités épidémiologiques de transmission du paludisme [26].

- ❖ Une zone soudano-guinéenne à transmission saisonnière longue  $\geq 6$  mois. Dans cette zone, l'indice plasmodique (IP) chez les enfants est  $\geq 80\%$ . L'état de prémunition est acquis vers l'âge de 5-6 ans au prix d'une forte mortalité infantile ;
- ❖ Une zone sahélienne à transmission saisonnière courte  $\leq 3$  mois. Dans cette zone, l'IP se situe entre 50-70%. L'état de prémunition est rarement atteint avant l'âge de 9-10 ans ;
- ❖ Une zone de transmission sporadique voire épidémique correspondant aux régions du Nord et à certaines localités des régions de Koulikoro et de Kayes. L'IP est en dessous de 5%. Tous les groupes d'âge sont à risque de paludisme grave ;
- ❖ Des zones de transmission bi ou plurimodales comprenant le delta intérieur du fleuve Niger et les zones de barrage et de riziculture (Manantali, Markala, Sélingué). L'IP se situe entre 40-50%. L'anémie reste un phénotype clinique important de la maladie ;
- ❖ Des zones peu propices à l'impaludation particulièrement dans les milieux urbains comme Bamako et Mopti où le paludisme est hypo endémique. L'IP est  $\leq 10\%$  et les adultes peuvent faire des formes graves et compliquées de la maladie.

## 4.2. Vecteurs

Les moustiques du genre *Anophèles* assurent la transmission du paludisme. Il existe environ 500 espèces d'anophèles, seuls une cinquantaine est capable de transmettre le paludisme à l'homme. Dans la pratique, 20 espèces assurent l'essentiel de la transmission dans le monde [27]. Le développement et la longévité des *anophèles* dépendent de la température avec un optimum entre 20 et 30°C pour une durée de vie de l'ordre de 30 jours. Les vecteurs responsables de la transmission en Afrique sont : *An. gambiae* et *An. funestus*. La distribution de ces vecteurs dépend fortement des variations spatiales et temporelles, *An. funestus* étant abondant pendant la saison froide et sèche, *An. gambiae* pendant la saison des pluies [28, 29].

## 4.3. Agents pathogènes

Le paludisme est transmis par un protozoaire appartenant au genre *Plasmodium*. Il existe de très nombreuses espèces de *Plasmodium* (plus de 140), touchant diverses espèces

animales mais les plus fréquemment retrouvées en pathologie humaine sont : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale curtisi*, *P. ovale wallikeri*, *P. malariae*, *P. knowlesi*, *P. cynomolgi* [22, 30]. Ces espèces diffèrent non seulement par leurs caractéristiques cliniques et biologiques, mais aussi par leur répartition géographique et leur capacité à développer des résistances aux antipaludiques.

#### **4.3.1. *Plasmodium falciparum***

Le *P. falciparum* est le plus largement répandu à travers le monde, il est responsable de plus de 99% des cas de paludisme en Afrique et provoque des formes cliniques graves potentiellement mortelles. Avec sa large répartition et sa prévalence élevée par rapport aux autres espèces, *P. falciparum* développe plus fréquemment des résistances aux antipaludiques [31]. Il est responsable de la fièvre tierce maligne [24]. Sa transmission se fait pendant toute l'année avec des recrudescences saisonnières. On n'observe pas de rechutes tardives comme avec les autres espèces [32].

#### **4.3.2. *Plasmodium vivax***

Le *P. vivax* est très largement répandu en Amérique du sud et en Asie, et dans certaines régions de l'Afrique [33]. Sa transmission s'arrête en dessous de 15°C. Sa période d'incubation est de 11 à 13 jours, mais on peut observer des rechutes (accès de reviviscence lié à la présence des hypnozoïtes) pendant 3 à 4 ans [34]. Le paludisme provoqué par le *P. vivax* est classiquement considéré comme bénin (fièvre tierce bénigne, c'est-à-dire due à un cycle érythrocytaire de 48 heures) mais en zone d'endémie il peut avoir des répercussions graves sur l'état de santé des populations, notamment par l'intermédiaire des anémies chez l'enfant. De plus en plus, quelques cas de *P. vivax* résistants à la chloroquine s'observe [32].

#### **4.3.3. *Plasmodium ovale***

Le *P. ovale* sévit en Afrique intertropicale du centre et de l'ouest, et dans certaines régions du Pacifique. Il provoque une fièvre tierce bénigne comme *P. vivax* dont il est très proche. Son incubation est de 15 jours au minimum mais peut-être beaucoup plus longue, jusqu'à 4 ans. Son évolution est bénigne mais on peut observer, comme avec *P. vivax*, des rechutes tardives (5ans). Schématiquement on dit que *P. ovale* remplace *P. vivax* là où

cette dernière espèce n'existe pas [32]. Deux sous-types existent : *P. ovale curtisi*, *P. ovale wallikeri* [22].

#### **4.3.4. *Plasmodium malariae***

Le *P. malariae* sévit dans les trois continents, mais de manière beaucoup plus sporadique. Il se différencie des autres espèces par une incubation plus longue 15 à 21 jours, par une périodicité différente de la fièvre (cycle érythrocytaire de 72 heures responsable d'une fièvre quarte) et surtout par sa capacité à entraîner des reviviscences très tardives (jusqu'à 20 ans après le retour de la zone d'endémie). L'infection est bénigne mais *P. malariae* peut parfois entraîner des complications rénales [32].

#### **4.3.5. *Plasmodium knowlesi***

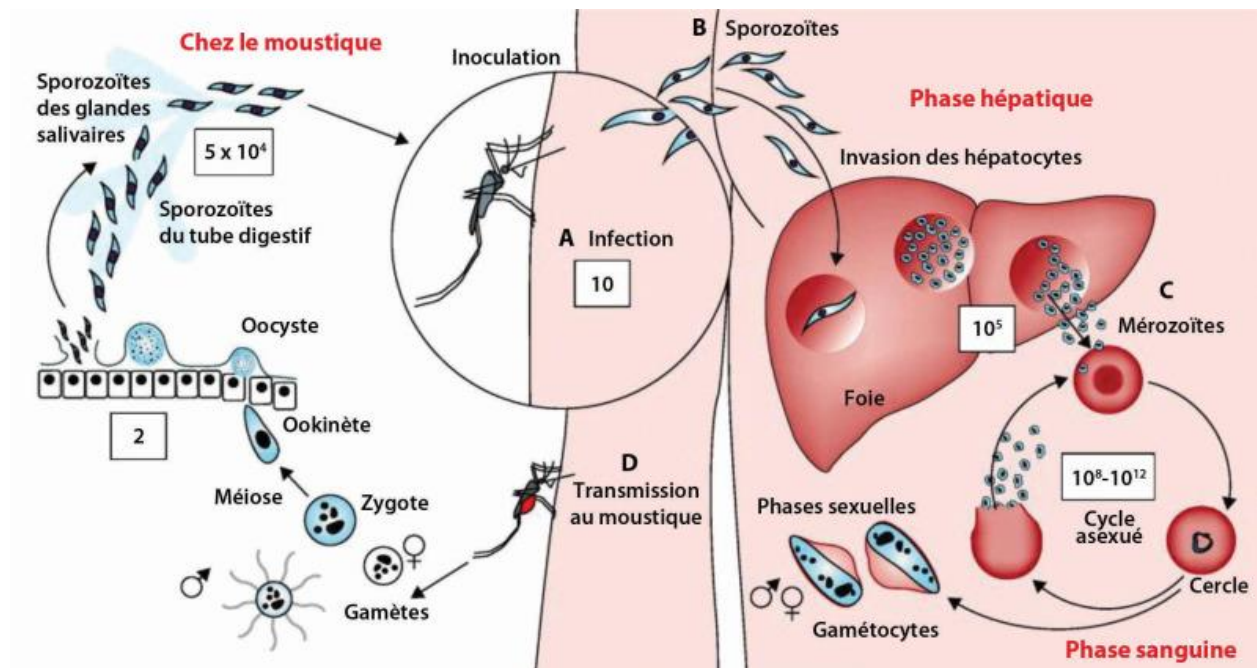
Le *P. knowlesi* sévit en Asie du sud-est particulièrement en Malaisie, à Bornéo, en zone forestière car il est étroitement lié à la répartition des singes macaques, son hôte habituel, et de son vecteur piquant l'homme et la singe. Il est morphologiquement proche de *P. malariae*. Il se différencie des autres espèces par un cycle érythrocytaire de 24 heures responsable d'une fièvre quotidienne. Il existe de rares formes graves, voire mortelles, avec forte parasitémie. A ce jour aucune chimiorésistance n'a été observée pour cette espèce [32].

#### **4.3.6. *Plasmodium cynomolgi***

Comme le *P. knowlesi*, *P. cynomolgi* fait partie des espèces des singes macaques et sévit en Asie du sud-est [35]. Récemment un cas de paludisme causé par *P. cynomolgi* a été signalé dans l'est de la Malaisie [36].

### **4.4. Cycle biologique du paludisme**

Le cycle se déroule successivement chez l'homme (phase asexuée chez l'hôte intermédiaire) et chez l'anophèle (phase sexuée chez l'hôte définitif). Chez l'homme le cycle est lui-même divisé en deux phases : la phase hépatique ou pré-érythrocytaire (exo-érythrocytaire) et la phase sanguine ou érythrocytaire (Figure 1)



**Figure 1. Cycle de développement du *Plasmodium***

**Source:** White, 2014 [37].

Le cycle commence par l'inoculation des sporozoïtes mobiles dans le derme (A), qui pénètrent ensuite dans le foie (B). Chaque sporozoïte envahit un hépatocyte, puis se multiplie. Après environ une semaine, les schizontes hépatiques éclatent, libérant dans le sang de milliers de mérozoïtes qui envahissent les globules rouges et commencent le cycle asexué (C). La maladie commence lorsque la parasitémie asexuelle atteint un seuil qui dépend de certaines caractéristiques comme l'âge, l'espèce et l'endémicité de la zone [38]. Au cours des différents cycles de multiplication, certains trophozoïtes matures se transforment en formes sexuelles (gamétocytes). Les gamétocytes sont ingérés par les moustiques anophèles lors de leur repas sanguin (D) et se reproduisent sexuellement, formant un ookinète (ou œuf mobile) puis un oocyste dans l'intestin du moustique. Les oocystes éclatent et libèrent les sporozoïtes, qui migrent vers les glandes salivaires et prêts à être inoculés lors du prochain repas de sang. Le cycle complet peut prendre plus ou moins 1 mois. L'estimation du nombre de parasites est présentée dans les différents rectangles- une charge parasitaire totale de  $10^{12}$  correspondant environ à 2% de parasitémie chez un adulte [37].

## **4.5. Physiopathologie du paludisme**

Malgré de nombreux travaux récents fondamentaux et expérimentaux, la physiopathologie du paludisme n'est pas encore parfaitement élucidée. Cela s'explique par son caractère complexe et plurifactoriel. Les principaux mécanismes impliquent l'hôte et le parasite dans des interactions nombreuses et souvent synergiques [39].

### **4.5.1. Accès palustre non compliqué**

La plupart des signes cliniques du paludisme est observée au stade érythrocytaire du cycle de développement du parasite où il se multiplie de manière asexuée dans les globules rouges [40]. Le principal phénomène observé est l'accès palustre ; il est généralement dû à la libération simultanée et massive des mérozoïtes suite à la destruction des hématies hôtes responsable de manifestation clinique telle que la fièvre [41]. La fièvre serait consécutive à la libération des pyrogènes tel que TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 lors des schizogonies [42, 43]. Elle n'apparaît que lorsque la parasitémie atteint le seuil pyrogène, son allure est variable d'une personne à l'autre et d'une espèce plasmodiale à l'autre [40].

Au cours des accès de primo-invasion, le cycle érythrocytaire est généralement non synchronisé. Lorsque les cycles se synchronisent progressivement, la fièvre prend alors son caractère de type intermittente, tierce (un accès toutes les 48 heures : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*) et quartes (un accès toutes les 72 heures : *P. malariae*) d'autres phénomènes peuvent s'associer (céphalées, tremblement ; sudation...) [41].

### **4.5.2. Accès palustre grave et compliqué**

Le paludisme grave représente encore une cause importante de mortalité en zone tropicale notamment chez les enfants malgré les moyens la mise en œuvre des interventions efficaces. *Plasmodium falciparum* est en général responsable des formes cliniques grave du paludisme. Associés à cela, certaines populations sont aussi exposées notamment les personnes d'âge extrême, les enfants de moins de 5 ans, les femmes enceintes, les voyageurs, les immunodéprimés. L'ensemble de ces populations sont considérées comme non immunes vis-à-vis du parasite.



La physiopathologie de l'accès pernicieux est extrêmement complexe et encore mal connue. Certains phénomènes ont été évoqués comme associés à la survenue des formes compliquées du paludisme, notamment la séquestration des globules rouges parasités qui adhèrent aux cellules endothéliales de l'hôte (cytoadhérence) ou aux globules rouges non parasités (rosetting) via des structures appelées « knobs » situées à la surface du globule rouge parasité [44]. La séquestration se décompose en 3 mécanismes : la cytoadhérence, la formation des rosettes et l'auto-agglutination.

#### **4.5.2.1. 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 [45]. 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, où elles interagissent entre elles et avec les protéines du squelette membranaire [39].

Cinq récepteurs membranaires ont été identifiés : la thrombospondine, les récepteurs CD6, ICAM-1 (Intercellular Cell Adhesion Molecule-1), VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1), ou INCAM 110 (Inducible Cell Adhesion Molecule-110) et E-sélectine (ou ELAM1, Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1) [46].

Le processus entraîne une obstruction microcirculatoire et une hypoxie subséquente, des perturbations métaboliques et une défaillance multi-organique, qui sont préjudiciables à l'hôte.

#### **4.5.2.2. Rosetting**

Le phénomène de "rosetting" est la capacité des hématies parasitées d'adhérer entre elles mais également aux 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. Ce qui entraîne une diminution de l'apport local en oxygène pouvant aboutir au décès [47]. 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 [48-50]. En outre, les IgM et IgG jouent un rôle dans le rosetting [51]. Ce processus de séquestration est essentiel à la bonne évolution et à la survie du parasite contrairement aux espèces non *falciparum*, mais à un effet délétère sur son hôte en obstruant les micro-vaisseaux [52].

#### **4.5.2.3. Auto-agglutination**

L'auto-agglutination est un mécanisme observé in vitro, elle correspond à l'adhérence entre plusieurs HP probablement favorisé par les plaquettes pour former des micro-agrégats susceptibles d'obstruer les capillaires profonds. Les mécanismes moléculaires qui prédisposent à sa survenue sont mal connus [39].

#### **4.5.2.4. Mécanisme immunologique**

La présence du parasite dans l'hôte provoque une réaction inflammatoire non spécifique qui vise à restreindre les conséquences pour l'hôte avant que les phénomènes immunitaires ne l'éliminent. Cette réaction inflammatoire peut être excessive, inadaptée, puis autonome, elle cause des dysfonctionnements puis des défaillances d'organes caractérisant le sepsis grave [53]. Les toxines du paludisme comprennent les molécules dérivées de parasite qui sont secrétées ou libérées par les parasites à des stades tardifs (trophozoïte en particulier au stade schizonte) et sont contenues parmi les protéines ancrées au glycosylphosphatidylinositol (GPI) [42]. Cette toxine facilite le recrutement de macrophage et la libération de cytokines pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6) [53]. Parmi ces médiateurs macrophagiques, le TNF- $\alpha$  est un acteur important, car son injection chez la souris reproduisait la plupart des manifestations cliniques et biologiques du paludisme grave. Chez l'homme, il a pu être démontré que le taux de TNF- $\alpha$  était corrélé au degré de gravité du paludisme, à la parasitémie et à la mortalité [54].

### **4.6. Immunité anti-palustre**

L'infection palustre stimule la réponse immunitaire de l'hôte. Ces réponses mettent en jeu le système immunitaire inné aussi bien que le système immunitaire adaptatif [55].

#### 4.6.1. Immunité innée ou naturelle

Le système immunitaire inné constitue la première ligne de défense contre les microorganismes. Il se mobilise dès les premières heures de l'infection. Les neutrophiles, les monocytes et les cellules NK (Natural Killer) semblent jouer un rôle prépondérant dans l'immunité innée observée au cours de la phase précoce du paludisme [39]. Parmi les cellules en première ligne lors de l'infection par le *Plasmodium*, on distingue les cellules dendritiques (DC), les lymphocytes T $\gamma\delta$ , les macrophages et les cellules NK (natural killer ou cellule tueuse naturelle). Ces cellules sont impliquées soit dans l'élimination des cellules infectées ou non (érythrocytes ou hépatocytes) soit dans l'initiation et la régulation de la réponse innée et adaptative [54].

Le taux de cellules NK croît aussi longtemps que celles-ci sont en mesure de détruire des globules rouges infectés par le *P. falciparum* en *in vitro*. Les cellules NK sont aussi de puissantes productrices de cytokines et de chimiokines en réponse à différents stimulus, notamment l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$ , l'IL-10, l'IL-13 ou le GM-CSF (*granulocyte/macrophage-colony stimulating factor*) [56]. La production rapide d'IFN- $\gamma$  (interféron  $\gamma$ ) est importante pour le pronostic évolutif de la pathologie. Des études récentes suggèrent que les cellules NK pourraient être l'une des sources de cette production précoce d'IFN- $\gamma$  [57]. Plus connues pour leur rôle dans l'immunité anti-tumorale et antivirale, les cellules NK seraient également capables de reconnaître directement des hématies infectées par *P. falciparum* [54].

Les preuves actuelles montrent que la reconnaissance précoce de *Plasmodium* et la libération ultérieure de cytokines et de médiateurs inflammatoires sont importantes pour l'élimination du parasite, mais peuvent également contribuer à la gravité de la maladie [58]. Au cours des dernières années, la famille des récepteurs toll-like (TLR) a été identifiée comme des molécules hôtes clés dans l'induction de réponses immunitaires innées aux ligands microbiens [59].

#### **4.6.2. Immunité acquise ou adaptative**

Cette immunité s'acquiert après plusieurs années d'exposition en zone endémique palustre contre les formes cliniques du paludisme [60]. Cependant, cette immunité n'est jamais stérilisante, car en zone de transmission endémique stable du paludisme, il est fréquent d'être porteur du parasite sans aucune manifestation clinique. Cet état est dit état de prémunition [61, 62]. L'immunité acquise dépend des espèces parasitaires, le stade de développement du parasite ainsi que la répétition de l'exposition [63]. De nombreux travaux en zone d'endémie palustre ont démontré que l'induction de l'immunité antipaludique adaptative nécessite une exposition longue. Elle se met en place progressivement avec l'âge et des expositions répétées [64]. Elle fait intervenir non seulement la réponse humorale mais aussi la réponse à médiation cellulaire. L'immunité humorale acquise est principalement dirigée contre les formes asexuées du stade érythrocytaire du cycle de développement [65].

##### **4.6.2.1. Réponse à médiation humorale**

L'infection palustre induit à la fois une production d'immunoglobulines polyclonales et spécifiques par les cellules lymphocytaires B. Ces anticorps produits au cours de l'infection palustre sont constitués essentiellement par des immunoglobulines G (IgG), les IgM mais aussi d'autres isotypes d'immunoglobulines. Bien que des anticorps d'isotypes différents puissent avoir des fonctions protectrices, les IgG sont en effet les plus performantes dans la protection antipaludique [66].

Le rôle central des IgG dans la protection antipaludique a été démontré dans les études fondamentales impliquant le transfert passif d'IgG purifiées à partir de sera d'adultes semi-immuns à des patients non immuns, entraînant l'élimination de la parasitémie [67]. Cette protection reflète la production des anticorps dirigés contre les antigènes de stade sanguin de *P. falciparum* bien que les mécanismes précis de cette protection restent incertains. Une large gamme d'immunoglobulines participerait aux mécanismes de protection, les plus importantes seraient les sous-classes IgG1 et IgG3 [68]. En effet, les sous-classes IgG1 et IgG3 sont cytophiliques et jouent un rôle important dans l'immunité antipalustre [69]. Le rôle des sous-classes IgG2 et IgG4, non cytophiliques, dans la

protection contre le paludisme n'est pas encore claire, mais il a été rapporté que ces sous-classes sont abondantes chez des individus cliniquement non protégés contre le paludisme [70, 71].

Au cours de l'infection palustre chez l'homme et les animaux, une élévation des IgE a été observée au laboratoire, traduisant le passage des activités régulatrices des cellules T de Th1 à Th2 en raison de l'exposition répétée des cellules du système immunitaire aux parasites du paludisme [72]. Les études ont montré qu'une élévation d'IgE pourrait être associée à l'apparition du paludisme grave (paludisme cérébral et autres formes sévères de paludisme) [73]. Les anticorps peuvent protéger contre le paludisme par divers mécanismes : inhibition de l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes par opsonisation de la phagocytose, inhibition de l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes, inhibition de la croissance intra-érythrocytaire du parasite, la clairance des érythrocytes infectés par ADCI « *Antibody Dependent Cellular Inhibition*, inhibition cellulaire dépendante des anticorps » [74].

#### **4.6.2.2. Réponse à médiation cellulaire**

Les études chez l'homme et les souris indiquent que les cellules T CD4+ et CD8+ sont importantes pour la protection contre le paludisme [75]. Il est actuellement établi que les cellules T CD4+ (T helper) et T CD8+ (T cytotoxiques) reconnaissent des peptides antigéniques du *Plasmodium* présentés respectivement par les molécules du CMH classe II et classe I exprimés à la surface des hépatocytes infectés [76]. Activés par les épitopes T parasitaire, les lymphocytes T CD8+ produisent de l'INF- $\gamma$  lequel induit à son tour la production de monoxyde d'azote (NO) par les hépatocytes et les macrophages conduisant à la lyse des hépatocytes infectés par *Plasmodium*. Le transfert de lymphocytes T CD8+ d'une souris immunisée à une souris naïve a montré que l'immunité protectrice contre le paludisme impliquait les cellules T CD8+ contre les stades pré-érythrocytaires [77]. Les lymphocytes T CD4+ sont essentiels pour la protection immunitaire contre les stades sanguins asexués du paludisme tant chez l'homme que chez les souris [78].

### **4.6.3. Antigènes du parasite**

#### **4.6.3.1. AMA-1 (Antigène-1 Membranaire Apicale du Mérozoïte)**

AMA-1 est une protéine membranaire intégrale de type I 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 [79]. 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 [80]. La protéine AMA-1 de *P. falciparum* est très polymorphe [81]. 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 [82].

#### **4.6.3.2. MSP1 (Protéine-1 à la surface du mérozoïte)**

La protéine de surface du mérozoïte est l'une des protéines les plus étudiées, elle est présente chez tous les espèces de *Plasmodium* étudiés. MSP1 est une protéine de surface importante avec une taille d'environ 190 kDa. Il joue un rôle majeur dans l'invasion érythrocytaire [83]. La protéine est la principale cible des réponses immunitaires humaines [84].

MSP1 contient 17 blocs de séquence flanqués de régions conservées. Le bloc 2, qui est la partie la plus polymorphe de MSP1, est regroupé en trois familles alléliques à savoir de type K1, MDA20 et RO33 [85]. Au cours de la maturation des mérozoïtes, MSP-1 subit 2 étapes de traitement protéolytique [86]. Après le clivage, le complexe MSP-1 reste attaché de manière non covalente à la surface du mérozoïte jusqu'à l'invasion, excepté un petit fragment de 19 kDa de l'extrémité C-terminale (MSP-1<sub>19</sub>) qui ne se détache pas du mérozoïte même après l'invasion. L'invasion des mérozoïtes est bloquée par les anticorps ciblant les épitopes MSP-1<sub>19</sub>. La MSP-1<sub>19</sub> est impliquée dans le développement normal des parasites [87].

#### **4.6.3.3. MSP2 (Protéine-2 à la surface du mérozoïte)**

La protéine de surface 2 du mérozoïte (MSP2) est une glycoprotéine de 23 kDa et est plus abondante à la surface du stade mérozoïte de *Plasmodium falciparum* codée par la *msp2* gène situé sur le chromosome 2 et composé de cinq blocs dont le bloc central est le plus polymorphe [88]. Ils sont impliqués dans l'invasion érythrocytaire, et sont ciblés par les réponses immunitaires [86]. Des études in vitro ont montré que les anticorps humains anti-MSP2 ont une activité fonctionnelle dans les dosages ADCl [89].

#### **4.6.3.4. EBA 175 (Antigène d'adhésion érythrocytaire 175)**

EBA-175 est une protéine de *P. falciparum* localisée dans les micronèmes à l'extrémité terminale du mérozoïte et a été bien caractérisée comme le ligand qui lie la glycophorine A (gypA), présente dans la membrane des érythrocytes [90]. La GpA est la principale glycoprotéine présente sur les érythrocytes humains et est fortement sialylée [91]. Les anticorps contre l'EBA-175 inhibent la liaison à la GpA et bloquent l'invasion des mérozoïtes in vitro [92].

#### **4.6.3.5. Antigène P27**

L'antigène P27 est une séquence de 27 acides aminés contenu dans la protéine d'exportation de trophozoïte de 1103 acides aminés (Tex1). Deux régions de Tex1 ont été synthétisées chimiquement. L'un des peptides synthétiques P27 couvre le domaine de la bobine enroulée (K845 à T871), l'autre est le P27A correspond à la région N-terminale intrinsèquement non structurée (H223 à S326). Les deux fragments de Tex1, les peptides P27 et P27A sont considérés comme de nouveaux candidats vaccins prometteurs pour le paludisme au stade sanguin [93].

Les propriétés immunogènes du P27A, associées à son faible polymorphisme et à son association avec une protection clinique contre le paludisme chez l'homme, justifient son développement ultérieur en tant que vaccin candidat contre le paludisme [94]. Le P27 est la cible des anticorps humains inhibant la croissance des parasites [95].

#### 4.6.3.6. Antigènes Pf27, Pv27, Pf43, Pv43, Pf45 et Pv45

Ces antigènes dit orthologues de *P. falciparum* et de *P. vivax*, provenant de stades sanguins asexués et contenant des structures alpha-hélicoïdales ont été sélectionnés à partir de l'analyse bio-informatique du génome du parasite correspondant. Une base de données du génome de *P. vivax* Salvador I (PlasmoDB) a été utilisée pour la sélection des protéines par le logiciel COILS [18, 96]. Ces antigènes orthologues sont les candidats idéaux pour des vaccins multi-espèces car ils sont susceptibles de susciter des réponses immunitaires contre toutes les espèces ciblées par la recherche [19, 97]. Jusqu'à cinquante orthologues de *P. vivax* présentant une homologie d'au moins 30% avec 170 protéines 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 [12].





## **4.7. Différents types de vaccins anti palustres**

### **4.7.1. 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 circumsporozoite à *P. falciparum* (CSP) couplé à l'antigène de surface du virus de l'hépatite B [98] et d'un adjuvant complexe, l'AS02A [99]. Parmi plus de 30 candidats vaccins antipaludique [100]. RTS, S/AS01 est le seul ayant atteint un stade d'évaluation clinique avancé, réalisée conformément aux directives de l'OMS garantissant la qualité, l'innocuité et l'efficacité des vaccins recombinants ciblant les parasites plasmodiaux aux stades pré-érythrocytaire et sanguin [101] et qui a été recommandé chez les enfants dans les zones à transmission modérée à forte du paludisme à *P. falciparum* [8].

En Gambie, le RTS, S/AS02 a réduit de 34% le risque de nouvelle infection d'adultes sur une période de 15 semaines [102]. 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 dont le vaccin a été administré. Il permettrait aussi de diminuer de 41,5%, le nombre d'hospitalisations liées au paludisme [103].

### **4.7.2. 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 de vaccin contre les stades sanguins asexués est le mérozoïte, la forme du parasite qui est libérée par les schizontes hépatocytaires ou érythrocytaires et qui envahie les hématies. Les efforts de développement d'un tel vaccin se sont concentrés sur les antigènes intervenant dans l'invasion des érythrocytes [104].

### **4.7.3. 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. Elle ne viserait 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 appelés vaccins bloquant la transmission. Les antigènes candidats vaccins sont entre autres : *Pfs25*, *Pfs28*, *Pf230*, *Pf45/48* [105-107].

## **4.8. Diagnostic biologique**

Il existe plusieurs méthodes de diagnostic du paludisme, mais les plus utilisés sont :

### **4.8.1. Tests de diagnostic rapide (TDR)**

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 le *P. malariae* [34]. Ils doivent toujours faire l'objet d'une confirmation par un frottis sanguin.

### **4.8.2. Goutte épaisse et le frottis mince**

Ils détectent la présence ou non du parasite et le frottis mince permet de voir la morphologie et faire le diagnostic différentiel d'espèce. Les deux méthodes sont utilisées pour estimer la parasitémie.

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

### **4.9.1. Actions préventives**

Les mesures préventives ont été mises en place pour la protection contre l'infection palustre. Il n'existe actuellement aucun vaccin contre le paludisme autorisé sur le marché, mais il y'a eu plusieurs essais vaccinaux contre *P. falciparum* seul le vaccin RTS, S/AS01 a pu atteindre la phase III. 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 [108].

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 anti vectorielle (utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides, l'utilisation de biolarvicides 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 [4].

### **4.9.2. 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 programme national de lutte contre le paludisme (PNLP) recommande les combinaisons à base de dérivés d'artémisinine en comprimé (Artémether-Luméfantrine, Artésunate-Amodiaquine) pour le traitement des cas du paludisme non compliqué après confirmation par la microscopie ou les TDR. Pour les cas graves et compliqués, l'artésunate ou l'artémether ou la quinine injectable sont retenus. Ces trois molécules 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 [109].

## **5. METHODOLOGIE**

### **5.1. Cadre de l'étude**

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'une collaboration scientifique entre les chercheurs de la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie (FMOS) et de la Faculté de Pharmacie (FAPH) de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB), Mali et ceux de l'Université de Lausanne en Suisse sur un projet de recherche visant à identifier un potentiel candidat vaccin à la fois contre *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax*.

### **5.2. Lieu d'étude**

Les échantillons de sérum ont été collectés à Kéniéroba, un village situé dans la savane forestière. C'est une zone d'endémie à *P. falciparum* où les cas sont enregistrés durant toute l'année mais avec des pics observés au cours de la saison des pluies allant de 5 à 6 mois. Les tests ont été réalisés au laboratoire d'Immunogénétique et de Parasitologie de l'ICER-Mali de la FMOS/FAPH de l'USTTB.

#### **5.2.1. Description du village de Kéniéroba**

Le village de Kéniéroba est situé à 55 km à l'ouest de Bamako dans la commune rurale de Bancoumana (cercle de Kati) sur la route nationale 15 (RN15 ; figures 2 et 3). Il est limité au sud-est par le hameau de pêche Fourda, au nord par le village de Nanguilabougou et à l'ouest par le village de Ticko. Il compte environ 2 593 habitants, qui sont essentiellement les Malinkés (90%), les Peulhs (6%) et les Bambaras (4%) etc... (recensement GIS/MRTC 2014).

Le fleuve Niger constitue le principal réseau hydrographique. Le climat est de type soudano-guinéen et la couverture végétale rencontrée marque une transition entre la savane arborée et la forêt guinéenne. Ce type de végétation existe encore à l'état délictuel au niveau des bois sacrés et le long du fleuve Niger par endroit. Les feux de brousse, l'exploitation du bois de chauffage, les défrichements nécessaires aux cultures vivrières ont profondément dégradé cette végétation, devenant propice à l'implantation

des moustiques. La savane arborée constitue la principale formation végétale mais aussi quelques galeries forestières, on distingue :

- une strate arborée avec les espèces telles que *Bombax costatum* (kapokier), *Vitellaria paradoxa* C.F. Gaertn. (Karité), *Parkia biglobosa* Jacq. (Néré), *Tamarindus indica* L. (tamarinier), *Mangifera indica* L. (manguier) ;
- une strate arbustive composée de *Combretum micranthum* G. Don (Kinkeliba); *Guieras senegalensis* JF.Gmel (N'kundiè en bambara), *Cassia sieberiana* DC (case de sieber, sindja (Pular));
- une strate herbacée ou savane de graminées dont *Cymbopogon giganteus* Chiov. (Tièkala ou Citronnelle de brousse), *Pennisetum pedicellatum* Trinet *Andropogon* sp (Ouaga ou paille à balai) ;
- une galerie forestière caractéristique de la savane guinéenne se forme le long du fleuve Niger.

Deux grandes saisons se succèdent dans cette zone : la saison des pluies de juin à octobre et la saison sèche de novembre à mai. Une courte saison de transition s'étalant de novembre à janvier que les communautés rurales désignent sous l'appellation vernaculaire de fôbonda qui se caractérise par un rafraîchissement des vents et redoutée par la population.

Les habitats de type traditionnel sont constitués de cases rondes et rectangulaires en terre battue et aux toitures en chaumes coniques, mais des maisons avec des toitures en tôle existent de plus en plus dans le village. Ces différents types de maisons propices au repos des moustiques, favorisent une densité et une agressivité anophélienne élevées. L'environnement physique des villages est propice à la transmission du paludisme. Les villages sont situés dans une grande plaine qui s'étend jusqu'au fleuve Niger. La plaine présente de nombreuses retenues d'eau pendant la saison des pluies. C'est une plaine de riziculture. Les retenues d'eau avec des crevasses naturelles du sol peuvent être des gîtes larvaires potentiels. Pendant la saison des pluies, il existe des cultures intradomiciliaires et une prolifération d'herbes sauvages dans le village, contribuant ainsi à augmenter la densité et l'agressivité des moustiques.

La température la plus élevée se situe à ~40°C au mois de mai et la plus basse est voisine de 18°C aux mois de décembre-janvier. La température moyenne annuelle est autour de 23°C. D'une manière générale, le climat y est assez agréable et la végétation est luxuriante.

La faune entomologique est constituée d'invertébrés et d'arthropodes. *Anopheles gambiae sl* et *Anopheles funestus* abondent dans le village où ils assurent la transmission du paludisme et de la filariose de Bancrofti surtout en saison des pluies. Les simulis transmettent l'onchocercose durant l'hivernage tandis que les glossines (mouche tsé-tsé) transmettent la maladie du sommeil. *Anopheles gambiae sl* est le vecteur majeur du paludisme rencontré dans la localité avec un taux moyen d'inoculation entomologique de 0,7 piqûres infectieuses/personnes/mois à Kéniéroba en 2014 [110].

Sur le plan des infrastructures sociaux de base, le village de Kéniéroba dispose d'un centre de santé dirigé par un infirmier aide-soignant. Ce dernier est secondé par deux matrones qui s'occupent des consultations prénatales et des accouchements au niveau de la maternité du dit centre. Le village dispose aussi d'une école publique comportant les premiers et seconds cycles de l'enseignement fondamental et d'une medersa communautaire qui s'occupe de l'enseignement coranique moderne.

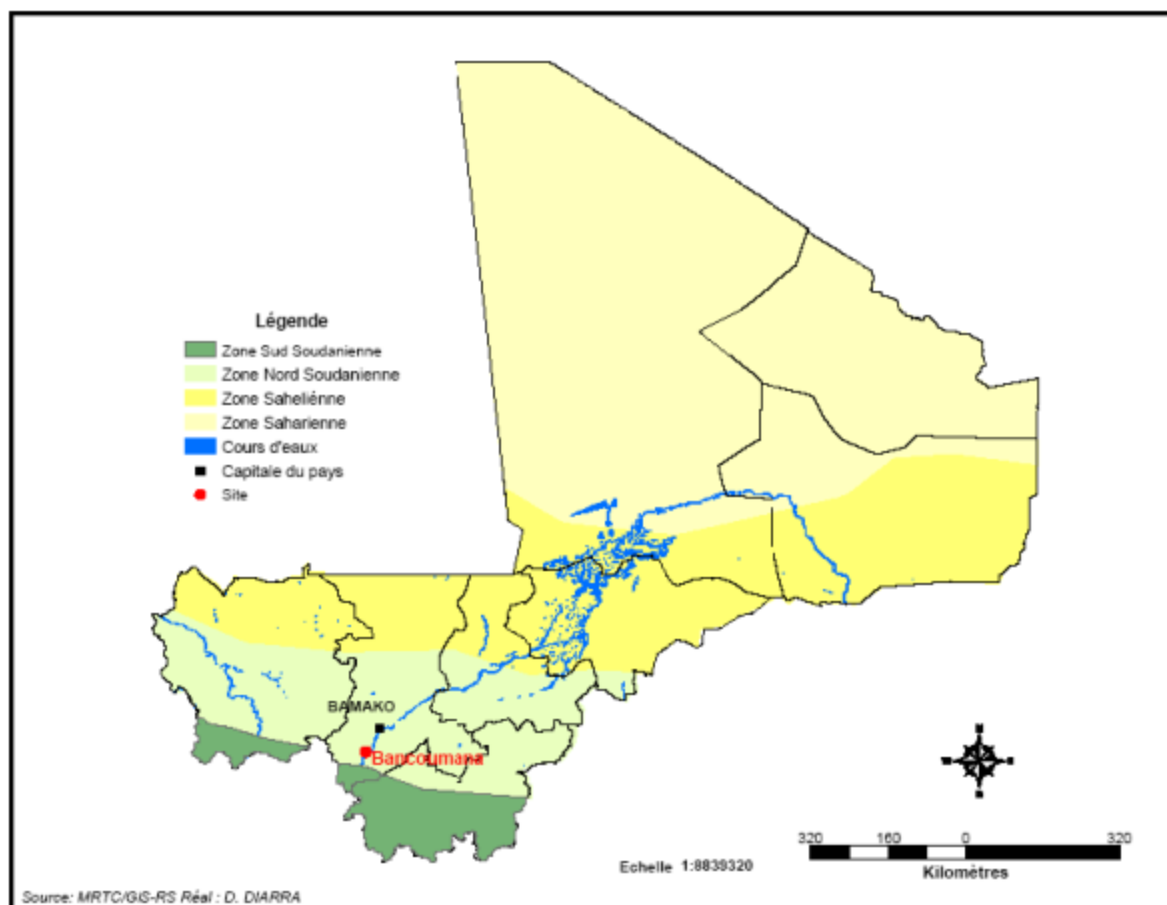
Les activités socio-économiques dominantes dans la commune rurale de Bancoumana sont marquées par l'agriculture, l'élevage, la pêche, l'artisanat, le commerce et la cueillette. L'agriculture constitue la principale activité économique des populations. La plaine de Bancoumana est propice aux cultures vivrières et industrielles. Aux abords du village, dans les retenues d'eau (deux digues), la culture du riz est très développée. Celle du sorgho, du mil, du maïs, du haricot, de la papaye, de l'orange et du citron a lieu surtout dans les alentours des concessions ou dans des jardins. La culture du dah, du coton, de l'arachide ou cacahuète, de la courge, du melon, de concombre, de l'oignon, de la patate douce, de la pomme de terre, du piment, du poivre de guinée, du tabac, du cotonnier, du sésame, de la tomate, de la banane, ainsi que d'autres produits maraîchers constituent d'importantes sources de revenu pour la population. La taille des exploitations est très



variable et dépend de la pluviométrie, des ressources humaines et financières disponibles et du patrimoine foncier.

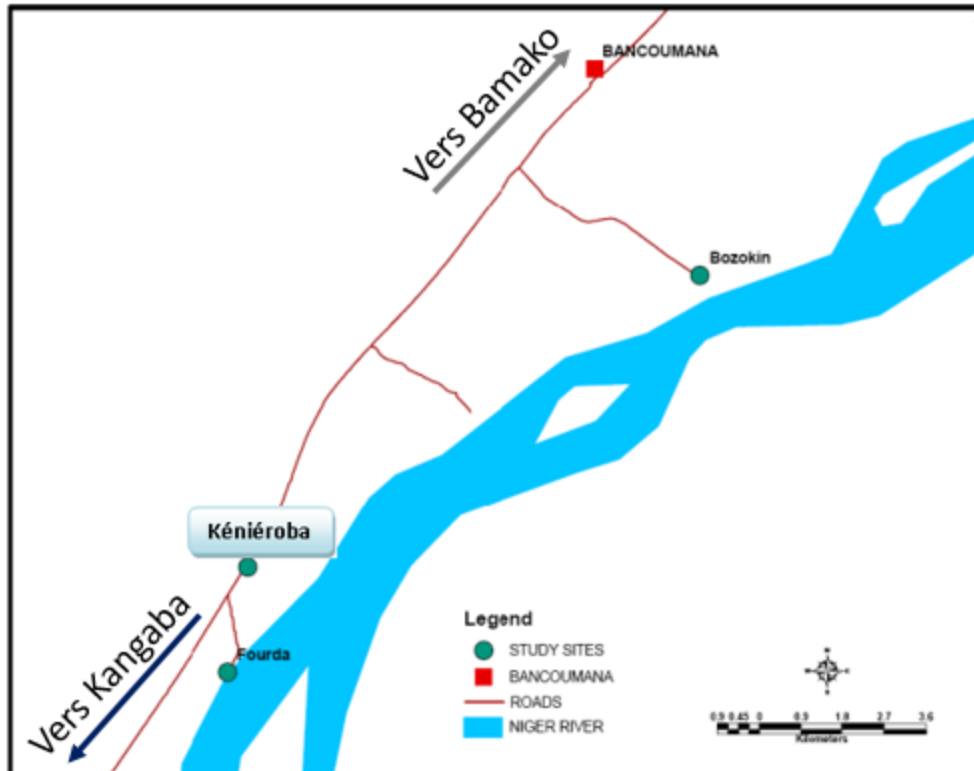
L'élevage des ovins, des caprins et des bovins y est pratiqué comme une activité économique secondaire. On y retrouve aussi quelques équidés (ânes et chevaux) utilisés comme animaux de trait. La plupart des villageois investissent leurs revenus dans l'élevage et dans les cultures industrielles. L'artisanat local est peu développé (cordonnerie, forgerie, maçonnerie, poterie). En dehors de la commercialisation des produits agricoles, le commerce des produits de consommation courante y est pratiqué surtout le jour de la foire hebdomadaire qui a lieu chaque jeudi à Kéniéroba.

L'islam représente la religion la plus dominante avec 95% de personnes qui s'en déclarent. Cependant, les religions traditionnelles sont assez présentes dans certaines grandes familles et sont visibles dans les pratiques quotidiennes de la vie socioculturelle.



**Figure 2. Carte du Mali avec la localisation de la commune rurale de Bancoumana, chel lieu du village de Kéniéroba**

**Source :** Unité GIS MRTC/FMPOS



**Figure 3. Plan de masse du village de Kénieroba dans la commune rurale de Bancoumana**

**Source :** Unité GIS MRTC/FMPOS

### **5.2.2. Laboratoire Immunogénétique et Parasitologie du MRTC/FMOS-FAPH/USTTB**

Le laboratoire d'immunogénétique et Parasitologie du Centre International d'Excellence dans la Recherche (ICER-Mali) de la FMOS/FAPH/USTTB a été créé en 2008 au sein du Département d'Entomologie et des Maladies à Transmission Vectorielles du MRTC. C'est le fruit d'une collaboration entre les chercheurs de l'USTTB et le Laboratoire de Recherche sur le Paludisme et les Vecteurs des Instituts Nationaux de la Santé des Etats-Unis d'Amérique (LMVR/NIH/USA). Le Laboratoire d'Immunogénétique a conduit de nombreuses études sur les différents aspects du paludisme notamment l'immunité innée et acquise contre le paludisme chez les enfants, la résistance aux antipaludiques et l'évaluation des stratégies de lutte et de prévention. Le laboratoire collabore avec les autres unités de recherche de l'ICER-Mali dans la lutte contre le paludisme et les autres maladies infectieuses au Mali. L'unité apporte également son soutien aux différents programmes nationaux notamment le PNLP dans la mise en œuvre des interventions de lutte chez les enfants et les femmes enceintes ; aide aussi les deux facultés dans le cadre de la formation continue des étudiants et les jeunes chercheurs. Le site principal pour mener les activités est le village de Kéniéroba, mais les activités se font aussi dans d'autres villages comme Dangassa, Koïla, Nioro du Sahel.

Le laboratoire d'immunogénétique dispose d'équipements variés adaptés à ses activités comme les équipements de biologie moléculaire, d'immunogénétique et parasitologie, le tout soutenu par un réseau informatique et une chaîne de froid adaptée au stockage des données et à conservation de différents types d'échantillons. Le laboratoire dispose d'un personnel qualifié et diversifié comprenant des immunologistes, un pharmacologue, des épidémiologistes, des médecins, des pharmaciens et des techniciens de laboratoire. Le laboratoire a également participé à plusieurs publications dans des revues scientifiques en collaboration avec des chercheurs de renommée internationale. Les analyses de biologie clinique et de recherche ont été effectuées dans ce laboratoire.

### **5.3. Type et période d'étude**

Nous avons mené une étude pilote qui consistait à tester la réactivité des antigènes du *P. falciparum* et leurs orthologues du *P. vivax* dans les échantillons de sérum provenant de Kéniéroba. Un passage transversal a été effectué en novembre 2018 chez les adultes pour collecter les échantillons, ceux des enfants collectés en novembre 2012 dans la même localité étaient déjà disponibles et conservés -80°C au niveau de l'unité Immunogénétique et Parasitologie de l'ICER-Mali.

### **5.4. Echantillonnage**

L'échantillon était constitué de 48 adultes choisis de façon exhaustive et 41 enfants dont les sera déjà disponibles ont été ajoutés pour un total de 89 échantillons.

#### **5.4.1. Critères d'inclusion**

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

- résider dans le village de Kéniéroba,
- avoir un âge entre 18-65 ans pour les adultes et 4-5 ans pour les enfants
- donner son consentement libre et éclairé pour participer à l'étude, et
- avoir un taux d'hémoglobine  $\geq 8\text{g/dl}$ .

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

Nous n'avons inclus les adultes ayant les conditions suivantes :

- toute condition qui, de l'avis de l'enquêteur, rendrait le participant incapable de se conformer au protocole (par exemple, maladie psychiatrique) ou de faire un prélèvement sanguin (l'hémophilie),
- un état de santé qui, de l'avis de l'enquêteur, ferait confondre l'analyse des données de l'étude (par exemple, malnutrition sévère, déficit immunitaire acquis ou inné), et
- exigence d'un traitement médicamenteux pour une maladie ou un état concomitant.

### **5.5. Variables mesurées**

Nous avons mesuré les variables suivantes :

- ✓ variables sociodémographiques : âge et sexe ;
- ✓ variable biologique : taux d'anticorps anti-*Pf27*, anti-*Pf43*, anti-*Pf45*, anti-*Pv27*, anti-*Pv43* et anti-*Pv45*.

## 5.6. 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). Le principe de cette technique est basé sur la détection et la quantification de la réaction antigène-anticorps dans un échantillon biologique. Les étapes de l'ELISA indirect pour la détermination du taux d'anticorps dans les échantillons de sérum lors de cette étude sont :

- sensibiliser la plaque d'ELISA (plaque de 96 puits) avec les antigènes (*Pf27*, *Pv27*, *Pf43*, *Pv43*, *Pf45* et *Pv45*) à une concentration finale de 5µg/ml et incuber à +4°C pendant toute la nuit ;
- laver la plaque à 4 reprises avec la solution de lavage TBS-T (Tris Buffered Saline with Tween®20) ;
- bloquer la plaque avec la solution TBS-T+ 5% lait (200µl/puit), puis incuber la plaque pendant une heure à la température ambiante ;
- vider les puits et transférer 50µl des échantillons de sérum à tester dilués à 1/50 dans la solution TBS-T+2,5% lait puis incuber la plaque pendant une heure à la température ambiante ;
- laver la plaque à 4 reprises et transférer dans les puits 50µl de l'anticorps secondaire dilué à 1/1000 dans la solution TBS-T+ 2,5% lait puis incuber de la plaque pendant une heure à la température ambiante ;
- laver à 4 reprises la plaque et ajouter 50µl du substrat (peroxydase) dans chaque puits pour une incubation de 15 minutes. Mettre ensuite 50µl de solution stop de peroxydase pour stopper la réaction (Dodécyl sulfate de sodium (seracare™)) ;
- la lecture de la réaction était ensuite effectuée avec le lecteur ELISA SoftMax®Pro Software à une densité optique (DO) 405nm.

Chaque échantillon a été utilisé en triplicata, tout échantillon avec une moyenne de DO supérieure ou égale à la moyenne de DO + 3 déviation standard des contrôles des négatifs était considéré comme positif pour l'antigène testé.

### **5.7. Identification et synthèse des antigènes**

Dans des études précédentes, des protéines des stades asexués érythrocytaires de *Plasmodium vivax* (n = 50) et *P. falciparum* (n = 166) contenant des motifs alpha-hélicoïdaux (coiled coil) dans leur structure ont été identifiés *in silico*, et les peptides correspondants ont été synthétisés chimiquement [97]. Sur la base des études de séroprévalence publiées des peptides alpha-hélicoïdaux dans les échantillons de plasma humain [12, 18, 19], les trois (3) paires de peptides orthologues qui ont montré la plus grande réactivité avec le plasma des zones d'endémie palustres ont été sélectionnées pour la présente étude. Les caractéristiques des couples orthologues de peptides sélectionnés sont représentés dans le tableau 1 et sont : *Pf27/Pv27*, *Pf43/Pv43* et *Pf45/Pv45*.

En bref, les peptides ont été synthétisés par la méthode de chimie en phase solide F-moc (fluorénylméthoxycarbonyle) [18, 19, 111] 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.

### **5.8. Gestion et l'analyse des données**

Les données ont été enregistrées sur un formulaire de rapport des cas (CRF). La saisie des données sociodémographiques a été faite sur Microsoft Excel 2010. Les résultats de l'ELISA ont été exportés directement dans Microsoft Excel 2010. Une vérification était faite par les investigateurs pour apporter les corrections nécessaires avant les recodages et les analyses avec le logiciel STATA version 14. Les résultats ont été présentés sous forme de tableaux et figures. Les figures ont été réalisées avec le Prism 9.

Le test de Student a été utilisé pour la comparaison des taux moyens d'anticorps. La corrélation de Pearson a été utilisée pour étudier la relation entre les différents taux moyens d'anticorps entre eux avec un seuil de signification statistique fixé à 5%. Les taux moyens d'anticorps ont été exprimés en densité optique (DO).

### **5.9. Déroulement de l'étude**

Au début du projet en 2008, 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 en mettant l'accent sur la possible utilisation des échantillons dans le futur à des fins de recherche. Chez les adultes en 2018, après la vérification des critères d'éligibilité, les données ont été collectées sur les caractéristiques sociodémographiques, suivi d'un prélèvement capillaire au bout du doigt pour déterminer le taux d'hémoglobine puis un prélèvement veineux était effectué dans un tube. Les échantillons sanguins étaient transportés à Bancoumana pour l'extraction du sérum par centrifugation. Les sera ont été conservés à -20°C avant de les transporter à Bamako dans les bonnes conditions de conservation.

Au laboratoire, les sera étaient conservés dans le congélateur à -80°C avant le test ELISA. Les 41 sera d'enfants collectés en novembre 2012 ont été ajoutés à ceux des adultes pour réaliser le test d'ELISA selon les bonnes pratiques de laboratoire. Les résultats issus de cette étude seront partagés avec les partenaires, les autorités sanitaires pour les futures directives.

### **5.10. Définition opératoire**

La 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.

### **5.11. Considérations éthiques**

Cette étude pilote découle de la grande cohorte de Kéniéroba sur l'immunité naturelle et acquise dont le protocole a été déjà approuvé par le comité d'éthique de la FMOS/FAPH de l'USTTB (cf. Lettre N°08-40/FMPOS du 5 Mai 2008), ainsi qu'aux Instituts Nationaux



de la Santé des Etats-Unis d'Amérique. L'autorisation communautaire a été obtenue auprès des autorités administratives et sanitaires ainsi que les notables coutumiers du village. Le consentement individuel a été obtenu auprès des adultes en 2018. Pour les enfants, le consentement avait été déjà obtenu en 2008 auprès des parents/tuteurs. Depuis le début de l'étude, les participants étaient informés sur la possible utilisation des données à des fins de recherche. 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.

## 6. RESULTATS

### 6.1. Résultats globaux

Au total, 89 échantillons ont été inclus dans cette étude dont 41 sera collectés chez les enfants en 2012 et 48 chez les adultes en 2018. Le sexe ratio était de 1,6 et de 1,8 en faveur des féminins respectivement pour les enfants et les adultes. La séroprévalence était de 42,7% vs 29,2% pour les antigènes orthologues *Pv27* vs *Pf27*, 12,4% vs 6,7% pour les *Pf43* vs *Pv43* et 13,5% vs 11,2% pour les *Pv45* vs *Pf45*. Parmi les antigènes testés, la séroprévalence des anticorps anti-*Pf27* (56,1%,  $p=0,0001$ ), anti-*Pv27* (87,8%,  $p=0,0001$ ) et anti-*Pv45* (29,3%,  $p=0,0001$ ) était significativement élevée chez les enfants.

## 6.2. Résultats descriptifs

Tableau 2. Répartition des groupes d'âge selon le sexe dans le village de Kéniéroba

Groupes d'âge	Masculin n (%)	Féminin n (%)	TOTAL
Enfant	16 (39)	25 (61)	41
Adulte	17 (35,4)	31 (64,6)	48

Le sexe féminin était majoritaire avec un ratio de 1,6 chez les enfants et 1,8 chez les adultes.

**Tableau 3. Séroprévalence des anticorps contre les antigènes du *P. falciparum* et leurs orthologues de *P. vivax* dans les sera provenant de Kéniéroba**

<b>Antigènes</b>	<b>Effectifs</b>	<b>Pourcentages</b>
<i>Pf27</i>	26	29,2
<i>Pv27</i>	38	42,7
<i>Pf43</i>	11	12,4
<i>Pv43</i>	06	06,7
<i>Pf45</i>	10	11,2
<i>Pv45</i>	12	13,5

La séroprévalence était respectivement de 42,7% vs 29,2% pour les antigènes orthologues *Pv27* vs *Pf27*, de 12,4% vs 6,7% pour les antigènes *Pf43* vs *Pv43* et de 13,5% vs 11,2% pour les antigènes *Pv45* vs *Pf45*.

**Tableau 4. Séroprévalence des anticorps contre les antigènes en fonction des groupes d'âge dans le village de Kéniéroba**

<b>Groupes d'âge</b>	<b><i>Pf27</i> n (%)</b>	<b><i>Pv27</i> n (%)</b>	<b><i>Pf43</i> n (%)</b>	<b><i>Pv43</i> n (%)</b>	<b><i>Pf45</i> n (%)</b>	<b><i>Pv45</i> n(%)</b>
Enfant	23 (56,1)	36 (87,8)	8 (19,5)	2 (4,9)	7(17,1)	12(29,3)
Adulte	3 (6,3)	2 (4,2)	3 (6,3)	4(8,3)	3(6,3)	0
<i>P</i>	<b>0,0001</b>	<b>0,0001</b>	0,06	0,5	0,12	<b>0,0001</b>

Les séroprévalences des anticorps contre les antigènes *Pf27* (56,1%,  $p=0,0001$ ), *Pv27* (87,8%,  $p=0,0001$ ), *Pv45* (29,3%,  $p=0,0001$ ) étaient significativement élevées chez les enfants comparés au groupe adulte.

### 6.3. Résultats analytiques

Tableau 5. Corrélation multiple entre les titres d'anticorps anti-*P. falciparum* et leurs orthologues de *P. vivax* dans les échantillons des enfants en 2012

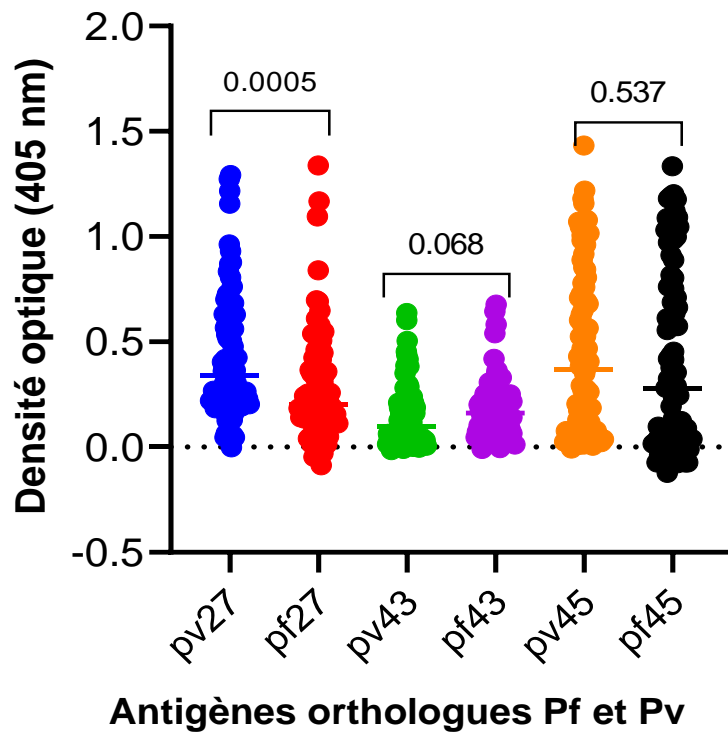
Antigènes	<i>Pf27</i>	<i>Pv27</i>	<i>Pf43</i>	<i>Pv43</i>	<i>Pf45</i>	<i>Pv45</i>
<i>Pf27</i>	1					
<i>Pv27</i>	<b>r=0,86</b> <b>p=0,0001</b>	1				
<i>Pf43</i>	r=0,09 p=0,55	r=0,12 p=0,46	1			
<i>Pv43</i>	r= -0,04 p=0,78	r= -0,04 p=0,82	<b>r=0,33</b> <b>p=0,03</b>	1		
<i>Pf45</i>	r=0,04 p=0,8	r=0,25 p=0,11	r=0,07 p=0,67	r=0,24 p=0,13	1	
<i>Pv45</i>	r=0,08 p=0,61	r= -0,03 p=0,84	r=0,26 p=0,09	r=0,35 p=0,02	<b>r=0,35</b> <b>p=0,03</b>	1

Une corrélation significative a été observée entre les titres anticorps anti-*P. falciparum* et leurs orthologues de *P. vivax* : *Pf27/Pv27* ( $r=0,86$   $p=0,0001$ ), *Pf43/Pv43* ( $r=0,33$   $p=0,03$ ), *Pf45/Pv45* ( $r=0,35$   $p=0,03$ ).

**Tableau 6. Corrélation multiple entre les titres d'anticorps anti-*P. falciparum* et leurs orthologues de *P. vivax* dans les échantillons des adultes en 2018**

Antigènes	<i>Pf27</i>	<i>Pv27</i>	<i>Pf43</i>	<i>Pv43</i>	<i>Pf45</i>	<i>Pv45</i>
<i>Pf27</i>	1					
<i>Pv27</i>	<b>r=0,41</b> <b>p=0,0042</b>	1				
<i>Pf43</i>	r=0,23 p=0,1095	r=0,46 p=0,0011	1			
<i>Pv43</i>	r=0,36 p=0,0111	r=0,50 p=0,0003	<b>r=0,79</b> <b>p=0,0001</b>	1		
<i>Pf45</i>	r=0,26 p=0,070	r=0,4 p=0,0048	r=0,32 p=0,0259	r=0,25 p=0,0929	1	
<i>Pv45</i>	r=0,32 p=0,0264	r=0,25 p=0,0890	r=0,13 p=0,3714	r=0,26 p=0,0801	<b>r=0,43</b> <b>p=0,0021</b>	1

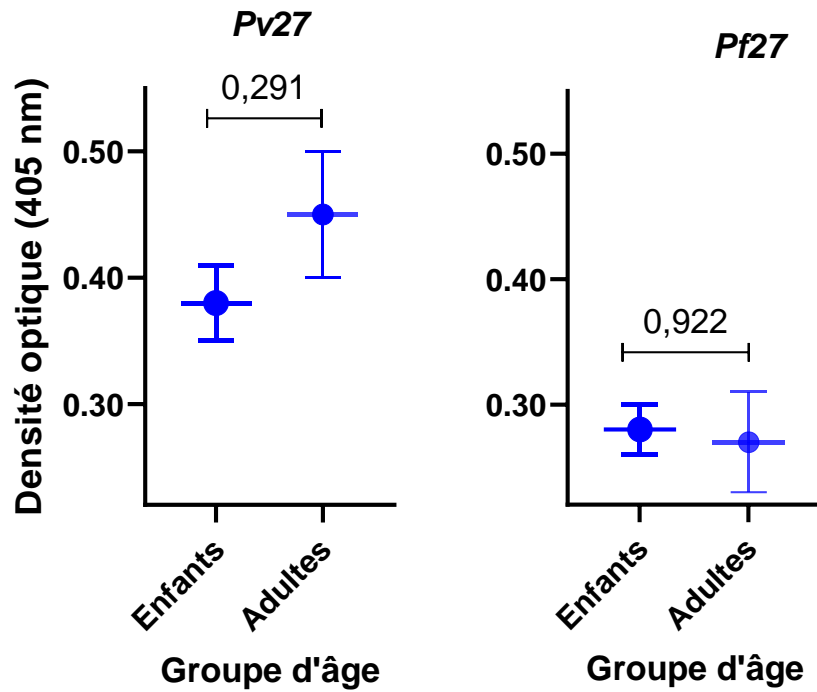
Une corrélation significative a été observée entre les titres anticorps anti-*P. falciparum* et leurs orthologues de *P. vivax*, *Pf27/Pv27* (r=0,41, p=0,0042), *Pf43/Pv43* (r=0,79, p=0,0001), *Pf45/Pv45* (r=0,43, p=0,002).



**Figure 4. Titre moyen d'anticorps contre les antigènes *Pf27*, *Pf43*, *Pf45* et leurs orthologues de *P. vivax* dans les échantillons des enfants et adultes**

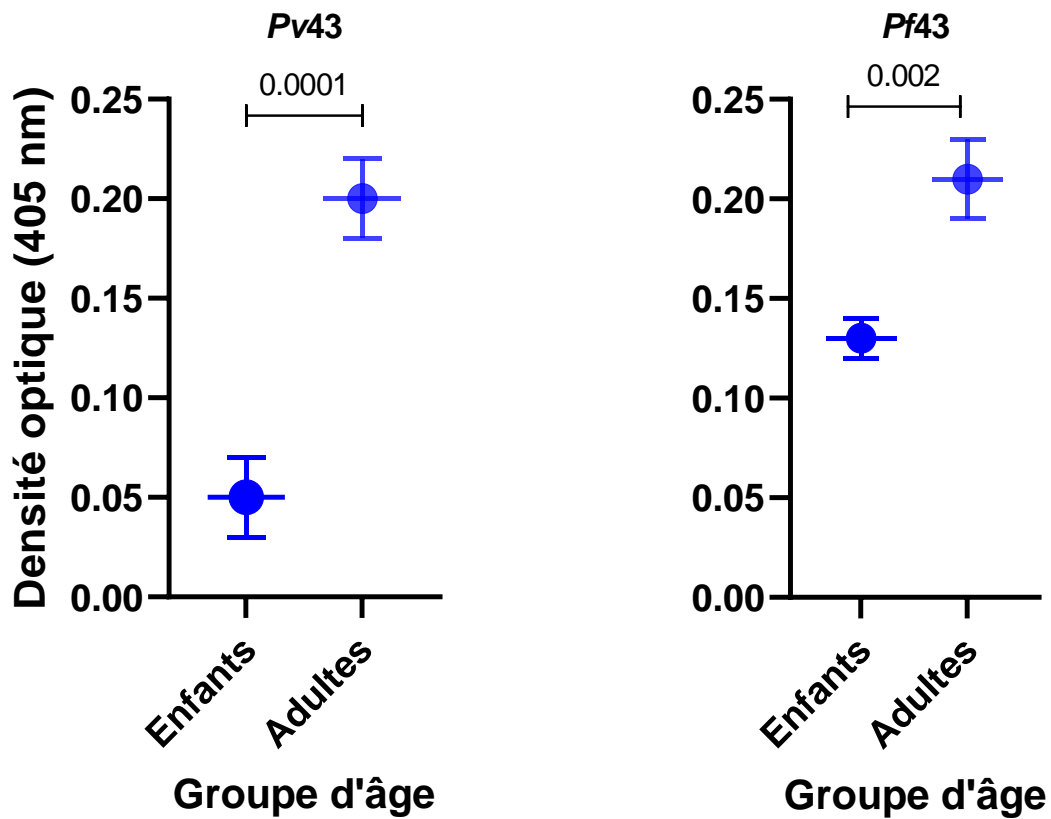
Le titre moyen d'anticorps anti-*Pv27* était significativement plus élevé que celui contre *Pf27* ( $p=0,0005$ ). En revanche, les titres moyens d'anticorps ne variaient pas entre les antigènes *Pf43* et *Pf45* de *P. falciparum* et leurs orthologues *Pv43* et *Pv45* du *P. vivax*.





**Figure 5. Titre moyen d'anticorps contre les antigènes *Pv27* et *Pf27* en fonction des groupes d'âge**

Les titres moyens d'anticorps contre les antigènes *Pf27* ( $p=0,922$ ) et *Pv27* ( $p=0,291$ ) ne variaient pas significativement entre les adultes et enfants.



**Figure 6. Titre moyen d'anticorps contre les antigènes *Pv43* et *Pf43* en fonction des groupes d'âge**

Les titres moyens d'anticorps anti-*Pv43* ( $p=0,0001$ ) et anti-*Pf43* ( $p=0,002$ ) étaient significativement plus élevés chez les adultes que chez les enfants.

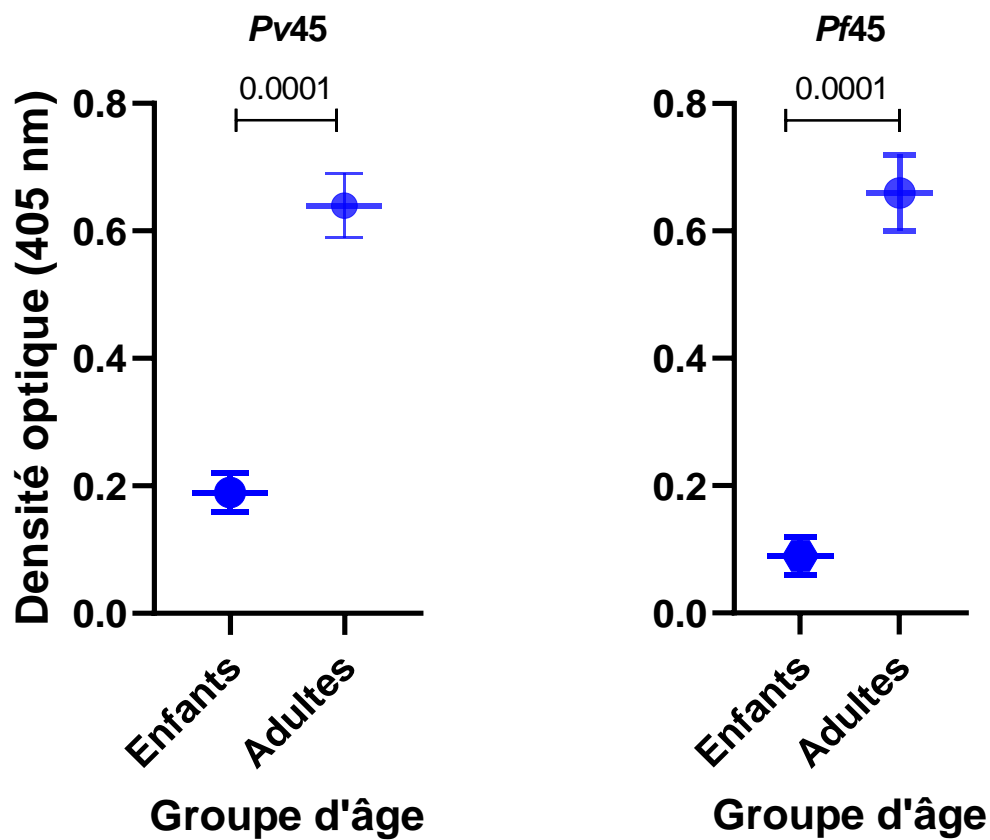
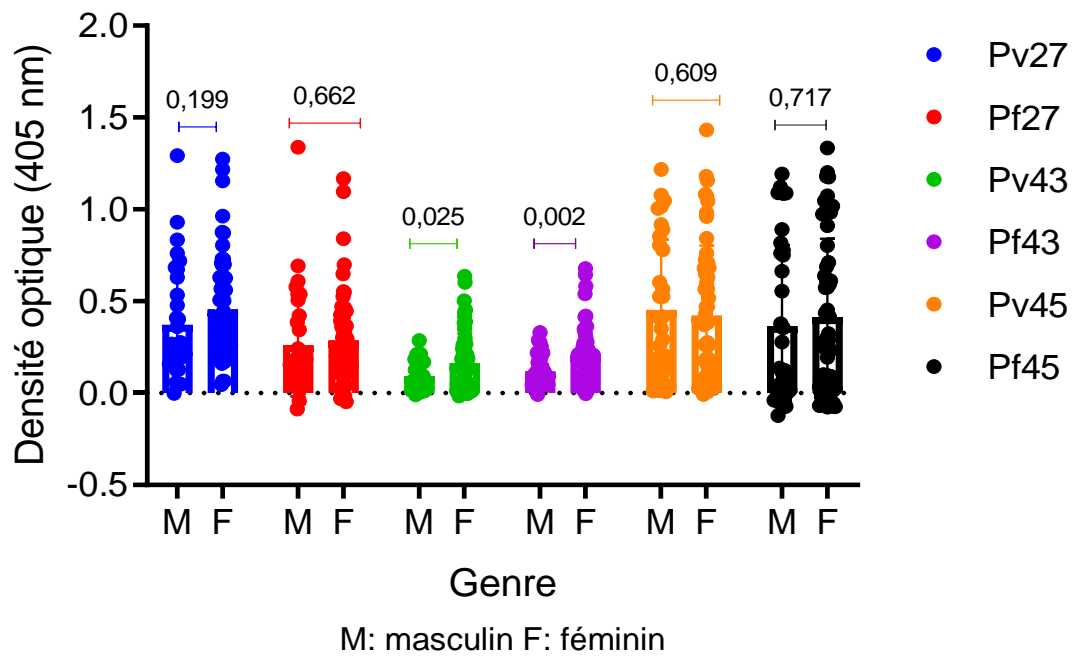


Figure 7. Titre moyen d'anticorps contre les antigènes *Pv45* et *Pf45* en fonction des groupes d'âge

Les titres moyens d'anticorps anti-*Pv45* et anti-*Pf45* étaient significativement plus élevés chez les adultes que chez les enfants ( $p=0,0001$ ).



**Figure 8. Titre moyen d'anticorps contre les antigènes *Pf27*, *Pf43*, *Pf45* et leurs orthologues de *P. vivax* en fonction du sexe**

Les titres moyens d'anticorps anti-*Pf43* et anti-*Pv43* étaient significativement plus élevés chez les féminins. En revanche, aucune différence significative n'a été observée avec les autres antigènes en fonction du sexe.

## 7. COMMENTAIRES ET DISCUSSION

Cette étude avait pour but de tester la réactivité de nouveaux antigènes du *P. falciparum* *Pf27*, *Pf43* et *Pf45* dans le sérum des volontaires vivant à Kéniéroba, une zone d'endémie à *P. falciparum*, mais aussi de déterminer la réactivité croisée de leurs segments orthologues du *P. vivax* dans la même zone. En effet, cette réactivité croisée entre les antigènes de *P. falciparum* et ceux de leurs orthologues de *P. vivax* offre une perspective de mise au point de nouveaux candidats vaccins susceptibles d'être efficaces à la fois contre *P. falciparum* et *P. vivax*.

Au total, 89 participants ont été inclus dans cette étude dont 41 enfants et 48 adultes. Le sexe ratio était respectivement de 1,6 et 1,8 en faveur des féminins chez les enfants et les adultes (tableau 2). Ce même constat a été déjà fait sur le plan national dans l'enquête démographique de santé en 2018 au Mali [3], et par Mahamadoun et col dans la même zone en 2017 [112]. De façon générale, cette tendance reflète l'évolution démographique au Mali.

La séroprévalence était globalement faible et variable en fonctions des antigènes testés. Une réactivité plus élevée a été observée avec les antigènes *Pv27* (42,7%) et *Pf43* (12,4%) comparée à leurs orthologues *Pf27* (29,2%) et *Pv43* (6,7% ; tableau 3). En revanche, nous avons observé une réactivité similaire entre les antigènes *Pf45* (11,2%) et *Pv45* (13,5%) Cependant, une étude réalisée en 2014 par Nora et col sur des échantillons de sérum provenant de zones où *P. vivax* est endémique a rapporté que la réactivité était bonne avec les antigènes *Pv27* (60 %), *Pv43* (55 %) et *Pv45* (57 %) en Colombie, ainsi qu'en Papouasie-Nouvelle-Guinée avec les mêmes antigènes *Pv27* (75 %), *Pv43* (30 %) et *Pv45* (43 %). Cette forte réactivité des antigènes de *P. vivax* peut s'expliquer par le fait que les échantillons provenaient d'adultes vivant dans des régions où le *P. vivax* est prédominant [18].

La séroprévalence était significativement plus élevée chez les enfants, notamment pour les antigènes *Pf27* (56,1%,  $p=0,0001$ ), *Pv27* (87,8%,  $p=0,0001$ ) et *Pv45* (29,3%,  $p=0,0001$ ). En revanche, nous n'avons pas observé de différence significative dans la prévalence entre les enfants et les adultes pour les antigènes *Pf43*, *Pv43* et *Pf45* (tableau 4).

De façon générale, les antigènes orthologues de *P. falciparum* et de *P. vivax* sont bien reconnus de manière similaire pour le même couple orthologue par les sera d'une zone d'endémie à *P. falciparum*. En effet, une corrélation significative de la prévalence a été observée chez les enfants entre les couples antigènes orthologues *Pf27/Pv27*, *Pf43/Pv43* et *Pf45/Pv45* mais aussi entre les antigènes non orthologues comme *Pv43/Pv45* (tableau 5). La même observation a été faite chez les adultes avec les couples antigènes orthologues, mais aussi entre les antigènes non orthologues comme *Pf27/Pv43* ; *Pf27/Pv45* ; *Pv27/Pf43* ; *Pv27/Pv43*, *Pv27/Pf45* et *Pf43/Pf45* (tableau 6). Toutefois, nous avons remarqué une forte corrélation des anticorps dirigés contre les couples orthologues *Pf27/Pv27* chez les enfants, tandis que chez les adultes cette corrélation concernait les couples orthologues *Pf43/Pv43*.

Le titre moyen d'anticorps anti-*Pv27* était significativement plus élevé que celui du *Pf27* ( $p=0,0005$ ). En revanche, ce taux était similaire pour les autres antigènes *Pv43 vs Pf43* et *Pv45 vs Pf45* (Figure 4). Les titres moyens d'anticorps pour les *Pf27* et *Pv27* ne variaient pas significativement entre les enfants et les adultes (Figure 5), contrairement aux antigènes *Pf43* ( $p=0,0001$ ), *Pv43* ( $p=0,0002$ ), *Pf45* ( $p=0,001$ ) et *Pv45* ( $p=0,0001$ ) dont les titres moyens d'anticorps étaient significativement plus élevés chez les adultes (Figure 6 et Figure 7). Globalement, les anticorps pour les antigènes orthologues de *Pf* et *Pv* semble être acquis dès l'enfance et se renforcent avec l'âge (adultes). Cette tendance d'acquisition du taux d'anticorps avec l'âge a été observée avec d'autres antigènes du *Plasmodium* [113-115]. Il a également été constaté que des sujets vivant dans des régions où le paludisme est endémique acquièrent une immunité partielle au fil des ans suivant une longue exposition aux parasites du paludisme, expliquant ainsi la forte réactivité observée chez les adultes [64, 116, 117].

En ce qui concerne le sexe, les titres moyens d'anticorps anti-*Pf43* et anti-*Pv43* étaient significativement plus élevés chez les féminins mais aucune différence significative n'a été observée pour les anticorps anti-*Pf27*, anti-*Pv27*, anti-*Pf45*, anti-*Pv45* (Figure 8). Kwenti et col ont fait le même constat en 2017 au Cameroun que le taux d'anticorps anti-AMA-1 était plus élevé chez les féminins mais que cette différence n'était pas le cas pour l'antigène MSP-1 [118].

La reconnaissance de ces antigènes de *P. falciparum* et de leurs orthologues de *P. vivax* a été déjà rapporté par Ayadi et col en 2020 chez des sujets vivant dans différentes zones d'endémie palustre à *P. falciparum*. Cette réactivité croisée entre les antigènes orthologues est expliquée par la similitude qui existe dans leurs séquences peptidiques comme rapporté par le même auteur [12]. En outre, cette réactivité croisée pourrait aussi résulter d'un contact préalable des populations avec le *P. vivax*. En effet, l'infection par *P. vivax* a été considérée comme absente pendant longtemps dans les populations africaines à antigène Duffy négatif qui sont principalement concernées par l'infection par *P. falciparum*, mais quelques cas d'infection par *P. vivax* sont maintenant identifiés parmi ces populations [119]. Au Mali, une faible prévalence de *P. vivax* a été signalée récemment [119, 120]. Ce constat permet de suggérer que, dans nos pays, les stratégies de lutte et l'identification des cibles vaccinales contre le paludisme devraient prendre en considération les espèces *P. falciparum* et *P. vivax*.

Globalement, cette étude a permis de confirmer que le sérum des personnes infectées par *P. falciparum* vivant au Mali reconnaît les antigènes de *P. vivax*, établissant ainsi l'existence d'un degré élevé de réactivité croisée entre les deux espèces de *Plasmodium*. Cette observation suggère que parmi les antigènes testés, Pf27/Pv27 et Pf45/Pv45 ont montré une meilleure réactivité croisée avec le potentiel d'être sélectionnés comme candidats. Il convient de noter que l'antigénicité de ces antigènes a déjà été testée dans des sera obtenus de donneurs provenant de pays où *P. falciparum* et *P. vivax* sont endémiques, et que les anticorps IgG spécifiques purifiés ont montré leur capacité à reconnaître les protéines natives en IFAT (Indirect Fluorescence Antibody Test) et leur activité fonctionnelle en ADCI (Antibody Dependant Cellular Inhibition) [17, 18, 20].

Nos résultats soutiennent ainsi la sélection de candidats vaccins prometteurs à combiner dans un vaccin polyvalent conférant une protection croisée contre le *P. falciparum* et *P. vivax*. Cette stratégie permettra de surmonter le polymorphisme important des antigènes de *Plasmodium* et d'éviter la longue caractérisation de la structure tridimensionnelle des protéines/domaines natifs. Aussi, la combinaison de deux ou plusieurs antigènes en un seul produit permettra de réduire considérablement le coût de fabrication et de développement d'un ou de plusieurs produits vaccinaux, fortement immunogènes et spécifiques.

## 8. LIMITES DE L'ETUDE

Cette étude s'est limitée à la détermination de la réactivité des antigènes *Pf27*, *Pf43*, *Pf45* de *P. falciparum* et de leurs orthologues de *P. vivax* dans des échantillons provenant d'une zone à forte endémicité à *P. falciparum*. Des investigations supplémentaires, incluant une analyse fonctionnelle et la dynamique des anticorps et par la suite leur association avec la protection contre l'infection et les formes cliniques seront nécessaires. En outre, la conception des polypeptides (épitopes les plus fréquents pour ces antigènes) comme candidats vaccins permettra d'évaluer leur immunogénicité et leur efficacité protectrice dans des modèles animaux.



## **9. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS**

### **9.1. Conclusion**

La prévalence des anticorps dirigés contre les antigènes de *P. vivax* dans les sera des populations de zone d'endémie à *P. falciparum* suggère l'existence de réactivité croisée entre les deux espèces de *Plasmodium*. Parmi les antigènes testés, les couples orthologues *Pf27/Pv27* et *Pf45/Pv45* ont montré une forte réactivité croisée avec le potentiel d'être sélectionnés comme candidats vaccins.

### **9.2. Recommandations**

Au terme de cette étude et au regard de nos résultats, les recommandations suivantes sont formulées :

#### **Aux autorités sanitaires et politiques**

- D'encourager et de subventionner d'avantage des études de recherche dans le cadre de la lutte contre le paludisme.

#### **Aux chercheurs**

- De mener d'autres études en vue de mieux caractériser ces antigènes en termes de leur localisation et de fonctionnalité de leur anticorps ;
- D'évaluer le rôle des anticorps produits contre ces antigènes dans la protection contre les formes cliniques de paludisme dans un grand nombre de participants ;
- De s'intéresser d'avantage aux stratégies d'identification de candidats vaccins qui soient multivalents et multi-espèces.

#### **A la population**

- D'adhérer aux protocoles et de faciliter les études de recherches susceptibles de déboucher à la mise au point d'un vaccin efficace contre le paludisme.

## 10. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Philippe, C.M., N.N. Odile, and O.L. Numbi, *[The problem of the use of Long-Lasting Insecticide Impregnated Mosquito Nets (LLIN) in children less than five years of age in Democratic Republic of Congo]*. Pan Afr Med J, 2016. **23**: p. 101.
2. OMS. *Rapport sur le paludisme dans le monde*. 2020; Available from: [https://www.who.int/docs/default-source/malaria/world-malaria-reports/world-malaria-report-2020-briefing-kit-fre.pdf?sfvrsn=69c55393\\_7](https://www.who.int/docs/default-source/malaria/world-malaria-reports/world-malaria-report-2020-briefing-kit-fre.pdf?sfvrsn=69c55393_7) (consulté le 03-09-2021).
3. INSTAT/CPS/SS-DS-PF/ICF. *Enquête Démographique et de Santé 2018*. 2019; Available from: <https://www.dhsprogram.com/pubs/pdf/FR358/FR358.pdf> (consulté le 05-06-2021).
4. OMS. *Rapport sur le paludisme dans le monde 2018*. 2018; Available from: <https://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2018/fr/> (consulté le 05-06-2021).
5. Arie, F., et al., *A molecular marker of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria*. Nature, 2014. **505**(7481): p. 50-5.
6. Ranson, H. and N. Lissenden, *Insecticide Resistance in African Anopheles Mosquitoes: A Worsening Situation that Needs Urgent Action to Maintain Malaria Control*. Trends Parasitol, 2016. **32**(3): p. 187-196.
7. Salamanca, D.R., et al., *Plasmodium falciparum Blood Stage Antimalarial Vaccines: An Analysis of Ongoing Clinical Trials and New Perspectives Related to Synthetic Vaccines*. Front Microbiol, 2019. **10**: p. 2712.
8. OMS. *Paludisme*. 2021; Available from: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/malaria> (consulté le 04-12-2021).
9. 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.
10. Dechavanne, C. *Construction de la réponse anticorps spécifique du paludisme chez le jeune enfant : étude combinée de l'hôte, du parasite et de leur environnement*. 2012; Available from: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00856581/document> (consulté le 30/07/2021).
11. Bouharoun-Tayoun, H., et al., *Antibodies that protect humans against Plasmodium falciparum blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes*. J Exp Med, 1990. **172**(6): p. 1633-41.
12. Ayadi, I., et al., *P. falciparum and P. vivax Orthologous Coiled-Coil Candidates for a Potential Cross-Protective Vaccine*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 574330.
13. Tong, P., et al., *An engineered HIV-1 gp41 trimeric coiled coil with increased stability and anti-HIV-1 activity: implication for developing anti-HIV microbicides*. J Antimicrob Chemother, 2013. **68**(11): p. 2533-44.
14. Liguori, A., et al., *NadA3 Structures Reveal Undecad Coiled Coils and LOX1 Binding Regions Competed by Meningococcus B Vaccine-Elicited Human Antibodies*. mBio, 2018. **9**(5).

15. Jiang, Z., et al., *Platform technology to generate broadly cross-reactive antibodies to  $\alpha$ -helical epitopes in hemagglutinin proteins from influenza A viruses*. Biopolymers, 2016. **106**(2): p. 144-159.
16. Corradin, G., V. Villard, and A.V. Kajava, *Protein structure based strategies for antigen discovery and vaccine development against malaria and other pathogens*. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2007. **7**(4): p. 259-65.
17. Villard, V., et al., *Rapid Identification of Malaria Vaccine Candidates Based on  $\alpha$ -Helical Coiled Coil Protein Motif*. PLOS ONE, 2007. **2**(7): p. e645.
18. Céspedes, N., et al., *Plasmodium vivax antigen discovery based on alpha-helical coiled coil protein motif*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e100440.
19. 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): p. e0179863.
20. Olugbile, S., et al., *Malaria vaccine candidate: design of a multivalent subunit  $\alpha$ -helical coiled coil poly-epitope*. Vaccine, 2011. **29**(40): p. 7090-9.
21. Agak, G.W., et al., *Longitudinal analyses of immune responses to Plasmodium falciparum derived peptides corresponding to novel blood stage antigens in coastal Kenya*. Vaccine, 2008. **26**(16): p. 1963-71.
22. Liviu, M., et al. *Paludisme*. 2016; Available from: [https://zoeproject.eu/documents/study/IO3\\_Malaria\\_FR.pdf](https://zoeproject.eu/documents/study/IO3_Malaria_FR.pdf) (consulté le 05-06-2021).
23. OMS. *Rapport sur le paludisme dans le monde 2019*. 2019; Available from: <https://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2019/fr/> (consulté le 05-06-2021).
24. Noguer, A., *Les facteurs influençant la distribution géographique du paludisme dans le monde*. Le Globe. Revue genevoise de géographie, 1979.
25. Macdonald, G., *Epidemiological basis of malaria control*. Bull World Health Organ, 1956. **15**(3-5): p. 613-26.
26. Doumbo, O. *Epidémiologie du paludisme au Mali : étude de la chloroquinorésistance, essai de stratégie de contrôle basée sur l'utilisation de rideaux imprégnés de perméthrine associée au traitement systématique des accès fébriles*. 1992.
27. Harbach, R.E., *The classification of genus Anopheles (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships*. Bull Entomol Res, 2004. **94**(6): p. 537-53.
28. Coetzee, M. and L.L. Koekemoer, *Molecular systematics and insecticide resistance in the major African malaria vector Anopheles funestus*. Annu Rev Entomol, 2013. **58**: p. 393-412.
29. Touré, Y.T., et al., *Ecological genetic studies in the chromosomal form Mopti of Anopheles gambiae s.str. in Mali, west Africa*. Genetica, 1994. **94**(2-3): p. 213-23.
30. Garrido-Cardenas, J.A., et al., *Plasmodium genomics: an approach for learning about and ending human malaria*. Parasitol Res, 2019. **118**(1): p. 1-27.
31. Pierre, A. and B.A. Gaüzère, *Paludisme*. Medecine tropicale, 2020: p. 30.

32. ANOFEL. *Paludisme*. 2014; Available from: <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/paludisme/site/html/cours.pdf> (consulté le 06-06-2021).
33. Ouldabdallahi, M., et al., [Study of morbidity and Plasmodium species in the several geographic-climatic areas of Mauritania]. *Bull Soc Pathol Exot*, 2015. **108**(2): p. 112-6.
34. Yombi, J.C. and U.N. Olinga, *La malaria : aspect clinique et thérapeutique*. Louvain Medical, 2015.
35. Faust, C. and A.P. Dobson, *Primate malarias: Diversity, distribution and insights for zoonotic Plasmodium*. *One Health*, 2015. **1**: p. 66-75.
36. Ta, T.H., et al., *First case of a naturally acquired human infection with Plasmodium cynomolgi*. *Malar J*, 2014. **13**: p. 68.
37. White, N.J., et al., *Malaria*. *Lancet*, 2014. **383**(9918): p. 723-35.
38. Rogier, C., M.-C. Henry, and A. Spiegel, *Diagnostic des accès palustres en zone d'endémie : bases théoriques et implications pratiques*. *Med. Trop*, 2001. **61** p. 27-46.
39. V. Laurent, P.B., S. Jauréguiberry, F. Bruneel, *Physiopathologie du paludisme à Plasmodium falciparum: principaux mécanismes et avancées récentes*. Edimark, 2012.
40. Angulo, I. and M. Fresno, *Cytokines in the pathogenesis of and protection against malaria*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002. **9**(6): p. 1145-52.
41. Eduardo Dei-Cas, P.M., Alain Vernes *Physiopathologie du paludisme Médecine/Sciences*, 1986.
42. Schofield, L. and F. Hackett, *Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites*. *J Exp Med*, 1993. **177**(1): p. 145-53.
43. McGuire, W., et al., *Levels of tumour necrosis factor and soluble TNF receptors during malaria fever episodes in the community*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1998. **92**(1): p. 50-3.
44. N. Argy , S.H., *Paludisme grave : de la physiopathologie aux nouveautés thérapeutiques*. Extrait du Journal des Anti-infectieux 2014.
45. 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.
46. Ho, M. and N.J. White, *Molecular mechanisms of cytoadherence in malaria*. *Am J Physiol*, 1999. **276**(6): p. C1231-42.
47. Marsh, K., et al., *The pathogenesis of severe malaria in African children*. *Ann Trop Med Parasitol*, 1996. **90**(4): p. 395-402.
48. Rowe, J.A., et al., *P. falciparum rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1*. *Nature*, 1997. **388**(6639): p. 292-295.
49. Carlson, J. and M. Wahlgren, *Plasmodium falciparum erythrocyte rosetting is mediated by promiscuous lectin-like interactions*. *J Exp Med*, 1992. **176**(5): p. 1311-7.

50. 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.
51. Scholander, C., et al., *Novel fibrillar structure confers adhesive property to malaria-infected erythrocytes*. Nat Med, 1996. **2**(2): p. 204-8.
52. Chen, Q., M. Schlichtherle, and M. Wahlgren, *Molecular aspects of severe malaria*. Clin Microbiol Rev, 2000. **13**(3): p. 439-50.
53. Saïssy, J.M., R. Petrognani, and C. Rogier. *Paludisme grave d'importation*. 2007; Available from: [http://jpmis2.free.fr/Divers/SFAR\\_2008/ca07/html/ca07\\_20/ca07\\_20.htm](http://jpmis2.free.fr/Divers/SFAR_2008/ca07/html/ca07_20/ca07_20.htm) (consulté le 09-06-2021).
54. Roetynck, S., et al., *[NK cells and innate immunity to malaria]*. Med Sci (Paris), 2006. **22**(8-9): p. 739-44.
55. Miller, L., et al., *The pathogenic basis of malaria*. Nature, 2002. **415**: p. 673-9.
56. 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.
57. Artavanis-Tsakonas, K. and E.M. Riley, *Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live Plasmodium falciparum-infected erythrocytes*. J Immunol, 2002. **169**(6): p. 2956-63.
58. Good, M.F. and D.L. Doolan, *Immune effector mechanisms in malaria*. Curr Opin Immunol, 1999. **11**(4): p. 412-9.
59. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
60. Bittencourt, N.C., et al., *Genetic sequence characterization and naturally acquired immune response to Plasmodium vivax Rhoptry Neck Protein 2 (PvRON2)*. Malaria Journal, 2018. **17**(1): p. 401.
61. Djimdé, A.A., et al., *Clearance of drug-resistant parasites as a model for protective immunity in Plasmodium falciparum malaria*. Am J Trop Med Hyg, 2003. **69**(5): p. 558-63.
62. Biswas, S., et al., *Naturally acquired immunity and reduced susceptibility to falciparum malaria in two subpopulations of endemic eastern India*. Scand J Immunol, 2008. **67**(2): p. 177-84.
63. 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.
64. Marsh, K. and S. Kinyanjui, *Immune effector mechanisms in malaria*. Parasite Immunol, 2006. **28**(1-2): p. 51-60.
65. 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.
66. Nebie, I., et al., *Humoral responses to Plasmodium falciparum blood-stage antigens and association with incidence of clinical malaria in children living in an area of seasonal malaria transmission in Burkina Faso, West Africa*. Infect Immun, 2008. **76**(2): p. 759-66.
67. Sabchareon, A., et al., *Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria*. Am J Trop Med Hyg, 1991. **45**(3): p. 297-308.

68. Tongren, J.E., et al., *Target antigen, age, and duration of antigen exposure independently regulate immunoglobulin G subclass switching in malaria*. Infect Immun, 2006. **74**(1): p. 257-64.
69. Bouharoun-Tayoun, H. and P. Druilhe, *Plasmodium falciparum malaria: evidence for an isotype imbalance which may be responsible for delayed acquisition of protective immunity*. Infect Immun, 1992. **60**(4): p. 1473-81.
70. Aucan, C., et al., *High immunoglobulin G2 (IgG2) and low IgG4 levels are associated with human resistance to Plasmodium falciparum malaria*. Infect Immun, 2000. **68**(3): p. 1252-8.
71. 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.
72. Perlmann, H., et al., *IgE elevation and IgE anti-malarial antibodies in Plasmodium falciparum malaria: association of high IgE levels with cerebral malaria*. Clin Exp Immunol, 1994. **97**(2): p. 284-92.
73. Maeno, Y., et al., *IgE deposition in brain microvessels and on parasitized erythrocytes from cerebral malaria patients*. Am J Trop Med Hyg, 2000. **63**(3-4): p. 128-32.
74. Bouharoun-Tayoun, H., et al., *Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of Plasmodium falciparum asexual blood stages*. J Exp Med, 1995. **182**(2): p. 409-18.
75. Langhorne, J., et al., *Immunity to malaria: more questions than answers*. Nat Immunol, 2008. **9**(7): p. 725-32.
76. Hoffman, S.L., et al., *T lymphocytes from mice immunized with irradiated sporozoites eliminate malaria from hepatocytes*. Bull World Health Organ, 1990. **68 Suppl**(Suppl): p. 132-7.
77. Weiss, W.R., et al., *CD8+ T cells (cytotoxic/suppressors) are required for protection in mice immunized with malaria sporozoites*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(2): p. 573-6.
78. Good, M.F. and L.H. Miller, *Interpreting challenge data from early phase malaria blood stage vaccine trials*. Expert Rev Vaccines, 2018. **17**(3): p. 189-196.
79. Hodder, A.N., et al., *The disulfide bond structure of Plasmodium apical membrane antigen-1*. J Biol Chem, 1996. **271**(46): p. 29446-52.
80. 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.
81. 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.
82. Gentil, F., et al., *A recombinant vaccine based on domain II of Plasmodium vivax Apical Membrane Antigen 1 induces high antibody titres in mice*. Vaccine, 2010. **28**(38): p. 6183-90.
83. Genton, B., et al., *A recombinant blood-stage malaria vaccine reduces Plasmodium falciparum density and exerts selective pressure on parasite populations in a phase 1-2b trial in Papua New Guinea*. J Infect Dis, 2002. **185**(6): p. 820-7.



84. Apio, B., et al., *Human IgG subclass antibodies to the 19 kilodalton carboxy terminal fragment of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 (MSP1(19)) and predominance of the MAD20 allelic type of MSP1 in Uganda*. East Afr Med J, 2000. **77**(4): p. 189-93.
85. Takala, S., et al., *Evidence for intragenic recombination in Plasmodium falciparum: identification of a novel allele family in block 2 of merozoite surface protein-1: Asembo Bay Area Cohort Project XIV*. Mol Biochem Parasitol, 2002. **125**(1-2): p. 163-71.
86. Holder, A.A., et al., *A malaria merozoite surface protein (MSP1)-structure, processing and function*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1992. **87 Suppl 3**: p. 37-42.
87. Moss, D.K., et al., *Plasmodium falciparum 19-kilodalton merozoite surface protein 1 (MSP1)-specific antibodies that interfere with parasite growth in vitro can inhibit MSP1 processing, merozoite invasion, and intracellular parasite development*. Infect Immun, 2012. **80**(3): p. 1280-7.
88. 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.
89. James S. McCarthy, J.M., Suzanne Elliott, Paul Fahey, Gilles Bang, Elissa Malkin, Eveline Tierney, Hayley Aked Hurditch, Christophe Adda, Nadia Croix, Jack S. Richards, Freya JI Fowkes, Michelle J. Boyle, *Un essai de phase 1 de MSP2-C1, un vaccin antipaludique au stade sanguin contenant 2 isoformes de MSP2 formulé avec Montanide® ISA 720*. PLOS ONE, 2011.
90. Soulama, I., et al., *Low-high season variation in Plasmodium falciparum erythrocyte binding antigen 175 (eba-175) allelic forms in malaria endemic area of Burkina Faso*. Trop Med Int Health, 2010. **15**(1): p. 51-9.
91. Marchesi, V.T., et al., *Chemical characterization and surface orientation of the major glycoprotein of the human erythrocyte membrane*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1972. **69**(6): p. 1445-9.
92. Sim, B.K., et al., *Induction of biologically active antibodies in mice, rabbits, and monkeys by Plasmodium falciparum EBA-175 region II DNA vaccine*. Mol Med, 2001. **7**(4): p. 247-54.
93. Kulangara, C., et al., *Cell biological characterization of the malaria vaccine candidate trophozoite exported protein 1*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e46112.
94. 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.
95. Steiner-Monard, V., et al., *The Candidate Blood-stage Malaria Vaccine P27A Induces a Robust Humoral Response in a Fast Track to the Field Phase 1 Trial in Exposed and Nonexposed Volunteers*. Clin Infect Dis, 2019. **68**(3): p. 466-474.
96. Lupas, A., M. Van Dyke, and J. Stock, *Predicting coiled coils from protein sequences*. Science, 1991. **252**(5009): p. 1162-4.
97. Kulangara, C., et al., *Sequence conservation in Plasmodium falciparum alpha-helical coiled coil domains proposed for vaccine development*. PLoS One, 2009. **4**(5): p. e5419.
98. Gordon, D.M., et al., *Safety, immunogenicity, and efficacy of a recombinantly produced Plasmodium falciparum circumsporozoite protein-hepatitis B surface antigen subunit vaccine*. J Infect Dis, 1995. **171**(6): p. 1576-85.

99. 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.
100. Birkett, A.J., *Status of vaccine research and development of vaccines for malaria.* Vaccine, 2016. **34**(26): p. 2915-2920.
101. WHO. *Guidelines on the quality, safety and efficacy of recombinant malaria vaccines targeting the pre-erythrocytic and blood stages of Plasmodium falciparum.* 2014; Available from: [https://www.who.int/biologicals/vaccines/Malaria\\_Guidelines\\_TRS\\_980\\_Annex\\_3.pdf](https://www.who.int/biologicals/vaccines/Malaria_Guidelines_TRS_980_Annex_3.pdf) (consulté le 11-06-2021).
102. 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.
103. 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**: p. 11.
104. Richards, J.S. and J.G. Beeson, *The future for blood-stage vaccines against malaria.* Immunol Cell Biol, 2009. **87**(5): p. 377-90.
105. 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.
106. Amoah, L.E., et al., *Dynamics of anti-MSP3 and Pfs230 antibody responses and multiplicity of infection in asymptomatic children from southern Ghana.* Parasit Vectors, 2018. **11**(1): p. 13.
107. 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): p. e0158212.
108. Vandoolaeghe, P. and L. Schuerman, *[The RTS,S/AS01 malaria vaccine in children aged 5-17 months at first vaccination].* Pan Afr Med J, 2018. **30**: p. 142.
109. PALUDISME, P.N.D.L.C.L. *PLAN STRATEGIQUE DE LUTTE CONTRE LE PALUDISME 2013-2017.* 2013; Available from: [https://www.severemalaria.org/sites/mmv-smo/files/content/attachments/2017-07-25/Mali%20malaria%20PStrag%202013-17PNLP\\_0.pdf](https://www.severemalaria.org/sites/mmv-smo/files/content/attachments/2017-07-25/Mali%20malaria%20PStrag%202013-17PNLP_0.pdf) (consulté le 06-12-2021).
110. Keïta, M., et al., *[Vectorial transmission of malaria in a village along the Niger River and its fishing hamlet (Kéniéroba and Fourda, Mali)].* Bull Soc Pathol Exot, 2014. **107**(5): p. 356-68.
111. Atherton, E., et al., *Synthesis of a 21-residue fragment of human proinsulin by the polyamide solid phase method.* Hoppe Seylers Z Physiol Chem, 1981. **362**(7): p. 833-9.
112. Assadou, M.H., et al., *Malaria Infection and Gametocyte Carriage Rates in Preparation for Transmission Blocking Vaccine Trials in Bancoumana, Mali.* Am J Trop Med Hyg, 2017. **97**(1): p. 183-187.
113. Balam, S., et al., *Plasmodium falciparum merozoite surface protein 2: epitope mapping and fine specificity of human antibody response against non-polymorphic domains.* Malaria journal, 2014. **13**: p. 510-510.



114. Griffin, J.T., et al., *Gradual acquisition of immunity to severe malaria with increasing exposure*. Proceedings. Biological sciences, 2015. **282**(1801): p. 20142657-20142657.
115. Stanisic, D.I., et al., *Acquisition of antibodies against Plasmodium falciparum merozoites and malaria immunity in young children and the influence of age, force of infection, and magnitude of response*. Infection and immunity, 2015. **83**(2): p. 646-660.
116. Akpogheneta, O.J., et al., *Duration of naturally acquired antibody responses to blood-stage Plasmodium falciparum is age dependent and antigen specific*. Infect Immun, 2008. **76**(4): p. 1748-55.
117. Barua, P., et al., *The impact of early life exposure to Plasmodium falciparum on the development of naturally acquired immunity to malaria in young Malawian children*. Malaria Journal, 2019. **18**(1): p. 11.
118. Kwenti, T.E., et al., *Variation in the immune responses against Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 and apical membrane antigen-1 in children residing in the different epidemiological strata of malaria in Cameroon*. Malar J, 2017. **16**(1): p. 453.
119. Niangaly, A., et al., *Plasmodium vivax Infections over 3 Years in Duffy Blood Group Negative Malians in Bandiagara, Mali*. Am J Trop Med Hyg, 2017. **97**(3): p. 744-752.
120. Gunalan, K., et al., *Plasmodium vivax Infections of Duffy-Negative Erythrocytes: Historically Undetected or a Recent Adaptation?* Trends Parasitol, 2018. **34**(5): p. 420-429.

## 11. ANNEXE

### Technique ELISA

#### ❖ Matériels

- Machine de lavage des plaques d'ELISA
- Lecteur de microplaque
- Aspirateur électrique
- Agitateur Magnétique
- Micropipette multicanale 50-300 µl
- Micropipette 10 µl, 20 µl
- Microplaque à fond plat
- Plaque de dilution ELISA
- Bassin de solution pour les micropipettes multicanaux
- Embout de micropipettes jetables de 1000µl, 200µl, 20µl, 10µl
- Flacon de 1000 ml
- Tubes jetables de 50 ml et 15 ml
- Feuille d'aluminium
- Mouchoirs de nettoyage jetable
- Gants Stériles
- Chronomètre approprié pour mesurer 15 min à 1 heure d'intervalle.

#### ❖ Réactifs

- Antigène de revêtement : *Pf27, Pv27, Pf43, Pv43, Pf45, Pv45*
- PBS 1X Bio Concept Cat. No.: 8-05F00-I
- Sérum
- Eau distillée
- Lait (Nonfat dry milk) BIO RAD cat 170-6404
- TBS-T (Tris Buffered Saline with Tween®20) Comprimé SIGMA-ALDRICH Lot # BCCB1564
- Substrat peroxydase (SeraCare)
- Anticorps anti-IgG humain (SeraCare) Cat. No.: 5220-0330
- Solution stop de peroxydase (Dodécyl sulfate de sodium) (SeraCare) 5X.

### ❖ Préparation des solutions

- Solution de lavage : 1 comprimé de TBS-T dans 500 ml d'eau distillée. Mélanger avec un agitateur magnétique à température ambiante jusqu'à ce que le comprimé soit dissout
- Tampon de Dilution / Blocage : Lait 5% dans du TBS/T
- Pour préparer 260 ml de Tampon de dilution/blocage, mélanger 13g lait écrémé en poudre et 260 ml de TBS/T dans un tube à 1000ml sur l'agitateur magnétique jusqu'à la dissolution complète. Conserver à 4 °C pour un maximum de cinq jours
- Lait 2,5% : Pour préparer 100 ml du lait 2,5%, mélanger 50 ml du lait 5% et 50 ml de TBS/T

- Solution d'anticorps secondaire

**Note :** Les lyophilisés des anticorps secondaires sont reconstitués à 1 mg/ml stockés à -20°C.

Pour 10 µl de la solution d'anticorps secondaires (1mg/ml) on ajoute 10 ml du lait 2,5%. Cette solution peut être préparée pendant que les plaques sont en incubation avec les anticorps primaires

- Solution stop à 1X : Pour préparer 20 ml de solution stop à 1X, mélanger 4 ml de solution stop à 5X et 16 ml de l'eau distillée.

## Procédures

### ❖ Premier jour :

Revêtement des plaques avec l'antigène

**Note :** Les plaques de polystyrène à 96 puits revêtu avec l'antigène doivent être conservées à 4°C

Identifier chaque plaque avec le nom de l'antigène et la date de revêtement avec marqueur indélébile sur le côté de la plaque.

- Le revêtement de chaque plaque nécessite 5 ml de solution de revêtement. Déterminer le volume total de solution de revêtement nécessaire pour revêtir le nombre de plaques Utilisées

- Diluer l'antigène de revêtement dans le tampon de revêtement PBS (1X) à une concentration de 5µg/ml dans un tube de 50 ml ou de 250 ml. La dilution souhaitée de l'antigène est déterminée par la concentration de la solution mère d'antigène
- Mélanger la solution en retournant le tube ou le flacon, puis versez la solution dans le bassin
- En utilisant une micropipette multicanale, mettre dans chaque puits 50µl de la solution de revêtement
- Empilez soigneusement les plaques en utilisant une pellicule en plastique. Laissez les plaques pendant au moins une nuit au réfrigérateur à 4°C.

❖ **Deuxième jour:**

Plaques de blocage

- Prendre un nombre désiré de plaques du réfrigérateur
- Laver les plaques à l'aide de la machine de lavage des plaques ELISA
- A l'aide d'une pipette multicanale, mettre dans chaque puits 200 µl (lait 5%) de tampon de blocage les couvrir d'une pellicule en plastique et laisser pendant 1 heure à température ambiante.

**NOTE** : 24 sera en triple exemplaire, à une seule dilution peuvent être testés sur une plaque. Sérum standard de dilution (sera de référence) sont inclus dans chaque plaque d'ELISA.

Préparer la dilution de l'anticorps primaire (le sérum) à 1/100 dilué lait PBS-2,5%.

- Application des anticorps primaire (sera)
- Veiller à ce que les plaques de dilution des sera test soient disponibles et à la température ambiante. Régler le volume de la pipette multicanale à 50µl
- Régler le chronomètre à 1 heure
- A l'aide de la pipette multicanale, mélanger le contenu des puits de la plaque de dilution et ensuite transférer 50 µl dans les puits de la plaque ELISA correspondante
- Démarrer le chronomètre pendant 1 heure et laisser les plaques à température ambiante

- Pendant l'incubation avec l'anticorps primaire. Préparer anticorps secondaires
- Lavage puis ajouter l'anticorps secondaire à 1/1000 dilué dans le lait PBS-2,5%
- 50 µl dans chaque puits pendant 1 heure à température ambiante
- Pendant l'incubation avec l'anticorps secondaire, au moins 30 minutes avant la fin de l'incubation, allumer le lecteur de la plaque ELISA.

#### Lavage et l'addition du substrat

- Régler le chronomètre à 15 minutes. Dès que la plaque est lavée, ajouter 50 µl de substrat par puits. Démarrer le Chronomètre. Recouvrir la plaque avec du papier aluminium à l'abri de la lumière
- Après les 15 minutes de substrat, on ajoute 50 µl de la solution stop dans chaque puits avant la lecture
- Lire la plaque à 405 nm avec le lecteur ELISA SoftMax®Pro Software à une densité optique (DO) à 405nm
- Enregistrer les données.

## 12. FICHE SIGNALÉTIQUE

**Nom :** KANTE

**Prénom :** SALIMATA

**Téléphone :** (+223) 7129 9790

**Email :** [salimatakante939@gmail.com](mailto:salimatakante939@gmail.com)

**Pays d'origine :** MALI

**Titre de la thèse :** 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

**Année Universitaire :** 2020-2021

**Ville de soutenance :** Bamako

**Lieu de dépôt :** Bibliothèque de la FMOS/FAPH de Bamako

**Source d'intérêt :** Immunologie, Parasitologie, Santé Publique

### Résumé

Les protéines de type alpha-hélicoïdales sont susceptibles d'induire une production d'anticorps dirigés contre le *Plasmodium*. Cette étude avait pour but d'étudier la réactivité des antigènes de *P. falciparum* (*Pf27*, *Pf43* et *Pf45*) et de leurs orthologues de *P. vivax* (*Pv27*, *Pv43* et *Pv45*) dans des échantillons provenant de donneurs de sang de Kéniéroba, une zone d'endémie de *P. falciparum* au Mali. Nous avons testé des échantillons des adultes prélevés en novembre 2018 ainsi que ceux des enfants prélevés en novembre 2012 dans la même localité en utilisant la technique ELISA. La séroprévalence des anticorps anti-*Pv27* était de 42,7 % vs 29,2 % pour les anti-*Pf27*, de 12,4 % pour les anti-*Pf43* vs 6,7 % pour les anti-*Pv43*, et de 13,5 % vs 11,2 % pour les anti-*Pv45* et les anti-*Pf45*. La séropositivité vis-à-vis des antigènes *Pf27* (56,1%,  $p=0,0001$ ), *Pv27* (87,8%,  $p=0,0001$ ), *Pv45* (29,3%,  $p=0,0001$ ) était nettement plus élevée chez les enfants. Une forte et positive corrélation a été constatée avec les sera des enfants et des adultes entre les antigènes de *P. falciparum* et leurs orthologues de *P. vivax*. Notre étude a confirmé l'existence de la réactivité croisée élevée entre les domaines hélicoïdaux des deux espèces de *Plasmodium*.

**Mots clés :** Réactivité croisée, *P. falciparum*, *P. vivax*, Adultes, Enfants, Mali

## Summary

### **Cross-reactivity of *P. falciparum* antigens Pf27, Pf43 and Pf45 with their orthologs Pv27, Pv43 and Pv45 of *P. vivax* to sera volunteers living in Kéniéroba, Mali**

The alpha-helical proteins are likely to induce antibody production against *Plasmodium*. The purpose of this study was to investigate the reactivity of *P. falciparum* antigens (*Pf27*, *Pf43*, and *Pf45*) and their *P. vivax* orthologs (*Pv27*, *Pv43*, and *Pv45*) in samples from blood donors from Kéniéroba, a *P. falciparum* endemic area in Mali. We tested samples from adults collected in November 2018 as well as from children collected in November 2012 in the same locality using ELISA. Seroprevalence of anti-*Pv27* antibodies was 42.7% vs 29.2% for anti-*Pf27*, 12.4% for anti-*Pf43* vs 6.7% for anti-*Pv43*, and 13.5% vs 11.2% for anti-*Pv45* and anti-*Pf45*. Seropositivity to *Pf27* (56.1%,  $p=0.0001$ ), *Pv27* (87.8%,  $p=0.0001$ ), *Pv45* (29.3%,  $p=0.0001$ ) antigens was significantly higher in children. A strong and positive correlation was observed with the sera of children and adults between *P. falciparum* antigens and their *P. vivax* orthologues. Our study confirmed the existence of high cross-reactivity between the helicoidal domains of the two *Plasmodium* species.

**Key words:** Cross-reactivity, *P. falciparum*, *P. vivax*, 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 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 consentirais à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels ;

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

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

Je le jure!