

Thèse de Pharmacie:

Evaluation de la tolérance et de l'immunogénicité du  
candidat vaccin antipaludique FMP1/AS02A

Ministère de l'Education Nationale

République du Mali

*Un Peuple – Un But – Une Foi*

UNIVERSITE DE BAMAKO

\*\*\*\*\*

FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET  
D'ODONTOSTOMATOLOGIE DU MALI

\*\*\*\*\*

Année universitaire 2005-2006      NO \_\_\_\_\_/

**TITRE**

**Evaluation de la tolérance et de l'immunogénicité d'un candidat vaccin antipaludique dérivé de la MSP1 (FMP1) associé à l'adjuvant AS02A dans une population adulte semi-immune à Bandiagara, Mali**

***THESE***

Présentée et soutenue publiquement le Samedi 25 Février 2006 à 12 heures  
devant la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie par

**Monsieur Amadou B. NIANGALY**

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

**Président du jury:** Pr Boubacar Sidiki CISSE  
**Membres du jury:** Pr Dapa Aly DIALLO  
Dr Bourema KOURIBA  
**Co-directeur de Thèse:** Dr Mahamadou Ali THERA  
**Directeur de Thèse:** Pr Ogobara K. DOUMBO

**Partenaires:** DMID (Division of Microbiology and Infectious Diseases), WRAIR (Walter Reed Army Institute of Research), CVD (Center for Vaccine Development) de l'université de Maryland Baltimore (UMB), GSKBio (GlaxoSmithKline Biologicals), Université de Bamako : FMPOS (Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie), DEAP (Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires ),

|   |
|---|
| <b>FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTO-STOMATOLOGIE</b><br><b>ANNEE UNIVERSITAIRE 2005 - 2006</b> |
|---|

**ADMINISTRATION**DOYEN : **MOUSSA TRAORE** - PROFESSEUR1<sup>ER</sup> ASSESSEUR : **MASSA SANOGO** - MAITRE DE CONFERENCES2<sup>ÈME</sup> ASSESSEUR : **GANGALY DIALLO** - MAITRE DE CONFERENCES AGREGESECRETAIRE PRINCIPAL : **YENIMEGUE ALBERT DEMBELE** - MAITRE DE CONFERENCES AGREGEAGENT COMPTABLE : **Madame COULIBALY Fatoumata TALL** - CONTROLEUR DES FINANCES**LES PROFESSEURS HONORAIRES**

|                       |                                      |
|-----------------------|--------------------------------------|
| Mr Alou BA            | Ophthalmologie                       |
| Mr Bocar SALL         | OrthopédieTraumatologie - Secourisme |
| Mr Souleymane SANGARE | Pneumo-phtisiologie                  |
| Mr Yaya FOFANA        | Hématologie                          |
| Mr Mamadou L. TRAORE  | Chirurgie Générale                   |
| Mr Balla COULIBALY    | Pédiatrie                            |
| Mr Mamadou DEMBELE    | Chirurgie Générale                   |
| Mr Mamadou KOUMARE    | Pharmacognosie                       |
| Mr Mohamed TOURE      | Pédiatrie                            |
| Mr Ali Nouhoum DIALLO | Médecine interne                     |
| Mr Aly GUINDO         | Gastro-Entérologie                   |

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

**D.E.R. CHIRURGIE ET SPECIALITES CHIRURGICALES****1. PROFESSEURS**

|                           |  |
|---------------------------|--|
| Mr Abdel Karim KOUMARE    | Chirurgie Générale                             |
| Mr Sambou SOUMARE         | Chirurgie Générale                             |
| Mr Abdou Alassane TOURE   | OrthopédieTraumatologie, <b>Chef de D.E.R.</b> |
| Mr Kalilou OUATTARA       | Urologie                                       |
| Mr Amadou DOLO            | Gynéco-Obstétrique                             |
| Mr Alhousseini Ag MOHAMED | ORL  |

**2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES**

|                                |                          |
|--------------------------------|--------------------------|
| Mr Abdoulaye DIALLO            | Ophthalmologie           |
| Mr Djibril SANGARE             | Chirurgie Générale       |
| Mr Abdel Kader TRAORE Dit DIOP | Chirurgie Générale       |
| Mr Abdoulaye DIALLO            | Anesthésie - Réanimation |
| Mr Gangaly DIALLO              | Chirurgie Viscérale      |
| Mr. Mamadou TRAORE             | Gynéco-Obstétrique       |

**3. MAITRES DE CONFERENCES**

|                     |                           |
|---------------------|---------------------------|
| Mme SY Aïda SOW     | Gynéco-Obstétrique        |
| Mr Salif DIAKITE    | Gynéco-Obstétrique        |
| Mr Filifing SISSOKO | Chirurgie Générale        |
| Mr Sékou SIDIBE     | Orthopédie. Traumatologie |
| Mr Abdoulaye DIALLO | Anesthésie - Réanimation  |

Mr Tiéman COULIBALY  
Mme TRAORE J. THOMAS  
Mr Mamadou L. DIOMBANA

Orthopédie Traumatologie  
Ophtalmologie  
Stomatologie

#### 4. MAITRES ASSISTANTS

Mme DIALLO Fatimata S. DIABATE  
Mr Sadio YENA  
Mr Issa DIARRA  
Mr Youssouf COULIBALY  
Mr Samba Karim TIMBO  
Mme TOGOLA Fanta KONIPO  
Mr Zimogo Zié SANOGO

Gynéco-Obstétrique  
Chirurgie Générale  
Gynéco-obstétrique  
Anesthésie - Réanimation  
ORL  
ORL  
Chirurgie Générale

#### 5. ASSISTANTS CHEF DE CLINIQUE

Mme Djénéba DOUMBIA  
Mr Nouhoum ONGOIBA  
Mr Zanafon OUATTARA  
Mr Adama SANGARE  
Mr Sanoussi BAMANI  
Mr Doulaye SACKO  
Mr Ibrahim ALWATA  
Mr Lamine TRAORE  
Mr Mady MAKALOU  
Mr Aly TEMBELY  
Mr Niani MOUNKORO  
Mr Tiemoko D. COULIBALY  
Mr Souleymane TOGORA  
Mr Mohamed KEITA

Anesthésie/Réanimation  
Anatomie & Chirurgie Générale  
Urologie  
Orthopédie - Traumatologie  
Ophtalmologie  
Ophtalmologie  
Orthopédie – Traumatologie  
Ophtalmologie  
Orthopédie/Traumatologie  
Urologie  
Gynécologie/Obstétrique  
Odontologie  
Odontologie  
ORL

#### D.E.R. DE SCIENCES FONDAMENTALES

##### 1. PROFESSEURS

Mr Daouda DIALLO  
Mr Siné BAYO  
Mr Amadou DIALLO  
Mr Moussa HARAMA  
Mr Ogobara DOUMBO

Chimie Générale & Minérale  
Anatomie-Pathologie-Histoembryologie  
Biologie  
Chimie Organique  
Parasitologie – Mycologie

##### 2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Yéniégué Albert DEMBELE  
Mr Anatole TOUNKARA  
Mr Amadou TOURE  
Mr. Flabou Bougoudogo  
Mr Amagana DOLO

Chimie Organique  
Immunologie **Chef de D.E.R.**  
Histoembryologie  
Bactériologie-Virologie  
Parasitologie-Mycologie

##### 3. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Bakary M. CISSE  
Mr Abdrahamane S. MAIGA

Biochimie  
Parasitologie

|                      |                               |
|----------------------|-------------------------------|
| Mr Adama DIARRA      | Physiologie                   |
| Mr Mamadou KONE      | Physiologie                   |
| Mr.Massa SANOGO      | Chimie Analytique             |
| Mr Mahamadou CISSE   | Biologie                      |
| Mr Sékou F.M. TRAORE | Entomologie médicale          |
| Mr Abdoulaye DABO    | Malacologie, Biologie Animale |
| Mr Ibrahim I. MAIGA  | Bactériologie - Virologie     |

**4. MAITRES ASSISTANTS**

|                           |                         |
|---------------------------|-------------------------|
| Mr Abdrahamane TOUNKARA   | Biochimie               |
| Mr Benoît KOUMARE         | Chimie Analytique       |
| Mr Moussa Issa DIARRA     | Biophysique             |
| Mr Kaourou DOUCOURE       | Biologie                |
| Mr Bouréma KOURIBA        | Immunologie             |
| Mr Souleymane DALLO       | Bactériologie-Virologie |
| Mr Cheik Bougadari TRAORE | Anatomie-Pathologie     |
| Mr Lassana DOUMBIA        | Chimie Organique        |
| Mr Mounirou BABY          | Hématologie             |
| Mr Mahamadou A. THERA     | Parasitologie-Mycologie |

**5. ASSISTANTS**

|                        |                                  |
|------------------------|----------------------------------|
| Mr Mangara M. BAGAYOGO | Entomologie Moléculaire Médicale |
| Mr Guimogo DOLO        | Entomologie Moléculaire Médicale |
| Mr Abdoulaye TOURE     | Entomologie Moléculaire Médicale |
| Mr Djibril SANGARE     | Entomologie Moléculaire Médicale |
| Mr Mouctar DIALLO      | Biologie Parasitologie           |
| Mr Boubacar TRAORE     | Immunologie                      |
| Mr Bokary SACKO        | Biochimie                        |

**D.E.R. DE MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES****1. PROFESSEURS**

|                       |                                 |
|-----------------------|---------------------------------|
| Mr Abdoulaye Ag RHALY | Médecine Interne                |
| Mr Mamadou K. TOURE   | Cardiologie                     |
| Mr Mahamane MAIGA     | Néphrologie                     |
| Mr Baba KOUMARE       | Psychiatrie, <b>Chef de DER</b> |
| Mr Moussa TRAORE      | Neurologie                      |
| Mr Issa TRAORE        | Radiologie                      |
| Mr Mamadou M. KEITA   | Pédiatrie                       |
| Mr Hamar A. TRAORE    | Médecine Interne                |
| Mr Dapa Aly DIALLO    | Hématologie                     |
| Mr Moussa Y. MAIGA    | Gastro-entérologie              |

**2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES**

|                       |                    |
|-----------------------|--------------------|
| Mr Toumani SIDIBE     | Pédiatrie          |
| Mr Bah KEITA          | Pneumo-Phisiologie |
| Mr Boubacar DIALLO    | Cardiologie        |
| Mr Somita KEITA       | Dermato-Leptologie |
| Mr Abdel Kader TRAORE | Médecine Interne   |
| Mr Siaka SIDIBE       | Radiologie         |
| Mr Mamadou DEMBELE    | Médecine Interne   |

**3. MAITRES DE CONFERANCES**

|                       |                   |
|-----------------------|-------------------|
| Mr Mamady KANE        | Radiologie        |
| Mr Saharé FONGORO     | Néphrologie       |
| Mr Bakoroba COULIBALY | Psychiatrie       |
| Mr Bou DIAKITE        | Psychiatrie       |
| Mr Bougouzié SANOGO   | astro-entérologie |

**4. MAITRES ASSISTANTS**

|                         |                       |
|-------------------------|-----------------------|
| Mme Tatiana KEITA       | Pédiatrie             |
| Mme TRAORE Mariam SYLLA | Pédiatrie             |
| Mr Adama D. KEITA       | Radiologie            |
| Mme SIDIBE Assa TRAORE  | Endocrinologie        |
| Mme Habibatou DIAWARA   | Dermatologie          |
| Mr Daouda K. MINTA      | Maladies Infectieuses |

**4. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE**

|                           |                          |
|---------------------------|--------------------------|
| Mr Kassoum SANOGO         | Cardiologie              |
| Mr Seydou DIAKITE         | Cardiologie              |
| Mr Mahamadou B. CISSE     | Pédiatrie                |
| Mr Arouna TOGORA          | Psychiatrie              |
| Mme DIARRA Assétou SOUCKO | Médecine Interne         |
| Mr Boubacar TOGO          | Pédiatrie                |
| Mr Mahamadou TOURE        | Radiologie               |
| Mr Idrissa A. CISSE       | Dermatologie             |
| Mr Mamadou B. DIARRA      | Cardiologie              |
| Mr Anselme KONATE         | Hépatogastro-entérologie |
| Mr Moussa t. DIARRA       | Hépatogastro-entérologie |
| Mr Souleymane DIALLO      | Pneumologie              |
| Mr Souleymane COULIBALY   | Psychologie              |
| Mr Sounkalo DAO           | Maladies Infectieuses    |
| Mr Cheick Oumar GUINTO    | Neurologie               |

**D.E.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES****1. PROFESSEUR**

|                          |  |
|--------------------------|--|
| Mr Boubacar Sidiki CISSE | Toxicologie                              |
| Mr Gaoussou KANOUTE      | Chimie Analytique, <b>Chef de D.E.R.</b> |

**2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES**

|                    |                    |
|--------------------|--------------------|
| Mr Ousmane DOUMBIA | Pharmacie Chimique |
| Mr Drissa DIALLO   | Matières Médicales |

**3. MAITRES DE CONFERENCES**

|                       |               |
|-----------------------|---------------|
| Mr Boukassoum HAIDARA | Législation   |
| Mr Elimane MARIKO     | Pharmacologie |
| Mr Alou KEITA         | Galénique     |

**4. MAITRES ASSISTANTS**

|                      |              |
|----------------------|--------------|
| Mr Benoit KOUMARE    |              |
| Mr Ababacar I. MAIGA | Toxicologie  |
| Mr Yaya KANE         | Galénique    |
| Mme Rokia SANOGO     | Pharmacognie |

**5. ASSISTANTS**

|                  |                           |
|------------------|---------------------------|
| Mr Saibou MAIGA  | Legislation               |
| Mr Ousmane KOITA | Parasitologie Moleculaire |

**D.E.R. DE SANTE PUBLIQUE****1. PROFESSEUR**

|                     |                                       |
|---------------------|---------------------------------------|
| Mr Sidi Yaya SIMAGA | Santé Publique, <b>Chef de D.E.R.</b> |
|---------------------|---------------------------------------|

**2. MAITRE DE CONFERENCES AGREGE**

|                    |                |
|--------------------|----------------|
| Mr Moussa A. MAIGA | Santé Publique |
|--------------------|----------------|

**3. MAITRES DE CONFERENCES**

|                    |                |
|--------------------|----------------|
| Mr Sanoussi KONATE | Santé Publique |
|--------------------|----------------|

**4. MAITRES ASSISTANTS**

|                      |                |
|----------------------|----------------|
| Mr Bocar G. TOURE    | Santé Publique |
| Mr Adama DIAWARA     | Santé Publique |
| Mr Hamadoun SANGHO   | Santé Publique |
| Mr Massambou SACKO   | Santé Publique |
| Mr alassane A. DICKO | Santé Publique |

**5. ASSISTANTS**

|                   |                        |
|-------------------|------------------------|
| Mr Samba DIOP     | Anthropologie Médicale |
| Mr seydou DOUMBIA | Epidémiologie          |
| Mr Oumar THIERO   | Biostatistique         |

**CHARGES DE COURS & ENSEIGNANTS VACATAIRES**

|                            |                   |
|----------------------------|-------------------|
| Mr N'Golo DIARRA           | Botanique         |
| Mr Bouba DIARRA            | Bactériologie     |
| Mr Salikou SANOGO          | Physique          |
| Mr Boubacar KANTE          | Galénique         |
| Mr Souléymanne GUINDO      | Gestion           |
| Mme DEMBELE Sira DIARRA    | Mathématiques     |
| Mr Modibo DIARRA           | Nutrition         |
| Mme MAIGA Fatoumata SOKONA | Hygiène du Milieu |
| Mr Mahamadou TRAORE        | Génétique         |
| Mr Yaya COULIBALY          | Législation       |
| Mr Lassine SIDIBE          | Chimie Organique  |

ENSEIGNANTS EN MISSION

Pr. Doudou BA  
Pr. Babacar FAYE  
Pr. Eric PICHARD  
Pr. Mounirou CISSE  
Pr. Amadou Papa DIOP

Bromatologie  
Pharmacodynamie  
Pathologie Infectieuse  
Hydrologie  
Biochimie

## DEDICACES

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

Je dédie ce travail:

### **A mon père, Birama Ogobassa NIANGALY**

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

### **A ma mère, Assé BAMADIO**

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

### **A mes sœurs : Hawa, Haram, Jacqueline, Yalowo, Yaouno**

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

### **A mes frères : Aly, Daouda et Ismaël**

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

### **A la grande famille NIANGALY à KORO (Banong)**

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

### **A ma tante Yagouno BAMADIO et famille**

A toutes les victimes du paludisme, aux enfants et femmes enceintes gardons l'espoir de contrôler complètement ce fléau qui est le paludisme.

## REMERCIEMENTS

A tous les Professeurs responsables de cours à la FMPOS, pour la qualité de l'enseignement que nous avons reçu d'eux.

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

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

Au Pr. Moussa HARAMA pour tout votre soutien et vos encouragements

Au Dr Abdoulaye DJIMDE nous ne saurions jamais vous remercier assez de votre soutien et votre engagement. Recevez ici l'expression de toute notre reconnaissance, soyez rassurés de notre fidèle attachement.

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

Aux docteurs: Mounirou BABY, Mady SISSOKO, Yacouba CISSOKO, Issa DIARRA, Modibo DAOU, Charles ARAMA, Daniel YALCOUYE, Mamadou KEITA et monsieur Moussa B. DEMBELE, pour votre entière disponibilité, votre soutien, et votre sympathie. Ce travail est le vôtre. Je vous en suis sincèrement reconnaissant.

Aux docteurs: Abdoulaye K. KONE, Ando GUINDO, Karim TRAORE, Sory DIAWARA, Mohamed ASSADOU.

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

Au Dr Dinkorma Ina OUOLOGUEM, Dr Modibo COULIBALY, Dr Karim TRAORE, Dr Renion SAYE, Dr Seydina DIAKITE, Dr Etienne GUIROU, Dr Souleymane DAMA, M<sup>lle</sup> Aminatou KONE.

A mes cadets: Agnes GUINDO, Antoine DARA, Youssouf TOLO, Younous KONE.

A tous les camarades de la 5ème année pharmacie de l'année universitaire 2001-2002 de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie de l'université de Bamako, Mali.

Aux gestionnaires et comptables: Danzele COULIBALY, Amadou ARAMA, Sékouba MARIKO, Mme Assa DAMBA et Sékou DOUMBO.

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

A tout le personnel du MRTC/DEAP.

A tous les chauffeurs du MRTC / DEAP

A nos partenaires : DMID, WRAIR, NIH, NIAID, CVD, UMB, GSkBio.

A nos guides locaux et tous les membres de l'équipe BMP de Bandiagara.

A tout le personnel du centre de santé de référence de Bandiagara.

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

Aux autorités et notables et à toute la population de la ville de Bandiagara.

A mes amis: Dr Oumar GUINDO, Dr Abdoulaye ARAMA, Dr Soumaila GUINDO, Mr Gana DJIGUIBA, Mr Yacouba DAMA

A mes oncles Monombem NIANGALY, Dr Adegné NIANGALY et Agadou NIANGALY.

Aux familles NIANGALY de Magnambougou et à tous mes cousins pour tous les efforts consentis. Recevez ici l'expression de toute ma reconnaissance, soyez rassurés de mon profond attachement.

A Mr DAMA Agadiou et famille pour votre sympathie, vos conseils et tout votre soutien. Je vous en suis profondément reconnaissant et soyez rassurés de mon attachement.

A Mr SAYE Daniel et famille

A la famille BAMADIO à SANA

A la famille Paton BAMADIO à Koro et Sevaré

A toutes et à tous, vous qui de près ou de loin m'avez soutenu, les mots me manquent pour vous exprimer toute ma joie, ma reconnaissance et tout mon respect. Je vous dis un grand merci.

## **Remerciements aux membres du jury**

### **A notre Maître et président du jury**

Professeur Boubacar Sidiki CISSE

Professeur Titulaire de Toxicologie,  
Responsable de l'enseignement de la toxicologie et de la Phytopharmacie à la  
Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie.

Cher Maître, c'est avec un grand honneur que vous nous faites en acceptant de  
présider ce jury malgré vos multiples occupations.

Votre rigueur scientifique et la clarté de vos cours de toxicologie et de  
phytopharmacie nous ont toujours fascinés et font de vous un homme respecté et  
admiré par vos étudiants que nous sommes.

Recevez ici nos sincères remerciements et notre plus grand respect

### **A notre Maître et juge**

**Professeur Dapa Aly DIALLO**

Professeur Titulaire d'hématologie,

Responsable de l'enseignement d'hématologie à la faculté de Médecine, de  
Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie

Chef de service d'hémo-oncologie médicale à l'hôpital national du point G

Responsable du laboratoire d'hématologie de la faculté de Médecine, de Pharmacie et  
d'Odonto-Stomatologie

Les mots nous manquent pour vous exprimer toute notre joie de vous compter parmi  
les membres de ce jury.

Cher maître, votre rigueur scientifique, votre disponibilité et votre sollicitude vis à vis  
de vos élèves et vos malades témoignent votre sens élevé de l'humanité.

Veillez accepter cher Professeur l'expression de toute notre reconnaissance et notre  
plus grand respect.

**A notre Maître et juge**

**Dr Bourema KOURIBA**

Maître Assistant d'Immunologie

C'est une chance pour nous de vous compter parmi les membres de ce jury malgré vos multiples occupations.

Nous avons été impressionnés par votre qualité scientifique, votre disponibilité et la simplicité avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail.

Retrouvez ici cher maître l'expression de nos sincères remerciements.

**A notre Maître et co-directeur de thèse**

**Dr Mahamadou Ali THERA**

Maître Assistant de Parasitologie et Mycologie

Chercheur au DEAP de la faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie

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

Nous avons toujours admiré vos qualités scientifiques et sociales.

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

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

Soyez rassurés de notre entière disponibilité.

**A notre Maître et Directeur de thèse  
Professeur Ogobara K. DOUMBO**

Professeur Titulaire de Parasitologie et de Mycologie  
Responsable de l'enseignement de la Parasitologie-Mycologie à la faculté de  
Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie  
Médecin chef du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires  
Directeur du Centre de Recherche et de Formation sur le Paludisme (MRTC)  
Directeur du Cours d'Epidémiologie pour Cadres Supérieurs de la Santé en Afrique

Cher Maître, c'est aujourd'hui une fierté pour nous d'être accepté à vos côtés.  
Les mots nous manquent pour vous exprimer toute notre gratitude, nous vous disons  
tout simplement MERCI.

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

**SOMMAIRE**

|   | <b>Pages</b> |
|---|--------------|
| <b>CHAPITRE I: INTRODUCTION</b>                       | 22           |
| <b>CHAPITRE II: OBJECTIFS</b>                         |              |
| 1- Objectif général                                   | 25           |
| 2- Objectifs spécifiques                              | 25           |
| <b>CHAPITRE III: GENERALITES</b>                      |              |
| 1- Cycle biologique du <i>Plasmodium falciparum</i>   | 28           |
| 2- Vaccination et candidats vaccins antipaludiques    | 29           |
| 3- Les antigènes                                      | 30           |
| 3.1- Les vaccins pré-érythrocytaires                  | 31           |
| 3.2- Les vaccins érythrocytaires                      | 33           |
| 3.3- Les vaccins bloquant la transmission             | 36           |
| 3.4- Les nouvelles approches de formulation de vaccin | 37           |
| 3.5- Les adjuvants vaccinaux                          | 39           |
| 3.5.1- Le QS-21                                       | 40           |
| 3.5.2- Le MPL   | 41           |
| 4- Etapes de développement d'un vaccin                | 42           |
| 5- Les éléments de la tolérance                       | 43           |
| 5.1- L'hémogramme                                     | 44           |
| 5.1.1- Définition                                     | 44           |
| 5.1.2- Les paramètres de l'hémogramme                 | 45           |
| 5.2- L'Alanine aminotransférase                       | 48           |
| 5.2.1- Définition                                     | 48           |
| 5.3- La créatinine                                    | 52           |
| 5.3.1- Définition                                     | 52           |
| 5.3.2- Méthodes d'exploration                         | 53           |
| 5.3.3- Signification des variations pathologiques     | 54           |
| 5.3.4- Méthodes de dosage                             | 54           |
| <b>CHAPITRE IV : NOTRE TRAVAIL</b>                    |              |
| 1- Le candidat vaccin FMP1/AS02A                      | 58           |
| 2- Justification de l'étude au Mali                   | 58           |
| 3- Le vaccin témoin antirabique IMOVAX®               | 59           |
| <br>  |              |
| 4- METHODOLOGIE                                       |              |
| 4.1-Lieu d'étude                                      | 61           |

|   |     |
|---|-----|
| 4.2-Période d'étude                                 | 66  |
| 4.3-Type d'étude                                    | 66  |
| 4.4-Population d'étude                              | 67  |
| 4.5-Technique d'échantillonnage                     | 67  |
| 4.6-Critères d'inclusion et de non-inclusion        | 67  |
| 4.6.1- Critères d'inclusion                         | 67  |
| 4.6.2- Critères de non-inclusion                    | 68  |
| 4.7-Organisation pratique du travail                | 69  |
| 4.8-Technique d'étude et variables mesurées         | 72  |
| 4.8.1- Evaluation clinique                          | 72  |
| 8.1.1- Matériels                                    | 72  |
| - Techniques de laboratoire                         | 73  |
| - Prélèvement du sang                               | 73  |
| - La réception                                      | 73  |
| - L'hémogramme                                      | 74  |
| - Les tests biochimiques                            | 75  |
| - Test de grossesse                                 | 78  |
| - Les tests immunologiques                          | 79  |
| 4.9-Considérations éthiques                         | 79  |
| 4.10-Collecte saisie, analyse des données           | 81  |
| <b>CHAPITRE V: RESULTATS</b>                        |     |
| 1-Résultats du screening                            | 82  |
| 2-Caractéristiques de base de la population d'étude | 83  |
| 3-Résultats cliniques                               | 85  |
| 4-Etude des paramètres de l'hémogramme              | 88  |
| 5-Résultats biochimiques                            | 99  |
| 6-Résultats immunologiques                          | 104 |
| <b>CHAPITRE VI: COMMENTAIRES ET DISCUSSION</b>      | 107 |
| <b>CHAPITRE VII: CONCLUSION</b>                     | 117 |
| <b>CHAPITRE VIII: RECOMMANDATIONS</b>               | 118 |
| <b>CHAPITRE IX: REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>     | 119 |
| <b>RESUME</b>                                       | 125 |
| <b>LES ANNEXES</b>                                  | 130 |

**LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX**

| <b>Figures</b>  | <b>Pages</b> |
|---|--------------|
| 1. Cycle de vie du <i>Plasmodium</i>  | 28           |
| 2. Photo et représentation schématique d'un mérozoïte de <i>P. falciparum</i>   | 36           |
| 3. Différents types de vaccin antipaludique   | 39           |
| 4. Structure du QS 21   | 40           |
| 5. Structure du MPL   | 41           |
| 6. Activité de l'ALAT   | 50           |
| 7. Métabolisme de la créatine   | 53           |
| 8. Carte du Mali avec le site d'étude (Bandiagara)  | 64           |
| 9. Carte de la ville de Bandiagara (site d'étude)   | 65           |
| 10. Moyennes pluviométriques annuelles de la ville de Bandiagara de 1997 à 2003   | 66           |
| 11. Distribution du nombre moyen des globules blancs  | 89           |
| 12. Distribution du taux moyen de l'hémoglobine   | 91           |
| 13. Distribution du taux moyen d'hématocrite  | 93           |
| 14. Distribution du nombre moyen des plaquettes   | 95           |
| 15. Distribution du nombre moyen des lymphocytes  | 97           |
| 16. Distribution des valeurs moyennes de la créatinine sérique  | 100          |
| 17. Distribution des valeurs moyennes de l'ALAT sérique   | 102          |
| 18. Courbe de distribution des moyennes géométriques des anticorps anti-FMP1  | 106          |
| <br>  |              |
| <b>Tableaux</b>   |              |
| <b>I.</b> Répartition des volontaires selon le sexe au dépistage  | 82           |
| <b>II.</b> Répartition des volontaires selon les pathologies diagnostiquées au dépistage  | 82           |
| <b>III.</b> Répartition des volontaires inclus selon le sexe  | 83           |
| <b>IV.</b> Répartition des volontaires inclus selon l'âge   | 83           |
| <b>V.</b> Distribution des moyennes des paramètres hématologiques et biochimiques selon le groupe à l'inclusion   | 84           |
| <b>VI.</b> Distribution de la valeur moyenne de la température orale, du pools et de la tension artérielle selon le groupe à l'inclusion                  | 84           |
| <b>VII.</b> Incidence des symptômes cliniques sollicités locaux durant 8 jours après chaque immunisation  | 85           |
| <b>VIII.</b> Incidence des symptômes cliniques sollicités généraux durant 8 jours après chaque immunisation   | 86           |
| <b>IX.</b> incidence des symptômes cliniques non sollicités entre J0 et J90   | 87           |
| <b>X.</b> Incidence du paludisme selon le groupe  | 88           |
| <b>XI.</b> Distribution du nombre des globules blancs ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ ) avant et après les immunisations selon le groupe d'étude              | 88           |
| <b>XII.</b> Comparaison appariée entre J0 et les autres jours de visite dans le groupe FMP1/AS02A pour les valeurs moyennes du nombre des globules blancs | 89           |
| <b>XIII.</b> Distribution du taux d'hémoglobine (g/dl) avant et après les immunisations selon le groupe d'étude.  | 90           |

|   |     |
|---|-----|
| <b>XIV.</b> comparaison appariée entre J0 et les autres jours de visite dans le groupe FMP1/AS02A pour les taux moyens d'hémoglobine  | 91  |
| <b>XV.</b> distribution du taux d'hématocrite (%) avant et après les immunisations selon le groupe d'étude  | 92  |
| <b>XVI.</b> comparaison appariée entre J0 et les autres jours de visite dans le groupe FMP1/AS02A pour les taux moyens d'hématocrite  | 93  |
| <b>XVII.</b> distribution du nombre des plaquettes ( $10^3/\mu\text{l}$ ) avant et après les immunisations selon le groupe d'étude  | 94  |
| <b>XVIII.</b> comparaison appariée entre J0 et les autres jours de visite dans le groupe FMP1/AS02A pour le nombre moyen des plaquettes   | 95  |
| <b>XIX.</b> Distribution du nombre de lymphocytes ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ ) avant et après les immunisations dans les deux groupes  | 96  |
| <b>XX.</b> comparaison appariée entre J0 et les autres jours de visite dans le groupe FMP1/AS02A pour les valeurs moyennes du nombre des lymphocytes                            | 97  |
| <b>XXI.</b> récapitulatif de la distribution des valeurs moyennes des paramètres hématologiques entre les deux groupes.   | 98  |
| <b>XXII.</b> distribution des valeurs de la créatinine sérique ( $\mu\text{mol/l}$ ) selon le groupe d'étude.   | 99  |
| <b>XXIII.</b> comparaison appariée pour la valeur moyenne de la créatinine sérique dans le groupe FMP1/AS02A  | 100 |
| <b>XXIV.</b> distribution des valeurs de l'ALAT sérique (U/L) selon le groupe d'étude.  | 101 |
| <b>XXV.</b> comparaison appariée pour la valeur moyenne de l'ALAT sérique dans le groupe FMP1/AS02A   | 102 |
| <b>XXVI.</b> récapitulatif de la distribution des valeurs moyennes des paramètres biochimiques entre les deux groupes.  | 103 |
| <b>XXVII.</b> moyennes géométriques du titre sérique d'anticorps anti-FMP1.   | 104 |
| <b>XXVIII.</b> ratio des moyennes géométriques des anticorps anti-MSP1 entre J0 et 30 jours après chaque immunisation selon le groupe d'étude et tous les trois mois après J90. | 105 |

**LISTE DES ABREVIATIONS**

|                        |  |
|------------------------|--|
| <b>3D7:</b>            | Souche de <i>Plasmodium falciparum</i> entretenue au laboratoire                         |
| <b>ADN:</b>            | Acide désoxyribonucléique  |
| <b>ALAT:</b>           | Alanine aminotransferase   |
| <b>AMA1:</b>           | Apical Membrane Antigen 1  |
| <b>AS02A:</b>          | Adjuvant System 2 de GlaxoSmithklineBiological sans thiomersal                           |
| <b>BMP:</b>            | Bandiagara Malaria Project   |
| <b>BPCs:</b>           | Bonnes Pratiques Cliniques   |
| <b>CCMH(MCHC):</b>     | Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (Mean Corpuscular Hemoglobin Content) |
| <b>CSP:</b>            | Circumsporozoite Protein   |
| <b>DEAP:</b>           | Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires                                  |
| <b>DMID:</b>           | Division of Microbiology & Infectious diseases   |
| <b>DSMB:</b>           | Data Safety and Monitoring Board   |
| <b><i>E. coli:</i></b> | <i>Escherichia coli</i>  |
| <b>EDTA:</b>           | Ethylene Diamine Triacetate Acid   |
| <b>EI:</b>             | Evènement Indésirable  |
| <b>EIG:</b>            | Evènement Indésirable Grave  |
| <b>FDA:</b>            | Foods and Drugs Administration   |
| <b>FMP1:</b>           | Falciparum Malaria Protein 1   |
| <b>FMPOS:</b>          | Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie                                 |
| <b>GCP:</b>            | Good Clinical Practice   |
| <b>GLP:</b>            | Good Laboratory Practice   |

|                   |  |
|-------------------|--|
| <b>GMP:</b>       | Good Manufactory Practices                             |
| <b>GSKBio:</b>    | GlaxoSmithklineBiological                              |
| <b>Hg (Hgb):</b>  | Hémoglobine (Hemoglobin)                               |
| <b>HCG:</b>       | Human Chorionic Gonadotrophin                          |
| <b>Ht (Hct):</b>  | Hématocrite (Hematocrit)                               |
| <b>IM</b>         | Intra musculaire                                       |
| <b>Lymp</b>       | Lymphocytes  |
| <b>m:</b>         | moyenne  |
| <b>MGG:</b>       | May-Grunwald-Giemsa                                    |
| <b>MM:</b>        | Moniteur Médical                                       |
| <b>MMVDU:</b>     | Mali Malaria Vaccine Development Unit                  |
| <b>MPL:</b>       | Monophosphoryl Lipide A                                |
| <b>MRTC:</b>      | Malaria Research and Training Center                   |
| <b>MSP-1:</b>     | Merozoite Surface Protein 1                            |
| <b>MVDU:</b>      | Malaria Vaccine Development Unit                       |
| <b>n:</b>         | nombre   |
| <b>NADH/NAD:</b>  | Nicotinamide Adenine Dinucléotide                      |
| <b>NIAID:</b>     | National Institute of Allergy and Infectious Diseases  |
| <b>NIH:</b>       | National Institutes of Health                          |
| <b>OMS:</b>       | Organisation Mondiale de la Santé                      |
| <b>Pfs25:</b>     | Antigène du gamétocyte de <i>Plasmodium falciparum</i> |
| <b>Pvs28:</b>     | Antigène du gamétocyte de <i>Plasmodium vivax</i>      |
| <b>Plt (Plt):</b> | Plaquettes (Plateletes)                                |

|                    |   |
|--------------------|---|
| <b>QS-21:</b>      | <i>Quillaja saponaria 21</i>  |
| <b>RBC (GR):</b>   | Red Blood Cell (Globule Rouge)  |
| <b>RTS,S:</b>      | Fusion protéique entre l'antigène circumsporozoite protéin du <i>Plasmodium falciparum</i> et HbsAg (Antigène de surface du virus d'hépatite B) |
| <b>SBAS2:</b>      | Smithkline Beecham Adjuvant System 2  |
| <b>SCI :</b>       | Statistic Cooperative Initiative  |
| <b>SD:</b>         | Standard Deviation  |
| <b>SMC:</b>        | Safety Monitoring Committee   |
| <b>SPf66:</b>      | Synthetic polypeptid <i>Plasmodium falciparum</i> 66  |
| <b>SST:</b>        | Serum Separator Tube  |
| <b>TBVs:</b>       | Transmission Blocking Vaccines  |
| <b>TCMH (MCH):</b> | Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (Mean Corpuscular Hemoglobin)   |
| <b>VGM (MCV):</b>  | Volume Globulaire Moyen (Mean Corpuscular Volume)   |
| <b>WBC (GB):</b>   | White Blood Cell (Globules Blancs)  |
| <b>WRAIR:</b>      | Walter Reed Army Institute of Research  |
| <b>WHO:</b>        | World Health Organization   |

## I- INTRODUCTION

Le paludisme est une érythrocytopathie fébrile et hémolysante, causé par le développement et la multiplication d'abord dans le foie puis dans les globules rouges d'un hématozoaire du genre *Plasmodium*, transmis à l'homme par la piqûre infectante des moustiques femelles du genre *Anopheles*.

Principale maladie parasitaire humaine, le paludisme représente une menace majeure pour près de 2 milliards de personnes dans le monde, avec 300 à 500 millions de cas de paludisme clinique rapportés par an et 1 à 2 millions de décès [1, 2] surtout chez les enfants de moins de 5 ans.

Le paludisme tue un enfant toutes les 30 secondes dans le monde, la plupart en Afrique au sud du Sahara [3].

En Afrique (continent le plus touché), 30% des admissions hospitalières en pédiatrie et 40% des consultations au dispensaire ont pour cause le paludisme [4]. Mortalité infantile et maternelle élevée, insuffisance pondérale à la naissance, absentéisme scolaire et faible productivité agricole, sont les principaux maux dont le paludisme est responsable sur ce continent. Cette maladie frappe surtout les pauvres qui vivent en zones rurales dans des habitations qui ne les protègent guère contre les piqûres des moustiques. En débilisant les bras valides et réduisant ainsi leur productivité, la maladie ne fait que les appauvrir encore plus. En 1997 la Banque Mondiale a estimé à 2 milliards de dollar [5] la perte économique que le paludisme inflige à l'Afrique.

Au Mali le paludisme est une cause principale de morbidité et de mortalité, avec une transmission saisonnière. Le paludisme constitue 48% des motifs des consultations dans la population générale dont 59,8% chez les enfants de 0 à 5 ans, le taux de

létalité du paludisme grave et compliqué au service de pédiatrie de l'hôpital Gabriel Touré a été de 15,3% en 2001 [6].

A Bandiagara, une ville sahélienne du Mali, la transmission du paludisme est d'une intensité saisonnière. Des études réalisées depuis 1999 ont montré que 85% des enfants de moins de 10 ans faisaient au moins un accès de paludisme durant une saison de transmission, en moyenne 1,92 épisodes de paludisme par enfant et par saison de transmission [7].

L'incidence du paludisme grave était de 2,5% en 2000 [7], le neuropaludisme représentait 40% et l'anémie sévère, 18,6% des cas.

Au cours de ces dernières années, le paludisme est de retour dans les zones où il avait été éradiqué depuis les années cinquante et la transmission s'étend de plus en plus dans les zones où le paludisme n'avait jamais été documenté dans le passé [8].

La lutte antipaludique repose à présent sur l'utilisation des médicaments pour éliminer les parasites, des supports imprégnés d'insecticides contre les vecteurs et des combinaisons stratégiques de ces outils en fonction de l'environnement social, économique et écologique.

Toutefois, l'émergence et l'extension du phénomène de résistance des parasites aux médicaments et des vecteurs aux insecticides handicapent sérieusement l'efficacité de ces outils [9].

Il est nécessaire de trouver de nouveaux outils de lutte contre le paludisme. Le vaccin antipaludique serait un atout majeur pour combattre et éventuellement éliminer ce fléau.

Les efforts de développement de vaccins antipaludiques se sont concentrés essentiellement sur deux étapes dans le cycle biologique de *Plasmodium falciparum* notamment l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes et des érythrocytes par les mérozoïtes. Un vaccin visant les mérozoïtes permettrait d'éviter les manifestations

cliniques en bloquant l'invasion des érythrocytes. Parmi un grand nombre d'antigènes du parasite, la MSP1 (Merozoite Surface Protein1) a été l'un des plus étudiés. C'est une protéine de surface du mérozoïte de *Plasmodium falciparum* qui est essentielle dans le processus de l'invasion de globule rouge par le mérozoïte [10].

Dans cette optique, le Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR) a développé et fabriqué un candidat vaccin dénommé FMP1 (Falciparum Malaria Protein 1), associé à un puissant adjuvant AS02A de GlaxoSmithkline Biological (GSKBio).

La FMP1 est une version recombinante de la portion C-terminale du fragment 42kDa de la MSP1, provenant de la souche 3D7 de *Plasmodium falciparum*. L'antigène FMP1 est constitué de 392 acides aminés.

Du fait du manque de modèles expérimentaux adéquats pour mesurer l'efficacité des vaccins antipaludiques, leur développement clinique exige un essai clinique de phase I chez l'homme pour évaluer la tolérance et l'immunogénicité de ces candidats vaccins, puis des phases II et III d'immunogénicité et d'efficacité.

Le Centre de Recherche et de Formation sur le Paludisme (MRTC) du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires (DEAP) de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie à l'Université de Bamako, s'est investi dans une stratégie de développement clinique de ce candidat vaccin FMP1/AS02A à Bandiagara au Mali. Cette étude s'intègre dans le cadre d'un partenariat étroit avec des institutions telles : le Malaria Vaccine Développement Branch (MVDB) du National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) du National Institutes of Health (NIH) des Etats-Unis, le Center of Vaccine Development de l'Université du Maryland, le WRAIR et GSKBio pour conduire un essai clinique de phase I afin d'évaluer la tolérance et l'immunogénicité de ce nouveau produit FMP1/AS02A.

Notre essai visait, à évaluer la tolérance et l'immunogénicité du candidat vaccin FMP1 associé à l'adjuvant AS02A dans une population adulte âgée de 18 à 55 ans à Bandiagara au Mali, une zone de transmission du paludisme d'intensité saisonnière.

## II- OBJECTIFS

### II-1-Objectif général:

- Evaluer la tolérance et l'immunogénicité du candidat vaccin antipaludique FMP1 associé à l'adjuvant AS02A dans une population adulte semi-immune âgée de 18 à 55 ans à Bandiagara au Mali.

### II-2-Objectifs spécifiques:

1. Déterminer l'incidence des symptômes cliniques sollicités pendant 8 jours après chaque immunisation
2. Déterminer l'effet du candidat vaccin FMP1/AS02A sur l'évolution des différents paramètres de l'hémogramme au cours des différents passages.
3. Déterminer l'effet du candidat vaccin FMP1/AS02A sur l'évolution de la créatinine et de l'ALAT sériques au cours des différents passages.
4. Suivre l'évolution du titre d'anticorps anti-MSP1 suite à l'administration des 3 doses du candidat vaccin FMP1/AS02A jusqu'à 12 mois après la première dose.

### III- GENERALITES

Le paludisme constitue un problème important de santé publique, les outils utilisés jusqu'à présent dans le contrôle de cette maladie ont montré leur insuffisance compte tenu de la complexité du cycle de vie de l'agent pathogène, le *Plasmodium*, qui échappe souvent au contrôle du système immunitaire de l'hôte.

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

#### **1-Cycle biologique du *Plasmodium falciparum*:**

Dans la nature le *Plasmodium* a deux hôtes : le moustique femelle du genre *Anopheles* chez lequel se déroule le cycle sexué sporogonique et l'hôte vertébré chez qui se déroule le cycle asexué schizogonique. Le cycle de vie du parasite comporte plusieurs étapes avec une expression de différents antigènes à chaque étape qui entraînent une réponse immunitaire spécifique de stade [11].

Le cycle peut être principalement résumé en trois étapes :

**Le cycle pré-érythrocytaire** : Le sporozoïte, forme infestante du parasite est injecté à l'homme avec la salive du moustique lors de son repas sanguin. A travers la circulation sanguine, les sporozoïtes gagnent rapidement le foie, pénètrent les hépatocytes. Dans ces cellules, chaque sporozoïte se développe et donne un schizonte. A maturité le schizonte appelé corps bleu éclate et libère environ 20.000 à 30.000 mérozoïtes dans la circulation sanguine [12].

**Le cycle érythrocytaire**: Une fois dans la circulation sanguine les mérozoïtes pénètrent activement dans les érythrocytes, où ils se transforment en trophozoïtes. La réplication de l'ADN et la multiplication des noyaux dont chacun s'entoure d'une

plage cytoplasmique donnera naissance à un schizonte ou corps en rosace [13]. A maturité le schizonte éclate et libère les mérozoïtes qui vont suivre immédiatement un cycle d'invasion des érythrocytes.

**Le cycle sexué**: Après plusieurs cycles asexués schizogoniques, certains mérozoïtes érythrocytaires se différencient en élément à potentiel sexuel, les gamétocytes mâles et femelles. En prenant son repas sanguin sur un sujet infesté, le moustique absorbe les différents stades du parasite. Les éléments asexués sont digérés. Les gamétocytes femelles se transforment en macro gamètes. La microgametogenèse transforme le gamétocyte mâle en microgamètes par exflagelation et division nucléaire [13].

La fécondation donne naissance à un zygote puis l'ookinète, œuf mobile qui traverse la paroi de l'estomac, formant à l'extérieur de la surface externe, l'oocyste dans lequel s'individualisent les sporozoïtes libérés par l'éclatement de l'oocyste mur. Les sporozoïtes gagneront avec prédilection les glandes salivaires de l'anophèle, qui les injecte à l'homme à l'occasion d'un repas sanguin.

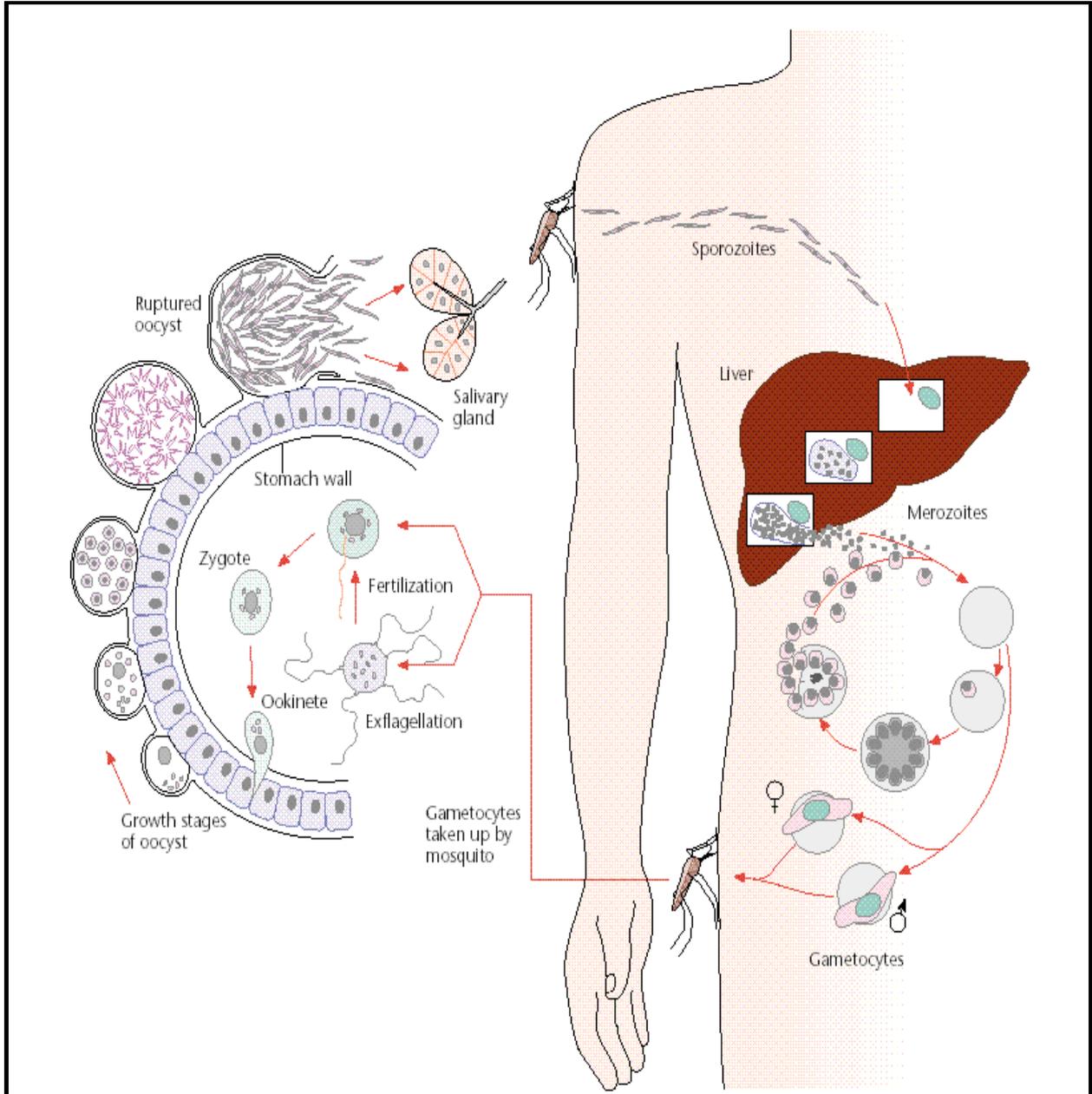


Figure1: Cycle de vie du *Plasmodium*

• Sherman I W, / © 2001 Nature Publishing Group.

## 2- Vaccination et candidats vaccins antipaludiques

La politique d'éradication du paludisme engagée par l'OMS après la deuxième guerre mondiale s'est soldée par un échec dans la plupart des pays d'Afrique au Sud du Sahara et fut abandonnée en 1969 à cause de certains facteurs tels: la résistance des vecteurs au DDT et l'apparition de souches de *Plasmodium falciparum* chimiorésistants à la chloroquine[14].

Le développement d'un vaccin contre le paludisme est de nos jours une urgence compte tenu de l'émergence et de l'extension du phénomène de résistance des parasites aux antipaludiques et des vecteurs aux insecticides.

Les efforts de mise au point d'un vaccin efficace contre le paludisme ont été ralentis par la complexité du cycle de développement du parasite et de sa capacité d'adaptation à l'hôte humain, échappant ainsi en partie au contrôle du système immunitaire.

Cette complexité du cycle offre également l'avantage de proposer un nombre élevé d'antigènes à potentiel vaccinal. Chaque stade du cycle de développement du parasite possède sa propre mosaïque et sa structure antigénique. Les efforts de la biologie moléculaire notamment le séquençage du génome de *Plasmodium* prédit près de 5300 gènes [15].

L'objectif poursuivi depuis 20 ans est de sélectionner parmi les antigènes somatiques et métaboliques du parasite les candidats les plus immunogènes susceptibles de conférer une réaction immunitaire protectrice, bien tolérée et durable.

La mise au point d'un vaccin antipaludique est un long processus et demande des moyens lourds et des capacités soutenues en ressources humaines et matérielles.

Les premiers essais de vaccination contre le paludisme remontent aux années 1910 lorsque les frères Sergent en Algérie et Celli en Italie tentèrent sans succès de mettre au point un vaccin efficace à partir des sporozoïtes [16].

Toutefois certaines études d'immunisation avec des sporozoïtes irradiés ont montré une immunité protectrice partielle ou complète chez la souris [17], chez le singe [18] et chez l'homme [19] contre une infection expérimentale au laboratoire.

D'autres études ont montré que des infections répétées entraînent une acquisition d'immunité naturelle spécifique mais partielle et de courte durée [20]. Les transferts passifs d'immunoglobulines purifiées obtenues à partir des sérums des sujets immuns en Afrique ont entraîné une diminution de l'infection chez les enfants Thaïlandais [21].

Ces différentes études ont fourni un espoir sérieux dans la possibilité d'immunisation contre le paludisme.

Les premiers essais cliniques du premier candidat vaccin synthétique multivalent nommé SPf66, mis au point par Manuel Pattaroyo et son équipe en 1987 en Colombie [22] (qui n'ont malheureusement pas fourni de résultats satisfaisants sur certains sites d'essai) ont cependant cristallisé les controverses sur la possibilité de vaccination contre le paludisme.

### **3-Les antigènes**

Les candidats vaccins antipaludiques sont constitués d'antigènes qui servent de cible pour le système immunitaire. Ces antigènes peuvent être des protéines entières exprimées par le parasite, des sous-unités de ces protéines antigéniques qui stimulent mieux le système immunitaire, des toxines parasitaires ou des gènes qui codent pour ces protéines.

Différents antigènes sont exprimés par le parasite pendant les différents stades du cycle biologique.

Les antigènes caractéristiques d'un stade dans le cycle de développement du parasite, caractérisent les types de vaccins qu'ils constituent. Ainsi nous avons des vaccins pré-érythrocytaires, des vaccins érythrocytaires et les vaccins bloquant la transmission.

Un vaccin pré-érythrocytaire induisant une protection à vie serait idéal surtout pour les voyageurs et les sujets neufs, mais sans écarter le risque que si un seul sporozoïte s'échappait du contrôle du système immunitaire à ce niveau, celui ci libérerait des milliers de mérozoïtes dans la circulation sanguine.

Un vaccin érythrocytaire efficace sera probablement le plus approprié car il empêchera l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes et évitera l'apparition des signes cliniques de la maladie. Le vaccin érythrocytaire pourrait être combiné avec un vaccin pré-érythrocytaire pour augmenter la protection individuelle, et/ou avec un vaccin bloquant la transmission afin de le protéger contre la sélection de types antigéniques réfractaires.

### **3-1 Les vaccins pré-érythrocytaires :**

Les vaccins pré-érythrocytaires préviennent l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes ou entraînent la destruction des parasites dans les hépatocytes infectés.

Malgré une connaissance encore incomplète du mécanisme de cette immunité protectrice, le rôle des lymphocytes T est évident dans la lyse des hépatocytes infectés par une réponse cellulaire de type Th1 notamment par stimulation des lymphocytes TCD4+ et TCD8+[23], aussi par la médiation des cytokines notamment l'Interféron gamma (IFN $\gamma$ ).

En effet une expérience de vaccination chez les souris déficientes en lymphocytes TCD8 n'a pas permis de les protéger par cette forme d'immunisation [24].

Les anticorps dirigés contre les antigènes du parasite au niveau hépatique préviendraient l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes. La protéine la plus caractérisée est le CSP (Circumsporozoite Protein) qui est exprimée avant et pendant l'infection des hépatocytes [25]. Beaucoup d'attentions ont été focalisées sur l'épitope immunodominant composé par un térapeptide répétitif NANP (Asn-Ala-Asn-Pro) de cette protéine. Les études préliminaires de la formulation recombinante [26] ou synthétique [27] du CSP ont montré que ces vaccins sont bien tolérés et immunogènes chez l'homme, mais avec une efficacité limitée. Ce ci pourrait être dû en une insuffisance de stimulation des cellules T helper.

Une approche récente développée par le WRAIR en collaboration avec le GSKbio a consisté à combiner une version recombinante de la partie

C-terminale de la région répétitive NANP du CS avec des épitopes des cellules T helper constitués par l'antigène de surface du virus d'hépatite B [28], ce candidat vaccin dénommé RTS,S est associé à un puissant adjuvant SBAS2 à base de Monophosphoryl Lipide A (MPL) et du Q-S21 (un dérivé de l'écorce du *Quillaja saponaria*) renommé plus tard AS02A. Le RTS,S/AS02A a été un bon inducteur de la réponse cellulaire de type Th1 et a entraîné une forte immunité humorale avec production d'une forte concentration d'IgG (immunoglobuline G) dirigées contre la région répétitive du CS [29]. Le RTS,S/AS02 a montré une efficacité de 71% chez les adultes semi-immuns en Gambie durant les 9 premières semaines de suivi, mais cette efficacité est revenue à 0% à la fin de la 15<sup>ème</sup> semaine [30]. Une étude de phase IIb du RTS,S/AS02A conduite au Mozambique chez les enfants âgés de 1 à 4 ans a montré que le candidat vaccin a été bien toléré et une efficacité de 29,9% contre les premiers épisodes cliniques de paludisme. Ce candidat vaccin a entraîné une réduction de 37% la prévalence de l'infection à *P. falciparum* au bout de 6 mois de suivi et de 28,9% après 21 mois. L'efficacité de ce candidat vaccin contre le paludisme grave était de 57,7%. [65, 66]

La caractérisation fonctionnelle de deux antigènes du stade hépatique réserve deux autres candidats vaccins plus que prometteurs, notamment le LSA-1 et le LSA-3 (Liver-Stage Antigen1 et 3). L'expression du LSA-1 commence au moment de l'infection de l'hépatocyte. Une étude menée par Kurtis JD et son équipe en 1991 a montré l'association entre une réponse immune spécifique au LSA-1 et une protection contre le paludisme sévère ou une forte parasitémie [31].

Le LSA-3 est moins étudié que le CSP et le LSA-1. Certaines études ont montré une certaine protection en utilisant des lipopeptides et les protéines recombinantes du LSA-3, mais l'expression de cet antigène complique l'interprétation des résultats [32, 33].

### **3-2 Les vaccins érythrocytaires:**

Un vaccin efficace du stade sanguin permettrait d'éviter les manifestations cliniques du paludisme et les complications telles que : le paludisme cérébral, l'anémie palustre, la défaillance rénale et d'autres formes graves du paludisme chez la femme enceinte en bloquant l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes.

Les complications rencontrées dans l'infection à *Plasmodium falciparum* seraient dues à l'adhésion des globules rouges infectés à l'endothélium vasculaire par l'intermédiaire de CD36, ICAM1 (InterCellular Adhesion Molecule 1), VCAM et la E-selectine, au placenta grâce à la Chondroïtine Sulfate A (CSA). La séquestration des globules rouges infectés peut entraîner un dysfonctionnement des organes à travers une obstruction microvasculaire et le largage des cytokines synthétisées telles que le Tumeur Necrosis Factor alpha (TNF $\alpha$ ) et d'autres médiateurs tel que l'oxyde nitrique (NO).

Les efforts de développement d'un tel vaccin se sont concentrés sur les antigènes intervenant dans l'invasion des érythrocytes. L'antigène le plus caractérisé et le plus étudié est la MSP1.

La MSP1 est une protéine de 195kDa exprimée à la surface des mérozoïtes de *Plasmodium falciparum* et est synthétisée au cours de la schizogonie érythrocytaire à partir d'une seule copie du gène de 5,1kb situé sur le chromosome 9. Cette protéine polymorphe subit une maturation en deux étapes. La première étape conduit aux fragments 33, 42 et 83 KDa. La deuxième étape a lieu au moment de l'invasion des érythrocytes, entraînant le clivage de la partie C-terminale du fragment 42 KDa pour aboutir aux fragments 33kKDa (MSP-1<sub>33</sub>) et 19kDa (MSP-1<sub>19</sub>) (Cooper, et al. 1993). La MSP-1<sub>19</sub> reste ancré à la surface du parasite par une liaison de type glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) au cours de l'invasion (Black Man et al. ,1990). Ce processus est essentiel dans l'invasion de l'érythrocyte par le mérozoïte.

Les anticorps dirigés contre la portion C-terminale de la MSP1 ont induit une immunité protectrice contre une forte parasitémie, l'anémie palustre et l'accès palustre clinique [34]. Ces anticorps entraînent *in vitro* une inhibition du développement des parasites [14] et préviennent l'invasion des érythrocytes [35]. Ces anticorps inhiberaient l'entrée des parasites en prévenant le clivage protéolytique de la MSP1 en fragments plus petits, ce qui est indispensable dans l'invasion des érythrocytes [36].

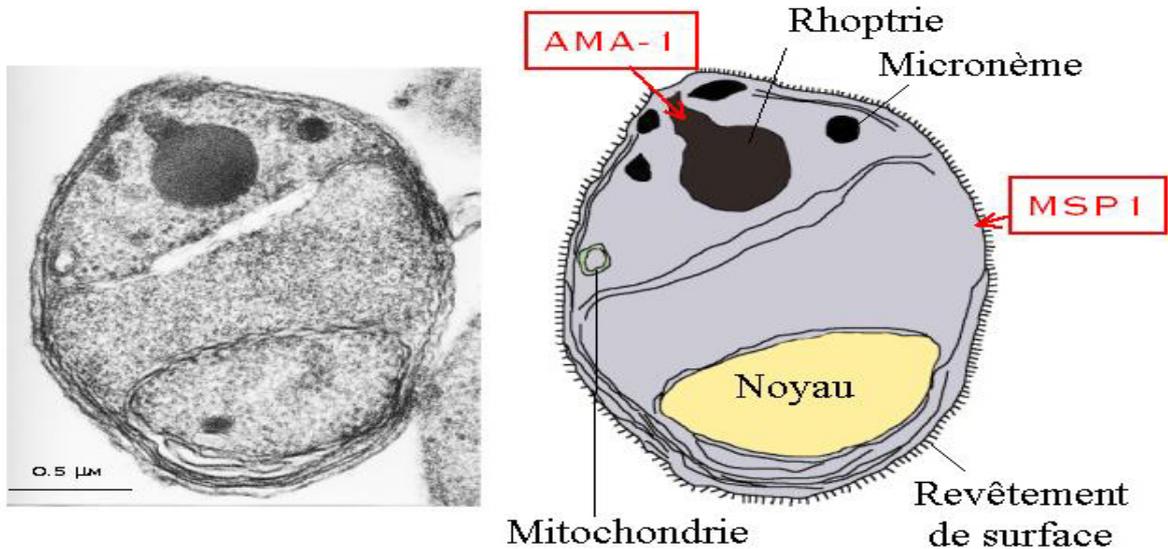
Une étude d'immunisation avec un vaccin à base de MSP1 menée par Kumar S, et son équipe en 2000 a montré une protection efficace contre une infection létale chez le singe *Aotus nancynai* [37]. Une étude de phase 1 menée en 1999 par Keitel WA et son équipe [38] à Washington DC avec une protéine recombinante de la partie C-terminale de la MSP1 fusionnée à des épitopes des cellules T helper de la toxine tétanique a entraîné une séroconversion qui a protégé 9 sur 16 volontaires en 3 immunisations à forte dose.

Des études immuno-épidémiologiques de deux autres antigènes de surface du mérozoïte : la MSP-2 et la MSP-3 ont montré l'importance de ces molécules comme étant des cibles de défense contre l'infection du stade érythrocytaire. Une étude d'un

candidat vaccin à base de MSP3 menée par Pierre Druilhe et son équipe a montré une tolérance satisfaisante et une bonne induction des réponses cellulaires T et B [67]

L'AMA1 (Apical Membrane Antigen1) est une protéine de 83Kda[39] synthétisée au cours du stade érythrocytaire par les formes matures de *Plasmodium falciparum*. Elle est initialement localisée dans les organelles apicaux, subit un clivage protéolytique pour donner un fragment de 66kDa qui sera exprimé à la surface du mérozoïte durant la phase d'invasion des globules rouges (Howell SA, et al. 2001). Cette protéine constitue un candidat majeur des vaccins du stade sanguin. Le gène AMA1 est relativement conservé. Les anticorps monoclonaux purifiés dirigés contre AMA1 ont entraîné une inhibition de l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes [40]. Des essais de vaccination effectués dans le modèle *Plasmodium fragile*/singe et *Plasmodium chabaudi adami*/souris avec AMA1 exprimée sous forme de protéine recombinante dans le système *Baculovirus* a montré une protection chez le singe (Collins WE, et al. 1994) et la souris (Anders RF, et al. 1998).

Un essai clinique de phase I d'un candidat vaccin à base de AMA1 est entrain d'être mené à Donegoubougou au Mali depuis Mai 2004.



**Figure 2:** Photo et représentation schématique d'un mérozoïte de *Plasmodium falciparum* avec localisation de la MSP1 et de l'AMA1. (Photo reproduite avec l'aimable autorisation du Dr. Peter David, Unité d'Immunologie Moléculaire des Parasites, I.P. France)

### 3-3 Les vaccins bloquant la transmission (TBVs)

Ces types de vaccins ont pour cible le stade sexuel du parasite. Ils induisent une immunité qui inhibe l'exflagellation et la fertilisation des gamètes chez le moustique vecteur ou le développement des zygotes et des ookinetes. Ce blocage dépend des anticorps de l'hôte absorbés par le moustique vecteur lors de son repas sanguin.

Les candidats vaccin les plus étudiés de ce stade ont été principalement le Pfs28 et le Pfs25 [41], les anticorps dirigés contre le Pfs28 entraînent un blocage de la transmission de *Plasmodium falciparum* et présentent une action synergique lorsqu'ils est combiné avec Pfs25. Ces deux antigènes sont très immunogènes et ont une diversité antigénique limitée [41].

Deux autres antigènes de gamétoocyte, le Pfs230 et le Pfs48/45 ont été caractérisés. Une réponse immunitaire naturelle à ces antigènes semble être associée à la prévention de la transmission *in vivo* et un haut titre d'anticorps dirigés contre ces antigènes a entraîné un blocage de la transmission *in vitro* [41].

### 3-4 Les nouvelles approches de formulation de vaccin

Les progrès récents de l'immunologie, de la génomique, de la biologie moléculaire et de la biochimie ont ouvert un champ nouveau dans le domaine de la vaccinologie. L'innovation technologique dans ce domaine est la mise au point des vaccins à ADN et les vaccins multivalents. La vaccination par l'ADN nu consiste à injecter directement dans la peau ou dans le muscle les gènes codant pour une protéine antigénique, l'organisme lui-même produit les antigènes qui vont stimuler la réaction immunitaire. Cette approche est particulièrement intéressante pour le stade pré-érythrocytaire car elle induit une immunité humorale et cellulaire spécifique par des lymphocytes TCD4+ et TCD8+ cytotoxiques.

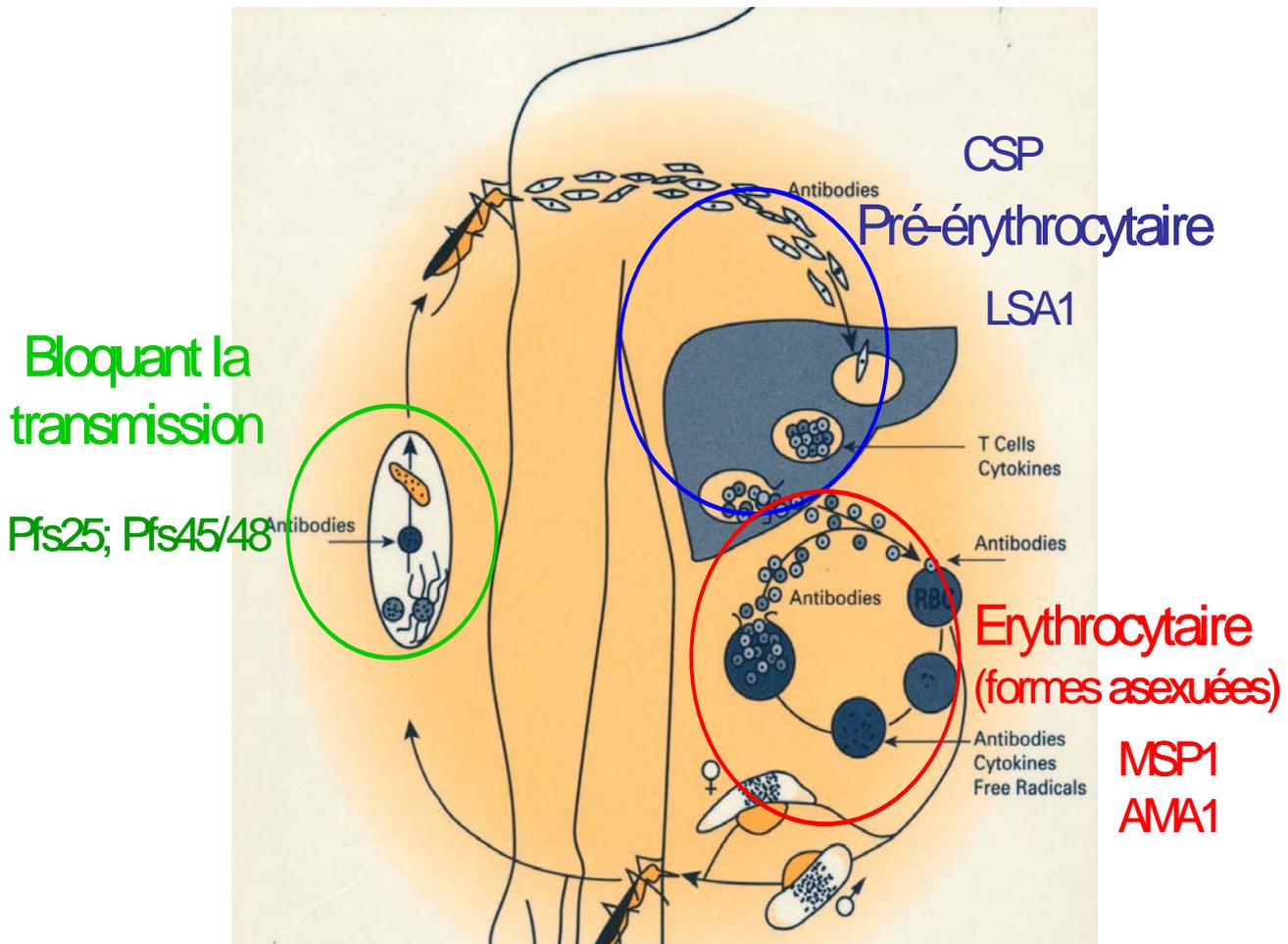
Depuis 1994, une protection dans le modèle souris a été démontrée en utilisant un vaccin à ADN codant pour le CSP de *Plasmodium yoelii* [42]. Un essai clinique de phase 1 d'un vaccin à ADN codant pour le CSP de *Plasmodium falciparum* mené en 1998 a rapporté une bonne tolérance et une bonne immunogénicité [43].

Une autre tendance a cherché à mettre au point des vaccins multiantigènes pour tenter de réduire le risque d'échappement du parasite en induisant à la fois une réponse immunitaire contre un grand nombre d'antigène.

Le premier candidat vaccin multivalent contre *Plasmodium falciparum* est le NYVAC-Pf7 [44] à base du *Vaccinia virus* atténué portant 7 gènes de *Plasmodium falciparum*, notamment ceux codant pour le CSP et LSA1 du stade pré-érythrocytaire, de la MSP1, AMA1 et SERA du stade sanguin asexué et des antigènes Pfs25 du vaccin bloquant la transmission. Les travaux initiaux n'ont pas montré une protection

humaine contre une infection à *Plasmodium falciparum*, bien que NYVAC-Pf7 a induit une immunité détectable[44].

Une autre formulation de candidat vaccin à base d'ADN, constitué de 5 antigènes du stade pré-érythrocytaire et 10 du stade érythrocytaire de *Plasmodium falciparum*[45] a induit une bonne réponse immune contre ces 15 antigènes[46].



**Figure 3 :** Différents types de vaccins antipaludiques

- **Source:** DANIEL J. Carucci & STEPHEN L. Hoffman, *Nat. Med.* Web Reprint. Special Malaria focus – 2000 page 6

### 3-5 Les adjuvants vaccinaux

Le terme adjuvant dérive du latin “*adjuvare*” qui veut dire aider, assister. Il désigne toute substance capable d’augmenter l’intensité de la réponse immunitaire dirigée contre un antigène administré simultanément.

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

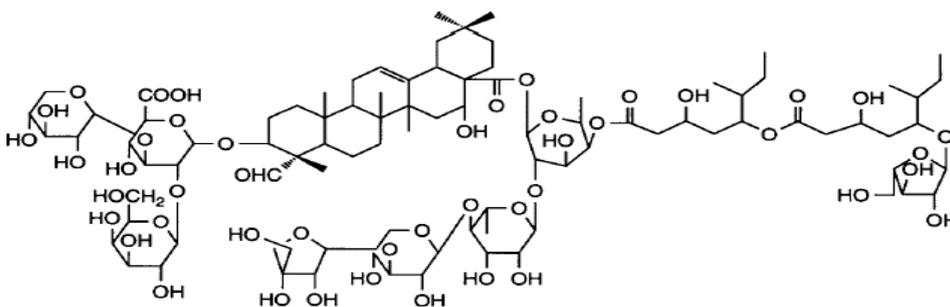
Les adjuvants sont utilisés comme constituant des vaccins et la plupart des temps ils sont indispensables pour l'installation d'une réponse immune protectrice. L'utilisation des adjuvants dans la formulation des vaccins permet d'obtenir des taux plus élevés d'anticorps avec moins d'antigène.

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

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

### 3-5-1 Le QS-21 :

*Quillaja saponaria* 21 (Stimulon™ QS-21 Adjuvant) [47]



- **Fig. 4** : Structure du QS21
- Source : **Kensil, C. R. et al**, Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex. *J. Immunol.*, 1991, 146:431-437.

Le QS-21 est un produit naturel dérivé de l'écorce de *Quillaja saponaria*, une espèce originaire du Chili et de l'Argentine. L'un des premiers adjuvants utilisés dans la formulation des vaccins pour augmenter l'immunité humorale et à médiation

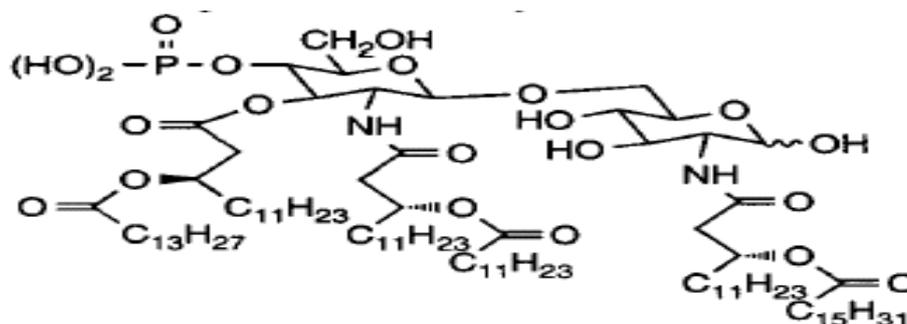
cellulaire. Le QS-21 est une molécule amphiphile avec une bonne hydrosolubilité. Cet adjuvant a été utilisé dans un essai de phase III d'un vaccin thérapeutique contre le mélanome à plus de 100µg par dose. Le QS-21 a été évalué au cours d'un essai de phase I et II de 31 vaccins différents entre 25 et 100µg de QS-21 avec un bon profil de tolérance.

L'adjuvant QS-21 a entraîné chez la souris une stimulation de la réponse humorale avec un bon titre d'anticorps spécifiques IgG1, IgG2b, et IgG2a. Généralement administré par voie intramusculaire ou sous-cutanée, QS-21 est également efficace par voie nasale ou orale.

Le QS-21 a entraîné une augmentation de la protection de l'homme par les candidats vaccins recombinants antipaludiques et une stimulation des lymphocytes T cytotoxiques dans un essai de phase I [47].

### 3-5-2 Le MPL : Monophosphoryl lipide A

(3-Q-desacyl-4'-monophosphoryl lipid A ; 3D-MLA) [47]



- **Fig. 5:** Structure du MPL
- Source: *Frederick R. Vogel, Michael F. Powell, and Carl R. Alving*, A Compendium of Vaccine Adjuvants and Excipients (2nd Edition)

Le MPL est un dérivé du Lipopolysaccharide (LPS) de *Salmonella minnesota* R595. Utilisé dans la formulation des vaccins, le MPL est généralement utilisé avec un

véhicule (émulsion huile dans eau) qui donne une liaison étroite avec l'antigène, ce qui augmente son activité. Le MPL est soluble dans l'eau et dans l'huile, mais cette solubilité est significativement diminuée en présence des cations métalliques divalents. Des essais cliniques de phase I/II ont montré que le MPL est bien toléré.

#### **4- Etapes de développement d'un vaccin :**

Le produit pharmaceutique, en l'occurrence le vaccin, qui fait l'objet d'un développement doit répondre à trois critères de base : sécurité, efficacité, qualité. Le développement se déroule selon trois types intégrés de processus : pharmaceutique, préclinique et clinique (Davenport, 1995 ; Braum et coll., 1996 ; Henchal et coll., 1996 ; Maki, 1996 ; Danner, 1997 ; Kopecko, 1997).

Le développement pharmaceutique d'un vaccin concerne deux volets : d'une part la production et la formulation, d'autre part l'élaboration des méthodes de contrôle et des spécifications qui serviront à la libération des lots et aux études de stabilité. Les produits issus de la biotechnologie et les vaccins en particulier doivent respecter un certain nombre de règles au cours du processus de fabrication leurs permettant d'obtenir le label GMP (*Good Manufactory Practices*)

Le développement préclinique concerne la pharmacologie chez l'animal en utilisant des modèles adaptés et les tests de pharmacotoxicité réglementaires et aussi d'évaluer la tolérance et la tératogénicité.

Cette longue étape de développement préclinique passe par une série de phases pour l'évaluation de la toxicité et de l'efficacité du vaccin chez l'animal, ce qui permet de constituer les pré-requis indispensables pour le développement clinique.

Le développement clinique d'un vaccin antipaludique est une succession de quatre phases bien codifiées :

- Une phase I de tolérance chez un petit nombre de volontaires adultes sains. Cette phase a pour but de tester la tolérance et aussi d'avoir une première idée de

l'immunogénicité du candidat vaccin chez l'homme. Cette phase peut être subdivisée en: une phase Ia menée sur des volontaires adultes sains naïfs et une phase Ib menée sur des volontaires adultes sains vivant dans des zones d'endémie ;

- Une phase II d'immunogénicité portant sur quelques centaines de sujets cibles du vaccin. En plus de la détermination exacte de la dose et l'établissement du calendrier vaccinal, cette phase établit la tolérance du vaccin dans cette population et prouve l'efficacité ;

- Une phase III d'efficacité, pouvant porter sur un nombre considérable de sujets. Cette phase comporte également un dépôt de la demande de vente publique (*AMM* : Autorisation de Mise sur le Marche).

- Après l'enregistrement du vaccin, une phase IV de pharmacovigilance mettra en évidence les éventuels effets secondaires rares et évalueront la stratégie d'utilisation du nouveau vaccin.

## **5- Les éléments de la tolérance**

L'introduction de tout nouveau produit pharmaceutique dans l'organisme humain commence obligatoirement par une étude de phase I. Dans le cas particulier des vaccins cette phase consiste à déterminer la sécurité et l'immunogénicité du produit.

L'évaluation de la sécurité d'un vaccin regroupe la détermination des événements adverses et l'évaluation du niveau de toxicité biologique. Le tissu hématopoïétique et d'autres organes tels que le foie et le rein constituent les cibles potentielles.

Le diagnostic des atteintes de ces tissus et organes se fait par la détermination des marqueurs biologiques spécifiques, sensibles et fiables.

Le foie constitue un centre de métabolisme des protéines, des lipides, des glucides et d'autres produits tels que les médicaments. Certains catabolites ou certains de ces produits peuvent avoir un effet toxique au niveau du foie. Le diagnostic biologique de

confirmation d'une lésion des hépatocytes repose couramment sur la détermination de l'ALAT sérique (enzyme prédominante au niveau du foie).

Le rein constitue un filtre qui sert d'un centre d'épuration du sang. Le rein débarrasse le sang de tous ses déchets métaboliques qui seront éliminés dans les urines. Certains déchets entraînent un fonctionnement excessif du rein ou d'autre ont un effet toxique. La créatinine qui est un déchet métabolique de la créatine présente dans les muscles striés constitue le marqueur biologique le plus stable dont la détermination permet de poser le diagnostic d'une lésion rénale.

Il est aussi nécessaire d'évaluer l'effet de ce produit au niveau du système hématopoïétique chez l'homme et ce ci peut se faire par l'hémogramme.

## **5-1 L'hémogramme:**

### **5-1-1 Définition**

C'est une technique de mesure permettant l'analyse quantitative et qualitative des éléments figurés du sang, à savoir les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes [48].

L'hémogramme est de plus en plus réalisé par des automates.

#### **- Principe de fonctionnement des automates**

Deux procédés sont utilisés par les appareils de mesure [49]:

#### La détection du volume des particules par variation d'impédance

Cette technique a été mise au point par COULTER. Le principe repose sur la détection de la charge électrique spécifique à chaque type de cellule. Les cellules sont mises en suspension dans un conducteur fluide. A leur passage à travers un orifice, elles provoquent des vibrations mesurables. Le nombre de vibrations indique le nombre de particules. Chaque particule est identifiée puisque l'amplitude de chaque vibration est proportionnelle au volume de la particule.

### La détection optique

Le principe consiste à faire passer le sang dans un micro-canal dont le très faible diamètre contraint les cellules à passer une par une. Ce micro-canal est traversé transversalement par un faisceau lumineux. L'interaction comporte également une diffusion et une diffraction de la lumière dépendant de plusieurs paramètres dont la taille, le contenu et la forme de la cellule. La lumière est recueillie par une cellule photoélectrique et chaque variation d'intensité lumineuse est convertie en signal électrique.

### **5-1-2 Les paramètres de l'hémogramme [49]**

L'hémogramme permet de mesurer le nombre absolu de cellules contenues par unité de volume de sang.

- **L'analyse quantitative**

#### **Mesure quantitative sur les globules rouges et leur contenu**

L'appréciation de la quantité de globules rouges présents dans un échantillon de sang peut se faire soit par le nombre de globules rouges, soit par l'hématocrite, ou par le taux l'hémoglobine.

Les globules rouges ou hématies sont des cellules anucléées, sans organites, contenant de l'hémoglobine. Le globule rouge normal a la forme d'un disque biconcave, de couleur rose-vif ou orangée avec une dépression claire au centre lorsqu'il est coloré par la technique de MGG (May-Grunwald-Giemsa). Ils assurent le transport de l'oxygène dans l'organisme.

A l'état normal tous les globules rouges ont sensiblement la même taille, la même forme, la même coloration et ne contiennent pas d'inclusions intracytoplasmiques. Toute modification de ces critères traduit un phénomène pathologique.

### **L'hématocrite**

L'hématocrite représente le volume occupé par les globules rouges dans un volume donné de sang, prélevé sur anticoagulant.

L'hématocrite peut être déterminé soit par une méthode manuelle par centrifugation ou à l'aide des automates.

Il varie en fonction de l'âge et du sexe.

### **Le taux d'hémoglobine**

Diverses méthodes sont utilisées pour le dosage de l'hémoglobine dans un échantillon de sang, notamment celle utilisant l'acide cyanhydrique qui transforme l'hémoglobine et tous ses dérivés en cyanméthémoglobine qui est dosé sur un spectrophotomètre à 540 nm. Les résultats sont exprimés en gramme par 100 ml de sang (g/dl).

### **Volume et contenu des globules rouges**

Le contenu des globules rouges dépend de la quantité d'hémoglobine synthétisée au cours de l'érythropoïèse et du volume de l'hématie. Leurs appréciations sont faites essentiellement par le calcul des constantes dites de Wintrobe : Volume Globulaire Moyen (VGM), Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine (CCMH) et Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine (TCMH).

**-Calcul du Volume Globulaire Moyen (VGM):** Il se fait en divisant le volume globulaire compris dans 1 mm<sup>3</sup> de sang (fourni par l'hématocrite) par le nombre de globules rouges contenus dans le même volume (fourni par la numération).

$$\text{VGM} = \frac{\text{Ht (l/l)}}{\text{Nombre de GR/l}}$$

La normale se situe entre 85 et 95 fl. En dessous de 85 fl, on parlera de *microcytose*, au-dessus de 95 fl de *macrocytose*, dans les limites normales de *normocytose*.

Il existe chez le petit enfant une microcytose (75-80 fl) qui semble physiologique.

**-Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine (CCMH) :** Elle est le rapport entre le résultat du dosage d'hémoglobine sur celui de l'hématocrite.

On obtient ainsi la quantité d'hémoglobine par unité de volume de globules rouges :

$$\text{CCMH} = \frac{\text{Hb(g/dl)}}{\text{Ht (l/l)}}$$

Le résultat normal est compris entre 0,32 et 0,36 généralement exprimé en pourcentage (%). Lorsque le contenu en hémoglobine des globules rouges par unité de volume est insuffisant, cette valeur est < 32% : il y a *hypochromie*. Lorsque la CCMH est comprise entre 32% et 36%, il y a *normochromie*. En revanche, il n'existe pas d'*hyperchromie*.

**-Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine (TCMH) :** La TCMH a moins d'intérêt physiologique que la CCMH ou le VGM. Elle s'obtient en divisant le résultat du dosage de l'hémoglobine par le nombre de globules rouges et indique le poids moyen d'hémoglobine par globule rouge.

### **La numération des réticulocytes**

Les réticulocytes sont des jeunes globules rouges qui sont passés et qui ne durent pas plus de 48 heures dans le sang. La durée de vie des globules rouges est d'environ 120 jours. Ces réticulocytes représentent donc environ 1% des globules rouges.

Le nombre normal des réticulocytes est entre 25000 et 100000/mm<sup>3</sup> pour un taux d'hémoglobine normal.

### Etude quantitative des globules blancs

Les globules blancs ou leucocytes sont des cellules mobiles possédant tous des organites fondamentaux des cellules animales et qui jouent le rôle de défense de l'organisme. Le comptage des globules blanc est fait sur le même prélèvement que les globules rouges et par le même appareil.

### Etude quantitative des plaquettes

Ce sont des petites cellules de 2 à 4  $\mu\text{m}$  de diamètre anucléées dans les quelles on distingue seulement quelques granulations colorées. Les plaquettes sont les principaux acteurs de l'hémostase primaire. Les compteurs électroniques les plus perfectionnés assurent simultanément sur le même prélèvement des comptes de globules rouges, des globules blancs et des plaquettes. L'intervalle de variation normale est très large de 150000 à 500000 par  $\text{mm}^3$ .

- **Analyse qualitative**

Elle est réalisée sur un frottis sanguin, qui consiste à étaler une fine goutte de sang sur une lame de verre et en l'examinant au microscope après coloration. Le colorant le plus utilisé est le May-Grunwald-Giemsa. Cet examen au microscope permet d'étudier la morphologie des hématies et de faire la « formule sanguine ». Elle permet en outre de différencier les lymphocytes, monocytes, les polynucléaires neutrophiles basophiles, éosinophiles et les cellules immatures éventuelles.

## **5-2- L'Alanine aminotransférase (ALAT)**

### **5-2-1 Définition**

L'ALAT encore appelée la transaminase glutamate pyruvate (TGP) est une enzyme intracellulaire qui intervient dans la synthèse et la dégradation des acides aminés. Cet

enzyme est principalement trouvée dans le foie, elle est normalement présente dans le sérum à basse concentration, mais libérée dans le sang en plus grande quantité lorsque les lésions des membranes entraînent une augmentation de la perméabilité voire une nécrose des hépatocytes [50].

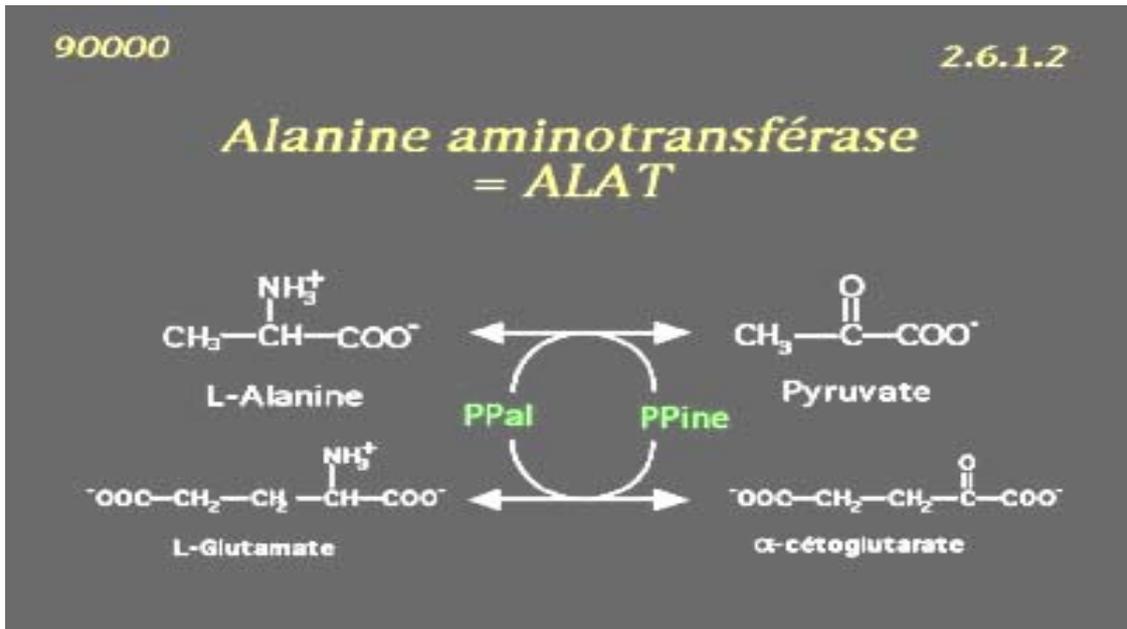
Elle est impliquée dans le métabolisme protéique, glucidique (la néoglucogenèse en particulier) et lipidique par le pyruvate formé.

L'ALAT catalyse le transfert du groupement  $\text{NH}_2$  d'une fonction amine sur un récepteur cétonique.

L'ALAT catalyse le transfert de la fonction amine de l'alanine vers l' $\alpha$ -cétoglutarate qu'elle transforme en glutamate.

Dans un premier temps, l'ALAT se lie à l'alanine puis transfère la fonction amine sur un coenzyme lié : le phosphate de pyridoxal (PPal) qui devient phosphate de pyridoxamine (PPine) sans cesser d'être lié à l'enzyme. L'enzyme se dissocie alors du pyruvate. Dans le second temps, l'enzyme liée au phosphate de pyridoxamine, forme un complexe avec l' $\alpha$ -cétoglutarate, puis transfère la fonction amine du coenzyme qui redevient phosphate de pyridoxal, vers le second substrat qui est transformé en glutamate.

Enfin, le complexe ALAT-glutamate se dissocie, l'enzyme et son coenzyme retrouvent leurs structures initiales.



**Fig. 6:** Activité de l'ALAT

Source : [www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/REbioch/POLY.Chp.5.6.html](http://www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/REbioch/POLY.Chp.5.6.html)

Les valeurs normales sériques de l'ALAT varient entre 5 et 55 UI/L et la demi-vie est de  $47 \pm 10$  heures. Les durées de conservation en tube fermé sont de trois jours au maximum entre 4 à 25°C. Par contre l'enzyme est instable à -25°C.

L'ALAT est essentiellement trouvée au niveau du foie (où elle est exclusivement cytoplasmique), mais elle se rencontre aussi par ordre de concentration décroissante, dans le rein, cœur, le muscle squelettique, le pancréas, la rate, les poumons et le sérum [51].

### Les valeurs normales

Les valeurs normales de l'activité sérique des transaminases sont différentes d'un laboratoire à un autre ; une valeur élevée indique la présence d'une anomalie mais ne définit pas une maladie. La mesure de l'ALAT dans une population « normale » ne suit pas une distribution « gaussienne » mais plutôt une courbe logarithmique.

**Les variations physiologiques [51]**

Les valeurs normales diffèrent d'un laboratoire à un autre du fait de la technique de dosage, mais aussi de la taille de population témoin considérée ou du fait de variations démographique ou géographique.

Dans la pratique quotidienne, au moment du prélèvement, certaines situations liées à l'échantillon peuvent influencer, le plus souvent modérément, les résultats du dosage comme l'exercice physique, la position assise ou debout, la stase veineuse ou l'hémolyse. Une activité sérique augmentée de l'ALAT est plus souvent observée chez l'homme que chez la femme, chez les sujets d'origine hispanique ou indienne aux Etats-Unis, entre 25 et 35 ans et chez les mariés[52].

Enfin, l'ALAT est plus élevée lorsque la consommation de cigarettes est supérieure à 20 par jour[53]. L'activité sérique des transaminases diminue pendant la grossesse et lors du déficit en vitamines B6.

**Les étiologies des transaminases élevées [54]**

Suivant le contexte et la clinique nous avons :

- les hépatites virales (A,B,C,D) ;
- les hépatites médicamenteuses et toxiques ;
- les hépatites auto-immunes ;
- la mononucléose, la tuberculose ;
- le cytomégalovirus, le Herpès ;
- la leptospirose et les rickettsioses ;
- les arboviroses (fièvre jaune, dengue) ;
- l'hémochromatose, la maladie de Wilson ;
- l'infarctus du myocarde, les myopathies, la cytolysse musculaire.

### **Mesure de l'activité de l'enzyme**

En général, le dosage des enzymes se fait de manière indirecte, en évaluant une propriété proportionnelle à la concentration d'enzyme :

- Soit une propriété physique : C'est la méthode calorimétrique, qui consiste à mesurer la quantité de chaleur dégagée lorsque l'on ajoute du substrat en excès à un milieu adéquat contenant l'échantillon d'enzyme à doser.
- Soit une propriété cinétique : C'est la mesure de l'activité enzymatique, la mesure est faite dans les conditions particulières où cette dernière est proportionnelle à la concentration de l'enzyme. Ce procédé s'adapte parfaitement à l'analyse avec les automates et consiste à suivre l'évolution de la réaction en fonction du temps. La substance dont on mesure la vitesse de disparition ou d'apparition doit posséder une propriété spectrale spécifique dans l'UV ou le visible. L'enregistrement des variations d'absorbance en fonction du temps est la technique la plus simple, la plus rapide et la plus spécifique.

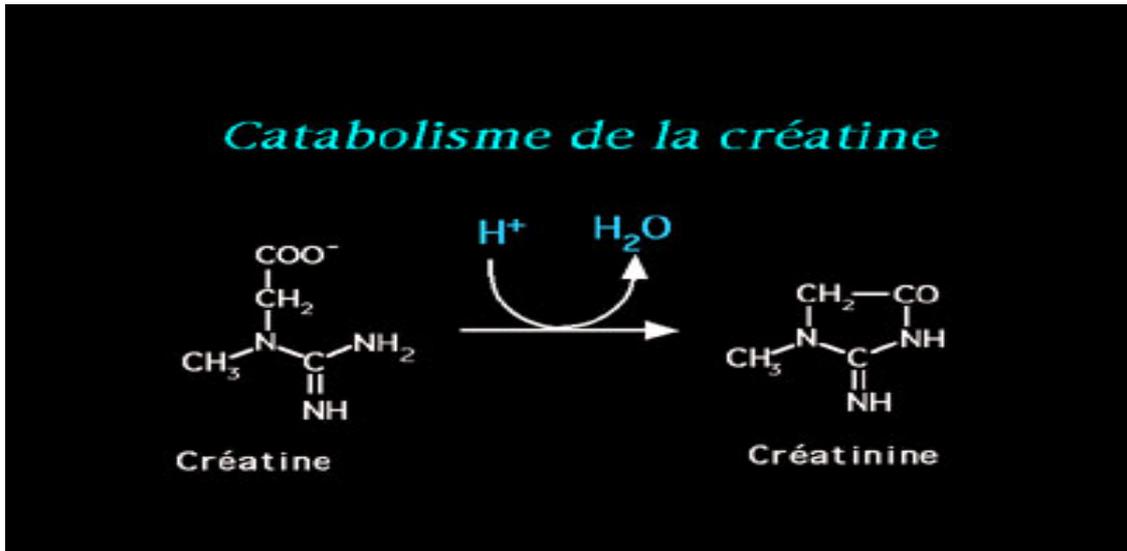
## **5-3 La créatinine**

### **5-3-1-Définition**

La créatinine est un constituant azoté non protéique, provenant de la déshydratation de la créatine, elle-même présente dans le muscle strié où elle permet le stockage de l'ATP (Adénosine Triphosphate) sous forme de créatine phosphate ou phosphagène par une réaction catalysée par la créatine kinase (CK). La créatinine plasmatique et urinaire est le reflet de la masse musculaire globale [55].

Au niveau du néphron, la créatinine subit la filtration glomérulaire ; elle n'est par la suite ni absorbée ni excrétée au niveau du tubule. Sa clairance mesure le volume du filtrat glomérulaire formé par seconde.

Clairance = 2 ml/seconde pour 1,73 m<sup>2</sup> de surface corporelle.



**Fig. 7:** Métabolisme de la créatine

Source : [www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/CNbioch/POLY.Chp.11.2.html](http://www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/CNbioch/POLY.Chp.11.2.html)

### 5-3-2-Méthodes d'exploration

#### Détermination de la créatinine sanguine

Le sang total renferme de la créatinine et de la créatine. La créatine se trouve surtout dans les globules rouges à des taux faibles, alors que la créatinine est également répartie entre les globules et le plasma. La concentration en créatinine totale du sang est remarquablement constante. Elle ne dépend ni du régime, ni de l'exercice physique, ni même d'autres influences biologiques. C'est le constituant sanguin dont le taux est le plus fixe.

La créatinine sanguine ne varie pratiquement que dans les lésions rénales.

Son taux varie, chez l'adulte, de 50 à 105  $\mu\text{mol/l}$  [55].

#### Notion de clairance

Elle établit le rapport entre la quantité d'une substance apportée par le plasma au niveau du rein et la quantité de cette substance éliminée par le rein. C'est le coefficient d'épuration plasmatique ou nombre de ml de plasma totalement épuré par le rein dans l'unité de temps. Ce volume théorique s'exprime en ml/s ou ml/minute.

$$C = \frac{UV}{P}$$

C = clairance = volume de plasma totalement épuré,

U = concentration urinaire par litre,

P = concentration plasmatique par litre,

V = volume d'urines émises en une seconde (ou une minute).

### **5-3-3-Signification des variations pathologiques :**

#### **Valeur pronostique dans le cadre du syndrome biologique de rétention azotée**

Un taux d'urée sanguine entre 8 et 12 mmol/l associé à une créatininémie à 88 µmol/l permet d'affirmer le caractère extra-rénal de cette azotémie. Par contre une urée à 17 mmol/l associée à une créatininémie à 220 µmol/l signifie une insuffisance rénale modérée.

Une azotémie à 33 mmol/l et une créatininémie à 600 µmol/l témoigne d'une insuffisance rénale avancée.

#### **Valeur pronostique et surveillance de la thérapeutique**

Tout au long de l'évolution d'une néphropathie, la valeur de la créatininémie et la clairance de la créatinine mesurent le degré d'insuffisance rénale et motivent de ce fait les attitudes thérapeutiques, alors que le taux d'urée sanguine et urinaire mesurent surtout le catabolisme azoté.

### **5-3-4-Méthodes de dosage :**

Le sérum ou le plasma peut être utilisé différemment.

Les échantillons de sérum ou de plasma ou d'urines peuvent être conservés plusieurs jours à l'abri de l'évaporation.

- **Méthodes enzymatiques**

### **La spectrorélectométrie**

C'est le cas de l'appareillage Boehringer "Reflotron Plus®".

L'analyse est basée sur une hydrolyse enzymatique de la créatinine entraînant la production d'ammoniac et une migration sélective de l'ammoniac à travers une membrane semi perméable vers une couche contenant un indicateur (bleu de bromophénol). Le changement de couleur produit par l'ammoniac peut être mesuré à 600 nm par réflectométrie.

créatinine

Créatinine + H<sub>2</sub>O -----> N méthylhydantoïne + NH<sub>3</sub>

Aminohydrolase

NH<sub>3</sub> + bleu de bromophénol -----> coloration bleue.

### **Méthode enzymatique lecture UV**

Dans ce cas la créatinine est catalysée sous l'action de plusieurs enzymes pour générer le pyruvate et le NADH. Ce dernier sous l'action de la lactate déshydrogénase va entraîner la formation de la lactate et du NAD<sup>+</sup>.

La cinétique décroissante de disparition du NADH suivie à 340 ou 366 nm est proportionnelle à la quantité de créatinine initiale présente.

- **Réaction de Jaffé : coloration picrique**

Après défécation à l'acide trichloracétique, on utilise la réaction de Jaffé.

La créatinine au contact d'un picrate alcalin donne une coloration orange. La créatine ne donnant pas cette réaction, la créatinine préformée est dosée seule. La lecture est effectuée à 510 nm.

On opère directement sur les urines, mais pour le sérum ou le plasma, sur un défécateur trichloracétique en méthode manuelle ou après dialyse en cas d'automatisation en flux continu.

On reproche à cette technique de Jaffé son manque de spécificité.

- **Méthode picratosodique après adsorption-élution par la bentonite**

La purification préalable de la créatinine est effectuée par adsorption sur bentonite suivie d'élution par le réactif de Jaffé, oxydation par l'iode des substances interférentes suivie d'extraction à l'éther.

**IV - NOTRE TRAVAIL:  
ESSAI THERAPEUTIQUE RANDOMISE EN DOUBLE  
AVEUGLE FMP1/AS02A vs. IMOVAX®**

### **1-Le candidat vaccin FMP1/AS02A**

Le FMP1, une version recombinante de la portion C-terminale du fragment 42KDa de la MSP1, fabriqué et développé par le WRAIR, provient de la souche 3D7 de *Plasmodium falciparum*. Cet antigène est marqué par l'histidine et exprimé dans *E.coli*. Un processus efficace de fermentation et de purification compatible avec les normes de l'industrie pharmaceutique a été développé.

L'adjuvant AS02A a été fabriqué par le GSKBio. Jadis appelé SBAS2, il représente une émulsion huile dans eau à base de monophosphoryl lipide A (MPL) et de QS-21 (dérivé de l'écorce de *Quillaja saponaria*).

Les deux produits ont subi les tests de contrôle de qualité requis selon les procédures des Bonnes Pratiques de Manufacture ( *Good manufactory Practices*: GMP).

Le candidat vaccin FMP1 se présente sous forme de poudre lyophilisée à utiliser en association avec l'adjuvant AS02A.

Le flacon de FMP1 contient 62,5µg de protéine lyophilisée avec 31% de lactose.

Une quantité de 0,5ml de l'adjuvant AS02A contient 250µl de SB62 (une émulsion d'huile dans l'eau), 50µg de MPL et 50µg de QS-21, complétée par une solution tampon saline (PBS). L'adjuvant AS02A est livré sous forme de seringues pré remplies, chaque seringue contient 0,65 à 0,75ml de liquide et doit être impérativement conservée entre 2° C et 8° C.

### **2-Justification de l'étude au Mali**

FMP1 a été bien toléré et a montré une bonne immunogénicité dans des essais de phase I sur des sujets neufs aux Etats-Unis. Un essai thérapeutique de phase I de FMP1 a été conduit au Kenya, une zone d'intense transmission du paludisme. La tolérance et l'immunogénicité d'un vaccin antipaludique peuvent varier selon

l'intensité de la transmission du paludisme et l'état de semi-immunité des populations. Au Mali, la transmission du paludisme est de moindre intensité avec un rythme saisonnier. Il est nécessaire de procéder à des essais thérapeutiques de phase I/II en zone d'endémie. La présente étude vise, alors, à évaluer la tolérance et l'immunogénicité de FMP1 au Mali.

### **3-Le vaccin témoin antirabique IMOVAX®**

Le recours à un groupe témoin est utile en zone d'endémie dans une étude de Phase I, car l'immunité acquise et l'exposition naturelle à la transmission du paludisme peuvent compliquer l'interprétation des données de l'immunogénicité. L'effet du candidat vaccin n'étant pas connu, une augmentation du titre des anticorps peut être attribuée à tort à ce produit. Le placebo serait un bon témoin, mais des problèmes éthiques. Un vaccin qui apporterait une protection contre une maladie existante dans la zone serait un témoin éthique. Car ce vaccin permettra de maximiser le rapport risques/bénéfices pour les participants, quand on sait que ce rapport est toujours défavorable dans un essai de phase I. Plusieurs vaccins peuvent répondre aux critères de choix d'un témoin pour notre étude, mais la plus part de ces vaccins sont disponibles dans le Programme Elargi de Vaccination au Mali.

Nous avons choisi le vaccin antirabique Imovax®.

Imovax® est fabriqué par Aventis Pasteur SA. Il s'agit d'une suspension du virus de la rage, asséchée par congélation, stérile et stable, préparée à partir de la souche PM-1503-3M et obtenue auprès de l'institut Wistar à Philadelphie, US. Chaque dose reconstituée de vaccin de 1ml contient 100mg d'albumine humaine, moins de 150µg de néomycine et 2,5UI d'antigène antirabique. Le vaccin Imovax® est livré sous forme de flacon contenant une dose unique d'antigène lyophilisé avec une seringue pré-remplie contenant 1ml d'eau pour injection comme diluant.

Son schéma de vaccination recommandé est 0, 7 et 21 jours. Mais des études hors label réalisées en Angleterre, en Allemagne, en France et en Belgique ont montré que 100% des sujets vaccinés avec deux doses à 1 mois d'intervalle présentaient des titres d'anticorps protecteurs, avec une moyenne géométrique de 10UI[50, 56].

Le vaccin Imovax® présente un profil de tolérance acceptable. Des réactions locales ou systémiques d'intensité modérée peuvent survenir suite à l'injection d'Imovax®. Ces réactions sont passagères et ne contre-indiquent pas l'utilisation du vaccin: elles consistent en une douleur locale, un érythème, un œdème ou un prurit au site d'injection [57]. Des maux de tête, une nausée, des douleurs abdominales, des douleurs musculaires et des vertiges, ont été rapportés chez 20% des personnes ayant reçu le vaccin [57]. Dans une étude[58, 59], deux sujets ont présenté des symptômes qui ressemblaient au syndrome de Guillain-Barré. Des réactions allergiques généralisées ont également été rapportées, sous forme d'urticaire généralisée, d'œdème de Quincke, de douleurs articulaires, de fièvre, de nausée et des vomissements. Ces réactions étaient rares après une dose de vaccin antirabique. Toutefois, elles ont été rapportées chez environ 7% des sujets ayant reçu une dose de rappel[60].

## **4- METHODOLOGIE**

### **4.1-Lieu d'étude**

Notre étude s'est déroulée dans la ville de Bandiagara (figure 6), chef lieu de cercle située au cœur de la région de Mopti sur le plateau Dogon. Elle s'étend de l'isohyète 200mm à l'isohyète 700mm.

La ville est irriguée par un affluent du fleuve Niger: le "Yamé" qui constitue un gîte pour le développement des anophèles pendant une bonne partie de l'année.

La végétation est de type sahélien sur un plateau rocailleux. Elle est dominée par des essences épineuses (dattiers sauvages, taniers, gommiers) et d'autres tels que les balanzans, les tamariniers et les raisins sauvages.

Le climat est caractérisé par une courte saison de pluie allant de juin -juillet à août-septembre avec une pluviométrie de 400 à 700 mm d'eau par an (673.2 mm pour l'année 2003), et une saison sèche plus longue. Le relief est dominé par une grande table de grès.

L'activité économique est essentiellement agropastorale, le tourisme est également assez développé.

La ville de Bandiagara comptait 12500 habitants au recensement du MRTC en 2002 : la tranche d'âge de 0 à 20 ans représente 57% de la population générale. Cette population est composée majoritairement de Dogons (environ 65%), suivis des Peuhls, Mossis, Bozos, Bamanans, Sonrhaïs, Sénoufos... [61].

La transmission du paludisme est saisonnière et couvre toute la saison des pluies. L'incidence du paludisme simple non compliqué était de 17,13% en 2002 et le taux de prévalence de l'infection de 75,6% [61].

La ville de Bandiagara a été depuis 1993, le site d'études épidémiologiques et entomologiques du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires (DEAP) de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie de

l'université de Bamako. Depuis 1999 Bandiagara abrite un projet de préparation du site pour la conduite d'essais cliniques de vaccins antipaludiques du DEAP avec le support financier et technique du NIH, et en partenariat avec l'université de Maryland, connu sous le nom de BMP (Bandiagara Malaria Project). Ce projet a conduit plusieurs études notamment : des études d'incidence du paludisme, une étude cas de paludisme sévère comparé au témoin paludisme simple et aux sujets bonne santé pour évaluer la susceptibilité immunogénétique au paludisme, une étude d'interaction immunologique entre l'infection palustre et la schistosomiase, une étude de clairance parasitaire par la chloroquine. En Avril 2003 une étude des normes a été menée pour établir la distribution normale dans la population locale des paramètres hématologiques et biochimiques pour avoir les intervalles de référence.

L'activité économique est essentiellement agropastorale, le tourisme est également assez développé.

La ville dispose de trois groupes scolaires et un lycée. Elle est le siège de plusieurs projets de développement.

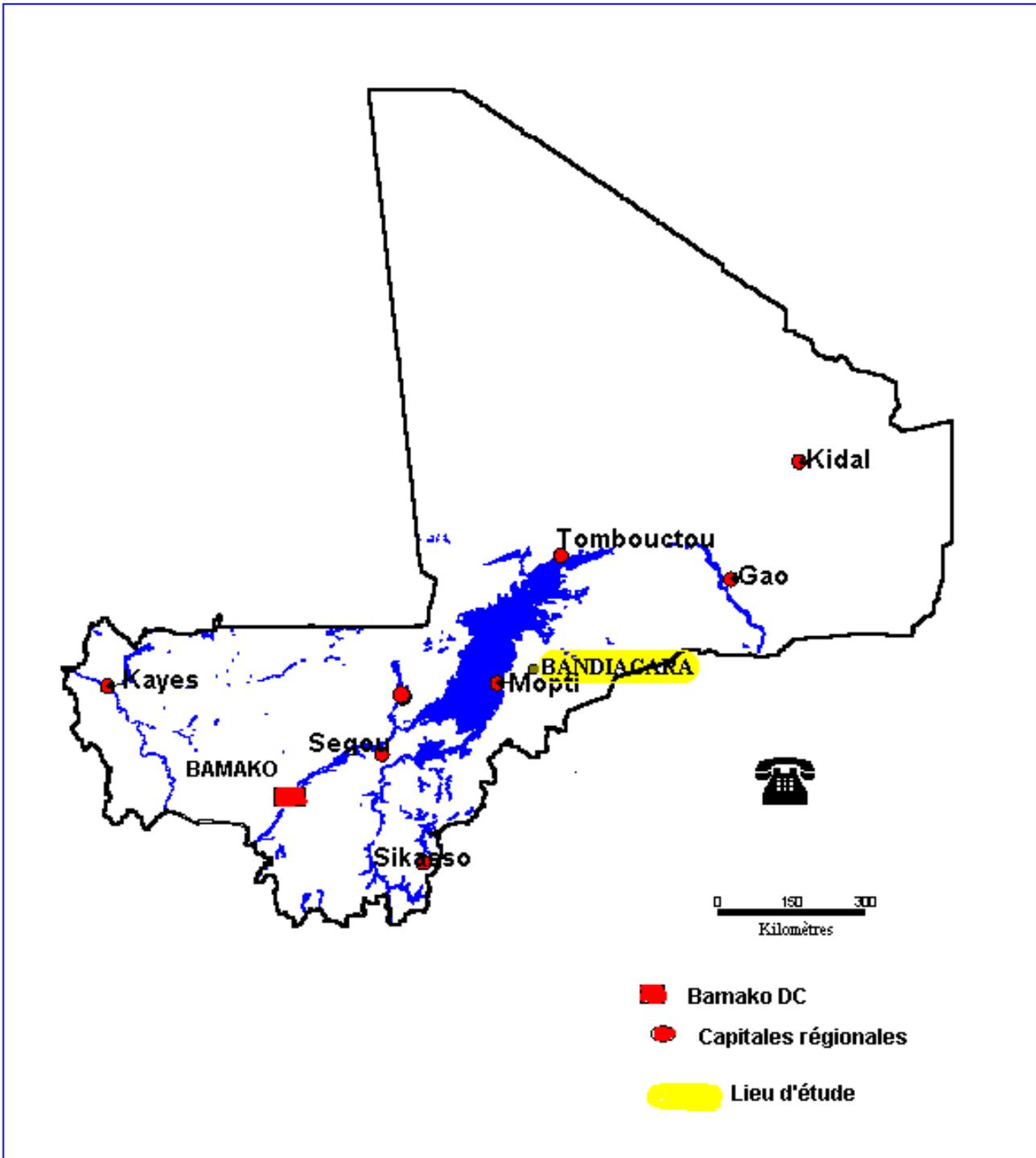
Comme infrastructures sanitaires, la ville dispose :

- D'un centre de santé de cercle avec quatre médecins, ce centre comprend un dispensaire, une maternité, un bloc opératoire, un dépôt de médicaments, un laboratoire d'analyses médicales, des salles d'hospitalisation, un service social, un cabinet dentaire et une salle informatique.

Notre étude s'est déroulée dans les locaux de ce centre.

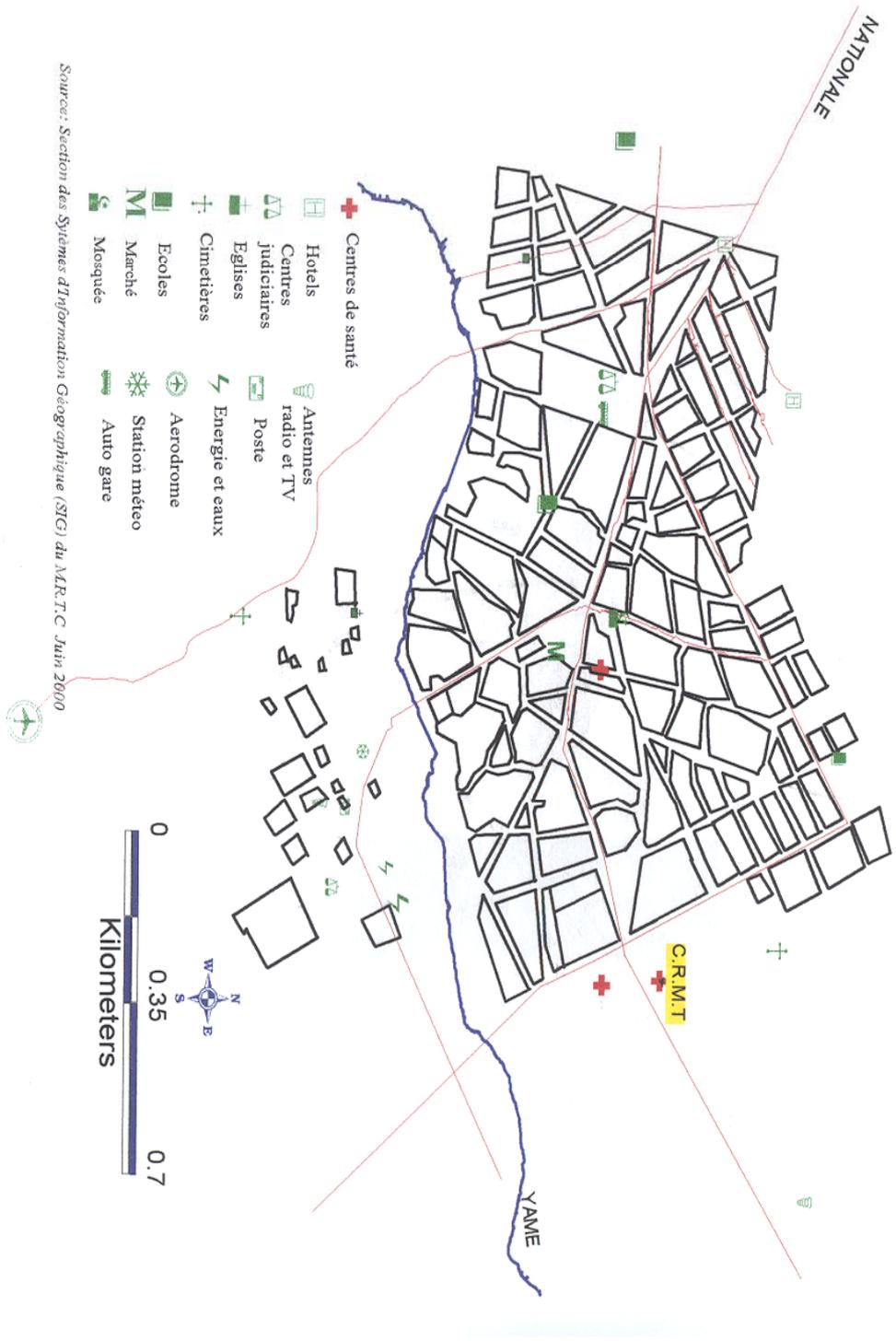
- D'un Centre Régional de Médecine Traditionnelle (CRMT) avec deux médecins, un pharmacien, un technicien supérieur de laboratoire sous l'égide de l'INRSP (Institut National de Recherche en Santé Publique). Ce centre comprend un laboratoire biomédical, une unité de production et de conditionnement de médicaments traditionnels améliorés.

- D'un centre de santé communautaire dirigé par un infirmier d'état et comprend un dispensaire, une maternité, et un dépôt de médicaments.



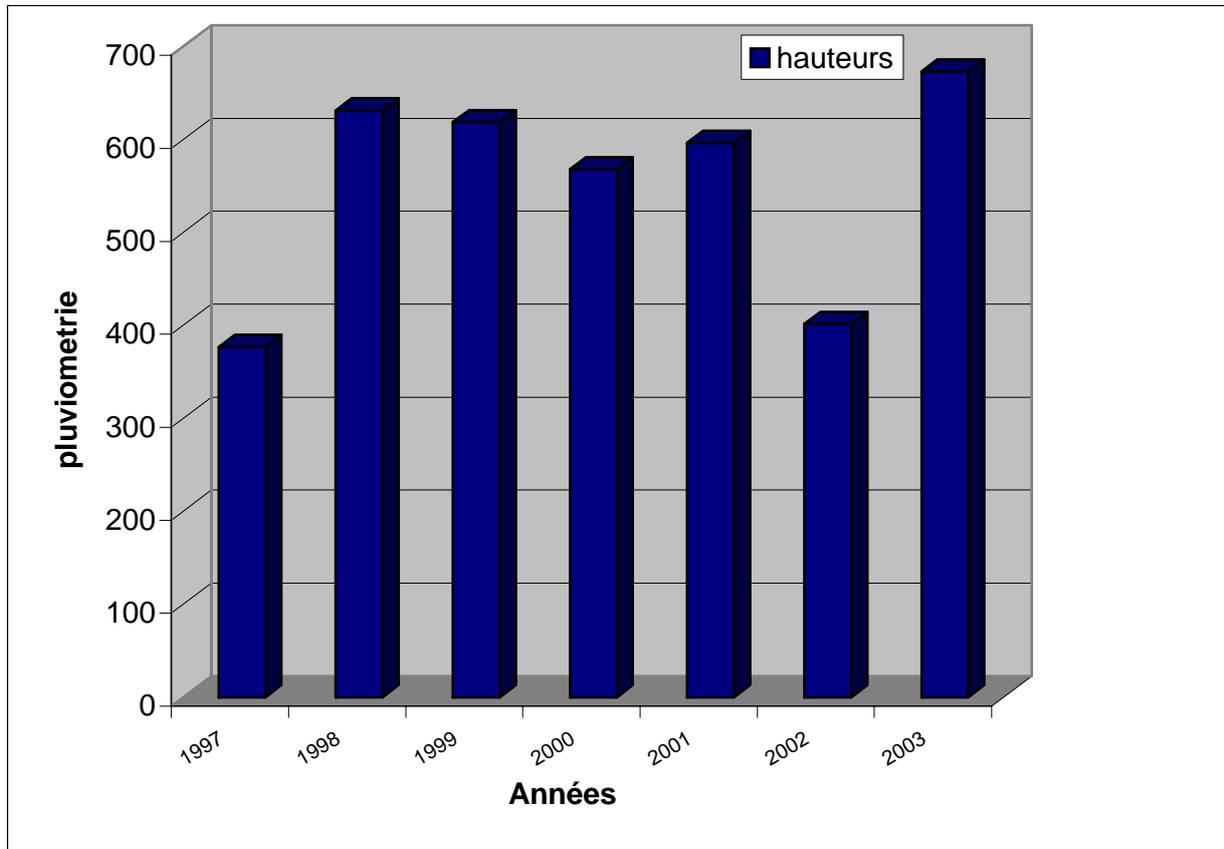
**Fig. 8:** Carte du Mali avec le site d'étude Bandiagara.

*Source : Section des Systèmes d'Information Géographique (SIG) du M.R.T.C. juin 2000*



**Fig. 9:** Carte de la ville de Bandiagara : Site d'étude

*Source :* Section des Systèmes d'Information Géographique (SIG) du M.R.T.C. juin 2000



**Fig. 10:** Moyennes pluviométriques annuelles de la ville de Bandiagara de 1997 à 2003.

#### 4.2- Période d'étude

Notre étude s'est déroulée du 01 juillet 2003 au 03 juillet 2004.

#### 4.3- Type d'étude

Nous avons effectué un essai thérapeutique randomisé de phase I avec groupe témoin en double aveugle et un suivi longitudinal de 12 mois.

- Voie d'administration : Par injection IM dans le muscle deltoïde.
- Schéma de vaccination : 3 doses administrées aux jours 0, 30 et 60.

- Une observation clinique pendant 30 minutes post-vaccinale dans une pièce séparée pour l'évaluation des signes vitaux: température orale, pouls, tension artérielle et fréquence respiratoire.
- Puis les participants ont été revus aux jours 1, 2, 3 et 7, post-vaccination pour l'évaluation des symptômes cliniques sollicités.
- Une évaluation clinique et biologique les jours 0 ; 14 ; 30 ; 44 ; 60 ; 74 ; 90 ; 180 ; 272 ; 364.
- Une visite à domicile mensuelle après le jour 90.

Randomisation: 40 enveloppes scellées, opaques et contenant le code (numéro de randomisation) du produit à administrer, dont l'allocation des codes a été faite par tirage aléatoire. Une enveloppe a été attribuée à chaque volontaire selon l'ordre d'arrivée pour recevoir le vaccin.

**4.4- Population d'étude :** La population d'étude était composée de volontaires adultes hommes et femmes âgés de 18 à 55 ans.

**4.5- Techniques d'échantillonnage:** Après avoir lancé un appel à la radio, nous avons procédé au recrutement des volontaires. Par la suite sur 108 personnes dépistées, 40 volontaires répondant à tous les critères d'inclusion et ne présentant aucun des critères de non-inclusion ont été inclus dans l'étude. Par prudence avec d'éventuels problèmes de tolérance des produits à leur première expérimentation chez l'homme, les essais cliniques de phase I utilisent une faible taille d'échantillon.

#### **4.6- Critères d'inclusion et de non-inclusion**

##### **4.6-1- Critères d'inclusion :**

- Sujets âgés de 18 à 55 ans, de sexe masculin ou féminin (sans grossesse)

- Pour les femmes, la volonté déclarée de ne pas tomber enceinte jusqu'à 1 mois après la dernière dose du vaccin
- Obtention d'un consentement éclairé par écrit des participants avant le début de l'étude
- Disponibilité et volonté de suivre les modalités du suivi pendant 12 mois.

#### **4.6-2- Critères de non-inclusion:**

- Sujets vaccinés avant par un vaccin antipaludique expérimental ou un vaccin antirabique
- Usage d'autre produit expérimental ou de médicament/vaccin sans autorisation de mise sur le marché (AMM) dans les 30 jours précédant la première dose ; ou programmé de le faire dans les 30 jours suivant la dernière dose
- Prise chronique (durant plus de 14 jours) de médicaments immunosuppresseurs ou d'autres médicaments modifiant l'état immunitaire dans les 6 mois précédant la première dose. Cela inclut les corticoïdes par voie orale ou par inhalation mais pas les formes par voie cutanée.
- Administration actuelle ou programmée d'un autre vaccin non prévu dans ce protocole dans les 30 jours avant la première dose, à l'exception du vaccin antitétanique.
- Vaccination antérieure avec un vaccin tel le RTS,S, contenant le MPL et/ou le QS21
- Etat suspecté ou confirmé d'immunodéficience ou d'immunosuppression, y compris l'immunodéficience à VIH
- Maladie auto-immune suspectée ou confirmée
- Antécédent d'allergie (y compris une anaphylaxie) à un vaccin quelconque
- Antécédent de réaction allergique grave à une substance quelconque ayant nécessité une hospitalisation ou des soins médicaux d'urgence
- Allergie connue à la tétracycline, la doxycycline ou à la néomycine

- Antécédent de splénectomie
- Titre sérique des ALAT  $\geq 35$ UI/L
- Créatinine sérique  $\geq 133\mu\text{mol/L}$ (1,5 mg/dL)
- Hb < 11g/dL pour les hommes et < 10g/dL pour les femmes
- Leucocytes < 3000/mm<sup>3</sup> ou > 13500/mm<sup>3</sup>
- Lymphocytes totaux  $\leq 1000/\mu\text{l}$
- Protéinurie (>traces) ; hématurie (>traces) ou présence de sucre dans l'urine
- Administration d'immunoglobulines et/ou de sang/produits dérivés du sang dans les trois mois précédents ou programme de l'administrer durant l'étude.
- Alcoolisme chronique connu/suspecté ou usage de drogues illicites
- Grossesse clinique ou examen positif de l'urine pour la présence de  $\beta$ -HCG avant la vaccination
- Allaitement
- Participation simultanée à un autre essai thérapeutique
- Signes cliniques de maladie aiguë ou chronique respiratoire, cardiovasculaire, gastro-intestinale, hépatique ou génito-urinaire ; ou toute autre condition clinique qui pourrait, selon l'opinion du chercheur principal, constituer un risque pour le participant s'il participait à l'étude
- Autres circonstances qui, de l'avis du chercheur principal, porteraient atteinte à la sécurité ou aux droits du participant ou qui rendraient le participant incapable d'adhérer aux schémas de suivi de l'étude.

#### **4.7- Organisation pratique du travail :**

Une campagne d'information et de sensibilisation a été faite auprès de la population quelques semaines avant la première vaccination. Elle a consisté en une rencontre avec le chef du village, les chefs de quartiers, les autorités politiques et

administratives et d'autres personnalités de la ville de Bandiagara. La rencontre avait pour but d'expliquer le protocole et d'obtenir le consentement communautaire.

Un consentement éclairé individuel écrit de tous les volontaires a été obtenu après une explication plus détaillée du protocole à chaque volontaire.

Le travail était organisé de la manière suivante :

- **Poste d'identification :** Ce poste était composé d'un investigateur et de quatre guides. Le travail consistait à identifier chaque volontaire par les guides au départ et aussi à travers la carte qui porte le numéro d'étude, la photo d'identité, le nom et prénom du volontaire au cours de l'étude. Après cette vérification de l'identité, le volontaire était dirigé, vers la salle d'administration de consentement lors du dépistage, et vers les postes cliniques au cours de l'étude.
- **Poste d'administration du consentement :** Ce poste était composé d'un investigateur et un témoin de la localité capable d'expliquer le protocole dans la langue parlée par le volontaire. Le volontaire était autorisé de partir avec la fiche de consentement pour pouvoir lire et bien comprendre avant de le signer.
- **Poste clinique :** composé de trois médecins tenant chacun une salle de consultation médicale. L'examen clinique et l'examen physique complet ont été effectués. Les participants étaient ensuite orientés vers la salle de prélèvement.
- **Poste de prélèvement :** constitué d'un biologiste et d'un étudiant en pharmacie en année de thèse, dont l'un s'occupait de l'étiquetage des tubes SST et EDTA sur lesquelles étaient inscrits: la date et l'heure du prélèvement, le numéro d'identification du participant et les initiales du technicien. L'autre biologiste était

chargé du prélèvement du sang veineux sur un tube SST et un tube EDTA. Les prélèvements étaient chargés sur un portoir approprié ensuite transportés dans la salle d'analyse clinique dans un panier réservé à cet effet. Un échantillon d'urines était collecté pour chaque volontaire pour l'appréciation de l'hématurie et de la protéinurie, le test de grossesse pour les volontaires de sexe féminin.

La centrifugation, les tests hématologiques et biochimiques ont été effectués dans le laboratoire clinique du BMP tenue par une partie des biologistes. Le participant était ensuite orienté vers la salle de vaccination.

- **Poste de vaccination:** Constitué de quatre médecins repartis dans deux petites salles réservées à cet effet et de deux pharmaciens chargés de la préparation des vaccins dans une autre salle séparée, communiquant avec les premières par deux petites fenêtres coulissantes. La randomisation à ce niveau était effectuée par l'attribution par ordre d'arrivée des volontaires des enveloppes randomisées opaques, scellées, contenant le code du produit à administrer. Après une vérification supplémentaire de l'identité du participant, il a reçu une dose de vaccin par injection IM dans le muscle deltoïde.
  
- **Salle d'observation clinique post-vaccinale :** Après chaque vaccination le participant a été observé pendant 30 minutes dans une pièce séparée pour l'évaluation des réactions locales et générales notamment la température orale, le pouls, la tension artérielle et la fréquence respiratoire.

Une réaction systémique allergique suivant une dose de vaccin. Les réactions locales sévères (de degré 3) et une urine positive pour  $\beta$ -HCG constituent une contre-indication à la vaccination.

- **Salle de réanimation :** Tenue par un médecin anesthésiste réanimateur, équipée de deux lits d'hospitalisation, deux bonbonnes d'oxygène de capacité (7,5m<sup>3</sup>), un lot de matériels et produits de réanimation.

Une ambulance correctement équipée était réservée pour référer immédiatement d'éventuels cas de réaction allergique grave vers un centre spécialisé.

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

#### **4.8- Technique d'étude et variables mesurées.**

##### **4.8-1- Evaluation clinique.**

**Matériels:** Thermomètre électronique, brassard, stéthoscope, otoscope-ophthalmoscope, marteau à réflexe, balance pèse-personne, table d'examen, lits d'hospitalisation, kit de réanimation, aspirateur, lot de médicaments, oxygène.

Les participants ont fait l'objet d'un examen clinique complet. L'anamnèse était orientée sur la mise en évidence d'antécédents d'infections récurrentes suggérant une dépression immunitaire, une splénectomie ou une réaction à un vaccin quelconque.

Nous avons procédé à un examen clinique tous les jours de procédure de vaccination.

Une évaluation des signes vitaux était faite au cours de l'examen physique il s'agit de :

-la température orale (la fièvre a été définie par une température supérieure ou égale à 37,5°C)

-le poids corporel, le pouls, la tension artérielle, la fréquence respiratoire.

Aux jours d'administration du vaccin, l'examen clinique a été fait avant et après vaccination.

**4.8-2- Techniques de laboratoire :** Tout le personnel du laboratoire a été formé aux principes de Bonnes Pratiques de Laboratoire au MRTC/ DEAP.

**Prélèvement du sang :** Le prélèvement du sang a été effectué au dépistage et aux Jours 0, 14, 30, 44, 60, 74, 90 et tous les trois mois par la suite.

Tous les volontaires ont été soumis au prélèvement du sang veineux au pli du coude. Tous les prélèvements ont été enregistrés sur une fiche de collecte de sang, les informations relevées étaient : la date et l'heure du prélèvement, le numéro d'identification du volontaire et les initiales du technicien.

Le nombre total de prélèvements par participant ne dépassait pas 11 durant l'étude, la quantité totale de sang prélevée pour les besoins de la recherche ne dépassait pas 95 ml par participant. Toutefois une quantité supplémentaire de sang pouvait être prélevée au besoin pour la prise en charge d'une maladie ou d'une circonstance particulière, si les chercheurs le jugeaient nécessaire.

Les prélèvements veineux dans les tubes SST et EDTA chargés sur un portoir ont été transportés dans la salle d'analyse biologique dans un panier réservé à cet effet. La durée de transport des échantillons entre la salle de prélèvement et la salle d'analyse ne dépassait pas une minute.

**La réception :** Tous les échantillons étaient enregistrés à leur réception sur la fiche de réception d'échantillons. Les données à enregistrer étaient : le numéro d'étude du volontaire, la date et l'heure du prélèvement, la date et l'heure de la réception ainsi que les initiales du technicien.

Chaque échantillon devait répondre à certaines normes :

- Respect du délai entre le prélèvement et la réception : au plus 4 heures pour les tubes SST et le même jour pour les tubes EDTA.
- Volume du prélèvement suffisant : tubes remplis au 2/3.

Les échantillons hémolysés (tubes SST) ou présentant des caillots (tubes EDTA) ont été réjetés. Toutes les insuffisances ont fait l'objet d'une documentation sur la feuille de réception et la feuille de rejet.

### **L'hémogramme**

L'hémogramme a été réalisé avec l'automate Coulter Act\*-10.

Le système Coulter compte et mesure avec précision la taille des cellules. Le principe repose sur la détection de la charge électrique spécifique à chaque type de cellules. Les cellules sont mises en suspension dans un conducteur fluide. A leur passage à travers un orifice, elles provoquent des vibrations mesurables. Le nombre de vibrations indique le nombre de particules. Chaque particule est identifiée puisque l'amplitude de chaque vibration est proportionnelle au volume de la particule.

### **Le contrôle de qualité**

Cette procédure permet de vérifier les performances du système Coulter Act-10. Ce contrôle de la qualité de l'appareil utilisant les contrôles: 4C Plus ou le 4C ES doivent passer quotidiennement sur le Coulter AcT-10 avant le test sur les échantillons.

Le contrôle doit être homogénéisé en retournant doucement le tube 50 fois pendant une minute. Ensuite, il faut plonger la sonde aspirante dans le tube de contrôle et appuyer sur le bouton permettant l'aspiration du sang.

Les résultats affichés sur l'écran doivent être comparés systématiquement à ceux du fabricant se trouvant sur la notice accompagnant le même lot de contrôle.

Si les valeurs étaient hors limites, le contrôle était testé à nouveau après homogénéisation. Les échantillons n'étaient analysés que si les résultats obtenus pour le contrôle étaient acceptables.

Tous les résultats étaient imprimés systématiquement et archivés.

## **Analyse des échantillons**

### L'échantillon

L'analyse se fait sur un prélèvement veineux collecté sur l'EDTA (Lavender top tubes) dans les 24 heures. Le système Coulter Act-10 aspire 12 µl de sang pour chaque test. Les prélèvements doivent être conservés à la température ambiante en raison de la numération des plaquettes. Les tubes doivent être placés sur l'homogénéisateur bidirectionnel en attendant la numération globulaire.

### Procédures

Après la réalisation du contrôle de qualité, il faut appuyer sur l'icône "sang total" pour analyser les échantillons. Ensuite on procède à la saisie et à la sauvegarde du numéro d'étude de l'échantillon en touchant sur l'icône "sauvegarde".

On présente le tube au bec d'aspiration de l'analyseur Coulter puis on appuie sur le bouton d'aspiration situé derrière la sonde. Après aspiration on retire le tube. Les résultats s'affichent automatiquement sur l'écran pour chaque paramètre.

En présence de lettres ("H" ou "L") ou d'étoiles ("\*"), le test de l'échantillon est à reprendre. En cas d'affichage d'un message d'erreur, il faut se référer au manuel des procédures spéciales pour y apporter une action corrective. L'échantillon doit être rétesté chaque fois que l'analyse donne une valeur anormale.

L'analyse des échantillons a été effectuée dans les conditions optimales de température située entre 15 – 27°C et d'humidité de la salle.

### Les tests biochimiques

La détermination des valeurs de la créatinine et de l'ALAT sériques a été réalisée sur le Reflotron Plus<sup>®</sup> de ROCHE.

### **Nettoyage et vérification du système optique**

Le nettoyage régulier de la chambre de mesure permet de maintenir la fiabilité de l'instrument et de donner les résultats corrects. Le nettoyage incorrect ou impropre peut être la source de résultats erronés. Le nettoyage se fait avec un tampon de nettoyage saturé avec l'isopropanol à 70%. Les différentes parties du système optique à nettoyer sont le dispositif de chauffage supérieur, le dispositif de chauffage moyen, la tête magnétique et la fente d'insertion de la bandelette. Ensuite il faut attendre 10 minutes après ce nettoyage avant d'allumer l'appareil.

Le principe de la vérification du système optique est basé sur la mesure de la réflectivité de la zone de test d'une bandelette dite "check", à trois différentes longueurs d'onde : 567- 642 - 951 nm. Les valeurs obtenues lors de cette lecture sont comparées avec celles attendues selon le fabricant.

### **Le contrôle de qualité**

Le contrôle de qualité doit être fait à chaque test pour garantir l'exactitude des résultats des analyses effectuées sur le Reflotron<sup>®</sup>.

Reconstitution des sera de contrôles: Les sera de contrôles: normal (Precinorm<sup>®</sup>) et anormal (Precipath<sup>®</sup>) utilisés pour vérifier le bon fonctionnement de l'appareil sont sous forme de lyophilisat dans des flacons.

Ouvrir délicatement le flacon en vérifiant que la date de péremption reste plus d'un mois. A l'aide d'une pipette de 1000 µl, on ajoute 2x1000 µl d'eau désionisée dans chaque flacon. Puis on ferme et remue doucement les flacons en leur imprimant des mouvements de rotation et en évitant de les agiter vigoureusement. Il faut attendre 30 minutes pour une dissolution complète. Les contrôles reconstitués, conservés à -20°C en aliquote de 75µl ne sont utilisables que dans les 30 jours suivant leur préparation.

Analyse des sera de contrôles : Avant chaque série de paramètre biochimique à doser, le contrôle de qualité est réalisé à l'aide d'une bandelette test du paramètre concerné.

On saisit à l'aide du clavier, le nom du contrôle et le numéro de lot en commençant par le contrôle normal (Precinorm<sup>®</sup>) ensuite le contrôle anormal (Precipath<sup>®</sup>). A l'aide de la pipette spéciale du Reflotron<sup>®</sup> munie d'un cône, on dépose 35µl du sérum au niveau du centre de la zone rouge de la bandelette en poussant le bouton-poussoir de la pipette au deuxième cran. Ce dépôt doit se faire avec un mouvement lent et la pipette tenue au-dessus de la bandelette en formant un angle de 45°. Il faut éviter à cette étape de toucher la bandelette avec le cône ou de former des bulles d'air. Puis on insère la bandelette horizontalement dans la chambre de mesure. La zone réactive et la partie portant l'abréviation du test sur la bandelette doivent être orientée vers le haut, et s'assurer d'avoir entendu un "clic". Le délai entre le dépôt du sérum et l'insertion de la bandelette dans la chambre de mesure ne doit pas dépasser 15 secondes.

Le résultat apparaît automatiquement et est imprimé. Les résultats des contrôles Precinorm<sup>®</sup> et precipath<sup>®</sup> obtenus ont été comparés aux fourchettes de valeurs inscrites sur la notice accompagnant le même lot de contrôles en cours d'utilisation.

## **Etude des échantillons**

### Centrifugation des échantillons

Les tubes vacutainer<sup>®</sup> SST contenant le sang étaient centrifugés à 2900 tours par minute pendant 10 minutes. Après la séparation, le sérum était directement utilisé pour le dosage.

### Analyse des échantillons

Le principe est basé sur la lecture magnétique par le Reflotron<sup>®</sup> d'une bandelette réactive imprégnée de sérum. Le réchauffement de la bandelette par l'appareil favorise la réaction entre l'échantillon et le réactif, ce qui se traduit par un changement de couleur dont l'intensité est mesurée par le système optique du Reflotron<sup>®</sup>.

La technique du dosage des échantillons est la même que celle des sera de contrôle.

### **Test de grossesse**

Nous avons utilisé le kit fabriqué par le laboratoire BIOTRON®

#### **Principe**

Il s'agit d'une réaction immunologique qualitative de type sandwich, permettant la détection de l'hormone HCG dans les urines. Ce test consiste à faire diffuser l'urine à travers un dispositif absorbant ; le conjugué anticorps/colorant contenu dans le dispositif, se lie à l'anticorps anti-HCG en formant un complexe antigène-anticorps. Ce complexe se lie à l'anticorps anti-HCG dans la zone de réaction positive du dispositif et entraîne la formation d'une bande de couleur rose quand la concentration en HCG est supérieure ou égale à 25 mU/ml.

En l'absence de HCG, cette bande de couleur rose n'apparaît pas dans la zone de réaction positive. L'apparition d'une bande de couleur rose dans la zone de réaction négative témoigne du fonctionnement correct du dispositif de réaction et des réactifs.

#### **Mode opératoire**

Après avoir enlevé le "paquet de réaction" de son emballage de papier d'aluminium, remplir le compte-gouttes d'urines et le tenir verticalement au-dessus du "paquet de réaction". Ensuite verser 6 gouttes d'urines sans faire de bulles d'air dans le puits du côté de la région "T" et lire le résultat après 5 minutes.

#### **Interprétation du résultat**

- L'apparition d'une bande de couleur rose au niveau de la région "C" de la fenêtre d'observation indique la bonne conduite du test.
- L'apparition de deux bandes de couleur rose dont l'une bien située dans la région "C" et l'autre dans la région "T", signifie le test positif.

- L'apparition d'une seule bande dans la région "C" avec absence de bande dans la région "T" témoigne que le résultat est négatif.
- Si aucune bande n'apparaît, soit l'urine a été déposée dans la fausse fenêtre soit le dispositif d'essai est détérioré, dans tous les cas le test est à reprendre.

#### Les limites

- La protéinurie, l'hématurie, peuvent entraîner une augmentation du taux de HCG dans les urines,
- Faux positifs : les patients souffrant de maladie trophoblastique ou de tératôme testiculaire ou ovarien peuvent donner des faux résultats positifs,
- Faux négatifs : Une urine trop diluée ainsi que certaines conditions pouvant entraîner la dénaturation de l'HCG comme le pH, la température, la contamination par les métaux lourds peuvent donner des faux négatifs,
- Les échantillons ayant une concentration en HCG < 25 mU/ml seront détectés négatifs.

**Détermination des taux sériques d'anticorps anti-FMP1** : Le plasma et les sera étaient aliquotés dans des cryotubes et gardés en congélation à une température  $\leq -70^{\circ}\text{C}$  ensuite transférées dans de l'azote liquide pour leur transport. Les sera ont été utilisés pour déterminer les taux d'IgG spécifiques anti-FMP1 au laboratoire du WRAIR à Silver Spring, USA par la méthode ELISA..

#### **4.9- Considérations éthiques :**

Cette étude a été approuvée par les comités d'éthique de l'université de Baltimore Maryland, de la FMPOS, du NIAID et du Walter Reed.

Au tout début de l'étude nous avons entrepris des visites de courtoisie aux différentes autorités (sanitaire, municipale, tradithérapeutes, chefs de quartier, notables) [68].

Au cours des ces visites nous avons donné des explications détaillées sur l'étude et nous avons répondu aux questions. Nous avons obtenu la permission communautaire et le consentement éclairé individuel de tous les participants, toutes les dispositions ont été prises pour garantir la confidentialité. Cette étude s'est déroulé sous la demande d'investigation pour mise sur le marché de la FDA portant le numéro IND BB-9202. Elle a été conduite sous l'expertise d'un Moniteur Médical Local (MM), d'un Comité de Surveillance de la Tolérance des produits sous investigation (CST : SMC en anglais), et d'un Comité de Suivi des Données et de la Tolérance du vaccin (SCDT : DSMB en anglais). Ces mécanismes avaient pour but de surveiller de la façon la plus objective la survenue d'effets indésirables, d'augmenter la protection des participants et de minimiser les risques.

Les participants ont bénéficié d'un suivi médical gratuit durant 12 mois au centre de recherche BMP à Bandiagara. Toute affection diagnostiquée était traitée aux frais du programme vaccin et conformément aux normes et procédures de prise en charge des maladies en vigueur au Mali.

Pour les cas de paludisme, la prise en charge a été assurée conformément aux directives du programme National de Lutte contre le Paludisme, avec la chloroquine en première intention à raison de 25mg/kg répartis sur 3 jours ; en cas d'intolérance à la chloroquine et en cas de paludisme grave, on aura recours à la quinine à raison de 25mg/kg/jour pendant 3 jours.

Pour le temps consacré à l'étude, les participants après approbation des comites d'éthiques, de la communauté des volontaires, ont reçu chacun une compensation de 100kg de riz donnés en deux tranches égales : une tranche après la première vaccination et le reste à la fin de l'étude. Cette quantité a été rigoureusement calculée

en fonction du temps perdu par volontaire à cause du vaccin. En effet les visites programmées étaient obligatoires même au moment des travaux champêtres causant donc un manque à gagner.

Des rapports sur les paramètres de tolérance clinique et biologique ont été produits et soumis à l'appréciation du SMC après l'administration de chaque dose d'immunisation et l'obtention de leur accord a été un préalable pour passer à une dose supplémentaire.

Les documents sources et les CRF étaient gardés dans des armoires métalliques fermées à clé.

#### **4.10- Collecte, saisie, analyse des données**

Les données étaient récoltées sur des documents sources et ont été ensuite transcrit dans les CRF « à trois pages ». Les dossiers et les échantillons de produits biologiques des participants ne portaient pas leur nom. Un numéro d'étude et un numéro de randomisation avaient été attribués à tous les participants. Une double-saisie a été effectuée pour réduire les erreurs de saisie. Une série de monitorages internes et 7 monitorages externes (USAMDA, GSK, WHO) ont été instaurés pour une meilleure qualité des données. Le logiciel Microsoft Access a été utilisé pour la saisie des données, l'analyse a été effectuée avec les logiciels Microsoft SAS, Stata et Epi Info.

Dans l'interprétation des résultats une probabilité (p) inférieure ou égale à 0,05 était en faveur d'une relation statistiquement significative entre les variables mesurées. Une partie des analyses statistiques a été effectuée par la société SCI (Statistic Cooperative Initiative de Washington US.).

**V- RESULTATS****1- Résultats du dépistage**

Au total 108 volontaires ont été dépistés.

**Tableau I** : répartition des volontaires dépistés selon le sexe.

| sexe   | Fréquences | Pourcentages |
|--------|------------|--------------|
| Hommes | 66         | 61,1         |
| Femmes | 42         | 38,9         |
| Total  | 108        | 100,0        |

Au dépistage les hommes étaient plus nombreux avec un ratio de 1,57.

**Tableau II** : répartition des volontaires au dépistage selon les pathologies diagnostiquées

|                                      | Fréquence | Pourcentage |
|--------------------------------------|-----------|-------------|
| <b>Non-inclusion</b>                 |           |             |
| Diabète                              | 2         | 1,8         |
| Grossesse                            | 5         | 4,6         |
| HTA                                  | 7         | 6,4         |
| IRA                                  | 6         | 5,5         |
| Infection génitale                   | 6         | 5,5         |
| Schistosomiase                       | 6         | 5,5         |
| Thrombopénie                         | 3         | 2,7         |
| ALAT élevé                           | 5         | 4,6         |
| Créat. Elevé                         | 2         | 1,8         |
| Autres                               | 26        | 24,0        |
| <b>Absence de pathologie notable</b> | 40        | 37,0        |
| <b>Total</b>                         | 108       | 100,0       |

Au total 68 volontaires (63%) présentaient au moins un critère clinique ou biologique de non-inclusion.

40 volontaires soit 37% ont été retenus et inclus dans l'essai.

## 2-Characteristiques de bases de la population d'étude

Après le dépistage 40 volontaires répondant à tous les critères d'inclusions et ne présentant aucun des critères de non-inclusion ont été sélectionnés pour l'essai. Chaque participant a reçu 3 doses d'un vaccin avec un intervalle de 30 jours entre les doses.

Le taux de suivi a été de 100 %, nous n'avons enregistré aucune perte de vu, ni d'abandon, ni de cas d'exclusion durant les 12 mois.

**Tableau III** : répartition des volontaires soumis à l'essai selon le sexe

| Sexe              | Imovax®<br>n=20 | FMP1/AS02A<br>n=20 | Total<br>N=40 |
|-------------------|-----------------|--------------------|---------------|
| <b>Hommes(%)</b>  | 18 (90%)        | 15 (75%)           | 33 (83%)      |
| <b>Femmes (%)</b> | 2 (10%)         | 5 (25%)            | 7 (28%)       |
| <b>Total (%)</b>  | 20 (100%)       | 20 (100%)          | 40 (100%)     |

Le sex-ratio était en faveur des hommes :

- 4,7 globalement
- 3 dans le groupe FMP1/AS02A
- 9 dans le groupe Imovax®

**Tableau IV** : répartition des volontaires soumis à l'essai selon l'âge

|            |        | Moyenne | Percentiles       |        |                   |
|------------|--------|---------|-------------------|--------|-------------------|
|            |        |         | 25 <sup>ème</sup> | Médian | 75 <sup>ème</sup> |
| Imovax®    | (n=20) | 38,5    | 32                | 40     | 46                |
| FMP1/AS02A | (n=20) | 40,3    | 35                | 42     | 46                |

Les volontaires avaient des moyennes d'âge comparables dans les deux groupes ( $p=0,53$ )

**Tableau V:** moyennes des paramètres hématologiques et biochimiques selon le groupe à l'inclusion

|                           | <b>GB</b><br>(10 <sup>3</sup> /μl) | <b>Hb</b><br>(g/dl) | <b>Ht</b><br>(%) | <b>Lymp</b><br>(10 <sup>3</sup> /μl) | <b>Plt</b><br>(10 <sup>3</sup> /μl) | <b>Créat</b><br>(μmol/l) | <b>ALAT</b><br>(U/L) |
|---------------------------|------------------------------------|---------------------|------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|----------------------|
| <b>Imovax® (n=20)</b>     | 5,9                                | 14,7                | 44,3             | 2,1                                  | 228                                 | 78,9                     | 16,5                 |
| <b>FMP 1/AS02A (n=20)</b> | 5,7                                | 14,5                | 43,1             | 2,1                                  | 253                                 | 75,6                     | 16,1                 |
| <i>P</i>                  | 0,67                               | 0,67                | 0,27             | 1,00                                 | 0,33                                | 0,42                     | 0,80                 |

Ce tableau nous montre qu'il n'y avait pas de différence statistiquement significative pour les valeurs moyennes des paramètres biologiques entre les deux groupes à l'inclusion.

**Tableau VI :** moyenne des valeurs de la température orale, du pouls et de la tension artérielle selon le groupe à l'inclusion

|                          | <b>Température<br/>orale(°C)</b> | <b>Pouls(bpm)</b> | <b>Tension<br/>Syst.(mmHg)</b> | <b>Tension<br/>Diast.(mmHg)</b> |
|--------------------------|----------------------------------|-------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| <b>Imovax® (n=20)</b>    | 36,7                             | 75,0              | 117,0                          | 75,0                            |
| <b>FMP1/AS02A (n=20)</b> | 36,8                             | 76,1              | 117,0                          | 76,5                            |
| <i>p</i>                 | 0,17                             | 0,74              | 1,000                          | 0,22                            |

L'analyse de ce tableau montre que les deux groupes étaient comparables au début pour les valeurs moyennes de la température orale, du pouls et de la tension artérielle.

**3 – Résultats cliniques**

**Tableau VII:** incidence des symptômes cliniques sollicités locaux durant 8 jours après chaque immunisation

|                                | <b>Imovax®</b><br>n=20 | <b>FMP1/AS02A</b><br>n=20 | <i>p</i>     |
|--------------------------------|------------------------|---------------------------|--------------|
| <b>Immunsation 1</b>           |                        |                           |              |
| Douleur au site d'injection.   | 3                      | 11                        | <i>0,01</i>  |
| Limit. mouvements de l'épaule  | 0                      | 2                         | <i>0,48</i>  |
| Gonflement au site d'injection | 1                      | 10                        | <i>0,003</i> |
| <b>Immunsation 2</b>           |                        |                           |              |
| Douleurs site d'inject.        | 2                      | 8                         | <i>0,06</i>  |
| Limit. mouvements de l'épaule  | 0                      | 3                         | <i>0,23</i>  |
| Gonflement au site d'injection | 6                      | 7                         | <i>1,000</i> |
| <b>Immunsation 3</b>           |                        |                           |              |
| Douleur au site d'injection    | 1                      | 4                         | <i>0,34</i>  |
| Limit. mouvements de l'épaule  | 0                      | 1                         | <i>1,000</i> |
| Gonflement au site d'injection | 8                      | 8                         | <i>1,000</i> |

Une différence statistiquement significative a été observée entre les deux groupes dans l'incidence de la douleur et du gonflement au site d'injection après la première immunisation.

**Tableau VIII:** Incidence des symptômes cliniques sollicités généraux durant 8 jours après chaque immunisation

|                       | <b>Imovax®</b><br>n=20 | <b>FMP1/AS02A</b><br>n=20 | <i>p</i>     |
|-----------------------|------------------------|---------------------------|--------------|
| <b>Immunsation 1</b>  |                        |                           |              |
| Fièvre                | 3                      | 5                         | <i>0,69</i>  |
| Douleurs articulaires | 0                      | 2                         | <i>0,48</i>  |
| Myalgie               | 0                      | 2                         | <i>0,48</i>  |
| Malaises              | 2                      | 2                         | <i>1,000</i> |
| Céphalées             | 2                      | 6                         | <i>0,28</i>  |
| Nausées               | 1                      | 2                         | <i>1,000</i> |
| <b>Immunsation 2</b>  |                        |                           |              |
| Fièvre                | 0                      | 1                         | <i>1,000</i> |
| Douleurs articulaires | 0                      | 5                         | <i>0,04</i>  |
| Myalgie               | 0                      | 6                         | <i>0,02</i>  |
| Malaises              | 4                      | 3                         | <i>1,000</i> |
| Céphalées             | 5                      | 9                         | <i>0,32</i>  |
| Nausées               | 1                      | 1                         | <i>1,000</i> |
| <b>Immunsation 3</b>  |                        |                           |              |
| Fièvre                | 0                      | 1                         | <i>1,000</i> |
| Douleurs articulaires | 1                      | 0                         | <i>1,000</i> |
| Myalgie               | 0                      | 3                         | <i>0,23</i>  |
| Malaises              | 1                      | 3                         | <i>0,23</i>  |
| Céphalées             | 3                      | 6                         | <i>0,45</i>  |
| Nausées               | 1                      | 1                         | <i>1,000</i> |

Il y avait une différence statistiquement significative entre les deux groupes pour l'incidence des douleurs articulaires et des myalgies après la deuxième immunisation.

**Tableau IX:** incidence des symptômes cliniques non sollicités entre J0 et J90 selon le groupe.

|                               | Imovax® | FMP1/AS02A |
|-------------------------------|---------|------------|
| Réactions au site d'injection | 14      | 8          |
| Fièvre                        | 8       | 16         |
| Traumatisme                   | 4       | 1          |
| Fatigue                       | 5       | 5          |
| Réaction allergique           | 1       | 0          |
| Myalgie                       | 2       | 4          |
| Arthralgie                    | 0       | 3          |
| Céphalées                     | 4       | 7          |
| Troubles gastro-intestinaux   | 10      | 13         |
| Douleur dentaire              | 1       | 1          |
| Conjonctivite                 | 8       | 3          |
| Paludisme                     | 5       | 5          |
| Signes cardio-vasculaires     | 2       | 0          |
| Otite                         | 1       | 1          |
| Infections génito-urinaire    | 2       | 0          |
| <b>Adénopathie</b>            | 1       | 1          |
| IRA                           | 16      | 20         |
| Rahs maculopapulaire          | 3       | 0          |
| Prurit                        | 1       | 1          |
| Eczéma                        | 1       | 0          |
| Urticaire                     | 0       | 1          |
| Prurit anal                   | 0       | 1          |
| Autres                        | 5       | 10         |

- Réactions au site d'injection = inflammation, douleur, masse, autres réactions
- Fatigue = Fatigue, Asthénie, Malaise
- Troubles gastro-intestinaux = diarrhée, constipation, gastro-entérite, nausée, vomissement, douleur abdominale, dyspepsie
- Signes cardio-vasculaires = Bradycardie, Souffle cardiaque
- RIA = bronchite, rhinopharyngite, laryngite, sinusite, toux
- Douleur dentaire = douleur dentaire, carie

Ce tableau donne l'incidence des événements rencontrés chez les volontaires au cours de l'étude en dehors d'une relation direct avec le candidat vaccin.

**Tableau X** : incidence du paludisme selon le groupe

| Nombre d'accès | Imovax® | FMP1/AS02A | P     |
|----------------|---------|------------|-------|
| 1              | 12      | 15         | 0,31  |
| 2              | 6       | 6          | 1,000 |
| 3              | 2       | 1          | 1,000 |
| 4              | 1       | 0          | 1,000 |

Ce tableau nous montre qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative pour l'incidence du paludisme dans les deux groupes

#### 4 - Etudes des paramètres de l'hémogramme

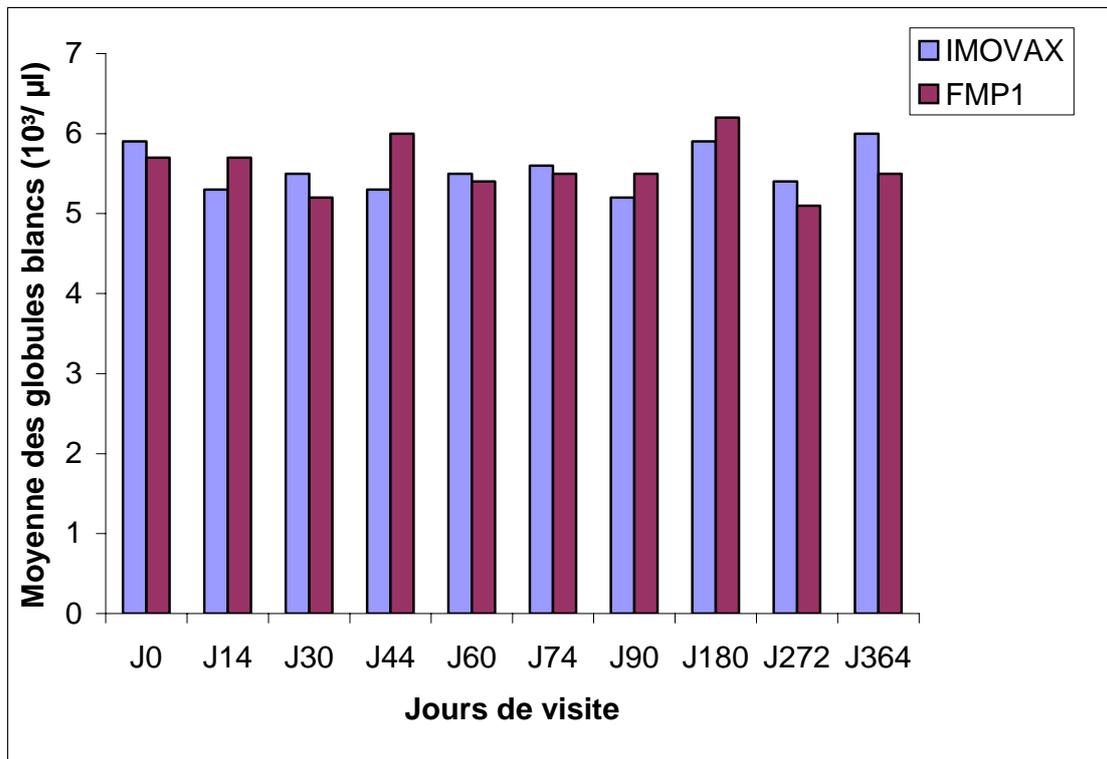
**Tableau XI**: distribution du nombre des globules blancs ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ ) avant et après les immunisations selon le groupe d'étude

|      | Imovax® |      |        |        | FMP1/AS20A |      |        |        |
|------|---------|------|--------|--------|------------|------|--------|--------|
|      | Moyenne | SD   | Minima | Maxima | Moyenne    | SD   | Minima | Maxima |
| J0   | 5,9     | 1,65 | 3,4    | 9,1    | 5,7        | 1,32 | 3,9    | 9,3    |
| J14  | 5,3     | 1,37 | 3,9    | 8      | 5,7        | 1,76 | 3,7    | 10,7   |
| J30  | 5,5     | 1,82 | 3,4    | 10,2   | 5,2        | 1,36 | 3,1    | 8,9    |
| J44  | 5,3     | 1,46 | 3      | 8,7    | 6          | 1,87 | 3      | 10,2   |
| J60  | 5,5     | 1,58 | 3,9    | 9,6    | 5,4        | 1,43 | 3,1    | 8,5    |
| J74  | 5,6     | 1,48 | 4,1    | 9,2    | 5,5        | 1,62 | 3,9    | 10     |
| J90  | 5,2     | 1,06 | 4,1    | 8,5    | 5,5        | 1,31 | 3,8    | 8,5    |
| J180 | 5,9     | 1,25 | 3,2    | 8,3    | 6,2        | 1,99 | 3,6    | 12,4   |
| J272 | 5,4     | 1,51 | 2,7    | 8,6    | 5,1        | 1,19 | 3,7    | 8,1    |
| J364 | 6       | 1,56 | 4      | 9,9    | 5,5        | 1,38 | 3,3    | 8,6    |

Ce tableau montre que le nombre moyen des globules blancs dans les deux groupes restait dans l'intervalle des normes établies sur notre site d'étude. Nous n'avions pas noté de valeur classée dans le tableau de grade de toxicité (*cf annexe*)

Intervalle de référence :

- **4,2 – 12,2.  $10^3/\mu\text{l}$**  (*cf annexe*)



**Figure 11:** distribution du nombre moyen des globules blancs

**Tableau XII :** comparaison appariée des valeurs moyennes du nombre des globules blancs entre J0 et les autres jours de visite dans le groupe FMP1/AS02A

| Jour 0 | GB (10 <sup>3</sup> /μl) | Jours de visite | GB (10 <sup>3</sup> /μl) | <i>p</i> |
|--------|--------------------------|-----------------|--------------------------|----------|
| J0     | 5,7                      | J30             | 5,2                      | 0,24     |
| J0     | 5,7                      | J60             | 5,4                      | 0,49     |
| J0     | 5,7                      | J90             | 5,5                      | 0,63     |
| J0     | 5,7                      | J180            | 6,2                      | 0,35     |
| J0     | 5,7                      | J272            | 5,1                      | 0,13     |
| J0     | 5,7                      | J364            | 5,5                      | 0,64     |

Ce tableau nous montre qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative dans l'évolution du nombre moyen des globules blancs par rapport à J0 dans le groupe FMP1/AS02A.

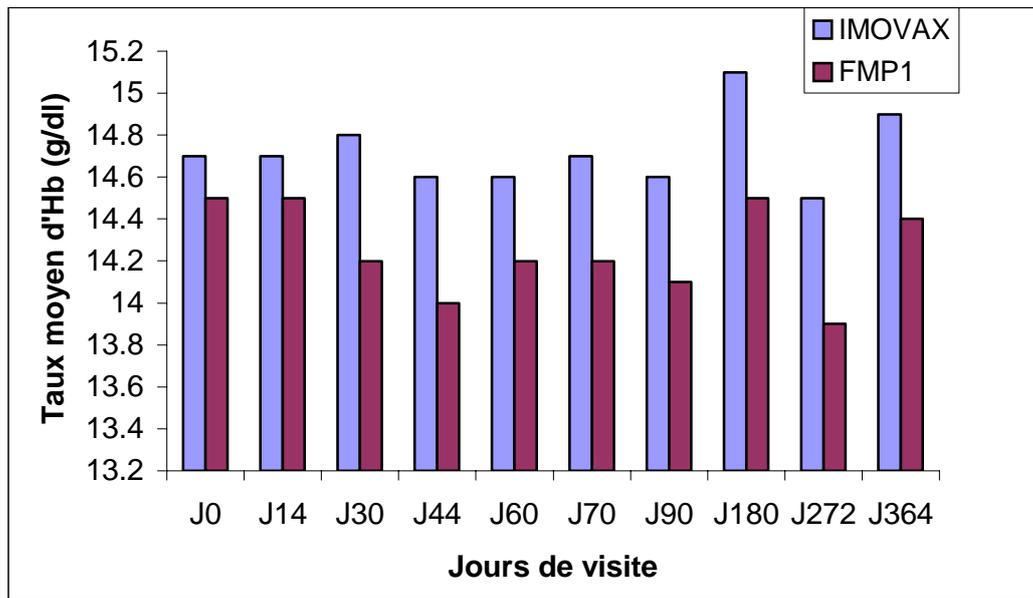
**Tableau XIII** : distribution du taux d'hémoglobine (**g/dl**) avant et après les immunisations selon le groupe d'étude.

|      | <b>Imovax®</b> |      |        |        | <b>FMP1/AS20A</b> |      |        |        |
|------|----------------|------|--------|--------|-------------------|------|--------|--------|
|      | Moyenne        | SD   | Minima | Maxima | Moyenne           | SD   | Minima | Maxima |
| J0   | 14,7           | 1,54 | 11,2   | 17,2   | 14,5              | 1,46 | 10,6   | 17,1   |
| J14  | 14,7           | 1,62 | 11,1   | 17,4   | 14,5              | 1,52 | 10,9   | 17,2   |
| J30  | 14,8           | 1,48 | 11,2   | 17,1   | 14,2              | 1,54 | 10,9   | 17,1   |
| J44  | 14,6           | 1,37 | 11,4   | 16,7   | 14,0              | 1,44 | 10,9   | 17,3   |
| J60  | 14,6           | 1,27 | 12,3   | 16,7   | 14,2              | 1,71 | 11,5   | 17,4   |
| J74  | 14,7           | 1,05 | 12,4   | 16,8   | 14,2              | 1,64 | 11,0   | 17,5   |
| J90  | 14,6           | 1,36 | 12,2   | 17,3   | 14,1              | 1,41 | 11,3   | 16,0   |
| J180 | 15,1           | 1,23 | 13,0   | 17,8   | 14,5              | 1,61 | 11,6   | 17,2   |
| J272 | 14,5           | 1,29 | 12,6   | 16,7   | 13,9              | 1,42 | 11,2   | 15,6   |
| J364 | 14,9           | 1,40 | 12,7   | 17,5   | 14,4              | 1,57 | 10,6   | 16,7   |

Ce tableau nous montre que les taux moyens d'hémoglobine étaient compris dans l'intervalle de référence fixé par l'étude des normes à Bandiagara.

Intervalle de référence : [cf annexe ]

- Hommes : **11,7 – 17,3 g/dl**
- Femmes : **10,0 – 14,4 g/dl**



**Figure 12:** distribution du taux moyen d'hémoglobine

**Tableau XIV :** comparaison appariée des taux moyens d'hémoglobine entre J0 et les autres jours de visite dans le groupe FMP1/AS02A

| Jour 0 | Hb (g/dl) | Jours de visite | Hb (g/dl) | <i>p</i> |
|--------|-----------|-----------------|-----------|----------|
| J0     | 14,5      | J30             | 14,2      | 0,53     |
| J0     | 14,5      | J60             | 14,2      | 0,55     |
| J0     | 14,5      | J90             | 14,1      | 0,38     |
| J0     | 14,5      | J180            | 14,5      | 1,00     |
| J0     | 14,5      | J272            | 13,9      | 0,006    |
| J0     | 14,5      | J364            | 14,4      | 0,83     |

L'analyse de ce tableau nous montre une différence statistiquement significative entre J0 et J272 ( $p=0,006$ ). Mais ces deux valeurs étaient toutes dans l'intervalle de référence des normes établies à Bandiagara

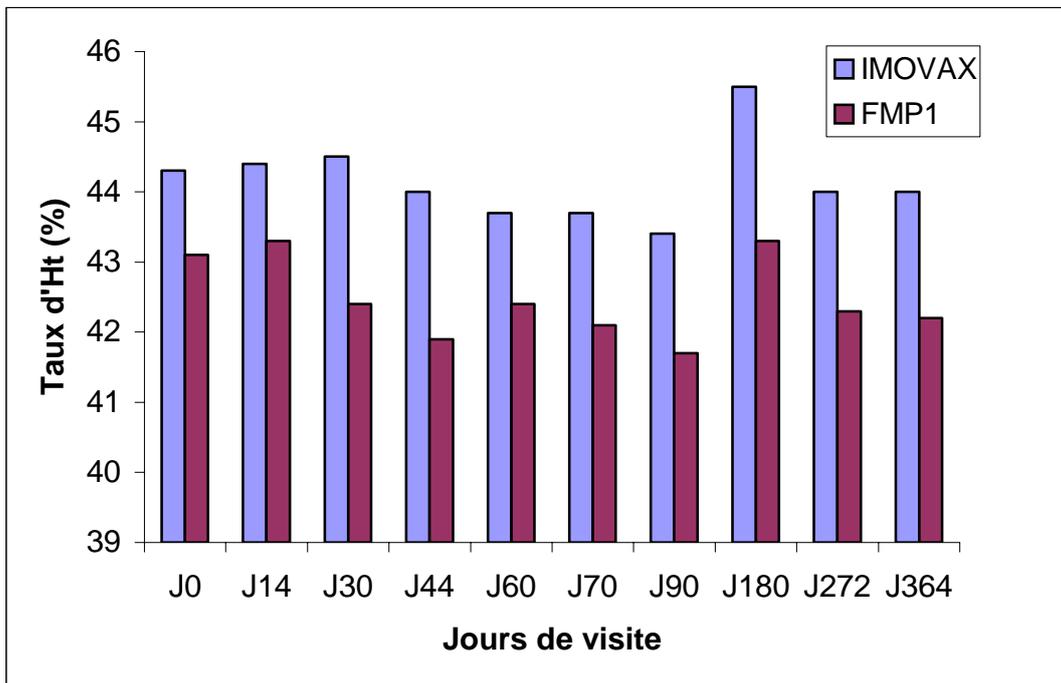
**Tableau XV:** distribution du taux d'hématocrite (%) avant et après les immunisations selon le groupe d'étude

|      | <b>Imovax®</b> |      |        |        | <b>FMP1/AS20A</b> |      |        |        |
|------|----------------|------|--------|--------|-------------------|------|--------|--------|
|      | Moyenne        | SD   | Minima | Maxima | Moyenne           | SD   | Minima | Maxima |
| J0   | 44,3           | 4,13 | 36,0   | 52,2   | 43,1              | 3,89 | 32,3   | 49,8   |
| J14  | 44,4           | 4,29 | 35,8   | 51,8   | 43,3              | 4,34 | 32,7   | 52,0   |
| J30  | 44,5           | 4,01 | 35,5   | 52,2   | 42,4              | 4,49 | 33,1   | 50,8   |
| J44  | 44,0           | 3,91 | 35,7   | 51,4   | 41,9              | 3,99 | 32,6   | 50,7   |
| J60  | 43,7           | 3,59 | 37,0   | 50,7   | 42,4              | 4,85 | 34,2   | 51,4   |
| J74  | 43,7           | 2,78 | 37,9   | 48,3   | 42,1              | 4,57 | 34,5   | 52,3   |
| J90  | 43,4           | 3,65 | 36,3   | 49,4   | 41,7              | 4,00 | 33,0   | 47,6   |
| J180 | 45,5           | 3,38 | 39,3   | 52,0   | 43,3              | 4,37 | 34,7   | 50,6   |
| J272 | 44,0           | 3,61 | 37,9   | 51,0   | 42,3              | 3,95 | 34,4   | 47,1   |
| J364 | 44,0           | 4,15 | 37,6   | 51,5   | 42,2              | 4,39 | 32,9   | 48,7   |

Ce tableau montre que dans les deux groupes les taux moyens d'hématocrite ont évolué dans l'intervalle de référence établi à Bandiagara.

Intervalle de référence : [cf annexe]

- Hommes : **36,4 – 52,3%**
- Femmes : **31,3 – 44,0%**



**Figure 13:** distribution du taux moyen d'hématocrite

**Tableau XVI :** comparaison appariée des taux moyens d'hématocrite entre J0 et les autres jours de visite dans le groupe FMP1/AS02A

| Jour 0 | Ht (%) | Jours de visite | Ht (%) | <i>P</i> |
|--------|--------|-----------------|--------|----------|
| J0     | 43,1   | J30             | 42,4   | 0,30     |
| J0     | 43,1   | J60             | 42,4   | 0,61     |
| J0     | 43,1   | J90             | 41,7   | 0,26     |
| J0     | 43,1   | J180            | 43,3   | 0,87     |
| J0     | 43,1   | J272            | 42,3   | 0,52     |
| J0     | 43,1   | J364            | 42,2   | 0,49     |

Le taux moyen de l'hématocrite a évolué de façon comparable à J0 durant les différents passages dans le groupe qui a reçu FMP1/AS02A.

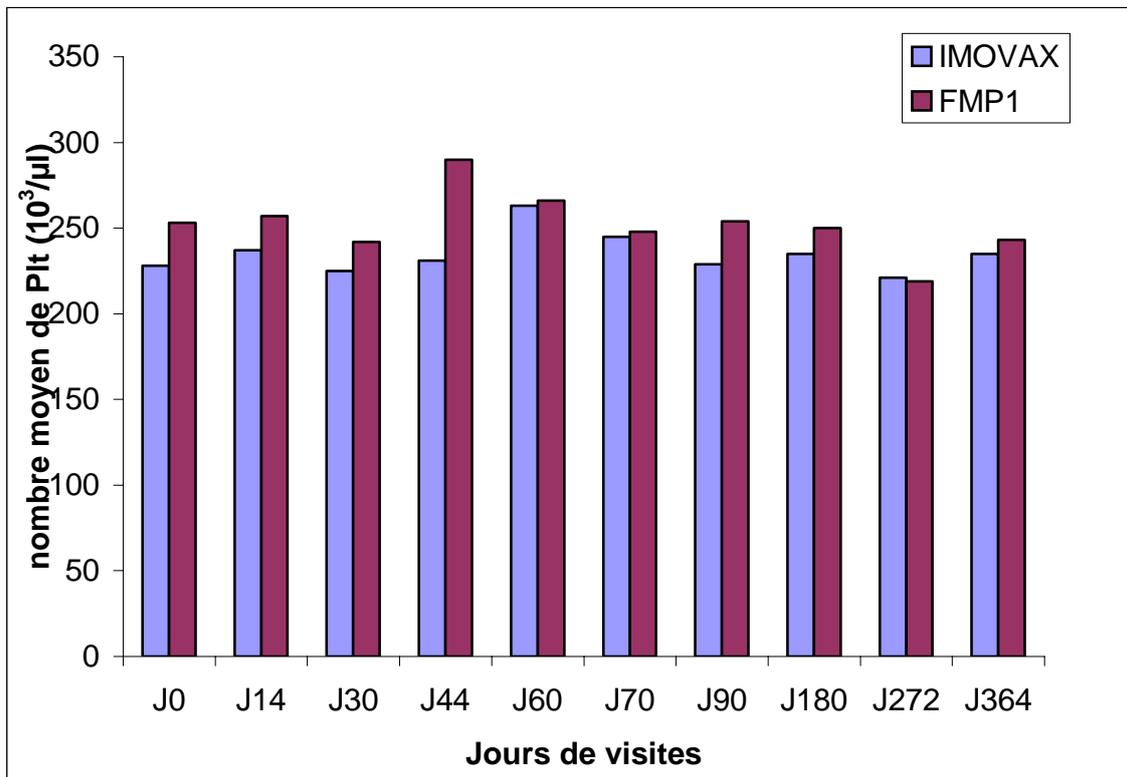
**Tableau XVII** : distribution du nombre des plaquettes ( $10^3/\mu\text{l}$ ) avant et après les immunisations selon le groupe d'étude

|      | <b>Imovax®</b> |      |        |        | <b>FMP1/AS20A</b> |       |        |        |
|------|----------------|------|--------|--------|-------------------|-------|--------|--------|
|      | Moyenne        | SD   | Minima | Maxima | Moyenne           | SD    | Minima | Maxima |
| J0   | 228            | 62,5 | 98     | 360    | 253               | 95,0  | 134    | 476    |
| J14  | 237            | 48,0 | 146    | 344    | 257               | 76,1  | 147    | 423    |
| J30  | 225            | 58,2 | 119    | 378    | 242               | 89,6  | 105    | 464    |
| J44  | 231            | 47,0 | 142    | 312    | 290               | 125,2 | 140    | 636    |
| J60  | 263            | 71,4 | 156    | 455    | 266               | 105,2 | 134    | 488    |
| J74  | 245            | 51,9 | 164    | 393    | 248               | 79,1  | 127    | 436    |
| J90  | 229            | 49,5 | 161    | 323    | 254               | 83,1  | 133    | 439    |
| J180 | 235            | 55,0 | 172    | 350    | 250               | 78,8  | 136    | 427    |
| J272 | 221            | 58,8 | 119    | 322    | 219               | 63,0  | 134    | 385    |
| J364 | 235            | 47,2 | 155    | 329    | 243               | 80,8  | 140    | 436    |

Le nombre moyen des plaquettes était normal dans les deux groupes durant toute l'étude.

Intervalle de référence : [*cf annexe*]

- **126 – 387.10<sup>3</sup>/ μl**



**Figure 14:** distribution du nombre moyen des plaquettes

**Tableau XVIII :** comparaison appariée du nombre moyen des plaquettes entre J0 et les autres jours de visite dans le groupe FMP1/AS02A

| Jour 0 | Plt (10 <sup>3</sup> /μl) | Jours de visite | Plt (10 <sup>3</sup> /μl) | <i>P</i> |
|--------|---------------------------|-----------------|---------------------------|----------|
| J0     | 253                       | J30             | 242                       | 0,70     |
| J0     | 253                       | J60             | 266                       | 0,68     |
| J0     | 253                       | J90             | 254                       | 0,97     |
| J0     | 253                       | J180            | 250                       | 0,91     |
| J0     | 253                       | J272            | 219                       | 0,18     |
| J0     | 253                       | J364            | 243                       | 0,72     |

Ce tableau montre qu'il n'y a pas eu de différence statistiquement significative par rapport à J0 dans l'évolution du nombre moyen des plaquettes dans le groupe FMP1/AS02A.

**Tableau XIX:** distribution du nombre de lymphocytes ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ ) avant et après les immunisations dans les deux groupes

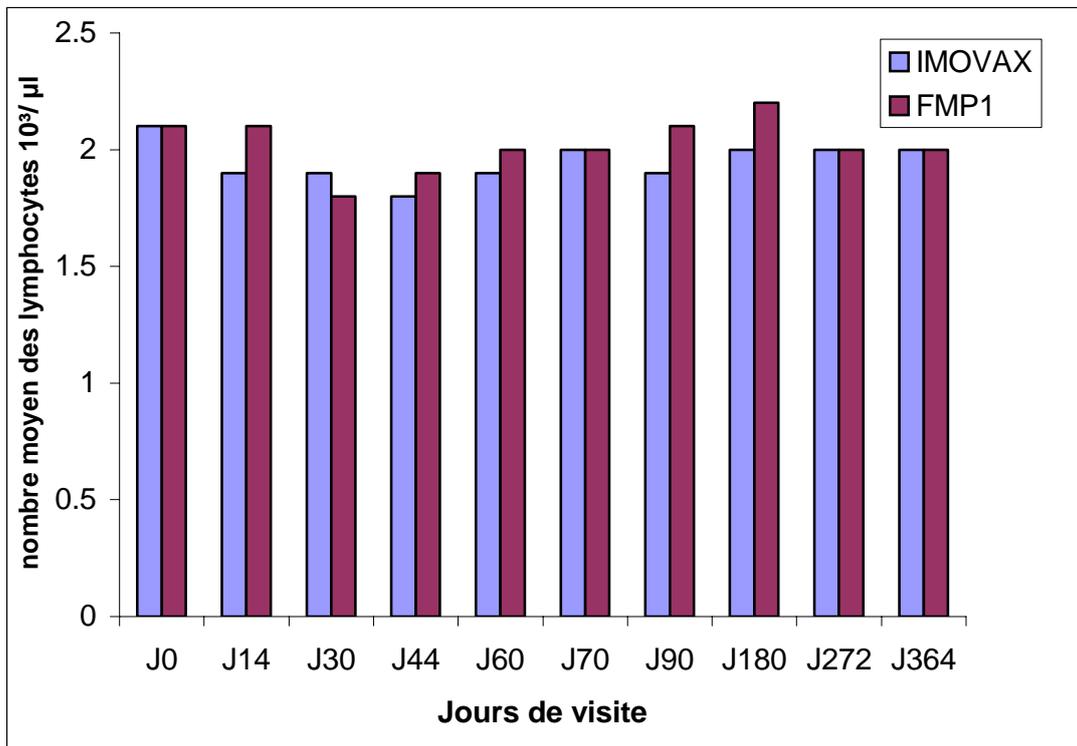
|      | <b>Imovax®</b> |      |        |        | <b>FMP1/AS20A</b> |      |        |        |
|------|----------------|------|--------|--------|-------------------|------|--------|--------|
|      | Moyenne        | SD   | Minima | Maxima | Moyenne           | SD   | Minima | Maxima |
| J0   | 2,1            | 0,73 | 1,1    | 4,2    | 2,1               | 0,40 | 1,2    | 2,6    |
| J14  | 1,9            | 0,46 | 1,2    | 3,2    | 2,1               | 0,58 | 1,3    | 3,7    |
| J30  | 1,9            | 0,51 | 1,1    | 2,9    | 1,8               | 0,51 | 1      | 3,1    |
| J44  | 1,8            | 0,44 | 1,2    | 2,9    | 1,9               | 0,59 | 0,8    | 3,1    |
| J60  | 1,9            | 0,48 | 0,9    | 3,1    | 2                 | 0,52 | 1,1    | 2,7    |
| J74  | 2              | 0,58 | 1,3    | 3,4    | 2                 | 0,58 | 1      | 3,2    |
| J90  | 1,9            | 0,40 | 1,3    | 2,7    | 2,1               | 0,57 | 1,1    | 3,4    |
| J180 | 2              | 0,62 | 0,9    | 3      | 2,2               | 0,73 | 1,2    | 4,4    |
| J272 | 2              | 0,53 | 1,1    | 3,1    | 2                 | 0,54 | 1      | 3,1    |
| J364 | 2              | 0,50 | 1,4    | 3,2    | 2                 | 0,48 | 1,2    | 3      |

Il ressort dans ce tableau que le nombre moyen des lymphocytes durant les différents passages est resté dans les limites de référence établies à Bandiagara.

Les valeurs basses rencontrées n'ont pas été classées dans le tableau de grade de toxicité. Elles n'étaient non plus significatives cliniquement. ( Grade de toxicité : *cf annexe*)

Intervalle de référence : [*cf annexe*]

- **1,5 – 5,3.10<sup>3</sup>/μl**



**Figure 15:** distribution du nombre moyen des lymphocytes

**Tableau XX :** comparaison appariée des valeurs moyennes du nombre des lymphocytes entre J0 et les autres jours de visite dans le groupe FMP1/AS02A

| Jour 0 | Lymp (10 <sup>3</sup> /μl) | Jours de visiste | Lymp (10 <sup>3</sup> /μl) | <i>p</i> |
|--------|----------------------------|------------------|----------------------------|----------|
| J0     | 2,1                        | J30              | 1,8                        | 0,04     |
| J0     | 2,1                        | J60              | 2                          | 0,49     |
| J0     | 2,1                        | J90              | 2,1                        | 1,00     |
| J0     | 2,1                        | J180             | 2,2                        | 0,46     |
| J0     | 2,1                        | J272             | 2                          | 0,50     |
| J0     | 2,1                        | J364             | 2                          | 0,47     |

L'analyse de ce tableau nous montre une différence statistiquement significative entre le début de l'étude et 30 jours après la première immunisation ( $p=0,04$ ). Mais ces deux valeurs étaient situées entre (1,5 – 5,1 10<sup>3</sup>/μl) : intervalle de référence de la population adulte locale de la ville de Bandiagara.

**Tableau XXI:** récapitulatif de la distribution des valeurs moyennes des paramètres hématologiques entre les deux groupes.

| Jours |          | J0   | J14  | J30  | J44  | J60  | J74  | J90  | J180 | J272 | J364 |
|-------|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Hb    | IMOVAX   | 14,7 | 14,7 | 14,8 | 14,6 | 14,6 | 14,7 | 14,6 | 15,1 | 14,5 | 14,9 |
|       | FMP1     | 14,5 | 14,5 | 14,2 | 14   | 14,2 | 14,2 | 14,1 | 14,5 | 13,9 | 14,4 |
|       | <i>p</i> | 0,67 | 0,68 | 0,21 | 0,18 | 0,40 | 0,25 | 0,25 | 0,19 | 0,16 | 0,29 |
| Ht    | IMOVAX   | 44,3 | 44,4 | 44,5 | 44   | 43,7 | 43,7 | 43,4 | 45,5 | 44   | 44   |
|       | FMP1     | 43,1 | 43,3 | 42,4 | 41,9 | 42,4 | 42,1 | 41,7 | 43,3 | 42,3 | 42,2 |
|       | <i>p</i> | 0,34 | 0,42 | 0,12 | 0,10 | 0,34 | 0,25 | 0,16 | 0,08 | 0,16 | 0,18 |
| Lymph | IMOVAX   | 2,1  | 1,9  | 1,9  | 1,8  | 1,9  | 2    | 1,9  | 2    | 2    | 2    |
|       | FMP1     | 2,1  | 2,1  | 1,8  | 1,9  | 2    | 2    | 2,1  | 2,2  | 2    | 2    |
|       | <i>p</i> | 1,00 | 0,23 | 0,55 | 0,54 | 0,53 | 1,00 | 0,20 | 0,35 | 1,00 | 1,00 |
| Plt   | IMOVAX   | 228  | 237  | 225  | 231  | 263  | 245  | 229  | 235  | 221  | 235  |
|       | FMP1     | 253  | 257  | 242  | 290  | 266  | 248  | 254  | 250  | 219  | 243  |
|       | <i>p</i> | 0,33 | 0,32 | 0,48 | 0,17 | 0,91 | 0,88 | 0,29 | 0,48 | 0,91 | 0,54 |
| GB    | IMOVAX   | 5,9  | 5,3  | 5,5  | 5,3  | 5,5  | 5,6  | 5,2  | 5,9  | 5,4  | 6    |
|       | FMP1     | 5,7  | 5,7  | 5,2  | 6    | 5,4  | 5,5  | 5,5  | 6,2  | 5,1  | 5,5  |
|       | <i>p</i> | 0,67 | 0,42 | 0,55 | 0,19 | 0,83 | 0,83 | 0,42 | 0,45 | 0,48 | 0,28 |

L'analyse de ce tableau nous montre qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les deux groupes dans la distribution des valeurs moyennes des paramètres hématologiques.

Hb = Hémoglobine (g/dl)

Ht = Hématocrite (%)

GB = Globules blancs ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )

Lymph = Lymphocytes ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )

Plt = Plaquettes ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )

**5-Resultats biochimiques**

**Tableau XXII** : distribution des valeurs de la créatinine sérique ( $\mu\text{mol/l}$ ) selon le groupe d'étude.

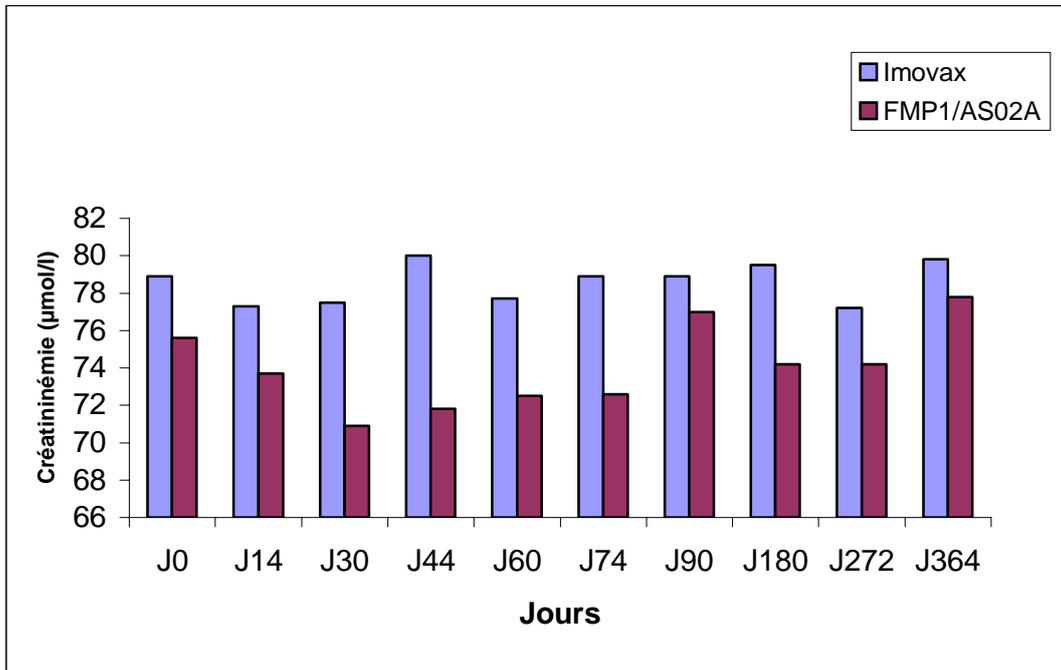
|      | <b>Imovax®</b> |       |        |        | <b>FMP1/AS20A</b> |       |        |        |
|------|----------------|-------|--------|--------|-------------------|-------|--------|--------|
|      | Moyenne        | SD    | Minima | Maxima | Moyenne           | SD    | Minima | Maxima |
| J0   | 78,9           | 11,24 | 62,9   | 105    | 75,6              | 14,69 | 48,9   | 102    |
| J14  | 77,3           | 11,94 | 63,3   | 105    | 73,7              | 14,50 | 47,4   | 104    |
| J30  | 77,5           | 14,21 | 60,9   | 110    | 70,9              | 11,76 | 44,4   | 90,8   |
| J44  | 80             | 12,13 | 65,6   | 112    | 71,8              | 11,71 | 49,1   | 98,9   |
| J60  | 77,7           | 12,35 | 56,4   | 109    | 72,5              | 13,55 | 46,8   | 97,8   |
| J74  | 78,9           | 12,62 | 63,5   | 109    | 72,6              | 12,78 | 50,4   | 97,9   |
| J90  | 78,9           | 11,78 | 62,3   | 111    | 77                | 16,43 | 53,9   | 128    |
| J180 | 79,5           | 14,04 | 55     | 99,1   | 74,2              | 14,10 | 48,4   | 106    |
| J272 | 77,2           | 12,85 | 63,1   | 103    | 74,2              | 17,31 | 44,3   | 115    |
| J364 | 79,8           | 9,88  | 63,3   | 101    | 77,8              | 13,66 | 58,2   | 114    |

Les valeurs moyennes de la créatininémie étaient comprises dans les limites établies à Bandiagara dans les deux groupes et.

Les valeurs les plus élevées ont été observées à J44 (112  $\mu\text{mol/L}$ ) dans le groupe Imovax et à J90 (128  $\mu\text{mol/L}$ ) dans le groupe FMP1/AS02A, mais aucune signification sur le plan clinique n'a été observée.

Intervalle de référence : [*cf annexe*]

- Hommes :  $\leq 101 \mu\text{mol/l}$
- Femmes :  $\leq 65,3 \mu\text{mol/l}$



**Fig. 16:** distribution des valeurs moyennes de la créatininémie aux jours de visites et selon le groupe

**Tableau XXIII :** comparaison appariée de la valeur moyenne de la créatinine sérique dans le groupe FMP1/AS02A

| Jour 0 | Créat.(µmol/l) | Jours de visite | Créat.(µmol/l) | <i>P</i> |
|--------|----------------|-----------------|----------------|----------|
| J0     | 75,6           | J30             | 70,9           | 0,27     |
| J0     | 75,6           | J60             | 72,5           | 0,49     |
| J0     | 75,6           | J90             | 77             | 0,77     |
| J0     | 75,6           | J180            | 74,2           | 0,76     |
| J0     | 75,6           | J272            | 74,2           | 0,86     |
| J0     | 75,6           | J364            | 77,8           | 0,62     |

Nous n'avons pas eu une différence statistiquement significative par rapport à J0 dans l'évolution des valeurs moyennes de la créatinine sérique pour le groupe FMP1/AS02A.

**Tableau XXIV:** distribution des valeurs de l'ALAT sérique (U/L) selon le groupe d'étude.

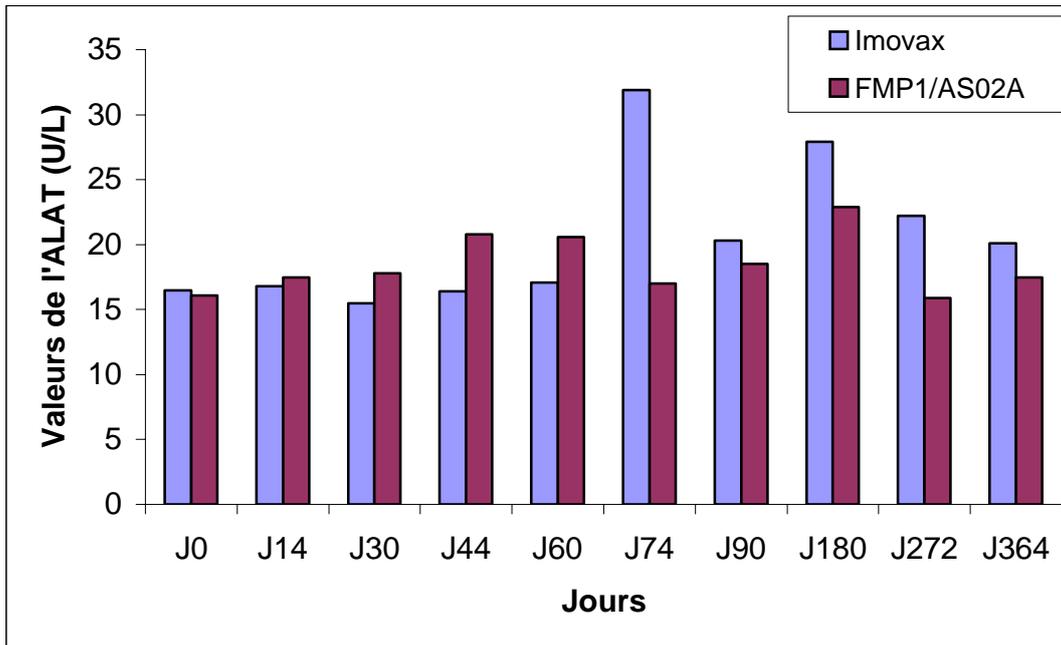
|      | <b>Imovax®</b> |       |        |        | <b>FMP1/AS20A</b> |      |        |        |
|------|----------------|-------|--------|--------|-------------------|------|--------|--------|
|      | Moyenne        | SD    | Minima | Maxima | Moyenne           | SD   | Minima | Maxima |
| J0   | 16,5           | 5,15  | 11,7   | 30,5   | 16,1              | 4,92 | 9,9    | 23     |
| J14  | 16,8           | 6,92  | 8,2    | 33,7   | 17,5              | 6,89 | 8,3    | 37,7   |
| J30  | 15,5           | 4,91  | 7,5    | 27,6   | 17,8              | 6,27 | 9,3    | 32,2   |
| J44  | 16,4           | 5,49  | 9,9    | 30     | 20,8              | 8,07 | 8      | 34,8   |
| J60  | 17,1           | 6,91  | 8,7    | 34     | 20,6              | 9,44 | 9,5    | 51,2   |
| J74  | 31,9           | 77,08 | 6,8    | 359,0  | 17                | 6,59 | 8,6    | 37,7   |
| J90  | 20,3           | 23,14 | 5,6    | 116    | 18,5              | 8,87 | 9,8    | 43,6   |
| J180 | 27,9           | 19,95 | 11,9   | 91,7   | 22,9              | 8,61 | 11,5   | 43,6   |
| J272 | 22,2           | 26,68 | 5,2    | 131    | 15,9              | 4,87 | 9,1    | 29,7   |
| J364 | 20,1           | 10,43 | 10,1   | 55,4   | 17,5              | 6,78 | 10     | 36,7   |

Ce tableau nous montre que les valeurs moyennes de l'ALAT étaient comprises dans les limites de référence des normes établies à Bandiagara.

La valeur la plus élevée a été observée à J74 (359 U/L : Grade 3 ) chez un volontaire dans le groupe Imovax®.

Intervalle de référence : [*cf annexe*]

- **8,03 – 43,3U/L**



**Figure 17:** distribution des valeurs moyennes de l'ALAT aux jours de visites et selon le groupe

**Tableau XXV :** comparaison appariée de la valeur moyenne de l'ALAT sérique dans le groupe FMP1/AS02A

| Jour 0 | ALAT(U/L) | Jours de visite | ALAT(U/L) | <i>P</i> |
|--------|-----------|-----------------|-----------|----------|
| J0     | 16,1      | J30             | 17,8      | 0,34     |
| J0     | 16,1      | J60             | 20,6      | 0,06     |
| J0     | 16,1      | J90             | 18,5      | 0,29     |
| J0     | 16,1      | J180            | 22,9      | 0,09     |
| J0     | 16,1      | J272            | 15,9      | 0,89     |
| J0     | 16,1      | J364            | 17,5      | 0,45     |

Les valeurs moyennes de l'ALAT sérique ont évolué de façon comparable à J0 durant toute notre étude.

**Tableau XXVI :** récapitulatif de la distribution des valeurs moyennes des paramètres biochimiques entre les deux groupes.

|       |          | J0   | J14  | J30  | J44  | J60  | J74  | J90  | J180 | J272 | J364 |
|-------|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Créat | IMOVAX   | 78,9 | 77,3 | 77,5 | 80   | 77,7 | 78,9 | 78,9 | 79,5 | 77,2 | 79,8 |
|       | FMP1     | 75,6 | 73,7 | 70,9 | 71,8 | 72,5 | 72,6 | 77   | 74,2 | 74,2 | 77,8 |
|       | <i>p</i> | 0,42 | 0,39 | 0,11 | 0,03 | 0,21 | 0,12 | 0,67 | 0,24 | 0,53 | 0,59 |
| ALAT  | IMOVAX   | 16,5 | 16,8 | 15,5 | 16,4 | 17,1 | 31,9 | 20,3 | 27,9 | 22,2 | 20,1 |
|       | FMP1     | 16,1 | 17,5 | 17,8 | 20,8 | 20,6 | 17   | 18,5 | 22,9 | 15,9 | 17,5 |
|       | <i>p</i> | 0,80 | 0,75 | 0,20 | 0,05 | 0,18 | 0,36 | 0,57 | 0,32 | 0,32 | 0,35 |

L'analyse de ce tableau montre qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les deux groupes dans la distribution des valeurs moyennes des paramètres biochimiques, sauf à J44, il y avait une différence entre les deux groupes pour les moyennes de la créatininémie ( $p = 0,03$ ) et de l'ALAT ( $p = 0,05$ ). Toutes ces valeurs étaient comprises dans l'intervalle de référence établie à Bandiagara.

**6- Résultats immunologiques****Tableau XXVII:** moyennes géométriques du titre sérique d'isotype IgG anticorps anti-FMP1.

|                   | N  | GMT   | < 95% CI > |        | Titres |        |
|-------------------|----|-------|------------|--------|--------|--------|
|                   |    |       |            |        | Min.   | Max.   |
| <b>ÌMOVAX®</b>    |    |       |            |        |        |        |
| J0                | 20 | 3282  | (1423      | 7568)  | 77     | 33876  |
| J14               | 20 | 3089  | (1332      | 7161)  | 58     | 35474  |
| J30               | 20 | 3485  | (1391      | 8728)  | 42     | 29348  |
| J44               | 20 | 4036  | (1796      | 9071)  | 78     | 33700  |
| J60               | 20 | 6915  | (3148      | 15190) | 75     | 69270  |
| J74               | 20 | 7051  | (3477      | 14300) | 107    | 71783  |
| J90               | 20 | 6892  | (3645      | 13029) | 112    | 66495  |
| J180              | 19 | 9089  | (3817      | 21645) | 114    | 59143  |
| J272              | 20 | 6367  | (2743      | 14779) | 75     | 77954  |
| J364              | 20 | 5015  | (2194      | 11462) | 80     | 57946  |
| <b>FMP1/AS02A</b> |    |       |            |        |        |        |
| J0                | 20 | 5858  | (2650      | 12950) | 44     | 100357 |
| J14               | 20 | 7627  | (3561      | 16336) | 59     | 115942 |
| J30               | 20 | 8007  | (3809      | 16831) | 64     | 40505  |
| J44               | 20 | 20044 | (12994     | 30919) | 2301   | 156056 |
| J60               | 20 | 26321 | (19611     | 35326) | 8845   | 133469 |
| J74               | 20 | 35194 | (26245     | 47194) | 8265   | 137811 |
| J90               | 20 | 37923 | (26788     | 53686) | 6148   | 163101 |
| J180              | 20 | 29150 | (18301     | 46432) | 3266   | 121370 |
| J272              | 20 | 19518 | (11181     | 34072) | 1140   | 140890 |
| J364              | 20 | 14693 | (8216      | 26272) | 782    | 115273 |

N : nombre de volontaire avec des données disponibles

&lt; 95%CI &gt; : 95% Intervalle de confiance, limites : inférieure et supérieure

GMT : Moyenne géométrique des titres d'anticorps

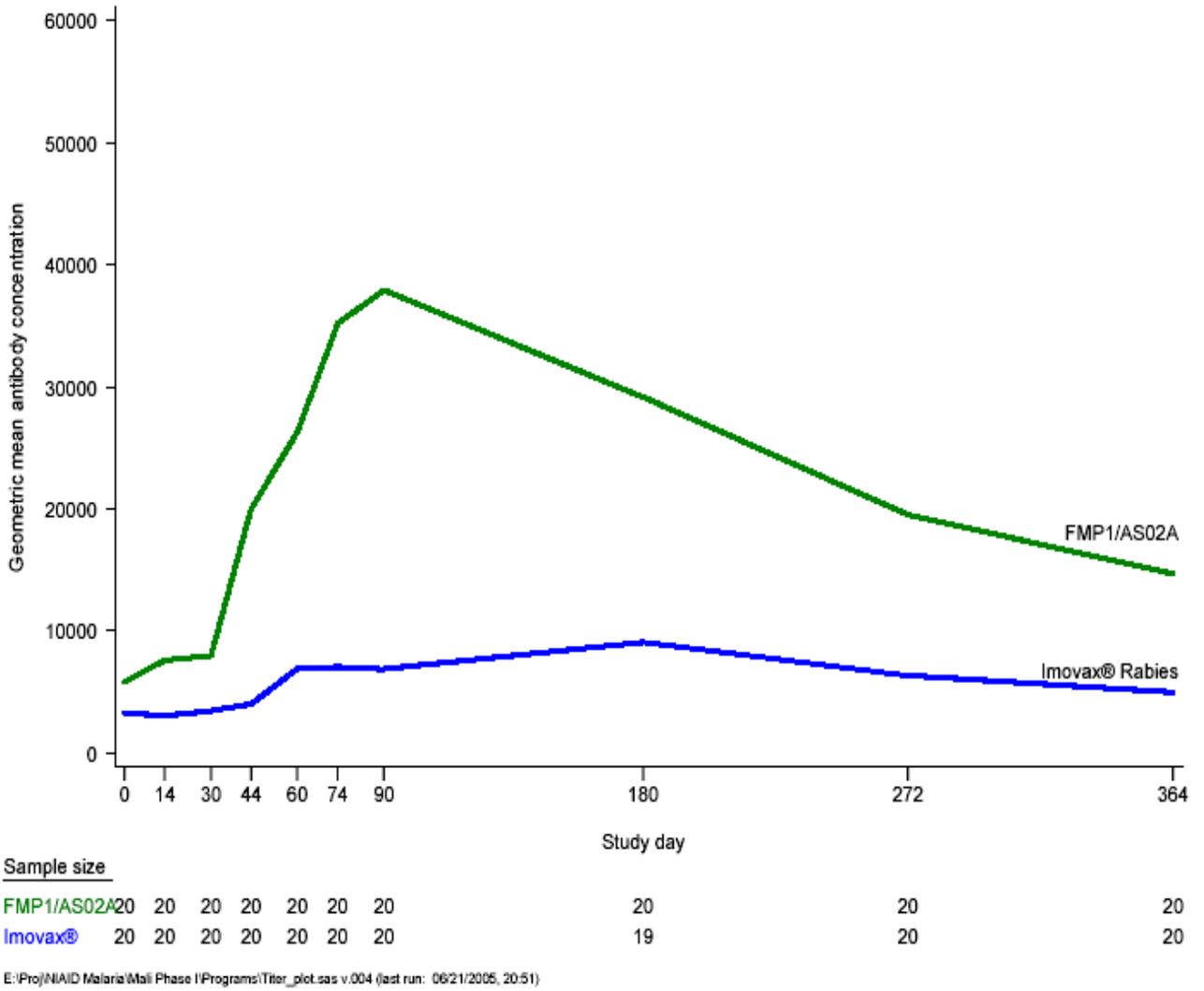
La moyenne géométrique des anticorps anti-FMP1 a progressivement augmenté dans le groupe FMP1/AS02A après chaque immunisation. Dans le groupe Imovax® le titre des anticorps anti-FMP1 a légèrement augmenté jusqu'à J60 et tendait à se stabiliser jusqu'à J90.

A J90 la moyenne géométrique des anticorps anti-MSP1 dans le groupe FMP1 était 5,5 fois supérieure à celui du groupe Imovax® .

**Tableau XXVIII :** ratio des moyennes géométriques des anticorps IgG anti-FMP1 entre J0 et les autres jours de visite selon le groupe d'étude.

|                   | <b>J30/J0</b> | <b>J60/J0</b> | <b>J90/J0</b> | <b>J180/J0</b> | <b>J272/J0</b> | <b>J364/J0</b> |
|-------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|----------------|----------------|
| <b>FMP1/AS02A</b> | 1,36          | 4,49          | <b>6,47</b>   | 4,97           | 3,33           | 2,50           |
| <b>Imovax®</b>    | 1,06          | 2,10          | 2,09          | 2,76           | 1,93           | 1,52           |

A J90 le taux moyen d'IgG anti-FMP1 était 6,47 fois celui à J0 dans le groupe FMP1.



**Fig. 18:** distribution des moyennes géométriques d'anticorps anti-FMP1.

## **VI- Commentaires et discussion**

### **1 - Méthodologie:**

Notre cadre d'étude a été la ville de Bandiagara, le choix de ce site se justifie par les raisons ci-après :

- Depuis 1993 cette ville a été le site des études entomologiques et épidémiologiques sur le paludisme, depuis 1998 cette ville abrite des études de préparation de site pour la conduite d'essais cliniques de vaccins antipaludiques.

- FMP1 a été bien toléré et a montré une bonne immunogénicité dans des essais de phase I sur des sujets neufs aux Etats-Unis et au Kenya dans une zone de transmission intense du paludisme. La tolérance et l'immunogénicité d'un vaccin antipaludique pourront varier selon l'intensité de la transmission du paludisme et l'état de semi-immunité des populations. A Bandiagara l'intensité de la transmission du paludisme a un rythme saisonnier.

Nous avons effectué un essai clinique randomisé en double aveugle avec groupe témoin.

Le recours à un groupe témoin est utile en zone d'endémie dans une étude de Phase I, car l'immunité acquise et l'exposition naturelle à la transmission du paludisme peuvent compliquer l'interprétation des données de l'immunogénicité. Une augmentation du titre des anticorps peut être attribuée à tort au FMP1 son effet étant méconnu.

#### Choix de l'Imovax®:

Le placebo serait un bon témoin. Mais un vaccin qui apporterait une protection contre une maladie existante dans la zone serait un meilleur

témoin. Car ce vaccin permettra de favoriser le rapport risques/bénéfices pour les participants.

La plus part des vaccins qui pourraient être choisis sont disponibles dans le Programme Elargi de Vaccination au Mali. Un choix aurait pu être le vaccin contre l'hépatite B. Selon les données disponibles la charge de morbidité liée à l'hépatite B est élevée au Mali. Une étude sérologique portant sur 172 adultes en 1980, vivant en zones urbaines, a trouvé une prévalence de 97,2% du marqueur sérologique indiquant un contact antérieur avec le virus de l'hépatite B. Le contact avec le virus de l'hépatite B confère une immunité protectrice par la suite. Par conséquent le bénéfice d'une vaccination contre l'hépatite B dans une population adulte du Mali est moindre.

La rage est une maladie mortelle et le risque de faire la rage à Bandiagara est une réalité.

Pour ces multiples raisons nous avons choisi le vaccin antirabique Imovax®. Son schéma de vaccination recommandé est 0, 7 et 21 jours. Mais des études hors label réalisées en Angleterre, en Allemagne, en France et en Belgique ont montré que 100% des sujets vaccinés avec deux doses à 1 mois d'intervalle présentaient des titres d'anticorps protecteurs[50, 56].

#### Choix des paramètres biologiques:

L'introduction de tout nouveau produit dans l'organisme de l'homme passe par une étude clinique de phase I pour évaluer la tolérance clinique et le niveau de toxicité de ce produit sur certains tissus et organes tels que le foie, le rein et le tissu hématopoïétique.

L'exploration du tissu hématopoïétique se justifie par le fait que tous les produits passent par le sang et de là ils sont distribués dans le reste de l'organisme.

Le foie constitue un centre de synthèse et de dégradation des glucides, des lipides, des protéines et des médicaments. Notre nouveau produit est une protéine antigénique associée à un adjuvant qui a une composition lipidique et d'alcaloïde, il est donc capital de déterminer le niveau de toxicité hépatique en relation directe avec ce produit.

Le rein constitue un filtre pour le sang. Cette fonction d'épuration pourrait entraîner une lésion rénale par suite de l'élimination de certains produits et déchets métaboliques. Ceci nous a amené à contrôler régulièrement l'état de fonctionnement de cet organe durant toute notre étude.

Les risques potentiels que les volontaires pourraient atteindre dans l'immédiat par suite de l'administration de ce produit sont les réactions allergiques à différents degrés. Un Médecin anesthésiste réanimateur suivait les volontaires pendant au moins 7 jours après chaque dose pour la prise en charge d'éventuels cas de réaction. Une ambulance correctement équipée était tenue sur place pour référer d'éventuels cas de réactions allergiques graves dans un centre spécialisé.

Le recrutement des volontaires a été effectué après un appel lancé à la radio de la ville. Au total 108 volontaires âgés de 18 à 55 ans se sont présentés. Par suite du dépistage, 40 volontaires répondant à tous les critères d'inclusion et ne présentant aucun des critères de non-inclusion ont été inclus pour l'étude. Les 40 volontaires ont été repartis dans deux groupes de 20 par attribution selon l'ordre d'arrivée des volontaires à la vaccination des enveloppes randomisées contenant le code du produit à administrer (Imovax® ou FMP1/AS02A). La randomisation des enveloppes a été faite par allocation aléatoire du code du produit.

Après le dépistage les volontaires qui n'étaient pas inclus pour des raisons d'anomalies d'ordre clinique ou biologique (Tableau II) ont bénéficié d'une prise en charge complète et ont été suivis durant toute l'étude lorsque c'était nécessaire. Des investigations cliniques, biologiques plus poussées et des examens complémentaires adéquats ont été faits pour chacun de ces volontaires.

Les échantillons de sang ont été collectés et transportés dans la salle d'analyse au maximum dans un délai de 30 minutes après prélèvement. A la réception un seul cas de rejet d'échantillon a été enregistré pour hémolyse de sang prélevé sur tube sec (SST), le volontaire a été vu et son accord a été obtenu, un autre tube SST a été prélevé. Toutes ces actions ont été documentées.

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

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

Le laboratoire de biologie clinique a bénéficié des contrôles de qualité interne, effectués sur les appareils tous les mois. Le contrôle de qualité externe a été régulièrement fait tous les trois mois par la société Américaine CAP (College of American Pathologists) pour le Reflotron® Plus, le AcT\*-10, le test de grossesse et la chimie des urines. (*cf annexes*)

Au total 7 monitorages ont été effectués sur le site dont 2 avant le démarrage de l'étude (USAMMDA, WHO) et les 4 au cours de l'étude respectivement par : (USAMMDA et GSKBio.), (USAMMDA, WHO) et (GSKBio.), (USAMMDA, WHO), le dernier à la fin de l'étude (USAMMDA et GSKBio) et ont conclu « L'investigateur principal et le staff de l'étude ont mené toutes les activités conformément aux règles et directives du GCP(BPC) : (Bonnes Pratiques Cliniques pour la conduite d'essais cliniques de vaccin). A ce point le monitoring de cette étude est terminé. »

## **2 – Caractéristiques de base de la population d'étude :**

La population d'étude était majoritairement constituée de sexe masculin (82,5%) avec un sex-ratio de 4,7 en faveur du même sexe.

Les deux groupes étaient comparables du point de vue de leur âge ( $p = 0,53$ ). L'âge médian était de 42 dans le groupe qui a reçu le candidat vaccin FMP1/AS02A et de 40 dans le groupe contrôle.

Au départ il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les deux groupes pour les paramètres biologiques et les signes vitaux. (Tableau III et IV).

## **3 – Tolérance clinique :**

Les manifestations cliniques étudiées portaient sur les effets indésirables sollicités, les événements adverses non sollicités et les événements adverses sérieux.

Les effets indésirables sollicités étaient recherchés pendant 8 jours après chaque immunisation, ils font parti des critères de jugement de la tolérance.

Ils regroupent les symptômes cliniques locaux (douleurs au site d'injection, œdème au site d'injection, rougeur, limitation du mouvement d'abduction de l'épaule) et généraux (fièvre, frissons, nausées, céphalées, malaises, myalgies et douleurs articulaires).

Nous avons noté une différence statistiquement significative entre les deux groupes dans l'incidence de la douleur et du gonflement au site d'injection après la deuxième immunisation (respectivement  $p = 0,01$  et  $p = 0,003$ ). Les signes les plus fréquents étaient des douleurs au site d'injection.

Il n'y avait pas de différence statistiquement significative dans l'incidence des symptômes cliniques sollicités généraux après la première et la troisième dose. Les douleurs articulaires et les myalgies étaient plus fréquentes dans le groupe FMP1 après la deuxième dose ( $P = 0,04$  et  $0,02$ ).

Les effets indésirables non sollicités regroupaient tous les événements malencontreux survenant au cours de l'étude, même s'il n'y avait pas de relation cause/effet avec les produits administrés. Ces événements ont été reportés durant 30 jours après chaque immunisation (Tableau IX). Ceci nous donne la morbidité générale des différentes affections sur cette population.

Deux cas d'événements adverses sérieux ont été documentés, tous survenus dans le groupe FMP1/AS02A. Un cas de sinusite et un cas de grossesse extra-utérine. Tous ont été traités et guéris. Ces deux événements n'étaient pas en relation direct avec le produit administré.

Sur 27 volontaires ayant fait au moins 1 accès de paludisme simple, 15 sont dans le groupes FMP1, 3 volontaires ont fait 3 accès dont 2 sont dans le groupe IMOVAX® et le seul volontaire qui a fait 4 accès est dans le groupe

IMOVAX®, il n'y avait pas de différence statistiquement significative dans l'incidence du paludisme dans les deux groupes.

#### **4- Tolérance biologique**

##### Paramètres hématologiques:

###### Les globules blancs:

Les valeurs moyennes des globules blancs étaient comparables dans les deux groupes. Nous n'avons pas noté de résultat hors des limites de référence suggérant une toxicité sur ces cellules. Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre le début de l'étude et les autres jours de visites pour le nombre moyen des globules blancs.

###### Les taux d'hémoglobine et d'hématocrite:

Les taux de ces deux paramètres étaient normaux dans les deux groupes. Toute fois la valeur la plus basse (10,6 g/dl) a été observée dans le groupe FMP1/AS02A chez une volontaire de sexe féminin, cette valeur était donc dans la limite de référence (10,0 – 14,4 g/dl) pour ce sexe. Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre le début de l'étude et les autres jours de visite pour les taux moyens de ces paramètres.

###### Le nombre des plaquettes:

Les valeurs moyennes des plaquettes dans les deux groupes ont normalement évolué. La valeur la plus basse a été observée dans le groupe Imovax®, cette thrombopénie n'était qu'une trace biologique sans signification clinique. Dans le groupe FMP1/AS02A les valeurs minimales se situaient toujours dans les limites de référence. Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre le début de l'étude et les autres jours de visites pour le nombre moyen des plaquettes.

### Les lymphocytes:

Les valeurs minimales des lymphocytes étaient souvent en dessous de la limite inférieure des normes biologiques de la population locale de la ville de Bandiagara.

Notre étude a été conduite dans une population adulte. En absence de tout symptôme clinique suggérant une lymphopénie, nous pensons que cet état biologique pourrait être dû à l'âge [62, 63].

La valeur la plus basse a été observée dans le groupe Imovax ( $0.8 \times 10^3/\mu\text{l}$ ).

Nous n'avons noté aucune variation significative sur le plan clinique.

### Les paramètres biochimiques:

#### La créatininémie:

La créatininémie n'a pas connu de variation pathologique lors des différents passages. Quatre participants ont eu une élévation du taux sérique de la créatinine. Les valeurs les plus élevées ont été observées à J44 (112  $\mu\text{mol/L}$ ) dans le groupe Imovax et à J90 (128  $\mu\text{mol/L}$ ) dans le groupe FMP1/AS02A, mais ces deux cas n'étaient pas cliniquement significatifs, la valeur de la créatinine s'est normalisée dans tous les cas sans traitement.

Il y'avait une différence statistiquement significative entre les deux groupes à J44 ( $P = 0,03$ ) pour la valeur moyenne de la créatinine, mais toutes ces valeurs étaient dans l'intervalle de référence établi à Bandiagara.

La différence des valeurs moyennes entre le début de l'étude et les autres jours de visite n'était pas statistiquement significative dans le groupe FMP1.

#### L'ALAT sérique:

La détermination de l'ALAT sérique lors des différents passages a donné une évolution normale des valeurs moyennes dans les deux groupes.

Cependant une élévation importante (359,0 U/L) pour une limite supérieure de 43,3 U/L a été observée à J74 dans le groupe Imovax. Cette valeur a atteint le degré 3 du grade de toxicité classé de 1 à 4. Après une investigation complète clinique et biologique du participant à la recherche d'une cause, nous n'avons pas trouvé d'autre signe d'atteinte hépatique. L'état clinique du participant est resté constamment bon, sans ictère, ni hépatomégalie, ni prurit. Le participant était sous traitement avec de l'érythromycine, antibiotique à toxicité hépatique connue, pour une angine de gorge à une posologie de 2 grammes par jour. Le traitement a été arrêté. Cette valeur a régulièrement baissé jusqu'à 11.3 U/L à J272 soit 6 semaines après.

### **5-Immunogénicité:**

La moyenne géométrique du titre sérique d'anticorps anti-MSP1 des volontaires dans le groupe IMOVA® est restée relativement stable durant toute l'étude soit une DO de  $3 \times 10^3$  avant la première immunisation,  $7 \times 10^3$  à J90 et  $5 \times 10^3$  à J364.

Alors que dans le groupe FMP1/AS02A la moyenne géométrique a évolué de façon régulièrement croissante après chaque immunisation dans le groupe FMP1/AS02A jusqu'à J90, soit une DO de  $6 \times 10^3$  avant la première immunisation,  $38 \times 10^3$  à J90 et  $15 \times 10^3$  à J364.

La moyenne géométrique du titre sérique d'anticorps anti-FMP1 était plus basse dans le groupe IMOVAX® que dans le groupe FMP1/AS02A au début de l'étude soit  $3 \times 10^3$  contre  $6 \times 10^3$ .

A J90 la moyenne géométrique du titre sérique des anticorps anti-MSP1 dans le groupe FMP1/AS02A était 5,5 fois plus élevée que dans le groupe

Imovax® ( $7 \times 10^3$  contre  $38 \times 10^3$ ) et 6,4 fois plus qu'avant la première dose dans le groupe FMP1/AS02A ( $6 \times 10^3$  contre  $38 \times 10^3$ ).

Après chaque immunisation le taux sérique d'anticorps anti-MSP1 a subi une augmentation de 2,3 fois la dose précédente en moyenne.

Après J90 le titre sérique d'anticorps anti-FMP1 dans le groupe FMP1/AS02A a régulièrement baissé mais toujours au-dessus de celui du groupe IMOVAX®, soit respectivement  $15 \times 10^3$  contre  $5 \times 10^3$  à J364.

Il faut cependant noter qu'une évolution légèrement croissante a été observée dans le groupe Imovax. A J60 la moyenne géométrique du titre sérique des anticorps anti-FMP1 était 2,10 fois supérieure qu'à J0 dans le groupe Imovax, ce ci pourrait être attribué à l'immunité acquise lors des infections naturelles [20].

Contrairement aux résultats du Kenya où la transmission du paludisme était intense, le titre sérique de base d'anticorps anti-FMP1 était important dans les deux groupes et le boosting n'était pas aussi net qu'il a été observé dans notre étude [69].

D.Gray Heppner et al. 2004 ont montré que ce candidat vaccin FMP1/AS02A a entraîné une bonne induction d'anticorps anti-MSP1 dans les modèles souris, rats et singes rhésus macaque [64].

## VII- Conclusion

Au terme de cette étude nous pouvons conclure que :

- L'étude des symptômes cliniques n'a pas évoqué des signes d'intolérance majeure sur le plan clinique.

- Les différents paramètres hématologiques n'ont pas subi une variation pathologique en relation directe avec le candidat vaccin antipaludique FMP1/AS02A. Ce produit n'a donc pas entraîné une toxicité hématologique significative dans ce groupe d'étude.

- Nous n'avons pas rencontré de variation des valeurs sériques de la créatinine cliniquement significative dans les deux groupes.

- Les valeurs de l'ALAT sérique ont évolué dans l'intervalle de référence établi à Bandiagara durant les 12 mois de suivi dans le groupe qui a reçu notre candidat vaccin antipaludique. Nous n'avons pas rencontré de signe évoquant une atteinte hépatique aiguë.

- Ce candidat vaccin a induit une réponse anticorps anti-FMP1 mesurable chez les volontaires.

Le candidat vaccin FMP1/AS02A a été bien toléré et présente une excellente immunogénicité dans cette étude.

### **VIII- Recommandations**

- 1- Poursuivre les stratégies de développement clinique du candidat vaccin FMP1 dans la population cible que constituent les enfants.
- 2- Renforcer le personnel du laboratoire d'immunologie du MRTC/DEAP.
- 3- Continuer le transfert de technologie entre les équipes de recherche du Nord et celles du Sud.
- 4- Encourager la population à participer aux essais vaccinaux (continuer la restitution des données des études menées à Bandiagara).

**IX- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- 1-WORLD HEALTH ORGANIZATION.** Malaria a global crisis Geneva: WHO, 2000
- 2-WORLD HEALTH ORGANIZATION.** Malaria fact sheet No 94. Geneva: WHO 1996
- 3-OMS, 2001,** Bulletin de l'OMS, Recueil d'article No4, 2001: Quelles perspectives pour faire reculer le paludisme 1133
- 4-Odile Mercereau-Puijalon.** Vaccins contre le paludisme un long chemin semé d'embûche. ©2002 Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS, 1p
- 5-WORLD BANK.** Economics of Malaria. 1999
- 6-Traore AM.** Analyse de la situation du paludisme au Mali et les stratégies de prise en charge des formes graves et compliquées dans le service de pédiatrie de l'hôpital Gabriel Touré. Thèse de Médecine Bamako, 2001, 83p; 121
- 7-Coulibaly D, Diallo DA, Thera MA, Dicko A, Guindo AB, Djimde A, Doumbo OK, Plowe CV.** Impact of pre-season treatment on incidence of falciparum malaria and parasite density at a site for testing malaria vaccines in Bandiagara, Mali. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 2002, **67**: 604-610
- 8-Le Sueur D, Sharp BL, Gouws E, Ngxongo S.** Malaria in South Africa. *S Afr Med J* 1996; **86**: 936-9
- 9-Wernsdorfer WH.** The development and spread of drug-resistance malaria. *Parasitol. Today*, 1991, 7: 297-303
- 10-Shanks GD, Biomndo K, Hay SI, Snow RW.** Changing patterns of clinical malaria since 1965 among a tea estate population located in the Kenyan highlands. *Trans R soc Trop Med Hyg.* 2000; **94**: 253-5
- 11-Irwin W Sherman.** *Plasmodium*, a genus of parasitic protozoons that are causative agents of disease malaria. Enclopedia of life sciences/ © 2001 *Nature Publishing Group.*
- 12-Daniel Webster & Adrian V.S. Hill.** Progress with new malaria vaccines.
- 13-Marc Gentilini, Martin Danis et Jean Mouchet.** Médecine tropicale (Université Francophone ) Paludisme ; ©Edition Marketing/Ellipses, 1991, .

- 14-Egan AF, Burghaus P, Druilhe P, Holder AA, Riley EM.** Human antibodies to the 19Kda C-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 inhibit parasite growth *in vitro*. *Parasite immunol.* 1999; **21**:133-9
- 15-Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berrimane M, Hyman RW et al.** Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2002 ; **419** : 498-511
- 16-LE Bras M , Denis Malvy.** Vaccination antipaludique : acquis et controverses. *Rev. Prat.* (Paris) 1998 Feb1. **48**(3) : 291- 295
- 17-Nussenzweig RS, Vanderberg J, Most H, Orton C.** Protective immunity produce by the injection of x-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*, *Nature* 1967; **216** : 160-2
- 18-Collins WE, Contacos PG.** Immunization of monkeys against *Plasmodium cynomolgi* by x-irradiated sporozoites. *Nature New biology* 1972; **236** : 176-7
- 19-Riekmann AH, Baeudoin RL, Cassells JS, Sell KW.** Use of attenuated sporozoites in the immunization of human volunteers against falciparum malaria. *Bulletin of World Health Organization* 1979; 57 (suppl 1): 261-5
- 20-Baird JK, Jones TR, Danudirgo EW, Aninis BA, Bangs MJ, Basri H, et al.** Age-dependent acquired protection against *Plasmodium falciparum* in people having two years exposure to hyperendemic malaria. *American journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1991; **45** : 65-76
- 21-Sabchareon A, Burnuf T, Ouattara D, Attanath P, Bouharoun-Tayoun H, Chantavanich P, et al.** Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *American journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1991; **45**: 65-76
- 22-TM Lopera, M Restepo, S Blair\*, HI Garcia\*\*.** Humoral Immune Response to the anti-malaria vaccine SPf66 in the Colombian Atroto River Region. *Memorias do Instituto Oswaldo Gruz*, .1998 Jul-Aug Vol. 93 (**4**)- 495-500
- 23-Filip Dubovsky, M.D., M.P.H., F.A.A.P.** Malaria vaccine initiative *at path* : Creating a Vaccine Against Malaria.
- 24-Hoffman SL, Isenbarger D, Long GW, Sedegah M, Szarfman A, Waters L, et al.** Sporozoite vaccine induces genetically restricted T-cell elimination of malaria from hepatocytes. *Science* 1989; **244**: 1078-81

- 25-Malik A, Egan JE, Houghten RA, Sadoff JC, Hoffman SL.** Human cytotoxic T lymphocytes against the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. Proceedings of the National Academy of science of the United states of America 1991 ; **88** : 3300-4
- 26-Ballou WR, Hoffman SL, Sherwood JA, Hollingdale MR, Nova FA, Hockmeyer WT, et al.** Safety and efficacy of a recombinant DNA *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine. Lancet 1987 ; **1** : 1277-81
- 27-Herrington DA, Clyde DF, Losonsky G, Cortesia M, Murphy JR, Davis J, et al.** Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* sporozoites. Nature 1998; **328**: 257-9
- 28-Stoute JA, Slaoui M, Heppner DG, Momin P, Kester KE, Desmons P, et al.** A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against Plasmodium malaria. RTS,S Malaria Vaccine Evaluation Group. New England Journal of Medicine . 1997 ; **336** :86-91
- 29-Lalvani A, Moris P, Voss G, Pathan AA, Kester KE, Brookes R, et al.** Potent induction of focused Th1-type cellular and humoral immune responses by RTS,S/SBAS2, a recombinant *Plasmodium falciparum* malaria vaccine. Journal of infectious diseases 1999; **180**:1656-64
- 30-Bojang KA, Milligan PJ, Pinder M, Vigneron L, Allouche A, Kester KE, et al.** Efficacy of RTS,S/AS02 malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* infection in semi-immune adults men in Gambie: a randomized trial. Lancet 2001; **358**:1927-34
- 31-Kurtis JD, Hollingdale MR, Luty AJ, Lanar DE, Krzych U, Duffy PE.** Pre-erythrocytic immunity to *Plasmodium falciparum*: the case for an LSA-1 vaccine. Trends parasitol 2001; **17**: 219-23
- 32-Daubersies P, Thomas AW, Millet P, et al.** Protection against *Plasmodium falciparum* malaria in chimpanzees by immunization with the conserve pre-erythrocytic liver-stage antigen 3. Nat. Med 2000; **6**: 1258-63
- 33-Barnes DA, Wollish W, Nelson RG, Leech GH, Petersen.** *Plasmodium falciparum*: D260, an intraerythrocytic parasite protein, is a member of the glutamic acid dipeptide-repeat family of proteins. Exp Parasitol 1995; **81**: 79-89
- 34-Egan AF, Morris J, Barnish G.** Clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria is associated with serum antibodies to the 19-Kda C-terminal fragment of the merozoite surface antigen, PfMSP-1. Infect Dis. 1996; **173**: 765-9

- 35-O'donnell RA, de Koning-Ward TF, Burt RA et al.** Antibodies against merozoite surface protein (msp)-1(19) are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria. *J Exp Med* 2001; **193**:1403-12
- 36-Holder AA, Guevara Patino JA, Uthaipibull C et al.** Merozoite surface protein1, immune evasion and vaccines against asexual blood stage malaria. *Parasitologia*; 1999; **41** (1-3): 409-14
- 37-Kumar S, Collins W, Egan A, Yadava A, Garraud O, Blackman MJ, et al.** Immunogenicity and efficacy aotus monkeys of for recombinant *Plasmodium falciparum* vaccines in multiple adjuvant formulations base on the 19KDa C terminus of merozoite surface protein. *Infection and Immunity* 2000; **68**: 2215-23
- 38-Keitel WA, Kester KE, Atmar RL, et al.** Phase 1 trial of two recombinant vaccines containing the 19KDa carboxy terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite protein-1 (msp1(19)) and T helper epitopes of tetanus toxoid. *Vaccine* 1999; **18**: 531-9
- 39-Escalante AA, Grebert HM, Chaiyaroj SC, Biswas S, Nahlen BL,Lal AA.** polymorphism in the gene encoding the apical membrane antigen (AMA-1) of *Plasmodium falciparum*. X. Asembo Bay Cohort project. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2001; **113**: 279-287
- 40-Hodder AN, Crewther PE, Anders RF.** Specificity of the protective antibody response to apical membrane protein 1. *Infection and Immunity* 2001; **69**: 3286-94
- 41-Duffy PE, Kaslow DC.** A novel malaria protein, Pfs28, and Pfs25 are genetically linked and synergistic as falciparum malaria transmission-bloking vaccines. *Infection and immunity* 1997; Mar **65**(3): 1109-13
- 42-Hoffman SL, Sedegah M, Hedstrom RC.** Protection against malaria by immunization with a *Plasmodium yoelii* circumsporozoit protein nucleic acid vaccine. *Vaccine* 1994 ; **12** : 1529-33
- 43-Wang R, Doolan DL, Le TP et al.** Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine. *Science* 1998 ; **282** : 476-80
- 44-Time JA, Lanar DE, Smith DM, et al.** NYVAC-Pf7, a poxvirus-vectored, multiantigen, multistage vaccine candidate for Plasmodium falciparum malaria. *Infect Immun* 1996 ; **64** : 3833- 44
- 45-Kumar S, Epstein JE, Richie TL, et al.** A multilateral effort to develop DNA vaccines against falciparum malaria. *Trends Parasitol* 2002 ; **18** : 129-35

**46-Doolan DL, Hoffman SL.** DNA-base vaccines against malaria :status and promise of the multi-stage malaria DNA vaccine operation. *Int J Parasitol* 2001 ; 31 : 753-62

**47-Frederick R. Vogel, Michael F. Powell, and Carl R. Alving.** A Compendium of Vaccines Adjuvants and Excipients 2<sup>nd</sup> Edition.

**48-Bernard J, Levy JP, Varet B, Clauvel JP, Rain JD, Sultan Y.** Hématologie, 8èd. Paris: Masson, 1996

**49-Potron G, Culioli-Pickel B, Bechar C, Droule C, Nguven P, Adzizian JC.** Automatisation en hématologie. *Encycl Med chir* (Paris-France). Sang, 13000 B 10,7-1990, 19p.

**50-Weil JH.** Biochimie générale. Paris : Masson, 1970, 7994.

**51-Vincent-Viry M.** Alanine aminotransferase. In : Siest J ; Shiele S. Références en biologie clinique. Paris, *Elsevier Eds*, 1990 ; 77-92

**52-Note d'information n° 666 DGS/DH/DRT** du 28 octobre 1996, abrogée par la circulaire **DGS/DH/DRT n° 98-228** du avril 1998.

**53-Robinson D, Whitehead TP.** Effect of body mass and others factors on serum liver enzyme levels in men attending for well polulation screening. *Ann Clin Biochem* 1989 ; **26** : 393-400

**54-Remy AJ. et Larrey D.** Exploration biologique hépatique.

Ency. Med. Chir. (Elsevier, Paris), Hépatologie, 7007.B.10, 1997, 4p

**55-Pierre Valdiguie.** **Biochimie clinique**, *Collection Biologie Médicale*.

*Bulletin of the World Health Organazition* 2003, 81 (12)

**56-Cox,J.H. & Schneider,L.G.** Prophylactic immunization of humans against rabies by intradermal inoculation of human diploid cell culture vaccine. *J. Clin. Microbiol.* **3** , 96-101 (1976).

**57-Recommendations of the Immunizations Practices Advisory Committee (ACIP).** Rabies Prevention United States. 393-408. 1984. Atlalnta, Centers for Disease Control. Morbidity and Mortality Weekly Report.

**58-Boe, E. & Nyland,H.** Guillain-Barre syndrome after vaccination with human diploid cell rabies vaccine. *Scand. J. Infect. Dis.* 1980, **12**, 231-232

**59-Bernard, K.W., Smith,P.W., Kader,F.J. & Moran,M.J.** Neuroparalytic illness and human diploid cell rabies vaccine. *JAMA*, 1982, **248**, 3136-3138.

**60-** Systemic allergic reactions following immunization with human diploid cell rabies vaccine. Atlanta, Centers for Disease Control. Morbidity and Mortality Weekly Report, 1984, **33**, 185-187.

**61-Traore K.** Impact d'une cure de sulfadoxine-pyriméthamine sur l'incidence du paludisme et chimiosensibilité de *P.falciparum* à la sulfadoxine-pyriméthamine à Bandiagara, Mali. Thèse de Médecine, Bamako, 2002, 56p ; 86

**62-Tarrallo P.** Leucocytes totaux et formule leucocytaire. In: *Siest G, Henny J, Schiele F, éditeur. Références en biologie clinique. Paris: Elsevier; 1990.p.369-83.*

**63-Keita Mamadou Niafou.** Etude de la distribution des paramètres hématologiques et biochimiques à Donéguébougou : une expérience d'introduction des bonnes pratiques de laboratoire au MRTC/DEAP/FMPOS. Thèse de Pharmacie, Bamako, 2003.

**64-W. Rioley Ballou, D. Gray Happner, et al.** Update on the clinical development of candidates malaria vaccines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2004, **71**, 239-247.

**65- Pedro L Alonso, et al.** Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children : randomised controlled trial. *Lancet* 2004 ; **364** : 1411 – 20.

**66- Pedro L Alonso, et al.** Duration with RTS,S/AS02A malaria vaccine in prevention of *Plasmodium falciparum* disease in Mozambican children: single-blind extended follow of a randomized controlled trial. [www.thelancet.com](http://www.thelancet.com), November 15, 2005.

**67- Pierre Druilhe, et al.** A Malaria vaccine that elicits in humans antibodies able to kill *Plasmodium falciparum*. [www.plosmedicine.org](http://www.plosmedicine.org), November 2005/ Volume 2/ Issue11/ e344.

**68- Dapa A Diallo, et al.** Community Permission for Medical Research in Developing Counties. HIV/AIDS. CID 2005 : 41 (15 July)

**69- José A. Stoute, et al.** Phase1 randomized double-blind safety and immunogenicity trial of *Plasmodium falciparum* malaria merozoite surface protein FMP1 vaccine, adjuvanted with AS02A, in adults in western Kenya. *Elsevier Ltd*, 2005.

**Fiche signalétique**

*Nom:* NIANGALY

*Prénom:* Amadou B.

*Nationalité:* Malienne

*Date de soutenance:* Février 2006

*Ville de soutenance:* Bamako

**Titre: Evaluation de la tolérance et de l'immunogénicité d'un candidat vaccin antipaludique dérivé de la MSP1 (FMP1) associé à l'adjuvant AS02A dans une population adulte semi-immune à Bandiagara, Mali.**

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

**Secteur d'intérêt:** Essai clinique, Vaccin, Paludisme, Santé publique.

**Résumé**

Ce travail avait pour but d'évaluer la tolérance et l'immunogénicité du candidat vaccin antipaludique FMP1 associé à l'adjuvant AS02A en essai clinique de phase I. Notre étude s'est déroulée dans la période allant du 01 juillet 2003 au 03 juillet 2004.

Pour atteindre ce but nous avons effectué un essai clinique randomisé avec groupe témoin et un suivi longitudinal de 12 mois chez 40 volontaires âgés de 18 à 55 ans tous sexes confondus.

Comme vaccin comparateur nous avons utilisé le vaccin antirabique IMOVAX®.

Le schéma de vaccination a été de trois doses administrées dans le muscle deltoïde avec un intervalle de 30 jours entre deux doses.

Les symptômes cliniques sollicités qui ont servi de critère de jugement de la tolérance ont été recherchés durant 8 jours qui ont suivi l'administration des doses. Les prélèvements de sang veineux ont été effectués tous les 14 jours

jusqu'à J90 et tous les 3 mois par la suite pour les tests hématologiques, biochimiques et le dosage des anticorps anti-FMP1.

Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les deux groupes pour l'incidence des symptômes cliniques sollicités, sauf pour les douleurs et les gonflements au site d'injection qui étaient plus fréquents dans le groupe FMP1 après la première dose.

L'étude des paramètres de l'hémogramme a montré que les valeurs étaient situées dans les limites établies par l'étude des normes à Bandiagara dans les deux groupes.

Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les deux groupes pour les valeurs moyennes des paramètres hématologiques et biochimiques. Nous n'avons pas rencontré de variations cliniquement significatives pour les valeurs de ces paramètres durant toute l'étude.

Le dosage des anticorps anti-FMP1 a montré qu'après chaque immunisation le titre sérique de ces anticorps augmentaient en moyenne plus de deux fois dans le groupe qui a reçu le candidat vaccin FMP1/AS02A.

A J90 c'est à dire 30 jours après la dernière dose, la moyenne géométrique des anticorps anti-FMP1 dans le groupe était 5,5 fois supérieure que celle du groupe témoin et 6,4 fois plus que celle à J0 dans le groupe FMP1/AS02A. Après J90 la courbe a régulièrement régressé dans le groupe FMP1 jusqu'au jour 364, mais toujours au-dessus du groupe témoin.

Il ressort dans cette étude que le candidat vaccin antipaludique FMP1/AS02A a été bien toléré et possède une excellente immunogénicité.

La poursuite du développement clinique de ce candidat vaccin réserve un grand espoir dans la recherche de vaccin antipaludique.

**Mots clés :** Bandiagara, tolérance, Immunogénicité.

Last Name: **NIANGALY**

First Name: **Amadou B**

Nationality: **Malian**

Locale of Defense: Bamako  
2006

Date of Defense: February

***Titre:* Evaluation of the safety and immunogenicity of a candidate malaria vaccine derived from MSP1 (FMP1) adjuvanted with AS02A in an adult semi-immune population in Bandiagara, Mali.**

Stored in the library of the Faculty of medicine, Pharmacy and Dentistry  
Relevant Areas of Interest: Clinical Trial, Vaccine, Malaria, Public Health

### **Summary**

The goal of this work was to evaluate the safety and immunogenicity of the candidate anti-malarial vaccine FMP1 adjuvanted with AS02A in a Phase I clinical trial. Our study took place in the period between 1 July 2003 and 3 July 2004.

In order to achieve this goal, we undertook a randomized controlled clinical trial with 12 months of longitudinal surveillance in 40 mixed-sex volunteers aged 18 to 55.

As a control, we chose the rabies vaccine IMOVAX®.

The design of the trial included three intramuscular vaccine doses in the deltoid administered every thirty days.

Solicited clinical symptoms serving as the basis for judgement of vaccine safety were sought during the 8 days following administration. Venous blood samples were drawn every 14 days through D90, and every three months following, for complete blood count, blood chemistries and anti FMP-1 antibody titers.

There was no statistically significant difference between the two groups in the incidence of solicited clinical symptoms except for pain and swelling at injection site was more frequent in FMP1 group (respectively  $p = 0.01$  et  $0.003$ ).

Analysis of hematological parameters demonstrated that the values in both groups fell within the limits established by the study as local norms in Bandiagara.

There was no statistically significant difference between the two groups in terms of mean hematological and biochemical parameter values. We encountered no clinical significant deviations in these values during the study.

Analysis of anti-FMP1 antibody levels demonstrated a significant elevation in serum antibody titers following each vaccine dose in the group that received the candidate vaccine until day 90.

At Day 90, thirty days following the final vaccine dose, the geometric mean of anti-FMP1 antibodies in the experimental group was 5.5 times greater than that of the control group, and 6.4 times greater than that of the experimental group from Day 0. The antibody titer was higher in FMP1 group at the end of the study.

It appears from this trial that the candidate malaria vaccine FMP1/AS02A was well tolerated and possessed excellent immunogenicity. The pursuit of the clinical development of this candidate vaccine holds out great hope in the search for a viable malaria vaccine.

**Keywords:** Bandiagara, Safety, Immunogenicity.

# ANNEXES

## Intervalles de Référence Hématologique chez l'adulte à Bandiagara

| <b>Parameter</b>                         | <b>Units</b>        | <b>Reference Interval</b> | <b>90%<br/>Confidence<br/>Interval of<br/>Lower Limit</b> | <b>90%<br/>Confidence<br/>Interval of<br/>Upper Limit</b> |
|--|---------------------|---------------------------|---|---|
| <b>WBC</b>                               | 10 <sup>3</sup> /μL | 4.2 – 12.2                | 4.0 – 4.2   | 9.9 – 12.9  |
| <b>RBC</b>                               |                     |                           |   |   |
| Males                                    | 10 <sup>6</sup> /μL | 4.13 – 6.2                | 4.09 – 4.28   | 5.85 – 6.51   |
| Females                                  | 10 <sup>6</sup> /μL | 3.60 – 5.57               | 3.37 – 3.79   | 5.21 – 5.63   |
| <b>Hemoglobin</b>                        |                     |                           |   |   |
| Males                                    | g/dL                | 11.7 – 17.3               | 10.7 – 12.2   | 16.6 – 17.8   |
| Females                                  | g/dL                | 10.0 – 14.4               | 8.3 – 10.9  | 14.2 – 14.5   |
| <b>Hematocrit</b>                        |                     |                           |   |   |
| Males                                    | %                   | 36.4 – 52.3               | 34.1 – 38.5   | 50.3 – 54.3   |
| Females                                  | %                   | 31.3 – 44.0               | 26.7 – 33.6   | 43.2 – 44.5   |
| <b>MCV</b>                               | fL                  | 71.5 – 99.2               | 67.4 – 76.1   | 96.8 – 101.5  |
| <b>MCH</b>                               | pg                  | 22.2 – 32.9               | 21.3 – 24.0   | 32.1 – 33.4   |
| <b>MHCH</b>                              | g/dL                | 31.1 – 33.9               | 30.9 – 31.6   | 33.8 – 34.1   |
| <b>Platelet Count</b>                    | 10 <sup>3</sup> /μL | 126 – 387                 | 108 – 142   | 361 – 409   |
| <b>Percent<br/>Lymphocyte<br/>Count</b>  | %                   | 27.0 – 58.1               | 25.0 – 28.0   | 56.4 – 60.4   |
| <b>Absolute<br/>Lymphocyte<br/>Count</b> | 10 <sup>3</sup> /μL | 1.5 – 5.3                 | 1.4 – 1.7   | 4.6 – 6.6   |

\* Based on adults ranging in age from 18 to 55 years old.

## **Intervalles de Référence Biochimique chez l'adulte à Bandiagara**

| <b><u>Parameter</u></b> | <b><u>Units</u></b> | <b><u>Reference Interval</u></b> | <b><u>90%<br/>Confidence<br/>Interval of<br/>Lower Limit</u></b> | <b><u>90%<br/>Confidence<br/>Interval of<br/>Upper Limit</u></b> |
|-------------------------|---------------------|----------------------------------|--|--|
| <b>ALT</b>              | U/L                 | 8.03 – 43.3                      | 6.67 – 9.07  | 37.8 – 84.7  |
| <b>Creatinine</b>       |                     |                                  |  |  |
| Males                   | mM/L                | ≤ 101                            | N/A  | 90.7 - 113   |
| Females                 | mM/L                | ≤ 65.3                           | N/A  | 62.8 – 65.6  |

\* Based on adults ranging in age from 18 to 55 years old.

MAL-032  
MMVDU-001**FICHE DES EVÈNEMENTS INDÉSIRABLES DES PARAMETRES BIOLOGIQUES**

| Date de l'analyse    | Paramètres Biologiques | Valeur | Grades <sup>1,2</sup> |   |   |   | Date de notification |
|----------------------|------------------------|--------|-----------------------|---|---|---|----------------------|
|                      |                        |        | 1                     | 2 | 3 | 4 |                      |
| __/__/__<br>jj mm aa |                        |        |                       |   |   |   | __/__/__<br>jj mm aa |
| __/__/__<br>jj mm aa |                        |        |                       |   |   |   | __/__/__<br>jj mm aa |
| __/__/__<br>jj mm aa |                        |        |                       |   |   |   | __/__/__<br>jj mm aa |
| __/__/__<br>jj mm aa |                        |        |                       |   |   |   | __/__/__<br>jj mm aa |
| __/__/__<br>jj mm aa |                        |        |                       |   |   |   | __/__/__<br>jj mm aa |

1

| Grade                     | 1                           | 2                       | 3                           | 4                                    |
|---------------------------|-----------------------------|-------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| Hemoglobin (Male)         | 9.5 - 10.5 gm/dL            | 8.0 - 9.4 gm/dL         | 6.5 - 7.9 gm/dL             | < 6.5 gm/dL                          |
| Hemoglobin (Female)       | 8.5 - 9.5 gm/dL             | 7.5 - 8.4 gm/dL         | 6.5 - 7.4 gm/dL             | < 6.5 gm/dL                          |
| Absolute Neutrophil Count | 1000-1500/mm <sup>3</sup>   | 750-999/mm <sup>3</sup> | 500-749/mm <sup>3</sup>     | <500/mm <sup>3</sup>                 |
| Platelets                 | 75000-99000/mm <sup>3</sup> | 50000-74999/m           | 20000-49000/mm <sup>3</sup> | <20000/mm <sup>3</sup>               |
| WBCs                      | > 13,000                    | >15,000                 | >20,000                     | >30,000 or <1,000                    |
| Creatinine (Male)         | 111-152 µmol/l              | 153-303 µmol/l          | 304- 606 µmol/l             | > 606 µmol/l or dialysis<br>required |
| Creatinine (Female)       | 71.8-100 µmol/l             | 101-200 µmol/l          | 201-392 µmol/l              | >392 µmol/l                          |
| ALT (SGPT)                | 54.1 - 108 UI/l             | 109-216 UI/l            | 217-433 UI/l                | > 433 UI/l                           |

<sup>2</sup> Cocher dans une des 4 cellules de l'item « Grades » le grade de toxicité observé

## SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence des maîtres de la faculté, des conseils 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 en leur enseignement ;

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

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

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

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

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