

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

FACULTE DE MEDECINE DE PHARMACIE ET D'ODONTOLOGIE

ECOLE DOCTORALE ED-SEV



ANNEE : 2013

N° 78

THESE DE DOCTORAT
SPECIALITE: PARASITOLOGIE
AIDA SADIKH BADIANE

**ETUDE DU POLYMORPHISME GENETIQUE ET DE
L'IMMUNITE HUMORALE INDUITE PAR LE CANDIDAT
VACCIN
ERYTHROCYTE BINDING ANTIGEN-175 (EBA-175)**

SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 30 DECEMBRE 2013

Devant la commission d'examen

MEMBRES DU JURY

Président :	Pr.	Souleymane		MBOUP	: FMPO, UCAD
Rapporteurs :	Pr.	Tandakha	Ndiaye	DIEYE	: FMPO, UCAD
	Pr.	Daouda		NDIAYE	: FMPO, UCAD
	Pr	Manoj	T.	DURASINGH	: HSPH, HARVARD
Examineur :	Pr.	Alioune		DIEYE	: FMPO, UCAD
Directeur de Thèse:	Pr.	Omar		NDIR	: FMPO, UCAD
Co-directeur :	Pr	Manoj	T.	DURASINGH	: HSPH, HARVARD

Dédicaces

JE

DEDIE

CE

TRAVAIL

A mes grands parents in memorium.

A ma mère et mon père qui nous ont inculqué une bonne éducation.

A mes frères et sœurs qui sont des compagnons de toujours dans le bonheur et dans les moments difficiles.

A mes cousines et cousins.

A toute ma famille au sens large.

Aux participants qui ont bien voulu faire parti de cette étude.

A Amy Kristine Bei qui a été mon mentor et « twin » durant cette thèse et qui n'a ménagé aucun effort pour mener à bien ce travail aussi bien à Dakar qu'à Boston. Depuis les expériences au laboratoire jusqu'à l'analyse des données.

A Ambroise Ahouidi pour les longues soirées passées au laboratoire.

A tout le personnel de la Biologie moléculaire : Awa Dème, Dior Diop Mare.

A tout le personnel du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie.

A l'équipe de terrain sans qui ce travail ne serait pas possible.

A mes collègues et amis sans qui les journées de travail seraient insupportables.

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration entre le département de Santé publique et le Laboratoire des maladies immunologiques et infectieuses de l'Université de Harvard, l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar et les Laboratoires de Bactériologie-Virologie et Parasitologie-Mycologie de l'hôpital Aristide LeDantec. Le financement a été fait par le Fogarty program.

Je remercie les personnes qui ont rendu ce travail possible:

Pr Souleymane Mboup, Chef de service du Laboratoire de Bactériologie-Virologie pour m'avoir accueilli dans son service depuis ma thèse d'exercice de Pharmacie, et qui m'a donné l'opportunité de continuer jusqu'à la thèse de troisième cycle.

Pr Manoj Duraisingh qui a initié ce travail de recherche et avec qui j'ai appris les nouvelles techniques en Biologie moléculaire et immunologie.

Pr Omar Ndir, Chef de service du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie et Directeur de thèse de ce travail, qui nous a donné la possibilité de mener ce travail.

Pr Daouda Ndiaye, qui a rendu ce travail possible grâce à la bonne organisation qui a permis de réaliser des tests *ex vivo*.

Pr Tandakha Ndiaye Dièye qui a spontanément accepté de faire parti du jury et de rédiger un rapport.

Pr Alioune Dièye qui a spontanément accepté de faire parti de ce jury de thèse en tant qu'examineur.

Dr Ousmane Sarr qui a initié mes premiers pas dans la recherche et qui a su me transmettre le virus.

Liste des abréviations

ABRA: Acidic Basic Repeat Antigen

ADN: Acide DéoxyriboNucléique

AMA1: Apical Membran Antigen 1

ARN: Acide RiboNucléique

BSA: Bovine Serum Albumin

CD: Classe de Différenciation

Cl⁻: Anion chlore

CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité

C-seg: Segment C

CSP: CircumSporozoïte Protein

CTA: Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine

DO: Densité optique

EBA-175: Erythrocyte Binding Antigen 175

EBL: Erythrocyte Binding-Like

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

EGF: Epidermal Growth Factor-like domains

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

FITC: Isothiocyanate de fluorescéine

FPLC: Fast protein liquid chromatography

F-seg : Segment F

GE: Goutte Epaisse

GLURP: Glutamate-Rich Protein

Gly A: Glycophorine A

Gly: Glycophorine

GPI : Glycosyl Phosphatidyl Inositol

GR : Globules rouges

GST: glutathione S-transferase

HC03: Anion bicarbonate

HCl: Chlorure d'hydrogène

HEPES: acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HRP: Histidin Rich Protein

IFN: Interféron

IgE: Immunoglobuline E

IgG: Immunoglobuline G

IgM: Immunoglobuline M

IL: Interleukine

KO: Knock Out

LSA1: Liver Stage Antigen 1

MSP: Merozoite Surface Protein

NO: Nitric Oxide (Oxyde Nitrique)

NTC: Neuraminidase-Trypsine-Chymotrypsine

OMS: Organisation Mondiale pour la Santé

P22: Proteine 22

Pb : Paires de base

PBS: Phosphate Buffered Saline

PBST: Phosphate Buffered Saline Tween

PcMSP4/5: *Plasmodium chaubadi* merozoite surface protein 4/5

PCR: Polymerase Chain Reaction

Pf41: Protein 41

PfEMP-1: *P. falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1

PfMSP-4: *Plasmodium falciparum* merozoite

PfRh: *Plasmodium falciparum* Reticulocyte binding protein Homolog

Pfs25: *Plasmodium falciparum* surface protein 25

PfSUB2: *Plasmodium falciparum* subtilisin-like protein 2

pGEX 6: plasmid expression systems

PS: Phosphatidyl Sérine

PIB: Produit Intérieur Brut

PMR: Parasite Multiplication Rate

PNLP: Programme National de Lutte contre le Paludisme

Pvs25: *Plasmodium vivax* surface protein 25

RBM: Roll Back Malaria

RII: Région II

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SA: Sialic Acid (Acide sialique)

SERA: Serine repeat antigen

SERP: Serine-stretch protein

SI: Selectivity Index (Index de sélectivité)

SLAP: Section de Lutte antiparasitaire

SP: Sulfadoxine-Pyriméthamine

SSP2: Sporozoite Surface Protein 2

STARP: Sporozoite-Threonin-Asparagine-Rich-Protein

TDR: Test de diagnostic rapide

Th: T helper

TMB: Tetramethylbenzidine

TNF: Tumor N factor

TPI: Traitement Préventif Intermittent

TRAP: Thrombospondin Related Anonymous Protein

Tris: Trishydroxyméthylaminométhane

UNICEF: United Nations Children's Fund

USAID: U.S. Agency for International Development

UV: Ultra violet

TIE: Taux d'inoculation entomologique

Figures

Figure 1 : Cycle évolutif de Plasmodium	13
Figure 2 : Répartition géographique du paludisme	21
Figure 3: Représentation schématique d'un mérozoïte	22
Figure 4 : Représentation schématique de la jonction entre mérozoïte et érythrocyte	29
Figure 5: Interactions moléculaires entre le mérozoïte et l'érythrocyte	33
Figure 6: Réactions immunitaires au cours du paludisme	39
Figure 7: Sites de collecte et de traitement des échantillons	55
Figure 8: Domaines d'Erythrocyte Binding Antigen 175 (EBA-175).....	59
Figure 9: Migration sur gel des fragments F et C.....	61
Figure 10: Distribution des allèles d'EBA-175	70
Figure 11: Distribution des groupes sanguins	71
Figure 12: Distribution des allèles d'EBA-175 selon les groupes sanguins.....	72
Figure 12A: Précision de la cytométrie de flux pour la détermination de la parasitémie.....	75
Figure 12B : Comptage des érythrocytes mono et polyinfectés par cytométrie de flux.....	77
Figure 12C: Comparaison cytométrie de flux et microscopie, expérience 1	78
Figure 12D: Comparaison cytométrie de flux et microscopie, expérience 2	79
Figure 12E: Comparaison cytométrie de flux et microscopie expérience 3	80
Figure 13A: Comparaison entre cytométrie et microscopie	84
Figure 13B: Parasitémie lue par cytométrie de flux (Th114).....	85
Figure 13C: Comparaison des parasitémies lues par microscopie et cytométrie (Th 114)	85
Figure 13D: Parasitémie lue par cytométrie de flux (Th133).....	86
Figure 13E: Comparaison des parasitémies lues par microscopie et cytométrie (Th 133).....	86
Figure 13F: Parasitémie lue par cytométrie de flux (Th133)	87
Figure 13G: Comparaison des parasitémies lues par microscopie et cytométrie (Th 148).....	87
Figure 14 A: Différents domaines d'EBA-175.....	88

Figure 14B : Positivité des anticorps en fonction de l'âge à Thiès.....	89
Figure 14C : Positivité des anticorps en fonction de l'âge à Vélingara.....	89
Figure 14D: Densité optique des échantillons par ELISA (Thiès).....	90
Figure 14E: Densité optique des échantillons par ELISA (Vélingara).....	90
Figure 15A: Réactivité des anticorps anti-RII purifiés par ELISA	92
Figure 15B: Inhibition de l'invasion des érythrocytes normaux à une concentration de 10 µg/ml.....	93
Figure 15C: Inhibition de l'invasion des érythrocytes traités par chymotrypsine à une concentration de 10 µg/ml	93
Figure 15D: Inhibition de l'invasion des souches de laboratoire avec des érythrocytes traités par la chymotrypsine (10µg/ml)	94
Figure 15E: Inhibition de l'invasion des souches de laboratoire avec des érythrocytes traités par la chymotrypsine (50µg/ml)	94
Figure 16A: Inhibition de l'invasion avec des IgG provenant de Vélingara.....	96
Figure 16B: Inhibition de l'invasion avec des IgG anti-RII.....	96
Figure 17A: Pourcentage de l'invasion avec des GR traités par des enzymes.....	98
Figure 17B: Pourcentage de l'invasion avec des GR traités par des enzymes au cours des années.....	99
Figure 17C: Inhibition de l'invasion par les anti-RII par les GR traités par neuraminidase.....	99
Figure 17D: Inhibition de l'invasion par les anti-RII par les GR traités par chymotrypsine	100

Tableaux

Tableau I: Définition des régions d'endémicité palustre.....	18
Tableau II: Quelques protéines parasitaires impliquées dans l'invasion	34
Tableau III: Programme d'amplification d'EBA 175	60
Tableau IV: Distribution de la population d'étude selon l'âge	69
Tableau V: Distribution du fragment F dans les classes d'âge.....	73
Tableau VI: Relation entre les allèles F et C et le sexe, la DP et la température	74
Tableau VII: Souche de laboratoire HB3 parasitémie par microscopie.....	76
Tableau VIII: Souche de laboratoire HB3 parasitémie par cytométrie de flux	76
Tableau IX: Comparaison entre microscopie et cytométrie de flux (HB3).....	77
Tableau X: Parasitémie déterminée par microscopie optique	81
Tableau XI: Parasitémie déterminée par cytométrie de flux	82

TABLE DES MATIERES

<u>Introduction</u>	1
<u>Première partie : Généralités sur le paludisme</u>	
1. <u>Epidémiologie du paludisme</u>	5
1.1. <u>Agents pathogènes</u>	5
1.2. <u>Vecteurs</u>	8
1.3. <u>Cycle évolutif</u>	10
1.4. <u>Mode de contamination</u>	14
1.5. <u>Facteurs favorisants</u>	14
1.6. <u>Répartition géographique</u>	15
1.7. <u>Indices épidémiologiques</u>	16
1.8. <u>Faciès épidémiologique</u>	19
2. <u>Invasion érythrocytaire</u>	22
2.1. <u>Ultrastructure du mérozoïte</u>	22
2.2. <u>Interaction mérozoïte-érythrocyte</u>	26
2.3. <u>Ligands parasitaires et récepteurs érythrocytaires</u>	29
3. <u>Rôle des groupes sanguins dans la pathogénie du paludisme</u>	35
4. <u>Immunité anti palustre et mécanismes d'échappement</u>	36
4.1. <u>Acquisition de l'immunité</u>	36
4.2. <u>Mécanismes immunitaires</u>	37
4.3. <u>Immunité dépendant des anticorps</u>	38
4.4. <u>Immunité cellulaire</u>	38
4.5. <u>Immunité contre les stades pré-érythrocytaires</u>	40
4.6. <u>Immunité contre les stades érythrocytaires</u>	42

4.7.	<u>Evasion de l'immunité</u>	46
	4.7.1. <u>Variation antigénique</u>	46
	4.7.2. <u>Polymorphisme génétique</u>	47
5.	<u>Candidats vaccins en cours d'étude</u>	48
	5.1. <u>Stade pré-érythrocytaire : RTS,S</u>	49
	5.2. <u>Stade érythrocytaire</u>	49
	5.3. <u>Stade sexué</u>	50
6.	<u>Problèmes posés par la détermination de la parasitémie</u>	51
Deuxième partie: Travail expérimental		
1.	<u>Sites d'étude</u>	53
2.	<u>Patients et recrutement</u>	56
3.	<u>Méthodes</u>	57
	3.1. <u>Etude génétique</u>	57
	3.1.1. <u>Extraction de l'ADN</u>	57
	3.1.2. <u>Amplification du gène EBA-175</u>	59
	3.1.3. <u>Détermination des groupes sanguins</u>	62
	3.2. <u>Etude parasitologique</u>	62
	3.2.1. <u>Culture des parasites</u>	62
	3.2.2. <u>Mesure de la parasitémie par cytométrie de flux</u>	63
	3.2.3. <u>Mesure de la parasitémie par microscopie optique</u>	63
	3.3. <u>Méthodes immunologiques</u>	64
	3.3.1. <u>Expression des protéines recombinantes</u>	64
	3.3.2. <u>Tests immunologiques ELISA</u>	64
	3.3.3. <u>Purification des anticorps de patients</u>	66
	3.3.4. <u>Tests d'invasion</u>	66

3.3.5. <u>Tests d'inhibition de l'invasion</u>	67
3.4. <u>Analyse statistique</u>	68
4. <u>Résultats</u>	68
4.1. <u>Caractéristique de la population d'étude</u>	68
4.2. <u>Etude génétique</u>	69
4.2.1. <u>Parasitémie et âge</u>	69
4.2.2. <u>Prévalence des allèles et des groupes sanguins</u>	70
4.2.3. <u>Distribution des fragments F/C selon le groupe sanguin</u>	71
4.2.4. <u>Relation entre les allèles F/C et l'âge</u>	73
4.2.5. <u>Relation entre les allèles F/C et température, parasitémie et sexe</u> ..	74
4.3. <u>Etude parasitologique</u>	74
4.3.1. <u>Concordance entre microscopie et cytométrie de flux</u>	74
4.3.2. <u>Résolution des érythrocytes multi-infectés par cytométrie de flux</u> .	80
4.3.3. <u>Validation du protocole</u>	82
4.4. <u>Etude immunologique</u>	88
4.4.1. <u>Reconnaissance immune de la région II d'EBA 175</u>	88
4.4.2. <u>Inhibition de l'invasion des souches de terrain et de laboratoire par les anticorps anti-RII</u>	91
4.4.3. <u>Association entre les voies d'invasion et l'inhibition des anticorps anti-RII</u>	95
4.4.4. <u>Association entre la réactivité des anticorps et l'inhibition des anticorps anti-RII</u>	100
5. <u>Discussion</u>	101
<u>Conclusion et perspectives</u>	110
<u>Bibliographie</u>	114

INTRODUCTION

Le paludisme est une érythrocytopathie due à un hématozoaire du genre *Plasmodium*, transmis à l'homme par un moustique qui est l'anophèle femelle infecté. Il constitue un problème de santé publique dans le monde et particulièrement en Afrique au sud du Sahara. En effet il reste la parasitose la plus dévastatrice même après un siècle d'efforts internationaux pour la contrôler. Selon les estimations récentes de l'OMS, 219 millions de cas et 660.000 décès dus au paludisme ont été recensés dans le monde. L'Afrique reste la zone la plus touchée, 80 % des cas et 90 % de décès y sont retrouvés [113].

Cependant, grâce aux méthodes d'intervention on note un recul de la maladie en effet, l'incidence estimée du paludisme a diminué de 17 % et la mortalité de 26% à travers le monde entre 2000 et 2010 alors qu'en Afrique la diminution de la mortalité est de 33% durant cette période [112] [113].

Dans ce continent, la mortalité a augmenté entre 1980 (493 000 cas) et 2004 (1 613 000 cas), puis a diminué de 30 % en 2010 (1 133 000 cas) [112]. Le Sénégal n'est pas épargné par cette maladie. Le paludisme y est endémique avec une recrudescence saisonnière de Juillet à Décembre. Selon le dernier rapport du PNLP en 2010, 174.000 cas de paludisme y ont été recensés avec 574 cas de décès [122].

Pour éradiquer le paludisme, le développement d'un vaccin serait très utile, cependant la multitude de stades parasitaires et d'antigènes rend difficile cette tâche. Des antigènes provenant de différents stades (hépatique, érythrocytaire et gamétocytaire) sont en cours d'étude pour la mise au point de vaccin. Plusieurs antigènes du stade érythrocytaire qui est responsable des signes cliniques du paludisme entraînent une production d'anticorps chez les sujets vivant en zone

d'endémie. Parmi ces antigènes, certains interviennent dans l'invasion érythrocytaire, étape essentielle du cycle évolutif de *Plasmodium falciparum* impliquant de multiples interactions spécifiques entre les ligands parasites et les récepteurs érythrocytaires, appelées voies d'invasion. *P. falciparum* utilise différentes voies d'invasion pour pénétrer dans les érythrocytes humains, par l'intermédiaire de deux familles principales de ligands d'invasion: la famille des Erythrocyte Binding Antigen (EBA) et la famille des Reticulocyte Binding Protein Homolog (PfRh) [61-72]. Donc bloquer cette étape, bien qu'elle n'empêche pas l'infection de survenir constitue un moyen de lutte contre la morbidité et la mortalité dues au paludisme. Les deux familles (EBA et Pfrhs) font l'objet de plusieurs études depuis quelques années ceci grâce à leur implication dans l'immunité anti palustre [127]. Le gène Erythrocyte Binding Antigen 175 (EBA-175) produit plusieurs protéines dont celle de la région II qui constitue le site de fixation à l'érythrocyte, et des anticorps sont élaborés contre cette protéine chez les sujets vivant en zone d'endémie [111]. Cependant pour que ces antigènes puissent être utilisés comme vaccin leurs anticorps doivent être protecteurs, malheureusement la présence d'anticorps ne signifie pas qu'ils sont protecteurs.

D'un autre coté le gène EBA-175 présente un dimorphisme dans sa région III (RIII) qui détermine les allèles F et C, il a été montré que la prévalence de ces allèles varie selon les pays et dans un pays selon les régions. Ces différences observées sont des facteurs importants à prendre en compte lors de l'utilisation de ces antigènes comme vaccins. De plus, l'influence de ces allèles dans la survenue et la symptomatologie du paludisme a fait l'objet de quelques études mais les résultats sont contradictoires.

Peu de choses sont connus concernant le rôle de cette RIII, cependant des anticorps sont également produits contre ces protéines F et C et comme pour la région II

(RII) leur nature protectrice doit être déterminée, ainsi que leur relation avec le dimorphisme génétique.

La région II d' EBA-175 constitue le site de liaison du mérozoite à l'acide sialique de l'érythrocyte, et puisque des anticorps sont dirigés contre protéine, il est primordial de rechercher si ces anticorps sont capables d'empêcher l'invasion des érythrocytes par les mérozoites de *P. falciparum* qui représente l'espèce la plus répandue et la plus redoutable. Les études d'invasion et d'inhibition de l'invasion qui permettent de répondre à ces questions, nécessitent de déterminer la parasitémie pour un grand nombre d'échantillons, donc mettre au point une technique pouvant lire un grand nombre d'échantillons dans un délai relativement court et permettrait d'éliminer la subjectivité retrouvée avec la microscopie optique va rendre ces études moins fastidieuses et plus fiables.

Ainsi, nous nous sommes fixés comme objectif général d'étudier les antigènes d'Erythrocyte Binding Antigen 175 (EBA-175) de *P. falciparum* pour la mise au point d'un vaccin contre le paludisme.

Nos objectifs spécifiques sont de:

1. Déterminer la prévalence des allèles de la région III (RIII) d'EBA-175 de *P. falciparum* et des antigènes ABO du système sanguin humain en fonction de ces allèles
2. Faire une étude comparative de la détermination du taux d'érythrocytes infectés entre la cytométrie de flux et la microscopie optique
3. Rechercher l'inhibition de l'invasion érythrocytaire de *Plasmodium falciparum* par les anticorps dirigés contre la région II d'EBA-175 chez l'homme.

Cette étude a été approuvée par le Comité National d’Ethique pour la recherche en Santé (CNEERS) du Sénégal et l’Institut de Santé Publique de l’université de Harvard des Etats Unis (Harvard School of Public Health, HSPH). Elle a été financée par Harvard Malaria Initiative de l’institut de santé publique de l’université de Harvard à Boston, USA et le Fogarty program.

Première partie: Généralités sur le paludisme

1. Epidémiologie du paludisme

1.1. Agents pathogènes - Classification

Les parasites responsables de paludisme chez l'homme appartiennent :

Règne: Animal

Sous règne: Protozoaires

Phylum: *Apicomplexa*

Classe: *Sporozoea*

Sous classe: *Coccidia*

Ordre: *Eucoccidiida*

Sous ordre: *Haemosporina*.

Genre: *Plasmodium* qui renferme deux sous genres:

Sous genre *Plasmodium* est caractérisé par des gamétocytes arrondis et renferme quatre espèces responsables de paludisme chez l'homme; *P. (P) vivax*, *P. (P) ovale*, *P. (P) malariae* et *P. (P) knowlesi* qui est un parasite que l'on croyait jusqu'à une date récente spécifique aux espèces simiennes, et qui a été découvert chez l'homme pour la première fois en Malaisie.

Le sous genre *Laverania* est caractérisé par des gamétocytes falciformés. Il renferme une seule espèce *P. (L) falciparum* et qui est l'espèce la plus redoutable pour l'homme.

- Biologie

Les parasites du genre *Plasmodium* vivent chez les mammifères qui représentent l'hôte définitif et les insectes vecteurs du genre *Anopheles* qui correspondent à l'hôte intermédiaire. Pourtant, d'un point de vue strictement biologique, le véritable hôte définitif de cet hématozoaire est le moustique (la reproduction sexuée parasite l'anophèle). L'homme et les autres vertébrés ne sont que des hôtes intermédiaires dans son cycle répliatif. Néanmoins, pour des raisons anthropocentriques, on considère que le vecteur n'est pas l'homme mais le moustique.

Mince fuseau de $12\ \mu / 1\ \mu$, le sporozoïte infectieux est injecté à l'homme lors de la piqûre d'une femelle d'anophèle infectieuse. Il atteint le foie en $\frac{1}{2}$ heure et pénètre dans un hépatocyte : c'est le début d'une crise pré-érythrocytaire hépatique qui va durer 6 jours pour *P. falciparum*, 8 jours pour *P. vivax*, 9 jours pour *P. ovale* et probablement 12 jours pour *P. malariae*.

Le cryptozoïte va subir dans l'hépatocyte une intense multiplication asexuée aboutissant au corps bleu, énorme schizonte mûr de 40 à 80 μ . Ce corps bleu bourgeonne alors de manière à émettre des vésicules contenant les jeunes mérozoïtes. Ces vésicules de membrane morte ne sont pas phagocytées par les macrophages en raison d'une action biochimique des parasites sur la membrane, qui suppriment les signaux de destruction phagocytaire des cellules mortes. Ces vésicules sont libérées dans les sinusoides hépatiques pour rejoindre ensuite la circulation sanguine.

C'est une véritable technique de cheval de Troie qui est ici utilisée pour passer des cellules hépatiques au sang. Les vésicules y libèrent alors un flot de jeunes mérozoïtes pré-érythrocytaires qui vont s'y répandre. C'est le début de la longue phase sanguine: les mérozoïtes s'accolent aux érythrocytes (margination),

les envahissent, s'y développent (trophozoïtes) puis s'y divisent (schizontes). L'éclatement des schizontes mûrs ou « rosaces » termine le premier cycle schizogonique érythrocytaire en libérant dans le sang, avec les déchets du métabolisme plasmodial (pigments et débris cellulaires), une nouvelle génération de plasmodiums, les mérozoïtes érythrocytaires.

Une succession régulière de cycles semblables va suivre, qui sera progressivement remplacée, les défenses immunitaires s'organisant, par des cycles érythrocytaires gamogoniques préparant les formes sexuées: les trophozoïtes, au lieu de se diviser, modifient leur rapport nucléo-plasmique et donnent des formes à un noyau volumineux et un cytoplasme densifié, les gamétocytes, mâles et femelles, qui vont demeurer en attente dans le sang circulant. Déglutis par une femelle anophèle, ces gamétocytes terminent le cycle sexué: devenus gamètes mâles et femelles ils se conjuguent donnant l'ookinète, qui après avoir traversé la paroi, s'arrête sur la face externe du gastre, devient oocyste puis sporocyste; son éclatement libère les sporozoïtes infectieux qui s'accumulent, en attente, dans les glandes salivaires, rendant ainsi la femelle d'anophèles infectieuse. Lorsque cette femelle piquera un homme, elle injectera les sporozoïtes avec sa salive et le cycle évolutif sera bouclé.

Pour *P. falciparum* c'est là toute l'évolution biologique avec *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale* certains mérozoïtes pré-érythrocytaires, ne gagnent pas le sang, mais s'attaquent à de nouveaux hépatocytes: c'est le début des cycles exo-érythrocytaires secondaires qui vont entretenir dans le foie la parasitose pendant 3 à 5 ans ou plus pour *P. vivax*, 2 ou 3 ans pour *P. ovale* et pendant la vie entière pour *P. malariae*.

Au sein du genre *Plasmodium*, 5 espèces sont anthropophiles : *P. vivax*, *P. ovale*, *P. falciparum*, *P. malariae* et *P. knowlesi*. Les trois premières sont des espèces

strictement inféodées à l'homme, tandis que *Plasmodium malariae* et *P. knowlesi* peuvent avoir comme hôte occasionnel le singe.

1.2. Vecteurs

- Classification

Les vecteurs du paludisme humain appartiennent tous au

Genre *Anopheles*.

Les anophèles appartiennent au

Phylum: *Arthropodes*

Classe: *Insectes*

Ordre: *Diptères*

Sous-ordre: *Nématocères*

Famille: *Culicidae*

Sous famille: *Anophelinae*

Genre: *Anopheles*

On compte environ 400 espèces anthropophiles et zoophiles d'anophèles dans le monde. Mais seules 60 d'entre elles sont des vecteurs de paludisme dans les conditions naturelles. Seules les femelles sont hématophages et donc capables de transmettre le paludisme.

En Afrique sub-saharienne les vecteurs du paludisme appartiennent à une douzaine d'espèces avec une compétence vectorielle (aptitude à transmettre le parasite) très variable.

Les anophèles du complexe *Anopheles gambiae* sont probablement les plus répandus et sont ceux qui assurent la plus grande partie de la transmission du paludisme en Afrique. Au Sénégal 20 espèces d'anophèles sont actuellement connues. Mais les principaux vecteurs du paludisme sont *Anopheles gambiae* et *Anopheles funestus*.

- **Biologie**

Seule la femelle est hématophage pour pouvoir assurer sa fonction de reproduction. A chaque ponte, elle dépose des centaines d'œufs. Or, cela nécessite d'acquérir, au travers de sa substance nutritive, une forme concentrée d'énergie. Ainsi, les quelques microgrammes de sang qu'elle ingère à chaque piqûre (pouvant représenter jusqu'à trois fois son poids) constituent une source concentrée de nutriments essentiels pour la maturation des œufs. Elle ne pique que le soir et la nuit se repérant grâce aux odeurs émises par ses proies. Elle dispose d'organes sensoriels très puissants, capables de détecter les odeurs corporelles, le gaz carbonique, la chaleur et la transpiration émis par son hôte; elle suit donc ces stimuli jusqu'à la localisation de l'hôte.

La présence d'eau stagnante est nécessaire pour la ponte. Ceci est lié à un des stades de développement du moustique. En effet, c'est une condition *sine qua non* pour que les larves survivent puisqu'elles se nourrissent de micro-organismes aquatiques. Cependant cette restriction n'est pas véritablement contraignante puisque la source d'eau peut prendre des formes très diverses : mares, flaques, trous remplis d'eau dans des arbres, pneus, boîtes de conserves, etc...

1.3. Cycle évolutif

Le cycle évolutif nécessite 2 hôtes: un hôte vertébré, qui peut être l'homme et un hôte invertébré, l'anophèle femelle. Il comprend une multiplication asexuée ou schizogonie qui se déroule chez le vertébré, et une multiplication sexuée qui comprend une gamogonie et une sporogonie qui a lieu chez l'anophèle femelle. Chez le vertébré, la multiplication asexuée (ou schizogonie) se déroule en 2 phases: une phase hépatique et une phase sanguine.

- Cycle chez l'homme

Phase hépatique pré-érythrocytaire ou phase exo-érythrocytaire

Elle débute lorsqu'un vertébré est piqué par l'anophèle infesté, qui lui inocule dans le sang des sporozoïtes. Pendant une demi-heure, ces sporozoïtes vont rester dans la circulation sanguine, avant de pénétrer dans une cellule hépatique. Ils s'arrondissent et deviennent des trophozoïtes. Ces derniers augmentent progressivement de taille, en même temps que leur noyau se divise plusieurs fois, formant ainsi des masses plurinucléées, les schizontes intra-hépatiques ou «corps bleu».

A maturité chaque noyau s'individualise avec un peu de cytoplasme du parasite pour donner plusieurs milliers de mérozoïtes (ou cryptozoïtes). L'hépatocyte parasité éclate et les mérozoïtes libérés pénètrent dans la circulation sanguine; puis une partie va pénétrer dans les hématies, alors que l'autre partie est détruite par le système immunitaire.

Le processus de reproduction se déclenche immédiatement dans tous les hépatocytes parasités pour les espèces *P. malariae* et *P. falciparum*.

Ce processus peut être retardé dans certains hépatocytes qui restent en attente (d'où leur nom d'hypnozoïtes) pendant plusieurs mois voire plusieurs années, pour les espèces *P. vivax* et *P. ovale*. C'est ce qui explique les rechutes tardives provoquées par ces 2 espèces.

La durée de la phase exo-érythrocytaire varie selon l'espèce plasmodiale. Elle est de 7 à 15 jours pour *P. falciparum*. La phase exo-érythrocytaire est cliniquement silencieuse.

Phase érythrocytaire ou sanguine

Elle commence avec la pénétration du mérozoïte dans l'hématie, puis le mérozoïte se transforme en trophozoïte. A l'intérieur de l'hématie, le parasite se nourrit de l'hémoglobine, qui est digérée et produit l'hème qui est ensuite cristallisée et donne des particules denses de couleur noire appelées hémozoïne. Le trophozoïte donne ensuite le schizonte sanguin puis les mérozoïtes. L'hématie parasitée éclate et libère les mérozoïtes dans le courant sanguin. Une partie de ces mérozoïtes va pénétrer dans les hématies alors qu'une autre partie sera détruite suite aux actions de l'immunité.

C'est l'éclatement simultané des corps en rosace d'une même génération qui provoque l'accès de fièvre, typique du paludisme. La durée du cycle érythrocytaire est de 48 heures pour *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale*, 72 heures pour *P. malariae* et de 24 heures pour *P. knowlesi*.

- Cycle chez l'anophèle

Il se déroule en deux phases, la gamogonie et la sporogonie.

Gamogonie

Après plusieurs cycles sanguins, certains mérozoïtes se transforment en éléments sexués, les gamétocytes mâles et femelles dont l'évolution ne peut se poursuivre que chez l'anophèle femelle qui s'infeste en piquant un sujet impaludé. Il va absorber en même temps que le sang, différentes formes parasitaires, seuls les gamétocytes poursuivront leur développement.

Dans son estomac, le noyau du gamétocyte mâle donne par exflagellation, 8 gamètes mâles ou microgamètes. Les gamétocytes femelles ne donnent chacun, qu'un seul gamète femelle, ou macrogamète immobile. La fécondation survient ensuite dans l'intestin de l'anophèle. L'œuf formé devient mobile (d'où son nom d'oocinète). Il traverse la paroi de l'estomac, et va s'enkyster sur la lame basale de celui-ci. Un tel kyste est appelé un oocyste.

Sporogonie

Le noyau de l'oocyste se divise plusieurs fois; il se forme de très nombreux sporozoïtes (jusqu'à 10 000 par oocyste), qui, par rupture de l'oocyste, sont libérés dans la cavité du moustique. Une partie de ces sporozoïtes va envahir les glandes salivaires du moustique, alors que l'autre partie est perdue. Lors d'un prochain repas de sang, les sporozoïtes des glandes salivaires seront injectés avec la salive (Figure 1).

Le cycle sexué chez *Anopheles* dure 12 à 20 jours selon la température et l'espèce plasmodiale. Il dure environ 12 jours pour *P. falciparum*.

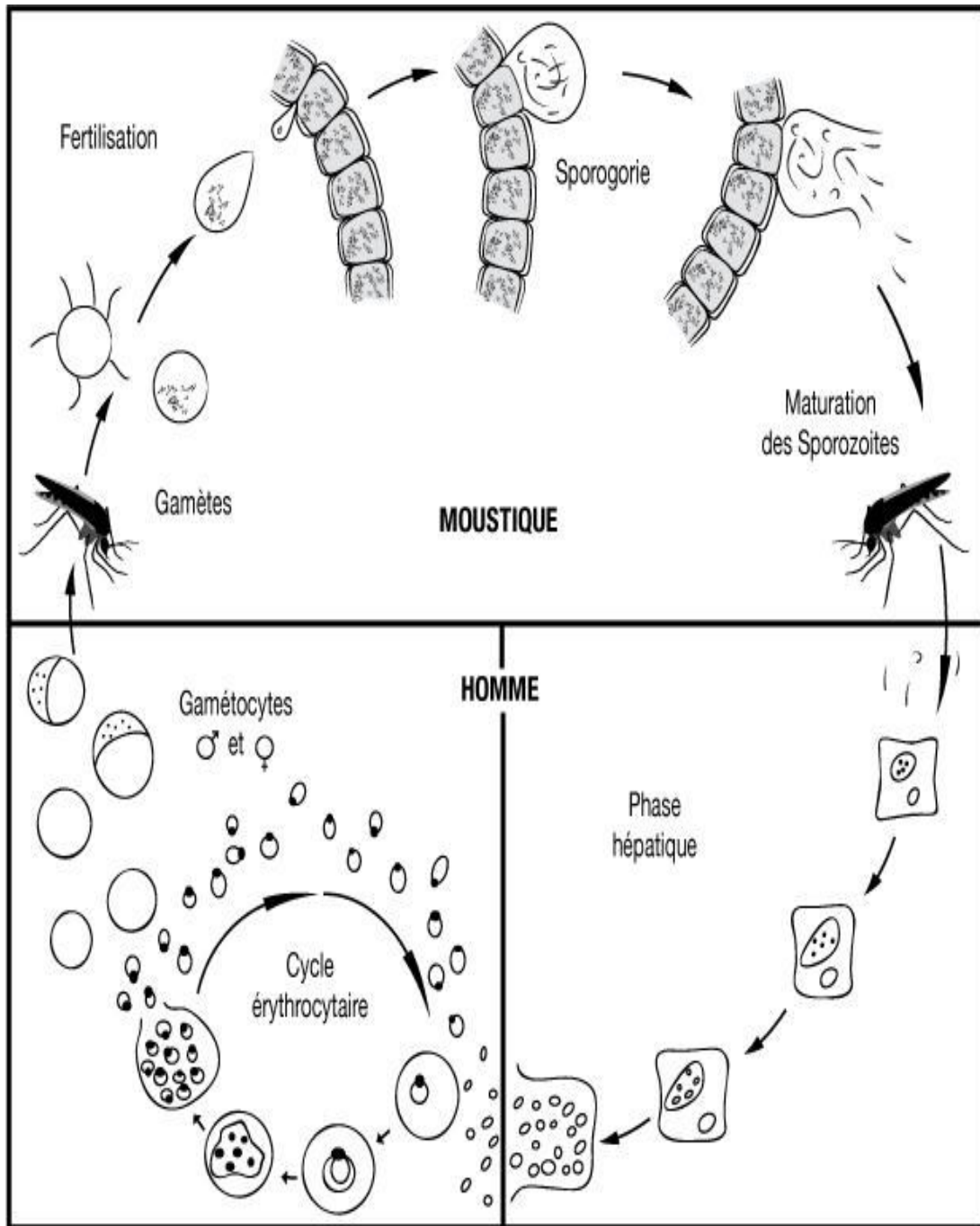


Figure 1 : Cycle évolutif de *Plasmodium*

1.4. Mode de contamination

Le mode de contamination le plus répandu est la piqûre de l'insecte vecteur infesté au cours d'un repas sanguin; mais l'infection peut se produire aussi au décours d'une transfusion sanguine et dans ce cas le cycle hépatique est court-circuité, et par voie transplacentaire, dans ce cas les plasmodies apparaissent dans le sang du nouveau-né avant le huitième jour de vie.

1.5. Facteurs favorisants

Le paludisme est retrouvé en zone tropicale, dans les régions où pullulent les moustiques du genre *Anopheles*. Leur développement dépend de facteurs climatiques tels que la température, l'humidité et les précipitations.

Les conditions socio-économiques défavorables, (promiscuité), peuvent aussi favoriser la transmission.

La température affecte la survie du parasite au cours de son cycle sexué chez l'anophèle, le développement est plus rapide entre 27° et 31°C et dure entre 8 et 20 jours selon les espèces et la température. Le cycle est plus long lorsque la température est plus basse, et ne peut pas se produire à des températures en dessous de 19°C pour *P. falciparum* et 15-16°C pour les autres espèces. La reproduction des anophèles est également modifiée par la température, et se traduit par un allongement de la durée de vie des moustiques et l'augmentation de la fréquence des repas de sang.

Les précipitations constituent également un facteur important dans le développement des anophèles permettant la sélection des sites de ponte. Des

modifications du réseau hydrographique (barrage et irrigations) entraînent la prolifération des vecteurs.

L'humidité de l'air est aussi un facteur important pour la survie des adultes *Anopheles* qui ont un taux de survie plus élevé et une activité supérieure si l'humidité relative de l'air ambiant est à environ 50 ou 60 %.

De même, les modifications des couverts végétaux et la déforestation, favorisent la multiplication des espèces dans les mares ensoleillées. Le développement des transports, favorisent les mouvements de population et entraîne une dissémination des vecteurs.

1.6. Répartition géographique

Parmi les cinq espèces de *Plasmodium* qui infectent l'homme, *P. falciparum* et *P. vivax* causent l'importante majorité du paludisme.

P. falciparum, qui provoque la plupart des cas les plus graves et les décès, est retrouvé généralement dans les régions tropicales, telles que l'Afrique subsaharienne et l'Asie du Sud, ainsi que dans le Pacifique occidental et dans les pays partageant la forêt amazonienne. Au Sénégal, il est responsable de 98% des cas de paludisme.

P. vivax est courant dans la plupart des régions de l'Asie (en particulier en Asie du Sud) et de la Méditerranée orientale, et dans la plupart des pays endémiques des Amériques.

P. malariae et *P. ovale* contribuent à un petit nombre seulement des infections palustres, *P. ovale* est retrouvé en Afrique et de façon sporadique en Asie du Sud et du Pacifique occidental, tandis que *P. malariae* a une distribution géographique

similaire à *P. falciparum* mais son incidence est inégale et est probablement sous-estimée.

P. knowlesi est une espèce responsable de paludisme chez les primates et qui est de plus en plus signalée chez l'homme dans les zones reculées de l'Asie du Sud en provenance de pays comme la Malaisie, la Thaïlande, le Viet Nam, le Myanmar et les Philippines.

1.7. Indices épidémiologiques

L'étude des limites et de l'intensité d'une épidémie dans une zone peut se faire par deux approches; soit par une étude quantitative qui consiste à estimer de manière précise le nombre de sujets atteints, soit par l'utilisation d'indicateurs pouvant déterminer de la façon la plus fiable possible le nombre de sujets atteints. Ces indicateurs sont souvent utilisés dans les zones les moins accessibles.

Chez l'homme

- Indice splénique (IS):

Il est souvent utilisé dans les zones les moins accessibles. Cette méthode est rapide et non coûteuse. Elle consiste à estimer la situation paludique en mesurant par palpations, les variations de la taille de la rate, notamment chez les enfants de 5 à 15 ans. A chaque accès palustre, la rate augmente de taille de façon importante et devient palpable sous le rebord costal du côté gauche, ce qui n'est pas le cas en temps normal.

Il représente le pourcentage de sujets porteurs de splénomégalie. Cet indice est apprécié chez les sujets de deux à neuf ans non soumis à une chimiothérapie. Il est peu spécifique et reflète les réinfections successives.

- **Indice plasmodique (IP) :**

Représente le pourcentage de sujets examinés présentant des hématozoaires dans leur sang périphérique. Il renseigne sur le degré d'endémicité dans une collectivité.

Chez l'enfant de moins un an, il reflète la fréquence des infections récentes. Chez l'adolescent et l'adulte, il informe sur le degré d'immunité de la population considérée.

- **Indice gaméocytaire (IG)**

Représente le pourcentage de sujets porteurs de gaméocytes dans la population humaine. Il indique le potentiel infectant de la population vis à vis des anophèles et donc le risque d'infectivité.

- **Indice séro-épidémiologique**

Est déterminé par la moyenne géométrique des titres d'anticorps spécifiques obtenus chez des sujets donnés.

Les valeurs de ces différents indices, déterminent les zones d'holo, d'hyper, de méso et d'hypo-endémie (Tableau I).

Tableau I: Définition des régions d'endémicité palustre

Zone hypo-endémique	IS entre 0 et 10 %, IP inférieur à 25 %
Zone méso-endémique	IS entre 11 et 50 %, IP entre 26 et 50 %
Zone hyper-endémique	IS entre 51 et 75 %, IP entre 51 et 75 %
Zone holo-endémique	IS supérieur à 75 %, IP supérieur à 75 %

IS : Indice splénique / IP : Indice plasmodique.

Chez le vecteur

- Indice sporozoitique:

Il représente le pourcentage d'anophèles d'une espèce donnée chez lesquels les glandes salivaires disséquées dans les vingt quatre heures suivant la capture, contiennent des sporozoïtes.

- Indice oocystique:

Il représente le pourcentage d'anophèles femelles d'une espèce donnée, chez lesquelles une dissection exécutée, dans les vingt quatre heures suivant la capture établit la présence d'oocystes dans l'estomac.

1.8. Faciès épidémiologiques

Ils représentent, une région ou un ensemble de régions où le paludisme présente, dans ses manifestations pathologiques, des caractères communs liés aux modalités de transmission du parasite.

Plusieurs faciès ont été décrits:

- Les faciès équatorial et tropical où le paludisme est stable, présent tout au long de l'année ou saisonnier. Toute la population est touchée et développe une prémunition pendant la prime enfance au prix d'une mortalité infanto-juvénile élevée, les adultes étant ensuite peu touchés par la maladie.

- Faciès sahélien où la stabilité du paludisme est intermédiaire ;

- Faciès désertique et montagnard, où le paludisme est instable.

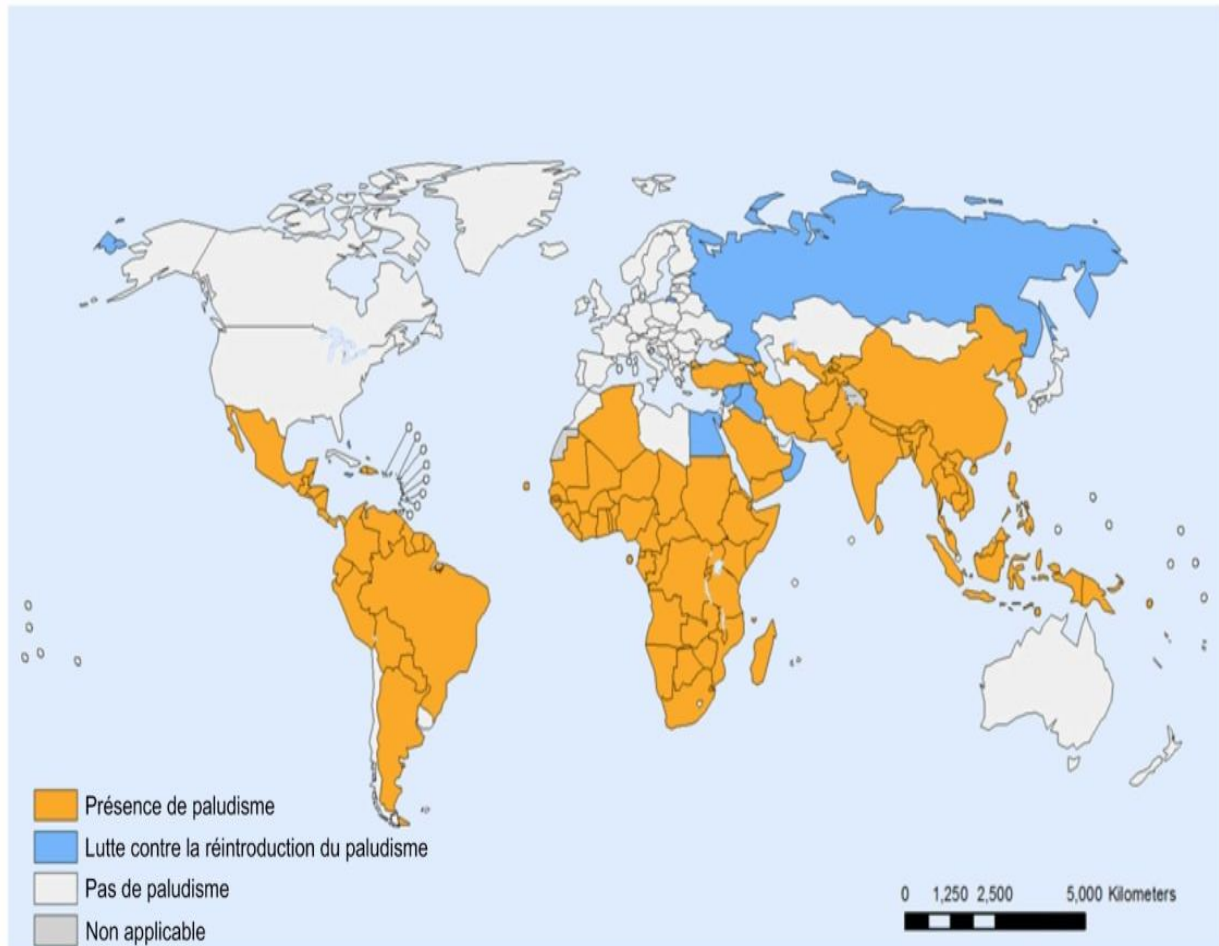
L'irrégularité de la transmission empêche le développement d'une prémunition et, au cours de certaines années pluvieuses et /ou chaudes, des épidémies touchant presque toutes les classes d'âge peuvent éclater.

Ces différents faciès peuvent être localement modifiés par les cours d'eau, les reliefs et les sols.

- Cas particulier du paludisme urbain : En Afrique, le paludisme est une endémie essentiellement rurale. Il n'existe pas de vecteurs spécifiquement urbains. En milieu urbain, la transmission est globalement beaucoup plus faible qu'en milieu rural, cela explique le niveau d'immunité plus faible des populations urbaines. On assiste depuis quelques années à une urbanisation accélérée. De plus en plus de sujets naissent et vivent en permanence dans les villes où la transmission anophélienne est faible, voir nulle. Ils n'acquerront pas d'immunité de prémunition. Ils s'infecteront essentiellement à l'occasion de brefs séjours en zone rurale et pourront développer, quelque soit l'âge, des formes graves de paludisme et

particulier des neuropaludismes. Ainsi, de par cette accélération de l'urbanisation en Afrique, on peut prévoir pour les prochaines années, une diminution des taux d'incidence du paludisme (les individus auront une probabilité plus faible d'être infectés), mais surtout une augmentation de la proportion des formes graves de paludisme de par l'absence de prémunition.

Pays et territoires affectés par le paludisme en 2010



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

Data Source: World Health Organization
Map Production: Public Health Information
and Geographic Information Systems (GIS)
World Health Organization

 World Health
Organization
© WHO 2012. All rights reserved.

Source : WHO 2012

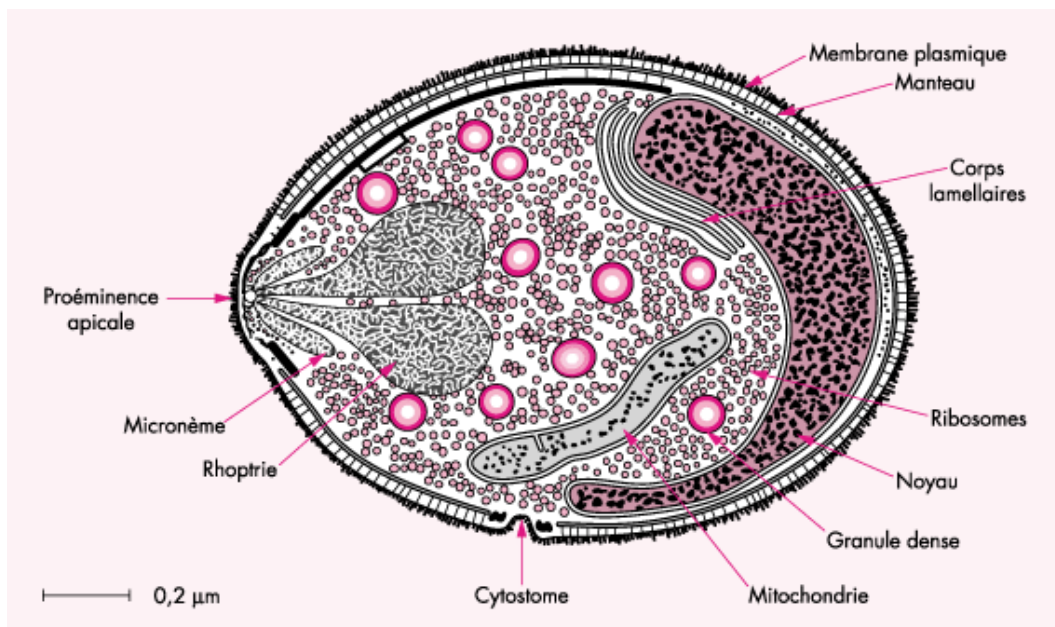
Figure 2 : Répartition géographique du paludisme

2. Invasion érythrocytaire

2.1. Ultrastructure du mérozoïte

Plasmodium fait partie du phylum des *Apicomplexa* qui sont caractérisés par la présence d'un complexe apical d'où leur nom et qui jouent un rôle primordial dans le processus d'invasion. Chez *Plasmodium*, c'est le mérozoïte qui est à l'origine de l'invasion érythrocytaire.

Le mérozoïte se présente sous la forme d'une petite cellule ovale polarisée possédant une proéminence apicale dont l'organisation est caractéristique des *Apicomplexa*. La cellule est recouverte d'une matrice extracellulaire filamenteuse de 15 à 20 nm d'épaisseur. Les mérozoïtes de *P. falciparum* mesurent 1,5 μm de long sur 1 μm de large. Le mérozoïte ne présente ni cils ni flagelles et ses mouvements se font par glissements impliquant le cytosquelette parasite.



[Bannister et Mitchell]

Figure 3: Représentation schématique d'un mérozoïte

Le mérozoïte est caractérisé par la présence du complexe apical qui est composé de deux rhoptries, de plusieurs micronèmes et granules denses qui interviennent dans le processus d'invasion. Ce complexe est caractéristique du phylum des *Apicomplexa* (Figure 3).

- Le complexe apical

On observe au niveau de la proéminence apicale du mérozoïte des organites particuliers communs aux Apicomplexes et qui sont dénommés les rhoptries, les micronèmes et les granules denses. Tous sont impliqués à un moment ou à un autre dans le processus d'invasion des cellules hôtes par ces parasites.

Les rhoptries, au nombre de deux chez *Plasmodium*, sont des organites en forme de poire d'un diamètre d'environ 200 nm; elles possèdent un pédoncule qui vient s'ouvrir au pôle apical lors de l'interaction entre le mérozoïte et l'érythrocyte. La présence de rhoptries est restreinte aux stades invasifs qui sont les sporozoïtes qui infectent les hépatocytes et les mérozoïtes qui parasitent les érythrocytes chez *Plasmodium*. On ne les détecte plus chez les formes intracellulaires du parasite précédant la différenciation des mérozoïtes. Ces organites présentent des caractéristiques de compartiment sécrétoire et, lors de l'invasion érythrocytaire, le relargage par ces structures, de protéines ainsi que de lamelles membranaires a été observé. En effet, une famille de protéines appelée *Plasmodium falciparum* reticulocyte binding protein homolog (PfRh) est impliquée dans les interactions secondaires spécifiques entre le mérozoïte et les érythrocytes.

Les micronèmes sont de petites structures allongées, en nombre plus important que celui des rhoptries, présentant également des caractéristiques de compartiment

sécrétoire et non détectables chez les formes intracellulaires de *Plasmodium*. Plusieurs protéines de micronèmes ont été étudiées (chez *Toxoplasma* et chez différentes espèces de *Plasmodium*) dont certaines sont des acteurs de la reconnaissance de la cellule-hôte par le parasite. La famille des Duffy Binding Like proteins est localisée dans les micronèmes ce sont des protéines impliquées dans les interactions secondaires. Cette famille est constituée de trois membres chez *P. falciparum*, Erythrocyte Binding Antigen 175 (EBA-175) [26], Erythrocyte Binding Antigen 140 (EBA-140) et Erythrocyte Binding Antigen 181 (EBA-181). Un autre membre de cette famille, Erythrocyte Binding Antigen 165 (EBA-165) n'est pas exprimé à l'état fonctionnel.

Les granules denses sont des organites sphériques. Ces organites ne sont pas exclusivement localisés au niveau du pôle apical du mérozoïte mais certains au moins déversent leur contenu à ce niveau et ils participent, comme les micronèmes et les rhoptries, au processus d'invasion. Chez *Toxoplasma*, le contenu des granules denses semble être sécrété tardivement lors de l'invasion et participerait à des modifications de la vacuole parasitophore. Il semble qu'il puisse exister plusieurs types de granules denses chez *Plasmodium* dont le contenu serait sécrété avec des cinétiques différentes lors du processus d'invasion : certains déversent leur contenu dès la formation d'une jonction entre mérozoïte et érythrocyte, et d'autres plus tardivement, lorsque la vacuole parasitophore est déjà formée.

Chez *P. falciparum*, une sérulyprotéase de la famille des subtilisines, *Plasmodium falciparum* subtilisines 2 (PfSUB2), stockée dans les micronèmes, est sécrétée à la surface du mérozoïte avant de subir une translocation au niveau du pôle postérieur, dans une voie dépendante de l'actine, il s'ensuit une protéolyse entraînant l'élimination ou l'effusion du revêtement couvrant la surface du mérozoïte [66].

- La membrane plasmique du mérozoïte

Cinq protéines parasitaires ont été décrites à la surface des mérozoïtes de *P. falciparum*.

La plus étudiée est la protéine Merozoite Surface Protein 1 (MSP-1), protéine polymorphe d'environ 200 kDa ancrée à la surface du mérozoïte par un glycolipide présente chez toutes les espèces plasmodiales et dont la maturation, liée au processus d'invasion, est conservée chez les différents *Plasmodium*.

Le dernier produit de maturation, MSP-1-19 reste ancré à la surface du parasite tout au long du processus d'invasion. Cette protéine est composée de deux domaines de type Epidermal Growth Factor-like domains (EGF). Les protéines MSP-2, MSP-4 et MSP-5 sont, comme MSP-1 ancrées à la membrane du mérozoïte par un domaine glycolipidique et les gènes spécifiant ces protéines sont arrangés en tandem sur le chromosome 2 MSP-4 et MSP-5, bien que de séquences primaires différentes, sont des protéines de 272 acides aminés ayant toutes deux un peptide signal, un domaine de type EGF dans la région carboxy-terminale et un ancrage glycolipidique. Chez le parasite murin *P. chabaudi*, il semble y avoir un seul de ces trois gènes, appelé PcMSP4/5, spécifiant une protéine de structure similaire à PfMSP-4 et PfMSP-5 et présentant à son extrémité amino-terminale des similarités de séquence avec PfMSP-2.

En plus de ces protéines intégrales de la membrane du mérozoïte, plusieurs protéines associées à cette membrane mais sans domaine d'ancrage membranaire, ont été identifiées. Les protéines MSP-3, Serine-stretch Protein (SERP), Glutamate-Rich Protein (GLURP), Acidic Basic Repeat Antigen (ABRA),

sécrétées par le parasite dans la vacuole parasitophore (VP) sont en effet détectées également à la surface du mérozoïte avec laquelle elles interagissent faiblement.

Les molécules de la surface du parasite impliquées dans ces interactions ne sont pas identifiées. Une protéine p22 a également été détectée à la surface des mérozoïtes, en association avec le complexe MSP-1. Cette protéine n'est pas dérivée de MSP-1.

Les molécules localisées à la surface du mérozoïte sont toutes susceptibles de médier la reconnaissance de la cellule-hôte et l'attachement du parasite à l'érythrocyte. Elles peuvent intervenir à différents stades du processus d'invasion, pas seulement dans ces étapes précoces de liaison mais également en cours d'internalisation du parasite.

2.2. Interactions mérozoïte-érythrocyte

La membrane érythrocytaire est constituée de deux domaines, une bicouche lipidique et le cytosquelette. Le domaine lipidique est similaire structurellement à celui retrouvé chez la plupart des cellules de mammifères. Le cytosquelette est différent de ce qui est considéré comme cytosquelette chez les autres cellules parce qu'il ne contient pas la tubuline, qui est une protéine structurale ne participant pas à la motilité cellulaire ou à la phagocytose.

Le processus d'invasion est probablement identique chez toutes les espèces de *Plasmodium* et implique les récepteurs érythrocytaires. Les récepteurs de l'invasion des érythrocytes, ou du foie sont retrouvés dans les micronèmes, à la surface de la cellule et dans les rhoptries.

Cependant les mécanismes moléculaires de l'invasion restent encore mal connus à ce jour.

P. falciparum parasite aussi bien les globules rouges âgés que les globules rouges jeunes. *P. yoelii*, parasite de préférence les réticulocytes qui sont des globules rouges produits depuis moins de 48 heures et qui présentent des restes d'ARN, mais une fois que les réticulocytes sont tous parasités, certaines souches virulentes peuvent envahir tous les érythrocytes provoquant une parasitémie élevée et éventuellement la mort. Ceci a également été retrouvé avec *P. falciparum*, avec le paludisme sévère et le paludisme simple, la souche virulente envahit tous les globules rouges alors que la souche avirulente parasite une sous population de globules rouges. *P. falciparum* peut utiliser plusieurs voies alternatives pour envahir le globule rouge avec une efficacité réduite ou parfois égale à celle des globules rouges qui ont perdu un récepteur tel que l'acide sialique [45]. Sur la membrane des érythrocytes se trouvent des glycoprotéines qui portent le nom de Glycophorines (Gly). Chez l'homme, quatre ont été identifiées, il s'agit des glycophorines A, B, C, et D qui sont des protéines transmembranaires (un seul passage, hélice alpha), glycosylées, avec une terminaison NH₂ externe et COOH intracytoplasmique.

Trois voies d'invasion acide sialique dépendante ont été identifiées: EBA-175/GlyA, EBA140/GlyC, et une voie d'invasion résistante à la trypsine et impliquant une protéine PfRh.

La pression exercée par *P. falciparum* chez l'homme a conduit à l'émergence et la persistance d'un certain nombre de désordres génétiques héréditaires [33] [146].

Des mutations de la glycophorine A ne sont pas retrouvées en Afrique malgré une invasion réduite des globules rouges ne possédant pas cette glycophorine cependant celles de la glycophorine B sont retrouvées. Les mutations de la

glycophorine C causées par une délétion de l'exon 3 du gène GlyC qui codent pour les antigènes Gerbich sont rares dans les pays occidentaux et sont généralement retrouvées dans les pays où le paludisme est endémique. Le système Gerbich est composé de onze antigènes qui sont situés sur les glycophorines C et D de la membrane des globules rouges.

En effet, dans le nord de la Papouasie-Nouvelle-Guinée, où le paludisme est endémique, il a été rapporté que les sujets ne présentant pas les antigènes Gerbich semblent avoir un avantage sélectif pour éviter les infections à *P. falciparum* et *P. vivax* [134].

Des études ultérieures ont confirmé que la glycophorine C est un récepteur de l'invasion érythrocytaire chez *P. falciparum* et que les sujets Gerbich négatifs expriment une GlyC altérée incapable de se lier au ligand du parasite [100].

Cependant, le parasite peut devenir moins virulent puisqu'il s'adapte à la survie dans des érythrocytes déficients.

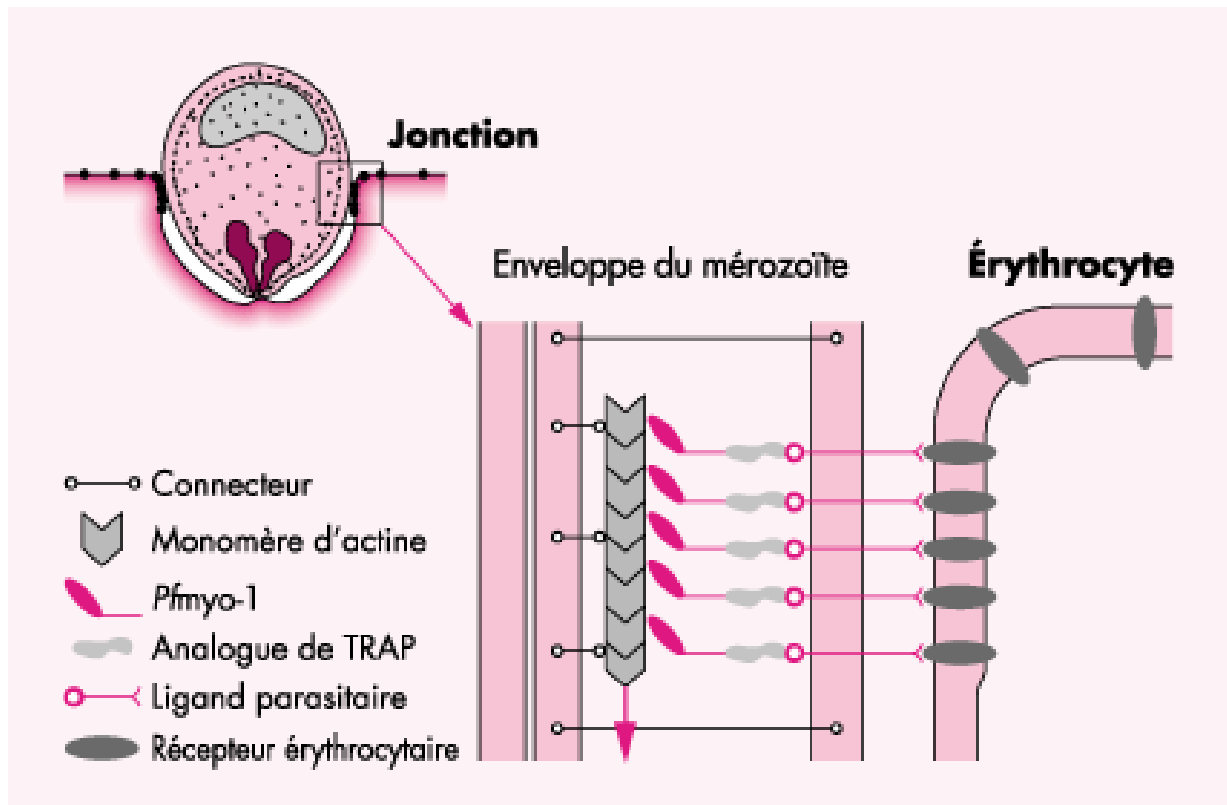


Figure 4. **Représentation schématique de la jonction entre mérozoïte et érythrocyte d'après Pinder et al. [87]**

2.3. Ligands parasites et récepteurs érythrocytaires

Les variations des phénotypes ou des voies d'invasion ont été démontrées avec des isolats de terrain et des souches de laboratoire de *P. falciparum*. Bien que les mécanismes ne soient pas entièrement compris, des différences dans les phénotypes d'invasion chez *P. falciparum* ont été clairement démontrées en fonction de leur sensibilité au clivage des récepteurs de surface des érythrocytes avec des enzymes bien définis. Les phénotypes d'invasion peuvent être classés en 2 groupes principaux:

- Invasion dépendant de l'acide sialique (SA-dépendante), démontrée par la diminution de l'invasion avec les érythrocytes traités par la neuraminidase (la neuraminidase clive l'acide sialique présent sur la surface des érythrocytes),

- l'invasion indépendante de l'acide sialique démontrée par l'invasion efficace des érythrocytes traités par la neuraminidase (SA-indépendante).

L'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes implique de nombreuses interactions entre les ligands parasitaires et des récepteurs érythrocytaires; et un certain nombre de protéines du mérozoïte ont été proposées ou sont établies comme ayant un rôle dans l'invasion érythrocytaire et peuvent être des cibles d'anticorps inhibiteurs. [35] (Tableau II)

L'attachement initial est associé aux antigènes présents sur la surface du mérozoïte. De nombreuses protéines de la surface du mérozoïte semblent intervenir dans ce processus. Les meilleurs candidats étant Mérozoïte Surface Proteins 1 (MSP1) qui a comme récepteur la bande 3 [64] et d'autres protéines de surface telles que les Glycosyl Phosphatidyl Inositol (GPI) [63], mais aussi, MSP4, MSP5, le groupe MSP-3/6, les familles MSP7 et Serine Repeat Antigen (SERA) semblent intervenir. Il existe également sur la surface du mérozoïte d'autres protéines périphériques telles que *Plasmodium falciparum* protein 41 (Pf41) et Acid Basic Repeat Antigen (ABRA). L'attachement initial est suivi par une réorientation apicale du mérozoïte, qui à l'inverse est plus connue et implique une protéine appelée Apical Membran Antigen 1 (AMA1) [102]. PfAMA1 est transportée à la surface des mérozoïtes avant que l'invasion ne débute et il a été démontré que des anticorps dirigés contre PfAMA1 bloquent spécifiquement l'invasion érythrocytaire bien qu'ils n'interfèrent pas avec l'attachement initial [102].

Des interactions secondaires sont ensuite requises pour l'activation des processus d'invasion. Elles concernent deux familles de ligands d'invasion qui sont

Erythrocyte Binding Antigen (EBAs; EBA175, EBA140/BAEBL, EBA181/JESEBL) et *P. falciparum* Reticulocyte Binding Homolog (PfRh) (PfRh1,-2a, 2b-, et -4). D'autres membres de ces familles, EBA165 et PfRh3, apparaissent sous forme de pseudogènes [26 ; 50]. Le rôle de ces ligands semble conservé dans une certaine mesure chez différentes espèces de *Plasmodium*. Les EBAs présentent une homologie avec les ligands d'invasion de *P. vivax* et *P. knowlesi*, et les protéines de PfRh ont une homologie avec les ligands d'invasion de *P. vivax* [60] et *P. yoelii* [101]

Les mérozoïtes peuvent utiliser différentes voies d'invasion. [45]. Les changements dans l'expression et / ou l'utilisation des protéines de EBA et PfRh permettent l'utilisation de voies d'invasion alternatives. [50 ; 45 ; 19]

L'invasion dépendant de l'acide sialique ou sensible à la neuraminidase implique les trois (3) EBAs et PfRh1, avec sans doute EBA-175 étant la plus importante. [26 ; 115 ; 136] Ces ligands se lient à l'acide sialique présent sur la surface des érythrocytes, EBA175 et EBA140 se lient à la glycopherine A et C respectivement) [115 ; 136]. EBA181 se lie à l'acide sialique présent sur la surface des érythrocytes à la protéine appelée bande 4.1 [91] (Figure 4).

PfRh2b et PfRh4 sont deux ligands importants intervenant dans l'invasion acide sialique indépendante, et les interactions semblent chymotrypsine sensibles [50]. Cependant, les récepteurs érythrocytaires reconnus par ces ligands sont encore inconnus.

PfRh2a présente environ 80% d'identité de séquence avec PfRh2b, différant dans la région C-terminale de la protéine. Il n'existe aucune preuve de la fonctionnalité de PfRh2a [50].

L'activation de PfRh4 apparaît essentielle pour l'invasion indépendante de l'acide sialique. Lorsque des isolats utilisant une voie d'invasion dépendante de l'acide sialique sont sélectionnés pour l'invasion d'érythrocytes traités par la

neuraminidase, il y a un passage à l'utilisation d'une voie d'invasion indépendante de l'acide sialique et l'induction de PfRh4. L'élimination de PfRh4 bloque la capacité de passer de la voie d'invasion acide sialique dépendante à celle acide sialique indépendante. De même, l'invalidation du gène EBA175 provoque un changement avec passage de la voie d'invasion acide sialique dépendante à celle acide sialique indépendante avec l'activation de l'expression de PfRh4.

A l'heure actuelle, il n'existe aucune preuve que d'autres ligands de l'invasion tels que MSP1 et AMA1, soient impliqués dans la variation phénotypique des voies d'invasion.

La signification biologique de l'utilisation des voies alternatives pour l'invasion des érythrocytes et la disponibilité de multiples ligands de l'invasion n'est pas connue mais pourrait constituer une stratégie pour faciliter l'invasion érythrocytaire du parasite en cas de polymorphisme des récepteurs de l'hôte ou de réponses immunitaires qui inhibent la liaison du ligand [50]. Bien que les familles de ligands EBAs et PfRhs jouent un rôle important dans l'invasion érythrocytaire, leur importance en tant que cibles d'anticorps inhibiteurs ou de protection n'a pas encore été établie de manière claire.

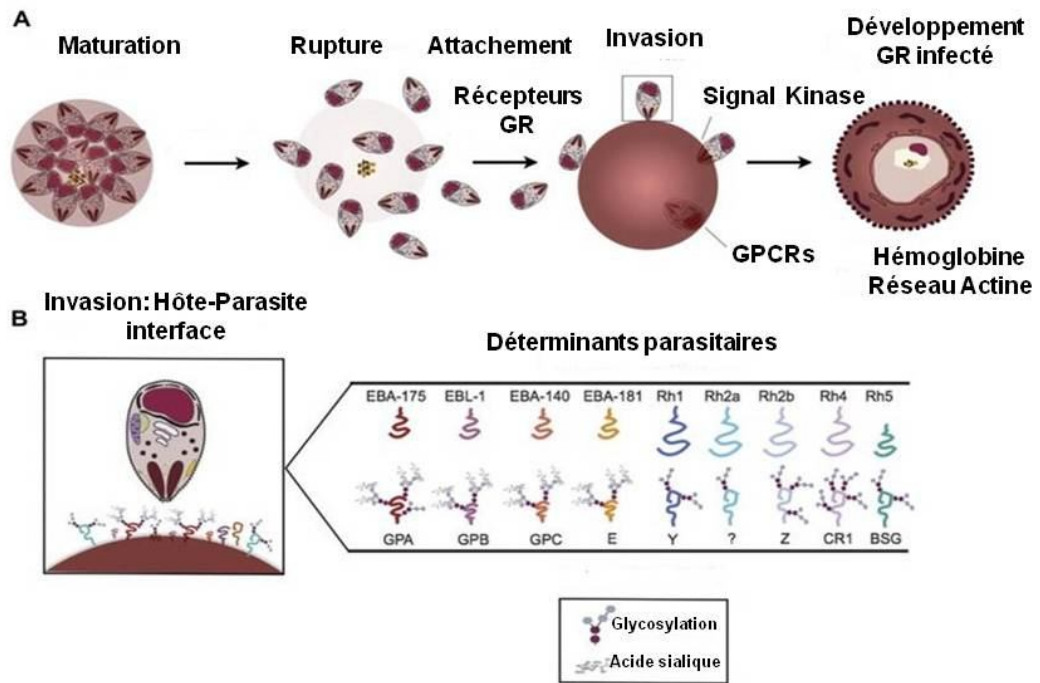


Figure 5: Interactions moléculaires entre le mérozoïte et l'érythrocyte [Bei AK et al 2012, Science] (traduit)

Tableau II : Protéines parasitaires impliquées dans l'invasion

Tableau I		
<i>Quelques protéines parasitaires impliquées dans le processus d'invasion</i>		
Protéine parasitaire	Localisation	Rôle (* établi ou ° présumé)
MSP-1	Membrane plasmique du parasite	* Interaction entre parasite et érythrocyte : liaison par les domaines de type EGF
MSP-2	Membrane plasmique du mérozoïte	Non déterminé
PfMSP-4	Membrane plasmique du mérozoïte	* Interaction entre parasite et érythrocyte : liaison par les domaines de type EGF
PfMSP-5	Membrane plasmique du mérozoïte	* Interaction entre parasite et érythrocyte : liaison par les domaines de type EGF
PfMSP-3 PfSERP PfGLURP ABRA	Vacuole parasitophore, association avec la surface du mérozoïte	Non déterminé
PfP22	Association à la surface du mérozoïte avec le complexe MSP-1	Non déterminé
PfSUB2	Granules denses du mérozoïte	* Sérylprotéase de maturation de MSP-1
PfEBA-175	Micronèmes du mérozoïte	* Interaction entre parasite et érythrocyte : liaison à la glycophorine A
PfEbl-1	Non déterminée	* Interaction entre parasite et érythrocyte : liaison par domaine de type Duffy-binding
Pv et <i>Plasmodium</i> DBP	Apex du mérozoïte	* Interaction entre parasite et érythrocyte : liaison à l'antigène Duffy
Pv RBP, et 2	Apex du mérozoïte	* Interaction entre parasite et réticulocyte : liaison spécifique
230 kDa	Rhoptries	* Interaction entre parasite et érythrocyte
Pf gp76	Apex du mérozoïte	* Dégradation de la bande 3 érythrocytaire, formation de la vacuole parasitophore
Pf-PLA2	Non déterminée	* Libération des mérozoïtes
Pf332	Structures de Maurer et membrane plasmique du globule rouge	* Maintien de l'intégrité du globule rouge, dégradation au moment de la libération des mérozoïtes
PfRESA	Granules denses	* Interaction avec les spectrines au cours du développement intra-érythrocytaire du parasite

3. Rôle des groupes sanguins dans la pathogénie du paludisme

Puisque *Plasmodium* interagit avec les globules rouges et y passe une partie de son cycle, il est primordial d'étudier les interactions entre ces deux éléments.

Ainsi, plusieurs études ont été réalisées aussi bien du côté des mérozoïtes que de celle des érythrocytes pour comprendre cette étape.

Dans la pratique clinique, le système ABO est le plus connu pour les études de compatibilité sanguine et a fait l'objet de plusieurs études investiguant son association avec les infections et les maladies non transmissibles [105; 5]. Une relation entre la distribution des groupes sanguins ABO et le paludisme a été suggérée pour la première fois il y a plus de 40 ans.

Les sujets du groupe O ont une protection contre les formes sévères du paludisme. Au Srilanka une étude a montré une forte évidence statistique d'une association entre les groupes sanguins ABO et la sévérité de l'infection à *P. falciparum* [92]. Il a été démontré que *P. falciparum* forme avec les hématies des rosettes plus larges chez les sujets qui ne sont pas du groupe O (A, B et AB) que chez les sujets de groupe O [97]. De manière intéressante, certaines souches de *P. falciparum* déclenchent la formation de rosette dépendant du groupe sanguin [119].

De plus, une plus grande prévalence du groupe O couplée à une faible prévalence du groupe A est retrouvée en Afrique au Sud du Sahara. Ceci semble être dû au fait que les antigènes A et B sont des récepteurs pour la formation de rosettes avec les globules rouges non infectés [27], qui se lient grâce à une protéine parasitaire appelée PfEMP1 exprimée à la surface des globules rouges infectés [12]. Les rosettes se forment avec les globules rouges du groupe O (bien qu'elles soient plus petites et plus faibles qu'avec les GR de groupe non O) avec l'implication d'autres molécules du GR, qui agissent comme des récepteurs alternatifs pour la formation

de rosettes. Par conséquent, la contribution des groupes sanguins ABO dans le paludisme nécessite plus d'investigations.

4. Immunité anti palustre et mécanisme d'échappement

4.1. Acquisition de l'immunité

En zone d'endémie, les adultes présentent un paludisme qui dans un premier temps est sous forme aigue puis se développe sous forme chronique grâce à la réponse immunitaire qui réduit la parasitémie avec de temps en temps des accès de fièvre accompagnés d'une augmentation de la parasitémie. Ce cycle peut durer plusieurs mois avant que l'infection ne guérisse. Les enfants sont plus susceptibles au paludisme et n'arrivent pas à se débarrasser de la forme aigue qui conduit rapidement à la mort en l'absence de traitement rapide et adéquat.

Ces observations montrent l'importance de l'immunité dans le contrôle du paludisme.

Cette immunité contre le paludisme est lente à se développer, et peut prendre plusieurs années en Afrique sub-saharienne, malgré des piqûres répétées de moustiques infectés. Les enfants âgés de cinq à dix ans sont capables de développer une immunité aux formes sévères de la maladie, mais souffrent encore des formes simples du paludisme jusqu'à l'adolescence, l'âge auquel l'immunité est établie. Cependant l'immunité à l'infection n'est jamais acquise de manière définitive et les adultes vivant en zones d'endémie, bien que rarement malades du paludisme, sont souvent porteurs du *Plasmodium* mais à des parasitémies plus faibles que chez les enfants. Ces observations suggèrent que l'immunité contre les formes graves, mais aussi bénignes de l'infection peut impliquer différents mécanismes immunitaires.

4.2. Mécanismes immunitaires

Théoriquement les mécanismes immunitaires peuvent être dirigés contre n'importe quel stade du cycle depuis l'entrée du sporozoïte dans l'organisme. Ainsi l'immunité cellulaire semble plus importante pour les stades pré-érythrocytaires. Durant la phase érythrocytaire, les formes libres telles que les mérozoïtes mais aussi les formes intra-érythrocytaires peuvent être des cibles de l'immunité. Etant donné que les molécules HLA ne sont pas retrouvées sur les parasites ou sur la surface des hématies parasitées, l'immunité humorale semble être le facteur clé. Les mécanismes de protection peuvent être une inhibition de l'invasion érythrocytaire [22], une destruction médiée par les anticorps cytophiles (anticorps ayant la capacité de se fixer sur les cellules) [24] et une clairance des hématies parasitées par les anticorps liant les protéines parasitaires exprimées à la surface de ces hématies [25].

L'élimination du paludisme passe nécessairement par la mise au point d'un vaccin, dont l'optimisme vient du fait que, bien que le système immunitaire humain n'empêche pas l'infection, l'immunité est acquise par exposition naturelle et continue au parasite. L'obtention d'un vaccin antipalustre efficace semble possible et est supportée par des observations sur des sujets vivant en zone d'endémie. En effet, au Madagascar après une longue période d'élimination du paludisme, les sujets qui ont vécu dans cette zone au moins 30 ans avant cette élimination étaient plus protégés contre le paludisme que les jeunes [43]. On note un rebond de la réponse anticorps à une variété d'antigènes après la réinfection, ce qui indique la présence de lymphocytes B mémoires, donc il semble que les personnes exposées au paludisme accumulent des lymphocytes B mémoires spécifiques aux antigènes de *Plasmodium* au cours de l'exposition.

Cependant, un vaccin pourrait avoir un mécanisme de protection qui n'a pas un rôle dominant dans l'acquisition de l'immunité naturelle.

Etant donné la complexité de *Plasmodium*, il est plus probable que tous ces mécanismes immunitaires interviennent dans la protection contre l'infection.

4.3. Immunité dépendant des anticorps

Les anticorps sont un facteur important de la protection contre le paludisme qui induit à la fois une production d'immunoglobulines (Ig) spécifiques et des anticorps polyclonaux. Bien que les anticorps de différents isotypes puissent avoir des fonctions protectrices, les immunoglobulines G (IgG) sont à cet effet, les plus performantes. Chez les sujets protégés contre le paludisme, les anticorps cytophiles des isotypes IgG1 et IgG3 sont prédominants [130].

En effet l'immunité contre le paludisme est associée aux anticorps IgG3 alors que pour IgG2 les données sont contradictoires, en effet des taux élevés d'IgG2 sont associés à une augmentation des épisodes de paludisme [109].

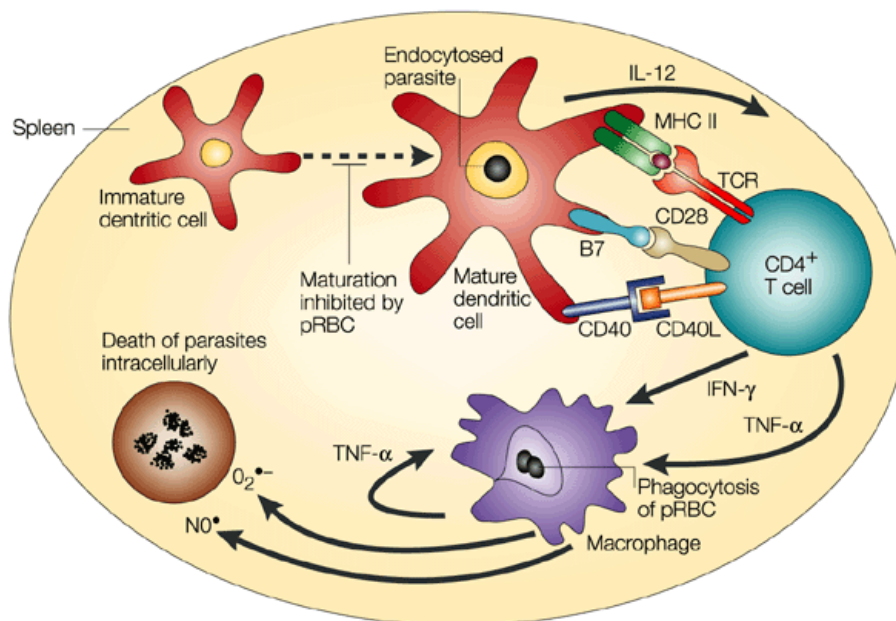
4.4. Immunité cellulaire

L'immunité cellulaire semble aussi avoir une importante place dans la protection contre le paludisme. Des expériences chez la souris suggèrent que la réponse de type Th1 provenant des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ sont impliqués dans la phase aiguë de la pathologie [55] mais la neutralisation de l'IFN γ n'est parfois efficace que partiellement [93].

Comme les érythrocytes n'expriment pas d'antigènes du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), la lyse par les cellules T CD8⁺ cytotoxiques, des

érythrocytes parasités par *P. falciparum*, n'aurait pas un rôle dans la défense contre les stades sanguins des parasites.

A l'inverse, de celles des cellules T CD8+, les fonctions régulatrices et les fonctions effectrices des cellules T CD4+ sont bien établies, aussi bien dans le paludisme expérimental de l'animal que dans celui de l'homme. Pour le paludisme expérimental, la preuve du transfert adoptif de la protection par de telles cellules, et de l'augmentation de la susceptibilité à l'infection des souris dépourvues de cellules T CD4+ par déplétion, a été rapportée. Par ailleurs pour le paludisme de l'homme, l'existence de différentes cellules T CD4+ fonctionnelles chez des sujets naturellement exposés a été établie de façon expérimentale. Ces cellules répondent aux antigènes de *P. falciparum* *in vitro* en proliférant et/ou en produisant des cytokines telles l'interféron (IFN) ou Interleukine 4 l'IL-4 [89].



Nature Reviews | Immunology

Figure 6: Réactions immunitaires au cours du paludisme

4.5. Immunité contre les stades pré-érythrocytaires

L'immunité contre les stades pré-érythrocytaires a été décrite pour la première fois en 1941. En effet des anticorps spécifiques aux sporozoïtes et acquis de manière naturelle ont été retrouvés en zone d'endémie. L'acquisition de ces anticorps est âge et exposition dépendantes [152; 29].

Depuis lors, il a été démontré que les sporozoïtes atténués peuvent infecter les hépatocytes mais sont incapables de se différencier en stades érythrocytaires [135]. En effet l'immunisation avec des sporozoïtes atténués induit une immunité stérile et protectrice contre *Plasmodium* avec tous les modèles d'étude (Humains, Primates non humains et rongeurs) [69; 132; 164].

Les sporozoïtes infectent les hépatocytes qui expriment les CMH classe I et II et sont par conséquent des cibles de l'immunité médiée par les lymphocytes T CD8. Cependant le mécanisme de protection du RTS,S, le principal vaccin dirigé contre le stade pré érythrocytaire est anticorps dépendant et n'induit pas une réponse significative de lymphocytes T CD8+ [85].

La protection est spécifique de l'espèce mais pas des souches [70] et peut durer jusqu'à neuf mois chez l'homme [51].

Circum Sporozoite protein (CSP)

C'est l'une des protéines les plus utilisées comme vaccin, elle est retrouvée à la surface des sporozoïtes. Plusieurs études en zone d'endémie ont montré la présence d'anticorps dirigés contre cette protéine. Concernant la nature protectrice de ces anticorps, les données semblent plutôt contradictoires, une étude antérieure a montré qu'il n'y avait pas de corrélation entre la présence d'anticorps anti CSP et la survenue d'épisodes de paludisme [68] alors qu'une étude plus récente a montré une association entre la réponse anticorps dirigée contre la peptide RI du CSP et la

protection contre les signes cliniques de l'infection chez des enfants en Tanzanie [23]. Ces anticorps pourraient agir en bloquant la modification de CSP qui est indispensable pour infecter le foie [23 ; 34]. Ceci suggère que des anticorps dirigés contre d'autres protéines du sporozoïte ou retrouvées à la surface des hépatocytes infectées pourraient intervenir dans la protection contre le paludisme.

Liver Stage Antigen 1 (LSA1)

C'est une protéine spécifiquement exprimée à l'interface hépatocyte/parasite des stades hépatiques uniquement appelée Liver Stage Antigen 1 (LSA1). C'est une large protéine de 139 KDa spécifique de *P. falciparum* et est composée de 86 copies d'une région centrale répétitive de 17 aminoacides riches en résidus E, Q et L. Des études séro-épidémiologiques au Burkina Faso, au Sénégal et au Madagascar ont montré la présence d'anticorps dirigés contre LSA1 et un épitope majeur des lymphocytes B [58]. Cependant comme pour la CSP la nature protectrice de ces anticorps restent à être déterminée.

Thrombospondin-related Anonymous Protein (TRAP)/Sporozoite Surface Protein 2 (SSP2)

C'est une protéine transmembranaire des micronèmes, conservée chez toutes les espèces de *Plasmodium*. Elle est retrouvée chez les sporozoïtes intestinaux et salivaires et est indispensable pour l'infection des glandes salivaires du moustique et des hépatocytes de l'homme, chez ce dernier l'expression cesse dès que le sporozoïte entre dans l'hépatocyte. La mise en évidence d'anticorps anti-TRAP acquis naturellement a été faite pour la première fois au Mali [131]. La transmission saisonnière dans cette zone a été corrélée aux fluctuations dans la proportion et l'amplitude de la réponse contre la protéine TRAP. Les anticorps ont persisté jusqu'à la saison sèche chez les adultes mais disparaissaient très vite chez

les enfants [131]. Les anticorps dirigés contre TRAP sont associés à la protection contre le paludisme sévère dans une étude au Mali [46] et à la protection chez des enfants au Kenya [79]. Il n'y avait aucune variation entre les niveaux de réponses IgG entre CSP et TRAP entre les enfants et les adultes durant la saison des pluies. Par contre dans une étude de suivi chez les enfants au Kenya durant la saison sèche le taux d'anticorps diminue dans cette même zone, les anticorps dirigés contre TRAP étaient absents jusqu'à quatre mois, puis augmentent avec l'âge [29].

Sporozoite-Threonin-Asparagine-Rich-Protein (STARP)

Elle a également fait l'objet d'études sur l'immunité [58]. Elle est exprimée par les stades pré-érythrocytaires et les stades asexuels et semble spécifique à *P. falciparum*. Des études séro-épidémiologiques au Burkina Faso et au Sénégal ont révélé une fréquence élevée d'anticorps IgG spécifiques de cette protéine [118]. Des anticorps acquis naturellement mais aussi des anticorps induits par vaccination inhibent l'invasion des hépatocytes *in vitro* [118]. Les anticorps IgG anti TRAP spécifique au fragment C terminal ont été retrouvés en Thaïlande chez des patients souvent atteints de paludisme aigu mais pas chez ceux n'ayant pas une récente histoire d'exposition au paludisme, ceci pourrait suggérer une réponse immunitaire humorale labile durant les infections naturelles [151].

4.6. Immunité contre les stades érythrocytaires

Les sujets vivant en zone d'endémie produisent des anticorps contre les stades sanguins de *Plasmodium*. Les stades érythrocytaires n'expriment pas les molécules HLA de classe I ou II, ce qui suggère que ces formes mettent en jeu l'immunité humorale. En effet des expériences chez la souris ont montré une stimulation des

lymphocytes B avec production d'anticorps conduisant à l'élimination des parasites, [89] cependant des facteurs provenant des macrophages et d'autres cellules du système immunitaire inné interviennent (Figure 6). Un nouveau concept de vaccination utilisant de faibles doses d'hématies infectées par *P. falciparum* non atténués [167] a prouvé l'existence d'une immunité protectrice qui est corrélée à la réponse immunitaire cellulaire Th1 plutôt qu'à la réponse anticorps chez la souris (*P. chabaudi*) [54] et avec une réponse immunitaire robuste médiée par les cellules T chez l'homme (*P. falciparum*).

Cependant les mécanismes immunitaires qui confèrent une protection contre ces stades sanguins restent mal connus et doivent être encore étudiés pour emmener des réponses claires. Ainsi plusieurs antigènes des stades érythrocytaires sont en cours d'études pour déterminer leur rôle dans l'immunité protectrice contre *Plasmodium*.

Merozoite Surface Protein (MSP)

Parmi les protéines situées à la surface des mérozoïtes, MSP 1 a été parmi les plus étudiées et il a été montré que des anticorps dirigés contre cette protéine ont été retrouvés chez des sujets vivant en zone d'endémie [28 ; 77]. Des anticorps monoclonaux et polyclonaux inhibent la croissance du *Plasmodium in vitro* et des expériences d'immunisation chez les animaux ont été bien établies pour MSP1 faisant de cette protéine un candidat vaccin intéressant [71 ; 65].

Apical Membran Antigen 1(AMA1)

Une protéine retrouvée dans le pôle apical appelée Apical Membran Antigen 1(AMA1) contenue dans les rhoptries des mérozoïtes et intervenant dans l'invasion érythrocytaire entraîne la production d'anticorps naturellement acquis qui sont capables de bloquer l'invasion érythrocytaire par les mérozoïtes [108]. Chez

l'animal des expériences ont montré une protection après immunisation par une protéine recombinante d'AMA1 de *P. chabaudi* et *P. yoelii* des rongeurs [108], chez les singes avec *P. knowlesi* [150] et chez les humains, une étude au Kenya a montré que la protéine AMA1 était associée à la protection contre le paludisme [124].

Erythrocyte Binding Antigen 175 (EBA-175)

Plusieurs protéines codées par le gène Erythrocyte Binding Antigen 175 sont immunogènes en effet, des anticorps sont retrouvés chez les sujets vivant en zone d'endémie. La protéine EBA-175 est retrouvée dans le surnageant des cultures. Chez *P. falciparum* EBA-175 dispose d'un motif riche en cystéine qui est également présent dans les protéines de liaison appelés Duffy Binding Proteins de *P. vivax* et *P. knowlesi* [1 ; 2]. La protéine est divisée en plusieurs régions, annotées de I à VII. Ce domaine riche en cystéine est situé dans la Région II (RII) de la protéine. Cette région comprend deux domaines F1 et F2 et le site de liaison des globules rouges est situé principalement dans le domaine F2 [139 ; 136] qui lie la glycophorine A sur les érythrocytes humains selon une voie acide sialique dépendante [26 ; 115]. La structure cristalline de la région II d'EBA-175 a confirmé aussi bien la nécessité des besoins en acide sialique que la dimérisation de la glycophorine A [155]. En plus de la région II (RII) qui est le domaine de liaison, il y a un grand domaine dans la région dimorphique RIII connu sous le nom de segment F / C. Il a été démontré que la région II, et la région dimorphisme III d'EBA-175 subissent une sélection diversifiée sans doute due à la réponse immunitaire chez les sujets vivant en zone d'endémie [16 ; 32]. Des études antérieures ont montré la présence d'anticorps dirigés contre ces domaines [111], cependant l'impact fonctionnel de ces anticorps humains sur l'invasion érythrocytaire n'a pas encore été exploré. Des fragments de protéines

recombinantes incluant la région II et le peptide 4 sont reconnus par des anticorps élués par des clusters immunologiques du merozoïte [82 ; 31 ; 137].

Plusieurs études ont montré que les sujets vivant dans les zones d'endémie développent une réponse humorale contre EBA-175 [32 ; 111 ; 40 ; 141 ; 138 ; 120 ; 110 ; 116 ; 126]. Cependant la nature protectrice de ces anticorps n'est pas établie de manière précise. En effet certaines études ont rapporté que les anticorps dirigés contre les domaines d'EBA-175 montrent une corrélation positive avec la protection contre les signes cliniques du paludisme, mais pas avec la réinfection [126] alors que d'autres montrent une protection marginale mais pas significative [111]. Bien que les anticorps dirigés contre la région II d'EBA-175 induits chez les animaux de manière expérimentale ont une activité inhibitrice de l'invasion in vitro [141 ; 76 ; 96], peu d'études ont mesuré l'activité protectrice d'EBA-175 sur la protection contre les signes cliniques du paludisme chez l'homme.

La région II qui constitue le domaine de liaison d'EBA-175 est actuellement considérée comme un candidat vaccin [80 ; 140] en raison du niveau élevé de conservation des séquences mais aussi dans leur expression par les souches de laboratoire et de terrain [139 ; 94] et l'acquisition d'anticorps qui augmentent avec l'âge chez les populations vivant en zone endémique [111 ; 110]. Les études expérimentales chez l'animal du vaccin EBA-175 RII ont révélé qu'il était sans danger et immunogène, produisant des anticorps qui inhibent l'invasion et ont montré une protection clinique chez 1 des 3 singes *Aotus* vaccinés contre le paludisme [140]. Des expériences chez le lapin ont montré que des anticorps dirigés contre EBA-175 RII inhibent l'invasion quelle que soit la voie d'invasion utilisée [76]. Il a également été montré que les IgG totales acquises par les individus exposés au paludisme ont la capacité d'inhiber l'invasion des érythrocytes, en fonction de la voie d'invasion utilisée par les souches de laboratoire de *P. falciparum* [120].

Autres protéines

Plusieurs stades asexués peuvent également stimuler l'immunité dont PfEMP1 est impliquée dans l'immunité contre *Plasmodium* et est un antigène clé de l'immunité acquise naturellement [48 ; 86]. GLURP, MSP2, MSP3 et SERA5 qui sont abondamment exprimées à la surface des mérozoïtes, de même que les Pfrhs qui font l'objet de nombreuses études ces dernières années.

4.7. Evasion de l'immunité

Malgré l'attaque du système immunitaire, l'organisme est incapable d'éliminer *Plasmodium*. Pourquoi malgré la présence des anticorps en zone d'endémie l'infection survient presque toujours ? D'un coté les facteurs qui confèrent la protection restent encore mal connus et de l'autre le parasite dispose de moyens pour échapper à l'immunité.

En effet, la variation antigénique et le polymorphisme génétique constituent deux mécanismes importants utilisés par *Plasmodium* pour se protéger contre le système immunitaire de l'hôte.

4.7.1. Variation antigénique

De manière générale, le terme variation antigénique fait référence aux variations phénotypiques des antigènes régulés par différents gènes d'une population clonale de parasites durant l'infection naturelle. La variation antigénique est différente de l'immunité spécifique aux souches. Un individu vivant en zone endémique sera exposé à une série de vagues d'infection, en particulier au cours de la saison des pluies. Ainsi chaque pic d'infection correspond à un phénotype parasitaire différent

et suite à chaque infection il existe une immunité solide pour ce phénotype. Avec le temps, l'individu va par conséquent accumuler des anticorps pour un grand nombre de phénotypes plasmodiaux différents. Ce phénomène s'explique par la variation antigénique dans l'immunité. Les antigènes de surface, qui sont les plus exposés à la pression immune, sont les plus susceptibles de variation antigénique. Chez *P. falciparum* un groupe de gènes appelés *Var genes* [13] sont responsables de la variation antigénique (PfEMP1) retrouvée à la surface des globules rouges infectés a les propriétés des molécules de variation antigénique. Récemment deux autres grandes familles d'antigènes qui sont des molécules de surface variant selon les clones, appelés *rifins* [56] et *STEVOR* [84] ont été décrites bien que leur rôle dans l'acquisition de l'immunité reste inconnu à ce jour. Toutes, ces protéines exprimées à la surface des globules rouges infectés sont appelés *Variant Surface Antigens* (VSA) ou antigènes variant de surface et l'immunité dirigée contre ces antigènes est appelée immunité spécifique aux variants.

4.7.2. Polymorphisme génétique

Malheureusement *Plasmodium* est capable de mettre en place un autre mécanisme pour échapper au système immunitaire, le polymorphisme génétique. Les protéines cibles de l'immunité sont hautement polymorphiques, et l'immunité acquise contre un parasite ne confère pas une immunité contre l'infection avec un autre clone. Le meilleur exemple est AMA1 qui peut contrôler le développement de la maladie chez les modèles animaux [150] ce qui en fait un important candidat vaccin. Cependant AMA1 est hautement polymorphique avec plus de 150 haplotypes qui semblent présents dans les zones où le paludisme est endémique [47]. La réponse anticorps est généralement spécifique à un haplotype, de telle sorte que les

anticorps spécifiques à un haplotype d'AMA1 qui bloquent l'invasion érythrocytaire vont bloquer partiellement celle d'un haplotype différent. L'implication de ces polymorphismes pour le développement de vaccins est très importante. En effet les haplotypes de AMA1 peuvent être groupés en six sous populations donc la vaccination avec un membre d'une sous population peut protéger contre les parasites exprimant les autres membres de cette sous population [47]. La plupart des résidus polymorphiques d'AMA1 sont consacrés sur une face de la molécule donc l'autre face est hautement conservée. Ainsi le caractère polymorphique des antigènes candidats vaccins et leur implication dans la protection contre les souches de *Plasmodium* doivent être étudiés.

5. Candidats vaccins en cours d'études

Plusieurs candidats vaccins sont en cours d'étude. On distingue les vaccins pré-érythrocytaires, les vaccins érythrocytaires et les vaccins dirigés contre les stades sexués. La plupart des vaccins actuellement en phase d'essais sont dirigés contre un seul des stades parasitaires. Le vaccin le plus avancé actuellement cible la phase pré-érythrocytaire alors que plusieurs candidats vaccins de la phase érythrocytaire sont en cours d'étude. La mise au point d'un vaccin dirigé contre les stades érythrocytaires est rendu difficile par le nombre élevé d'antigènes retrouvés à leur surface qui peuvent être cible de l'immunité.

5.1. Stade pré-érythrocytaire: RTS,S

Dans les hépatocytes chaque sporozoïte subit une répllication dans une vacuole parasitaire, séparant ainsi le parasite du cytoplasme de l'hépatocyte. Un certain nombre de protéines parasitaires sont transportées sélectivement à travers la membrane vacuolaire vers le cytosol et dans le cas du Circumsporozoïte Protein (CSP), dans le noyau où la CSP influence l'expression de certaines de gènes hépatiques, créant un environnement idéal pour la croissance du parasite. [147]

Au cours des dix dernières années, le RTS,S a ouvert la voie, montrant une efficacité progressive chez les plus jeunes sujets et dans une variété de paramètres épidémiologiques, sanctionnée par une étude licenciée [9]. Il est actuellement en phase III d'essai clinique.

Dans une étude récente, effectuée chez des enfants, ce vaccin a montré une efficacité de 55,8% et de 34,8% contre le paludisme sévère. [3].

D'autres candidats vaccins de la phase pré-érythrocytaire sont en phase de développement et d'essais cliniques.

5.2. Stade érythrocytaire

Des anticorps spécifiques de certaines protéines parasitaires ont montré un rôle crucial dans le contrôle de l'infection à ce stade. Plusieurs protéines du mérozoïte [98] sont en développement comme candidat vaccin. Idéalement, la sélection des candidats vaccins contre la phase érythrocytaire sera guidée par une connaissance de la nature des anticorps qui confèrent une protection naturelle acquise chez les adultes immunisés. Malheureusement, on ne connaît pas la spécificité, l'affinité ou les isotypes d'anticorps qui confèrent une protection contre le paludisme.

Le génome de *Plasmodium* code pour environ 5600 protéines, faisant de l'identification des cibles de l'immunité protectrice une tâche ardue. En l'absence de telles connaissances, il est difficile de mettre en évidence des cibles rationnelles pour les anticorps protecteurs. Les ligands situés sur ces mérozoites semblent constituer d'intéressants candidats vaccins. *P. falciparum* utilise de nombreux ligands pour envahir les globules rouges, ce qui fait que les anticorps dirigés contre un seul ligand ne pourront pas empêcher l'infection. Un important candidat vaccin parmi les ligands parasitaires de l'invasion est l'Erythrocyte Binding Antigen 175 dont le récepteur est la glycopherine A [136]. En effet un vaccin recombinant de la région RII d'EBA-175 a été testé chez des adultes vivant aux USA et s'est montré non toxique et immunogène. [53]

Des protéines recombinantes de la membrane du mérozoite, de fonctions inconnues telles que MSPs et AMA1 ont été testées ou sont dans le processus d'être testés seuls ou alors sont en combinaison dans les phases II d'essais cliniques. A ce jour, un seul vaccin contenant une combinaison de protéines du mérozoite a montré une protection contre le stade érythrocytaire. [62]

Trois protéines relarguées en grande quantité par les globules rouges parasites lors de leur lyse, qui sont: Serine Repeat Antigen 5 (SERA5), la Glutamate-Rich Protein (GLURP) et Merozoite Surface Protein 3 (MSP3) sont également en cours de développement en tant que vaccin.

5.3. Stade sexué

Les vaccins qui bloquent la transmission ont pour cible le stade sexué du parasite chez le moustique vecteur, et peuvent réduire la transmission du paludisme. Ils entraînent une réduction durable de la transmission, lorsqu'ils sont utilisés en tant

que composant d'un programme de contrôle du paludisme, pouvant ainsi contribuer à une élimination locale de la maladie.

Les protéines Pfs25 et Pvs25 exprimées à la surface des ookinètes de *P. falciparum* et *P. vivax* respectivement qui sont des stades retrouvés chez le moustique sont les principaux candidats vaccins bloquant la transmission.

Ces deux vaccins ont été testés en essai clinique chez l'homme [103 ; 83]

Les anticorps développés chez certains de ces volontaires peuvent inhiber de manière significative le développement du parasite chez le moustique, cependant leur niveau était très bas pour un vaccin efficace [99].

6. Problèmes posés par la détermination de la parasitémie

Les manifestations cliniques du paludisme sont associées à la phase sanguine du cycle parasitaire du *Plasmodium*. Cette phase est caractérisée par une croissance exponentielle du parasite dans le sang, avec des cycles d'invasion, de développement et de rupture des hématies infectées. L'invasion efficace des érythrocytes et l'absence de sélection des érythrocytes pour l'invasion sont associées à la sévérité des manifestations cliniques [101]. L'efficacité de l'invasion érythrocytaire est évaluée par le taux de multiplication parasitaire ou « Parasite Multiplication Rate » (PMR) et l'index de sélectivité « Selectivity Index » (SI) [30]. Le taux de multiplication parasitaire (PMR) est le facteur de multiplication de la parasitémie initiale à chaque cycle durant la phase asexuée érythrocytaire, alors que l'indice de sélectivité (SI) est le taux d'érythrocytes multi-infectées, c'est-à-dire le nombre d'érythrocytes contenant plus d'un parasite par rapport à ceux attendus de manière randomisée, comme prédit par la distribution de Poisson, l'efficacité de l'invasion parasitaire et la sélectivité ont été précédemment mesurés par microscopie optique [142 ; 16 ; 41], cependant cette méthode est fastidieuse,

longue et biaisée. Les méthodes basées sur la cytométrie de flux ont été précédemment décrites pour *Plasmodium falciparum* [73 ; 20 ; 168], mais ne se sont pas intéressées aux études d'invasion. Notre objectif était de mettre au point un protocole utilisant un colorant appelé SYBR Green I, qui peut simultanément déterminer aussi bien la parasitémie que le nombre d'érythrocytes mono et poly-infectés, donnant ainsi une évaluation des phénotypes d'invasion possibles.

Deuxième partie : Travail expérimental

1. Sites d'étude

- Sites de recrutement des patients

Les participants à l'étude ont été recrutés à Thiès et à Vélingara.

Thiès est l'une des plus grandes villes du Sénégal, située à 70 km à l'Est de Dakar, sur la ligne du chemin de fer Dakar-Niger. La région de Thiès compte 1698412 habitants en 2011. La ville de Thiès présente une endémicité faible avec un taux d'inoculation entomologique (TIE) [123] inférieur à 5, et une morbidité de 20,7% en 2007 et 4,7 en 2008 % [121]. Le site prélèvement à Thiès est le service de Lutte antiparasitaire (SLAP) qui est une structure sanitaire du ministère de la santé qui a été érigé en district sanitaire dirigé par un médecin chef et qui a un rôle de diagnostic, de formation et de recherche. Elle comprend deux unités; la parasitologie et l'entomologie et joue un rôle prépondérant dans la prise en charge du paludisme dans cette zone.

La Section de lutte anti-parasitaire (SLAP), implanté dans la région de Thiès a été créée en 1953 en accord tripartite entre l'Organisation mondiale de la santé (OMS), le Fise (actuel Unicef) et le gouvernement français. Ce service avait pour objectif de parvenir à l'éradication du paludisme ceci par la lutte anti-vectorielle (utilisation insecticide à effet rémanent (DDT et HCH) dont la zone pilote était la région de Thiès. Le centre a réadapté ses actions vers des activités de lutte anti paludique visant le contrôle de la maladie. Sa mission est entre autres, d'effectuer des études et enquêtes épidémiologiques en collaboration avec les programmes nationaux et l'université. Le SLAP intervient dans des domaines qui font partie des axes prioritaires du plan stratégique du Programme Nationale de Lutte contre le

Paludisme (PNLP) dont le dépistage, la formation et la supervision du personnel de santé, la promotion et l'utilisation des moustiquaires imprégnées.

Le centre dispose maintenant des équipements modernes offerts par les Américains où des techniciens en laboratoire pourront être mieux formés à travers les microscopes.

La ville de Vélingara fait partie de la région de Kolda, elle située dans le Nord-est à 565 km de Dakar. La région compte près de 620.013habitants en 2011.

C'est une ville rurale qui vit principalement du commerce des produits agricoles locaux.

Le paludisme y est hyperendémique, avec une recrudescence saisonnière et un TIE d'environ 100 [123] (Figure 7), la prévalence était de 29, 2 % en 2008 et 12, 1 % en 2007 [121]. La ville compte un district sanitaire et plusieurs postes de santé, qui jouent un rôle primordial dans la lutte contre le paludisme. Le recrutement a été fait dans deux postes de Santé; Bonconto et Sare Coly.

- **Site de traitement des échantillons**

Les échantillons recueillis ont été acheminés à l'hôpital Aristide LeDantec, qui abrite l'unité de Biologie moléculaire constitué de deux sections dont celle de Malaria où les expériences ont été réalisées. L'hôpital Aristide LeDantec est un centre hospitalier national et universitaire, situé dans le centre ville de Dakar et qui est composé de plusieurs services cliniques, biologiques, radiologiques et chirurgicaux. La section Malaria a été créée en 2002 par une collaboration entre l'institut de santé publique de l'université de Harvard de Boston, et les Laboratoires de Bactériologie-Virologie de l'hôpital Aristide LeDantec et de Parasitologie de l'université Cheikh Anta Diop de Dakar. L'équipement a été

financé entièrement par les Américains qui ont également assuré la formation des chercheurs et le transfert de technologies. Ceci a permis à la section Malaria de disposer d'équipement permettant de réaliser des techniques de biologie moléculaire et les cultures parasitaires qui ont été nécessaires pour cette étude.



Figure 7: Sites de collecte et de traitement des échantillons

2. Patients et recrutement

Seuls les cas de paludisme simple à *P. falciparum* ont été inclus dans l'étude. Lorsque le patient est diagnostiqué positif, il lui est proposé de faire partie de l'étude.

Une fiche de consentement confectionnée à cet effet, traduite en français et en wolof et signée par le patient et l'investigateur a été remise au patient ou à son responsable légal s'il est mineur. Aucun prélèvement n'a été effectué avant l'obtention du consentement éclairé du patient ou de son responsable légal. Pour préserver la confidentialité des inclus, un code connu seulement par les responsables de l'étude est utilisé en guise d'identification.

Les critères d'inclusions sont ceux de l'OMS:

- Une infestation à *P. falciparum* uniquement, confirmée par une goutte épaisse;
- Taux d'hémoglobine ≥ 6 g/ dl
- Une absence de signes généraux de danger chez les enfants de moins de 5 ans ou d'autres signes de paludisme à *P. falciparum* graves et compliqués tels que définis actuellement par l'OMS;
- Une température axillaire supérieure ou égale à 37,5°C ou toute histoire de fièvre;

Les critères d'exclusion sont les suivants:

- Absence de consentement du malade ou de ses parents ou tuteurs pour les mineurs.
- Grossesse

– Paludisme grave

Le plasma utilisé pour les tests d'ELISA provient de patients sénégalais consentants, vivant à Thiès (133) et à Vélingara (94) et atteints de paludisme simple à *P. falciparum* au cours de la saison de transmission (Septembre à Décembre) en 2004 et 2005 pour les prélèvements de Vélingara.

Du plasma provenant de donneurs de sang (75) vivant dans une zone non endémique (Boston) a également été collecté et utilisé comme contrôle négatif pour les réactions ELISA.

Les souches de *P. falciparum* utilisées dans les études d'invasion et d'inhibition de l'invasion (66) ainsi que les plasmas pour la recherche d'anticorps proviennent de patients vivant à Thiès et ont été collectées durant les saisons de transmission 2009 à 2011.

Les patients présentant une parasitémie supérieure ou égale à 0,7 % ont été inclus dans cette étude. La parasitémie a été déterminée par microscopie optique en utilisant le réticule de Miller et par cytométrie de flux.

3. Méthodes

3.1. Etude génétique

3.1.1. Extraction de l'ADN

L'ADN parasite a été extrait à partir du sang prélevé sur papier filtre (Whatman) et séché à l'air libre. Cette extraction a été faite avec le kit QIAmp DNA mini kit (Quiagen kit, Germany) en suivant le mode opératoire du fabricant.

Les extrémités contenant le sang séché sont coupées, mises dans un tube eppendorf de 1,5 ml et mélangées avec 180 µl de Buffer ATL.

Elles sont incubées à 85 °C pendant 10 minutes puis centrifugées brièvement.

On ajoutera 20 µl de protéinase K. L'ensemble est mélangé au vortex puis incubé à 56 °C pendant 1 heure.

Une solution tampon appelée Buffer AL est ajoutée (200µl) puis mélangée entièrement au vortex et ensuite incubée à 70°C pendant 10 min. Il est essentiel pour la lyse, que l'échantillon et le tampon AL soient mélangés immédiatement et complètement.

Ajouter 200 µl d'éthanol (96-100%) à l'échantillon et mélanger entièrement au vortex.

Avec précaution, le mélange obtenu à l'étape précédente est mis dans la colonne QIAamp (fournie par le fabricant du kit) en évitant de toucher les bords. Le bouchon est fermé, et puis le tube est centrifugé à 8000 tours pendant 1 mn. La colonne QIAamp est placée dans un nouveau tube de 2 ml tandis que le tube contenant le filtrat est jeté.

Avec précaution, le bouchon de la colonne est ouvert et on y ajoute 500 µl de Buffer AW1, en évitant de toucher les bords. Fermer le capuchon et centrifuger à vitesse maximale environ 14000 tours par minute pendant 3 minutes.

Placer la colonne QIAamp dans un nouveau tube eppendorf de 1,5 ml et jeter le tube contenant le filtrat. Avec précaution, ouvrir le capuchon de la colonne et ajouter 150 µl de Buffer AE ou bien de l'eau distillée. On incubera à la température du laboratoire pendant 1 minute, ensuite on centrifugera à 8000 tours par minute pendant 1 minute.

3.1.2. Amplification du gène EBA-175

L'amplification du gène EBA-175 situé dans la région III (Figure 8) s'est faite par PCR nichée, les amorces et le programme utilisés sont décrits dans le tableau ci-dessous (Tableau III). Le produit de la première amplification a été utilisé pour la deuxième amplification, comme déjà décrite [11].

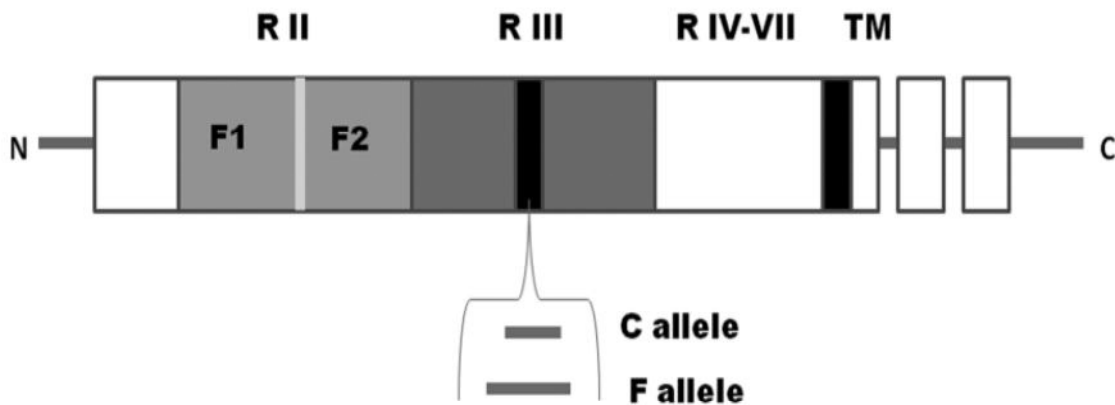


Figure 8: Domaines d'Erythrocyte Binding Antigen 175 (EBA-175)

Tableau III: Programme d'amplification de EBA 175

<p>Première amplification:</p> <p>Amorce sens : F1: 5'-CAA GAA GCA GTT CCT GAG GAA-3'</p> <p>Amorce anti sens: R1: 5'-TCT CAA CAT TCA TAT TAA CAA TTC-3'</p> <p>Deuxième amplification:</p> <p>Amorce sens: F2: 5'-CAA TTC CTC CAG ACT GTT GAA CAT-3'</p> <p>Amorce anti sens: R2: 5'-GAG GAA AAC ACT GAA ATA GCA CAC-3'</p>	
Programme (pour les 2 amplifications)	Volume réactionnel (pour les deux amplifications, 20µl)
1. 94 °C 5mn	Go Taq (dNTP, Mgcl2) 6 µl
2. 94° C 1mn	10pmol/µl sens 1 µl
3. 56°C 1mn	10pmol/µl antisens 1 µl
4. 72°C 2mn	ADN 1,5 µl
5. retour à 2 et répéter 29 fois	H ₂ O 10,5
6. 72°C 3mn	

Pour chaque prélèvement le produit de l'amplification est migré par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% puis visualisé sur une table à lumière UV après imprégnation de bromure d'éthidium.

Un produit de PCR à 795 paires de base (pb) indique une infection avec une ou des souches de *Plasmodium* présentant l'allèle F, alors qu'une bande à 714 pb correspond à la présence de l'allèle C (Figure 9). La présence des deux bandes indique une infection mixte, avec des souches différentes de *P. falciparum* présentant les allèles F et C.



M: Marqueur de poids moléculaire
1-12: Echantillons
Ligne 14: Allèle C
P: Contrôle positif 3D7: Allèle F
N: Contrôle négatif: H₂O

Figure 9: Migration sur gel des fragments F et C

3.1.3. Détermination des groupes sanguins

Les groupes sanguins ont été déterminés par la méthode de Simonin qui est un test utilisant des globules rouges tests permettant la détermination et l'identification des anticorps plasmatiques circulants. Le sérum ou le plasma du patient contenant les anticorps potentiels est mélangé avec des globules rouges A et B séparément. La présence ou l'absence d'agglutination permet de déterminer le groupe sanguin. Une agglutination avec les GR de groupe A et non avec les GR du groupe B signifie que le patient est du groupe B et vice versa. Une absence d'agglutination avec les GR A et B signifie que le patient est du groupe AB. Si on note une agglutination avec A et B alors le patient est du groupe O.

3.2. Etude parasitologique

3.2.1. Culture des parasites

La culture *in vitro* de *P. falciparum* s'est faite en présence de globules rouges O⁺ à 4% d'hématocrite dans le milieu RPMI-1640, supplémenté avec 25mM HEPES, 0,21 % de bicarbonate de sodium, 50 mg/l d'hypoxhantine et 0,5% d'albumax. Les manipulations ont été faites sous hotte. Les expériences d'invasion ont été réalisées en mélangeant des globules rouges infectés traités avec un mélange d'enzymes avec un volume équivalent de globules rouges non traités ou des globules rouges traités avec un mélange d'enzymes comme contrôle négatif. Les globules rouges infectés au stade trophozoite et provenant de patients sénégalais atteints de paludisme simple à *P. falciparum* ont été traités avec la 2-3, 6, 8- *Vibrio cholera* neuraminidase (66.7 mU/ml, Calbiochem), la trypsine (1 mg/ml, Sigma), et la chymotrypsine (1 mg/ml, Worthington) pour prévenir la ré-invasion. Les tests ont

été réalisés en double avec une parasitémie finale comprise entre 0,45 et 1 % à un hématocrite de 2 % dans du milieu de culture RPMI complet. Les cultures ont ensuite été mises dans une jarre gazé avec un mélange de CO₂, N₂ et d'O₂. Après 48h à 72 h d'incubation, la parasitémie est déterminée au microscope optique et par cytométrie de flux.

3.2.2. Mesure de la parasitémie par cytométrie de flux

200 µl de culture parasitaire synchronisée avec du sorbitol a été mis en culture dans des plaques de 96 puits pendant 48 h à une parasitémie de 1 %. Les échantillons ont été testés en triple et incubés à 37 °C jusqu'à ré-invasion. Les cultures ont été centrifugées à 1200 tours pendant 5 minutes pour récupérer les globules rouges dans le culot de centrifugation, et lavées deux fois avec 100 µl d'une solution de lavage constituée de PBS 1X (Phosphate Buffered Saline 1 fois normale) + 0,5 % de BSA (Bovine Serum Albumin) + 0,02 % d'azide de sodium. Les érythrocytes ont été incubés avec 75 µl de SYBR Green I (Molecular Probes) dilué à 1/1000^{ème}, pendant 20 minutes à 25-30 °C (température ambiante).

Les cellules ont été lavées avec la solution de lavage, et remises en suspension dans du PBS1X. Les données de cytométrie de flux ont été obtenues au FACSCalibur (Becton Dickinson) avec une acquisition de 100.000 événements par échantillon. La courbe initiale a été réalisée avec des érythrocytes, non infectés et non traités avec le SYBR Green I, pour compter leur autofluorescence. Les données ont été analysées avec le logiciel Flow Jo 8.8.6 (Tree Star).

3.2.3. Mesure de la parasitémie par microscopie optique

Des frottis minces ont été réalisés et la parasitémie a été déterminée comme étant le pourcentage d'érythrocytes infectés, le calcul a été fait par comptage de 500 érythrocytes en utilisant un réticule de Miller (nombre total d'érythrocytes 4.500). Les érythrocytes polyinfectés ont été comptés en utilisant un compteur avec une différentielle électronique.

3.3. Méthodes immunologiques

3.3.1. Expression des protéines recombinantes par repliement oxydatif

La protéine RII a été produite par repliement oxydatif optimisé pour les protéines de type Duffy [14 ; 95]. Les acides aminés de 145 à 761 de la région II (RII) provenant du gène EBA-175 de la souche de laboratoire 3D7 ont été exprimés à partir de la souche *E.coli* BL21 avec le vecteur pET-28. Les protéines dénaturées ont été extraites des cellules en utilisant une solution composée d'hypochloride de guanidine, 50mM Tris pH 8, 100mM NaCl, 5mM DTT. Le repliement a été fait par la méthode de dilution rapide 400 mM L-arginine, 50mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 2 mM de glutathione réduite, et 2mM glutathione oxydée. La protéine RII repliée a été concentrée avec *Amicon*, puis purifiée par chromatographie d'échange avec des colonnes *monoS*, puis par chromatographie par filtration utilisant des colonnes *superdex* 200 16/60.

3.3.2. Tests immunologiques ELISA

Les plasmas ont été testés pour la présence d'anticorps anti EBA 175 RII, F-segment et C-segment par Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Un mélange de sérum de patients vivant en zone d'endémie, à volume égal est utilisé

pour réaliser la courbe d'étalon, et des plasmas de sujets vivant à Boston comme contrôle négatif.

Les plaques de 96 puits ont été sensibilisées aux protéines recombinantes à la concentration de 0,1 µg/ml pour RII, 0,3 µg/ml pour F-segment, C-segment et GST dans du PBS et incubés pendant toute la nuit (environ 12 heures) à 4 °C. Les plaques ont été ensuite lavées trois fois avec du PBST (PBS 1x + 0,05 % Tween 20), puis les sites de fixation non spécifiques ont été saturés avec une solution de lait à 1% diluée dans du PBST et incubées pendant 2 heures à température ambiante (25-30°C).

Les plaques ont été lavées trois fois avec du PBST et les plasmas des patients ont été ajoutés individuellement et en double à une dilution de 1/800^{ème}, puis incubées à température ambiante pendant 2 heures. Après trois lavages avec du PBST, l'anticorps secondaire qui est une IgG anti humaine provenant de la chèvre et conjugué à du HRP est rajouté aux plaques à une dilution de 1/8000^{ème}, l'incubation est faite pendant deux heures à température ambiante. Les plaques sont lavées cinq fois avec du PBST, puis 100 µl de Sureblue TMB substrate (KPL) sont ajoutés à chaque puits, au bout de dix minutes la réaction est arrêtée en ajoutant un volume égal d'acide chlorhydrique 1N filtré, cette dernière étape est réalisée dans la même salle où se trouve le lecteur ELISA ceci pour éviter la prolongation de la réaction qui pourrait causer des précipitations. Les densités optiques ont été lues à 450 nm avec un lecteur d'ELISA. Pour les protéines qui ont été liées au GST (protéines recombinantes F et C), la densité optique du GST a été soustraite de la DO de la protéine (ce qui donne une DO spécifique) pour l'analyse des données. La densité optique (DO) est lue au spectrophotomètre à 450nm.

Le Contrôle négatif est constitué de sérum de sujets non exposés au paludisme, vivant à Boston (USA) pour déterminer le seuil de positivité (toute réactivité

inférieure ou égale à ce seuil est considérée comme négative, et positive si la réactivité est supérieure à ce seuil).

3.3.3. Purification des anticorps de patients

Des plasmas provenant de 200 patients vivant à Vélingara qui est une zone hyperendémique ont été groupés et utilisés pour purifier les anticorps anti RII, anti F-segment et anti C-segment. La protéine RII a été couplée aux colonnes CNBr. Les protéines utilisées pour capturer ces anticorps sont couplées à des colonnes de sépharose (sigma). La chromatographie a été réalisée avec les colonnes AktaFPLC (GE Healthcare) en utilisant les techniques standards. Les sérums groupés ont été dilués au 1/10^{ème} avec du PBS et chargés dans les colonnes à la vitesse de 1ml/min. La colonne a été lavée avec du PBS jusqu'à ce que la densité optique lue à 280 nm soit stable.

Les anticorps ont été élués avec 100 mM de glycine (pH 2, 5) en fractions de 500 µl dans des puits contenant 50 µl de Tris HCl (pH 8,0). Les fractions contenant des pics sont groupées, dialysés dans du PBS 1X et concentrées. Des anticorps dirigés contre les protéines recombinantes d'EBA175 ont été testés pour l'enrichissement et la spécificité par ELISA.

3.3.4. Tests d'invasion

Les expériences d'invasion ont été réalisées comme décrites ultérieurement [49]. Des globules rouges parasités ont été incubés avec des globules rouges traités par des enzymes dans un volume final de 50 µl à un hémocrite de 2 % et incubés pendant environ 48 heures. Les érythrocytes ont été traités avec les enzymes suivants: la neuraminidase (66.7mU/ml), la trypsine (1.0mg/ml), la chymotrypsine

(1.0mg/ml), le mélange faible trypsine/chymotrypsine, et le mélange neuraminidase-trypsine-chymotrypsine comme contrôle négatif et des globules rouges traités re-suspendus dans du milieu de culture RPMI comme contrôle positif. Après ré-invasion, les cultures sont lues par microscopie optique et par cytométrie de flux utilisant le SYBR Green par la méthode déjà décrite [18]. Les données obtenues par cytométrie de flux ont été analysées avec le logiciel FlowJo 8.8.6 (Tree Star). Les critères de réussite pour un test d'invasion sont un taux de multiplication parasitaire (PMR ou Parasite Multiplication Rate) supérieur ou égal à 1 et le contrôle positif de l'invasion doit être au moins deux fois supérieur au contrôle négatif (RPMI invasion/NTC invasion > 2).

3.3.5. Tests d'inhibition de l'invasion

Les anticorps purifiés par affinité ont été testés sur les souches de terrain isolées à Thiès, ils ont été incubés avec des souches de terrain à une concentration finale de 10 ou 50 µg/ml (ou de 0 à 200 µg/ml) pour un cycle d'invasion (48 H). Après ré-invasion la parasitémie est mesurée par cytométrie de flux. La parasitémie initiale est comprise entre 0,7 et 1 %. L'expérience a été réalisée avec des globules rouges normaux et aussi avec des globules rouges traités par la chymotrypsine. Les globules rouges traités et non traités sont dilués à un hémocrite de 4 % et incubés avec des érythrocytes infectés pour avoir une parasitémie comprise entre 0,3 et 0,5 % dans 25 µl par puits, en double. Les parasites ont été incubés pendant 48 H ou jusqu'à ré-invasion (déterminée par lecture au microscope optique pour chaque échantillon).

3.4. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été effectuées avec les logiciels SPSS 16.0, STATA 11.0 (College Corporation, Tx, USA) et GraphPadPrism 5. Les tests ont été considérés significatifs si le P-value était inférieur à 0.05.

Les comparaisons de l'inhibition des anticorps anti RII en fonction de la voie d'invasion ont été faites en utilisant le Mann-Whitney U test.

Les comparaisons entre l'inhibition de l'invasion avec les globules rouges non traités et les globules rouges traités par la chymotrypsine ont été réalisées avec le test non paramétrique apparié (non-parametric paired t-test).

Les corrélations entre les données de la microscopie et de la cytométrie de flux ont été réalisées avec le coefficient de corrélation de Spearman.

4. Résultats

4.1. Caractéristique de la population d'étude

- Etude génétique

Elle a inclus 129 patients atteints d'accès palustre simple à *P. falciparum*, comprenant 38% de femmes avec un sexe ratio de 1,78. Ces patients étaient âgés de 1 à 75 ans dont 85% âgés de plus de 10 ans. La population d'étude a été divisée en deux classe d'âge de ≤ 10 ans et > 10 ans parce que la majorité des patients sont adultes et que Thiès est une zone hypoendémique. La répartition de la population d'étude par classe d'âge est présentée dans le tableau IV.

Tableau IV: Distribution de la population d'étude selon l'âge

Age	Nombre	Pourcentage
[0 - 10 ans]	20	15,5
plus de 10 ans	109	84,5
Total	129	100,0

- Etudes immunologiques

La recherche d'anticorps par ELISA s'est faite sur 227 échantillons dont 133 provenant de Thiès et 94 provenant de Vélingara. Les tests d'invasion et d'inhibition de l'invasion ont inclus 66 échantillons.

Les patients étaient âgés de 1 à 66 ans avec un sexe ratio de 1, 8 en faveur des hommes. La moyenne d'âge globale de 20, 3 ans alors qu'à Vélingara elle est 12, 7 ans et 24, 7 ans à Thiès.

4.2. Etude génétique

4.2.1. Parasitémie et âge

Les parasitémies ont été rapportées en pourcentage dans cette étude et varient entre 0,1 (4500 Parasites/ μ l) et 12,5 % (562.500 P/ μ l) avec une moyenne de $2,2 \pm 0,4$

(99.000 ± 18.000 P/ μ l). Une corrélation négative significative a été retrouvée entre l'âge et la parasitémie ($P = 0,011$).

4.2.2. Prévalence des allèles et des groupes sanguins

Le génotypage a montré que 67,5% ($n = 129$) des patients présentaient le segment F, 27,9% le fragment C et 4,6% présentaient les deux segments (Figure 10).

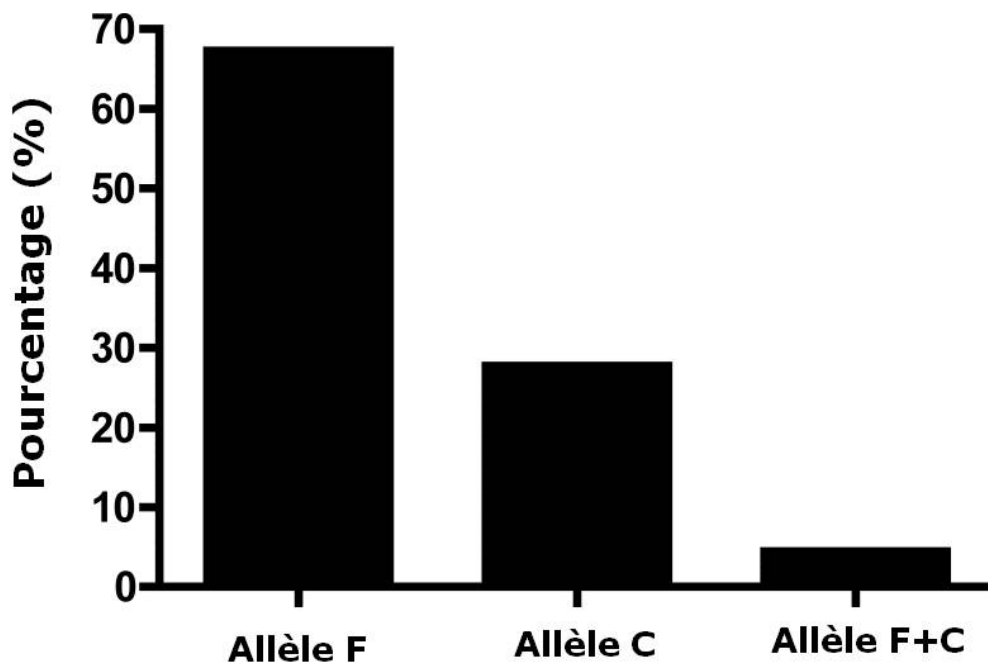


Figure 10: Distribution des allèles d'EBA-175

Parmi les patients ($n = 122$, pour les 7 patients restant les plasmas n'ont pas été retrouvés) pour lesquels la détermination des groupes sanguins a été réalisée, 59,

8% étaient du groupe O, 19,7% du groupe A, 17,2 du groupe B et 3,3% du groupe AB (Figure 11).

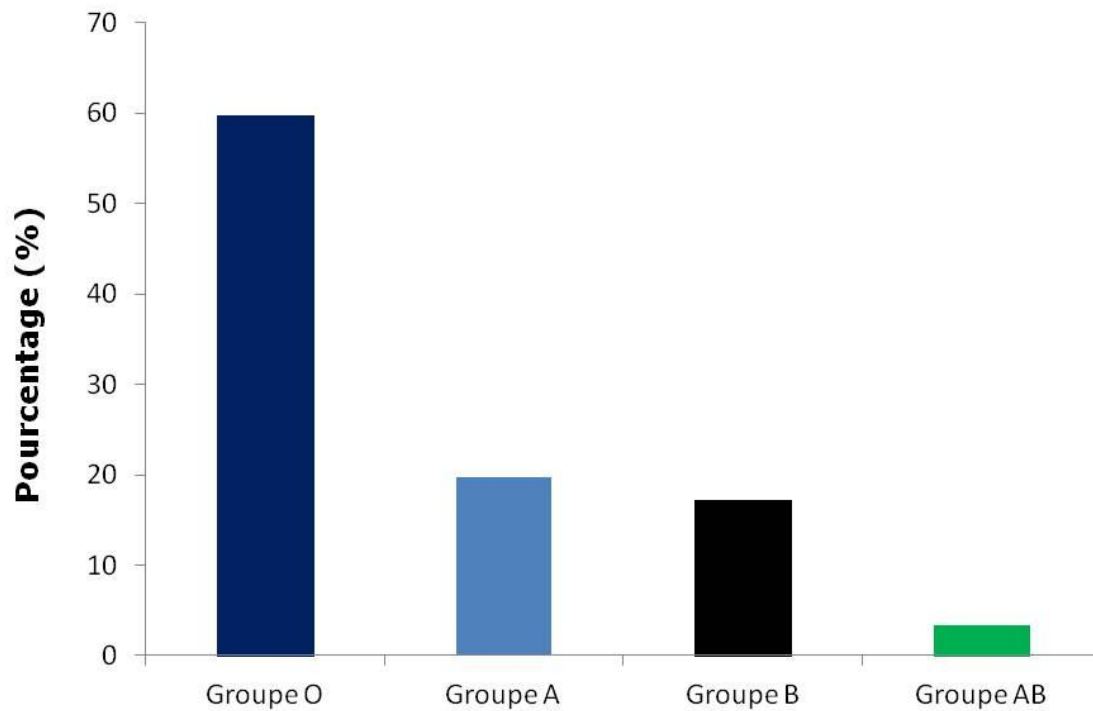


Figure 11: Distribution des groupes sanguins

4.2.3. Distribution des fragments F et C selon le groupe sanguin

La distribution des fragments F et C au sein des différents groupes sanguins a été étudiée.

Dans le groupe O, le fragment F d'EBA-175 est présent chez 67% des sujets, tandis que 26% ont le fragment C et 6% les deux fragments.

Dans le groupe A, il est noté une prédominance du fragment F avec 63% et le fragment C représente 37%, la présence des deux fragments n'est pas retrouvée.

Dans le groupe B, le fragment F est présent avec 71 %, suivi du fragment C, 19 % et de l'association 10 % . (Figure 12).

Dans le groupe AB le fragment F représente 75% et le fragment C 25 % et l'association n'est pas retrouvée.

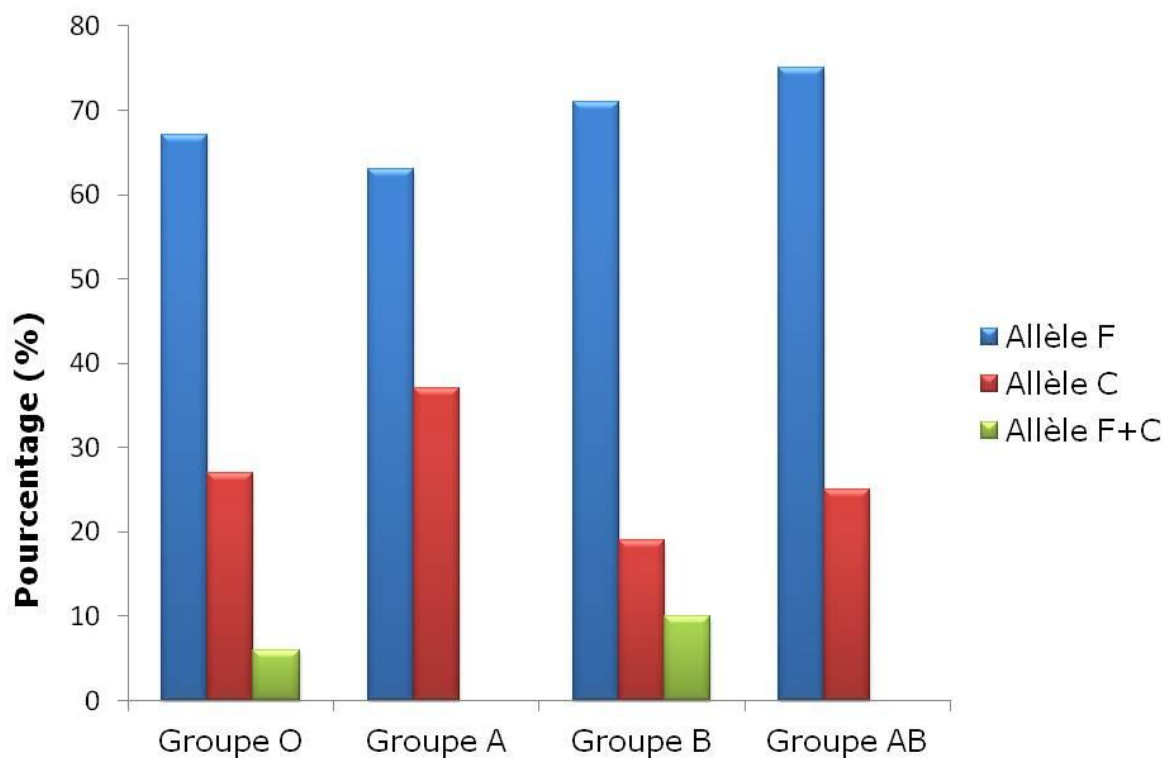


Figure 12: Distribution des allèles d'EBA-175 selon les groupes sanguins

4.2.4. Relation entre les allèles F/C et l'âge

Le fragment F était prédominant dans les deux groupes d'âge, 80% chez les moins de 10 ans et 70,6% chez les plus de 10 ans. Pour ce qui concerne l'allèle C, les moins de 10 ans représentent 20% et les plus de 10 ans 34,9% (Tableau V).

Les allèles du gène EBA 175 ne présentent aucune corrélation avec l'âge. ($p > 0,05$).

Tableau V: Distribution du fragment F dans les classes d'âge

Age	Présence F	Absence F	Total	p-value
< 10 ans	80% (16)	20% (4)	100% (20)	
≥ 10 ans	70,6% (77)	29,4% (32)	100% (109)	0,391
Total	72% (93)	27,9% (36)	100% (129)	

4.2.5. Relation entre les allèles F/C et la température, parasitémie et sexe

La température corporelle a été mesurée pour chaque patient à l'inclusion c'est à dire à J_0 et varie de $36,1^{\circ}\text{C}$ à 41°C avec une moyenne de $38,8 \pm 0,3$. Aucune corrélation avec la densité parasitaire n'a été notée ($p=0,405 > 0,05$ non significatif).

Il n'y avait pas non plus de corrélation entre les allèles d'EBA-175 et le sexe ou la température (Tableau VI).

Tableau VI: Relation entre les allèles F et C et le sexe, la DP et la température

Paramètres	Sexe/allèle	Temp/allèle	DP/allèle	Sexe/allèle	Temp/allèle	DP/allèle
	F	F	F	C	C	C
Pearson correlation	0,347	0,455	0,989	0,685	0,161	0,659

4.3. Etude parasitologique

4.3.1. Concordance entre la microscopie optique et la cytométrie de flux

La souche de laboratoire HB3 a été diluée en série et la parasitémie mesurée par cytométrie de flux. Une corrélation linéaire ($R_2 = 0,99666$, Figure 12A) a été retrouvée dans la détermination de la parasitémie entre les deux méthodes, avec une limite de détection de 0,2 % (Tableaux VII, VIII et IX).

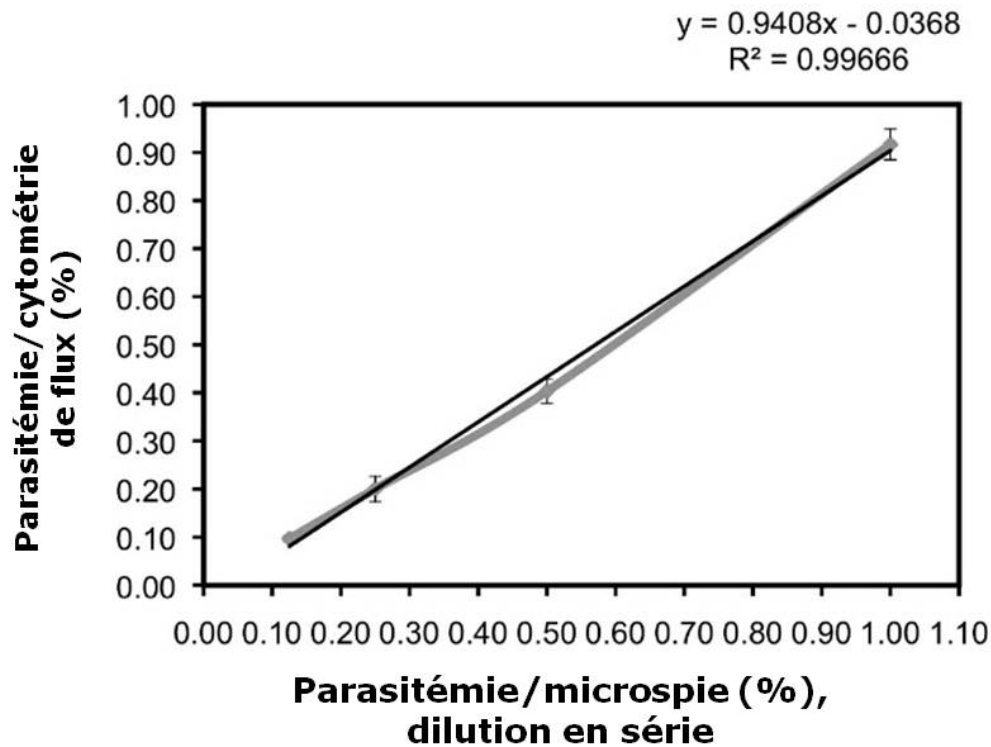


Figure 12 A: **Corrélation entre la microscopie optique et la cytométrie de flux**
Précision de la cytométrie de flux pour la détermination de la parasitémie durant le premier cycle de développement du *Plasmodium*.

La cytométrie de flux fournit des déterminations précises de la parasitémie de *P. falciparum*. Cette expérience montre une très grande corrélation entre la microscopie et la cytométrie de flux avec un $R_2 = 0,99666$ entre ces deux méthodes.

Les points individuels représentent la parasitémie moyenne des triplicata pour chaque échantillon et les bars d'erreur l'écart-type.

Tableau VII: Nombre de parasites par hématie lue par la microscopie optique pour la souche HB3

	Mono	Double	Triple	Total
Microscopie	43	8	1	52
% Total	0,83	0,15	0,019	100

Tableau VIII: Nombre de parasites par hématie lue par la cytométrie de flux pour la souche HB3

1% A	0,7	0,1	0,01	0,93
1% B	0,7	0,09	0,02	0,94
1% C	0,67	0,09	0,01	0,88
Moyenne	0,69	0,093333	0,013333	0,916667
% Total	0,752727	0,101818	0,014545	

Tableau IX: Comparaison entre la microscopie et la cytométrie de flux (HB3)

Microscopie	FACS	Standard Déviation
1,000	0,916667	0,032146
0,500	0,403	0,025166
0,250	0,200	0,026458
0,125	0,097	0,005774

B

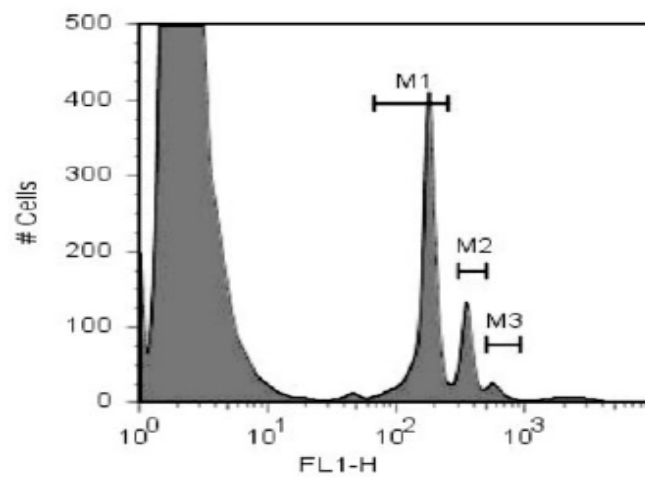


Figure 12B : Mise en évidence des érythrocytes polyinfectés

La cytométrie de flux permet de compter les érythrocytes mono et polyinfectés. Après coloration avec le SYBR Green I, 100.000 globules rouges ont été comptés

et trois pics apparaissent correspondant à des érythrocytes mono, double et triplement infectés.

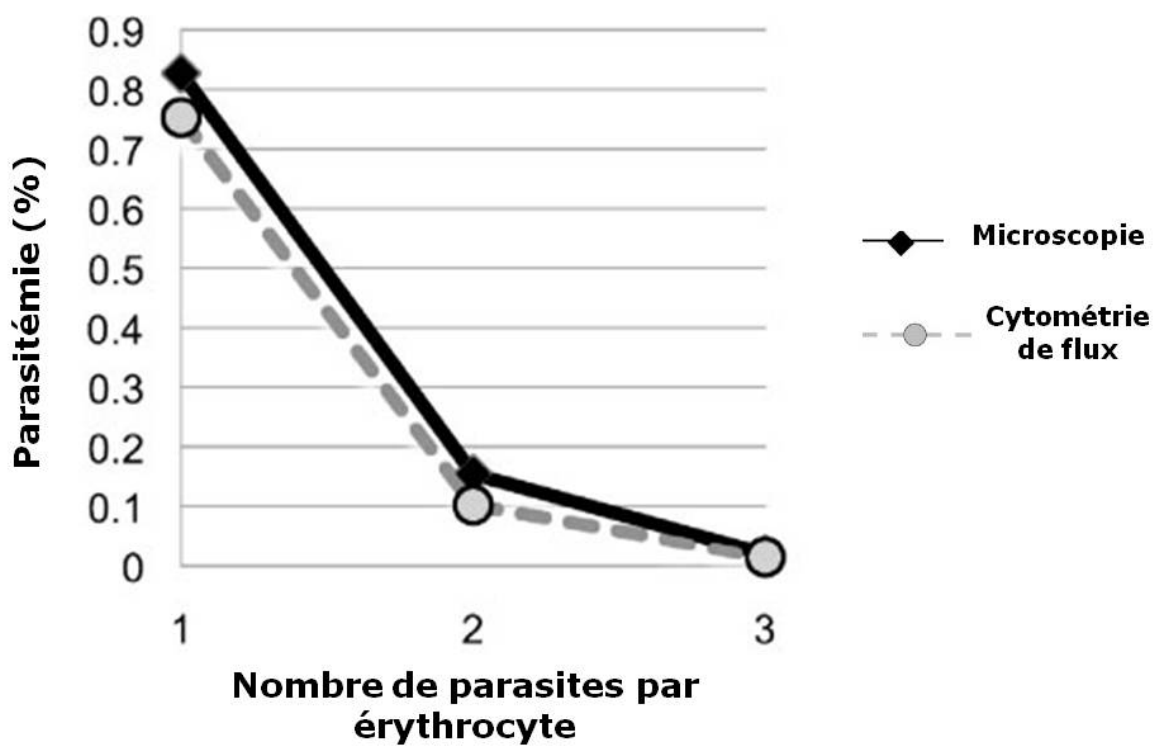


Figure 12C: Expérience 1

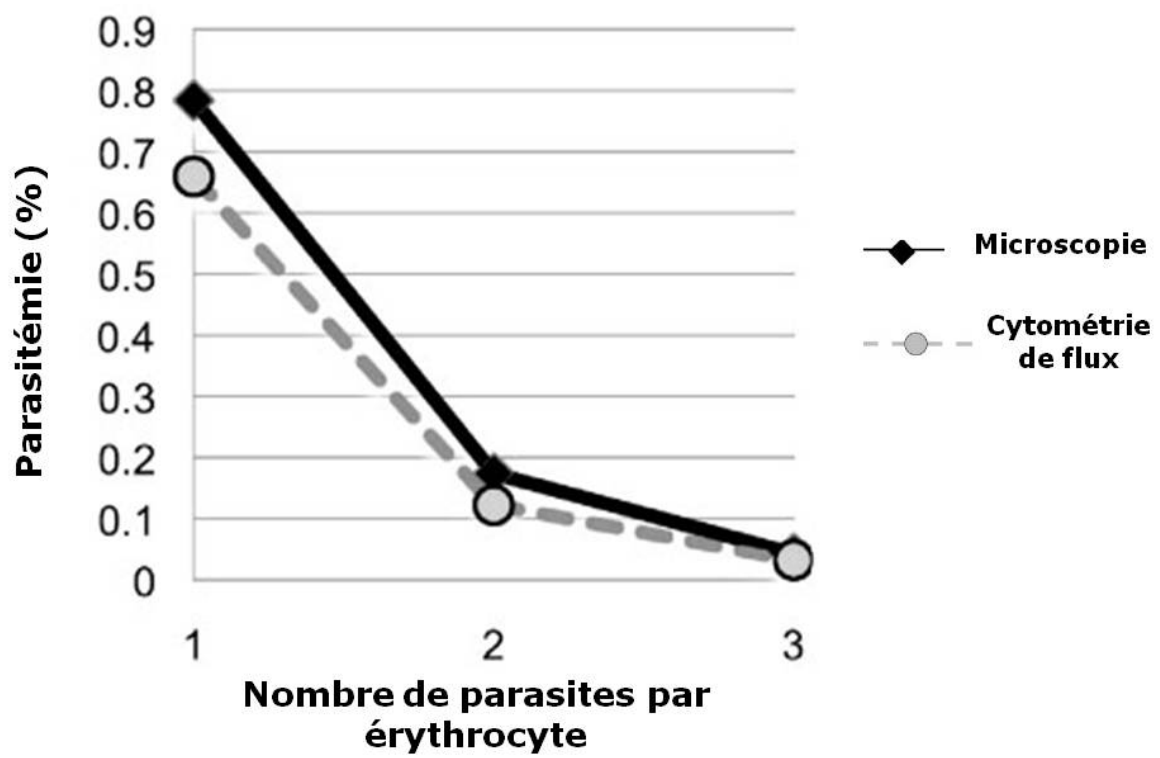


Figure 12D: Expérience 2

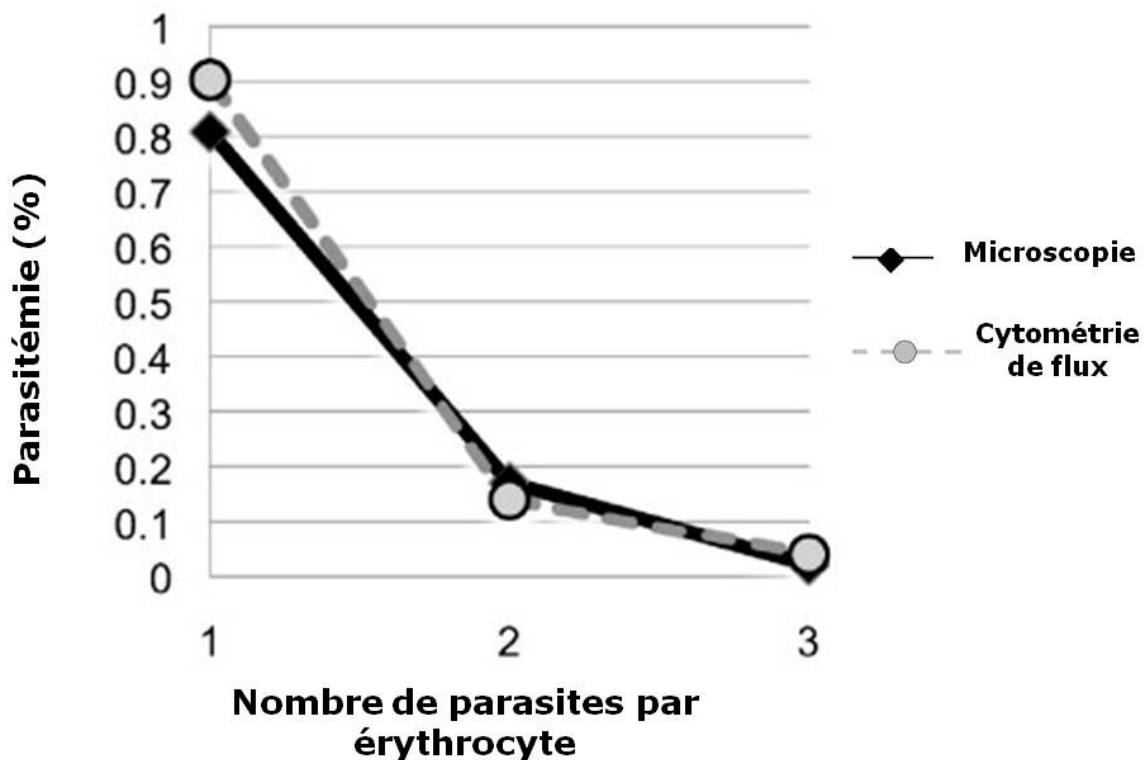


Figure 12E: Expérience 3

Figure 12C, D et E: les érythrocytes mono, doublement et triplement infectés ont été comptés par cytométrie de flux et par microscopie. La parasitémie calculée par les deux méthodes a montré une grande corrélation et une très bonne reproductibilité entre les expériences.

4.3.2. Résolution des érythrocytes multi-infectés par la cytométrie de flux

La grande concordance de la parasitémie déterminée par microscopie et par cytométrie de flux pour différencier les érythrocytes polyinfectés, est attribuée à l'habilité de résolution de la cytométrie de flux pour les érythrocytes mono,

doublément et triplement infectés (12B). Comme cela a été démontré par les deux méthodes, les érythrocytes poly-infectés sont beaucoup moins nombreux que les érythrocytes mono-infectés. Les érythrocytes contenant plus de trois parasites n'ont pas une bonne résolution avec la cytométrie de flux. Cependant, la détermination par microscopie optique a montré que ce phénomène est rare avec les souches de terrain, moins de 0,01% (Tableau X).

Nous avons compté le nombre d'érythrocytes mono et polyinfectés avec trois expériences (Tableau XI). Toutes ces expériences ont montré une parasitémie exacte des érythrocytes infectés aussi bien mono que polyinfectés (Fig 12C).

Tableau X: Parasitémie déterminée par la microscopie optique

	Parasitemia		Mono parasitemia		Double parasitemia		Triple parasitemia		Poly parasitemia	
Th 114 Parasitémie Initiale	0,52	0,53	0,48	0,38	0,036	0,14	0	0	0	0
Th114 RPMI	2,56	2,13	1,50	1,56	0,58	0,41	0,48	0,17	0,23	0,13
Th 116 Parasitémie Initiale	0,66	0,66	0,59	0,63	0,069	0,035	0	0	0	0
Th116 RPMI	1,02	1,08	0,77	0,75	0,18	0,29	0,073	0,033	0	0,033
Th133 Parasitémie Initiale	0,93	1,11	0,89	1,04	0,03	0,07	0	0	0	0
Th133RPMI	2,03	2,14	1,39	1,56	0,50	0,41	0,14	0,17	0,03	0,03
Th148 Parasitémie Initiale	0,36	0,33	0,36	0,33	0	0	0	0	0	0

Th148 RPMI	1,26	1,26	0,84	0,76	0,35	0,36	0,07	0,14	0,03	0,03
------------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

Tableau XI: Parasitémie déterminée par la cytométrie de flux

	Parasitemia		Mono parasitemia		Double parasitemia		Triple parasitemia		Poly parasitemia	
Th 114 Parasitémie Initiale	0,82	0,79								
Th114 RPMI	2,94	2,96	1,67	1,68	0,88	0,88	0,38	0,38	0,18	0,17
Th 116 Parasitémie Initiale	1,04	0,87								
Th116 RPMI	1,3	1,32	0,94	1,99	0,29	0,24	0,07	0,08	0	0
Th133 Parasitémie Initiale	1,55	1,59								
Th133RPMI	2,23	1,89	1,59	1,58	0,49	0,41	0,148	0,048	0	0
Th148 Parasitémie Initiale	0,4	0,45								
Th148 RPMI	1,03	1,41	0,64	0,89	0,30	0,39	0,087	0,127	0,004	0,046

4.3.3. Validation du protocole

La cytométrie de flux présente l'utilité de mesurer la parasitémie *in vivo* et *ex vivo*.

Pour valider notre méthode basée sur la cytométrie de flux, nous avons évalué la parasitémie d'échantillons provenant de patients sénégalais *ex vivo* et des cultures incubées pendant un cycle parasitaire c'est-à-dire 48 heures (Figure 13). Trois souches provenant de patients atteints de paludisme simple à *P. falciparum* ont été testées.

Nous avons trouvé que la mesure de la parasitémie totale par cytométrie de flux était reproductible, précise et en concordance avec la parasitémie calculée par microscopie pour les expériences d'invasion *ex vivo* (Figure 13A). De plus, cette méthode permet de détecter les différences entre la parasitémie *in vivo* c'est-à-dire obtenu par comptage direct à partir du sang du malade et la parasitémie *in vitro* ou *ex vivo* qui est obtenue par culture, et le nombre de parasites par érythrocyte infecté (Figure 13B, D et F). En effet, alors que la plupart des parasitémies *in vivo* sont constituées d'érythrocytes mono-infectés, la parasitémie *ex vivo* montre plusieurs érythrocytes poly-infectés, de plus, on note plus d'infection multiple avec les cultures *ex vivo* qu'avec les cultures *in vitro* d'adaptation au laboratoire (13C, E et G). De plus, nous avons montré une bonne concordance entre les mesures des multi-infections par microscopie et par flow pour les isolats *ex vivo*, ce qui est similaire à ce qui a été noté pour les souches de laboratoire. Ces résultats indiquent que notre méthode basée sur la cytométrie de flux est robuste et précise pour la détermination des parasitémies lors des tests d'invasion érythrocytaire, aussi bien pour les isolats adaptés en culture que pour les souches de terrain, cette méthode est applicable pour la détermination des parasitémies durant les études d'invasion ou d'inhibition de l'invasion *ex vivo*.

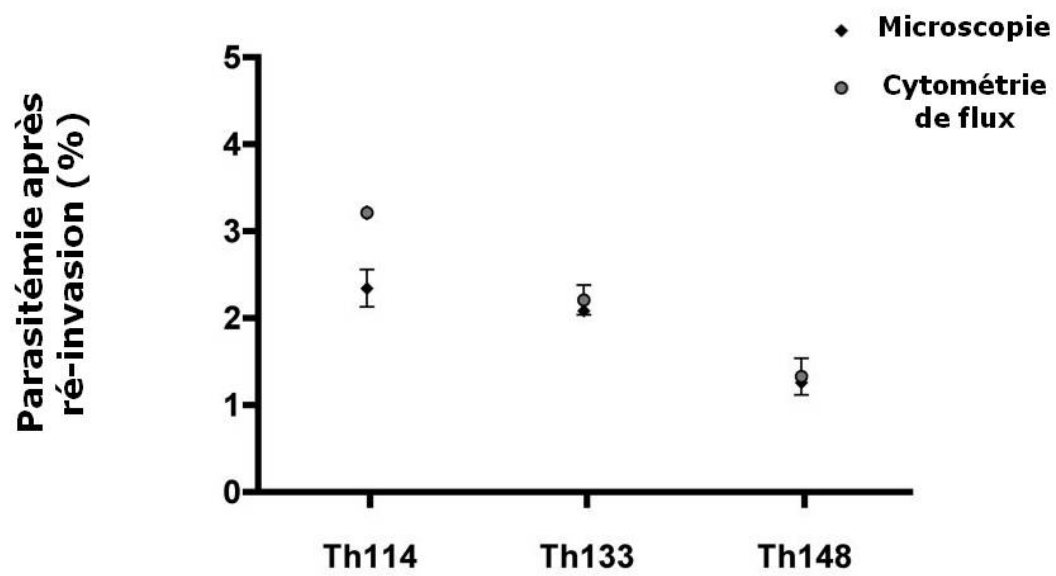


Figure 13 A: Comparaison entre la cytométrie et la microscopie optique

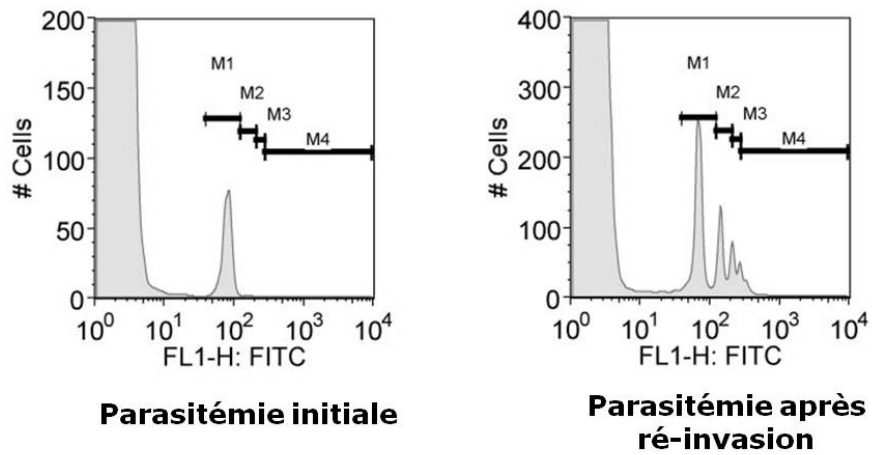


Figure 13B: Parasitémie lue par la cytométrie de flux (Th114)

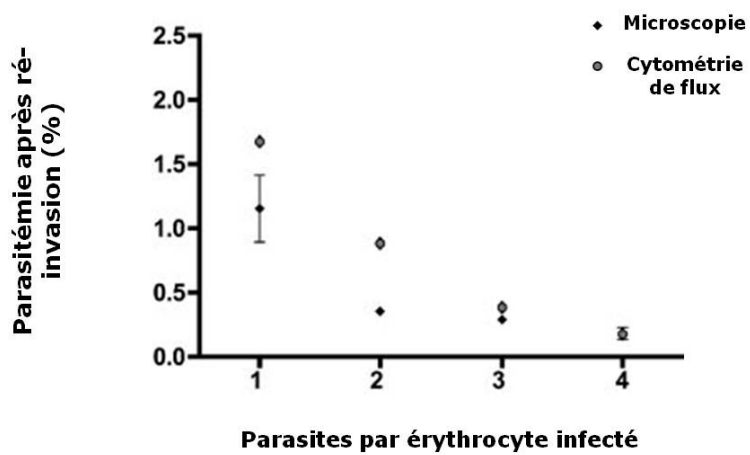


Figure 13C: Comparaison des parasitémies lues par la microscopie optique et la cytométrie

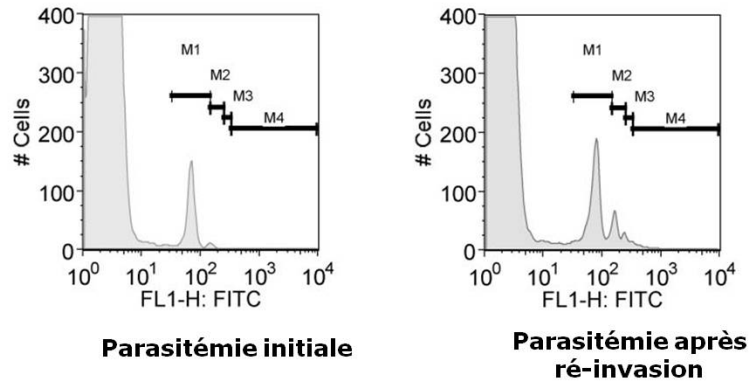


Figure 13D: Parasitémie lue par la cytométrie de flux (Th133)

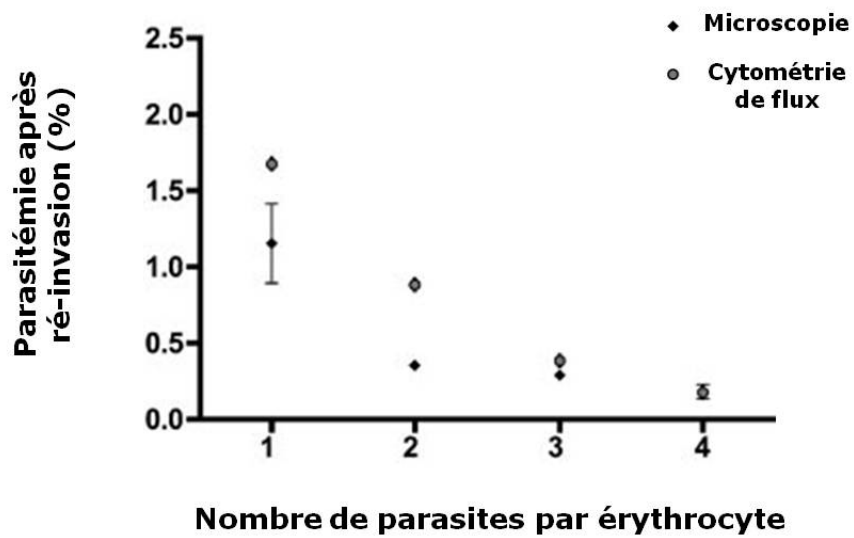


Figure 13E: Comparaison des parasitémies lues par la microscopie optique et la cytométrie

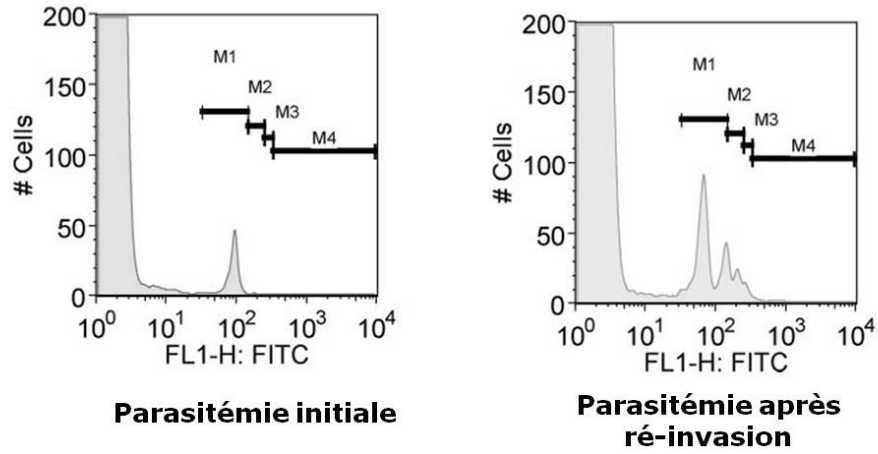


Figure 13F: Parasitémie lue par la cytométrie de flux (Th133)

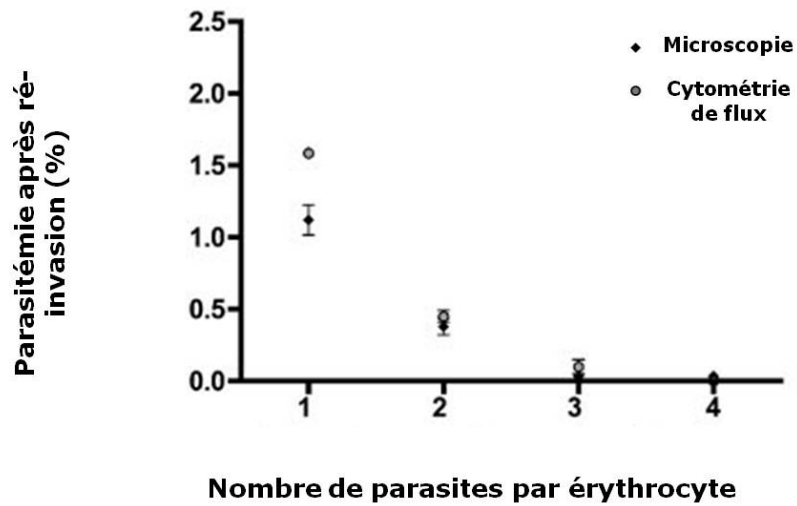


Figure 13G: Comparaison des parasitémies lues par la microscopie optique et la cytométrie

4.4. Etudes immunologiques

4.4.1. Reconnaissance immune de la région II d'EBA 175

Pour déterminer la réactivité immunitaire d'EBA-175, nous avons mesuré les niveaux d'IgG contre une protéine recombinante pure et soluble de la région II (RII) [Figure 14A]. Ces anticorps ont été déterminés chez 133 patients à Thiès et 94 provenant de Vélingara et nous avons trouvé un taux de positivité de 35 % dans la population d'étude totale. Ensuite parce que les deux zones sont d'endémicité différente, nous les avons analysées par zone et à Thiès nous avons observé un taux de positivité de 29, 32 %, et à Vélingara ce taux de positivité est légèrement plus élevé avec 30,85 % [Figure 14]. Nos résultats montrent que l'acquisition de ces anticorps est âge dépendante à Vélingara (Fisher Exact test, $p < 0.001$) (Figure 14C), mais cette corrélation n'est pas retrouvée à Thiès (Fisher Exact test, $p = 0.133$) (Figure 14B). De même, les concentrations d'anticorps dirigés contre la région II n'augmentent pas significativement avec l'âge à Thiès (Mann-Whitney U-test, $p = 0.0894$) (Figure 14D) alors qu'à Vélingara l'augmentation des titres d'anticorps est significativement corrélée à l'âge (Mann-Whitney U-test, $p = 0.0001$) (Figure 14E). Ces données démontrent la présence d'anticorps dirigés contre les domaines d'EBA-175 au Sénégal.

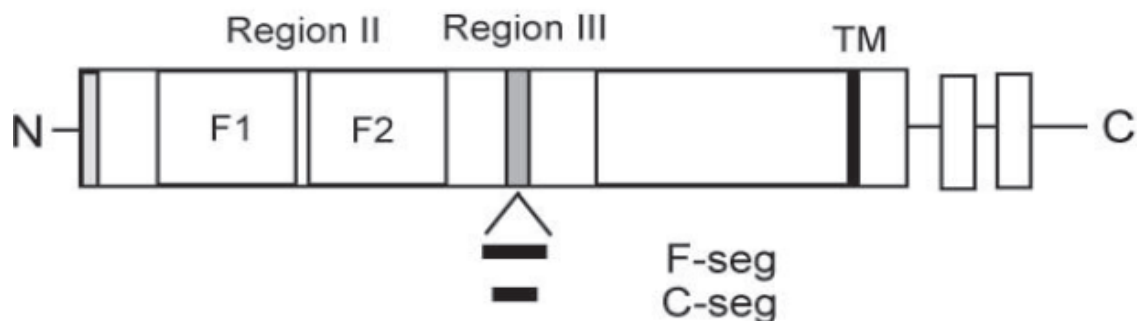


Figure 14A: Différents domaines d'EBA-175

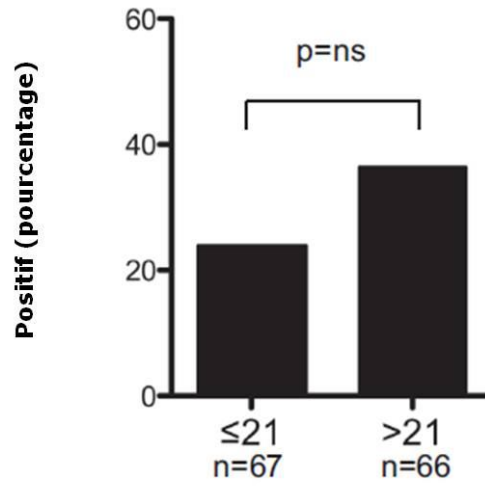


Figure 14B : Positivité des anticorps en fonction de l'âge à Thiès

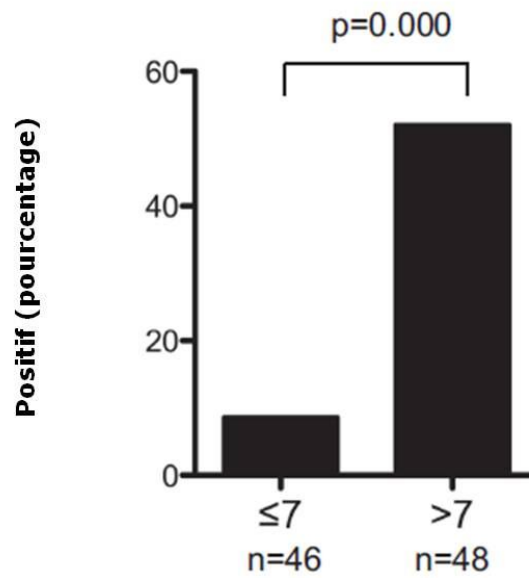


Figure 14C : Positivité des anticorps en fonction de l'âge à Vélingara

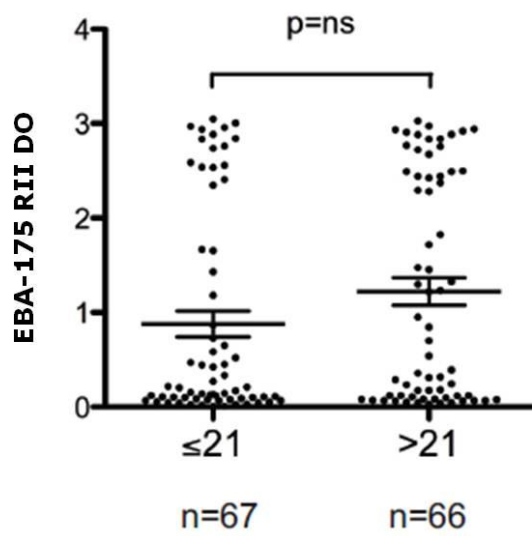


Figure 14D: Densité optique des échantillons par ELISA (Thiès)

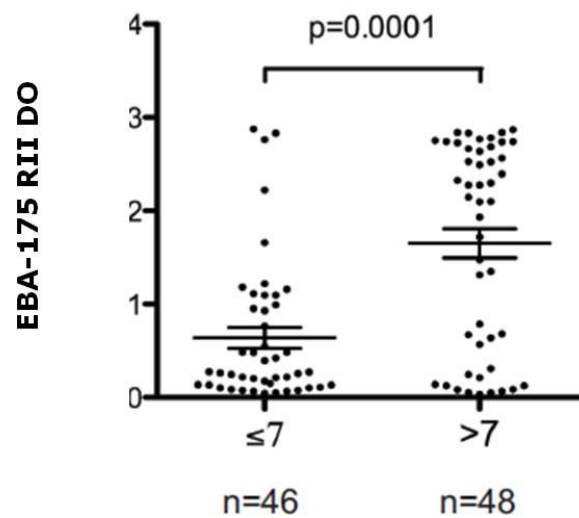


Figure 14E: Densité optique des échantillons par ELISA (Vélingara)

4.4.2. Inhibition de l'invasion des souches de terrain et de laboratoire par les anticorps anti-RII

Les anticorps anti-RII purifiés par affinité ont montré un enrichissement de 1000 fois par rapport au mélange de sérum de patients provenant de Vélingara (Figure 15A). Ces anticorps sont utilisés pour tester leur inhibition sur l'invasion par des souches de laboratoire utilisant des voies d'invasion alternatives (3D7 qui est acide sialique indépendante et W2mef est acide sialique dépendante). Nous avons ensuite testé l'inhibition spécifique en utilisant des souches dont le gène EBA-175 est invalidé (Knock Out line) comme contrôles. Pour limiter le répertoire des récepteurs sur le globule rouge, nous avons réalisé des essais d'invasion avec des globules rouges traités avec la chymotrypsine qui clive plusieurs récepteurs, mais laisse intacte la glycophorine A qui interagit avec EBA-175. Nous avons observé une faible inhibition de l'invasion avec les globules rouges non traités pour la souche sauvage 3D7 et les souches de laboratoire (3D7 Δ 175 et W2mef Δ 175) [Figure 15B]. Cependant le traitement avec la chymotrypsine a révélé une inhibition des souches sauvages (62 % pour 3D7, 79 % pour W2mef) et une faible concentration pour les souches dont le gène EBA-175 a été invalidé (127% de pourcentage d'invasion pour 3D7 Δ 175, 120% pour W2mef Δ 175) [Figure 15C]. Ces expériences ont été effectuées avec des concentrations physiologiques de 10 et 50 μ g/ml d'anticorps RII. A ces concentrations, W2mef et 3D7 ont présenté des taux d'inhibition relativement semblables [Figures 15D et 15E] ce qui a été observé dans d'autres études [76]. Ces résultats montrent que l'inhibition observée est spécifique mais ne dépend pas nécessairement de la voie d'invasion utilisée avec les souches de laboratoire. Puis nous avons testé l'inhibition de ces anticorps à la concentration de 10 μ g/ ml sur des souches de terrain provenant de patients atteints de paludisme simple à *P. falciparum*.

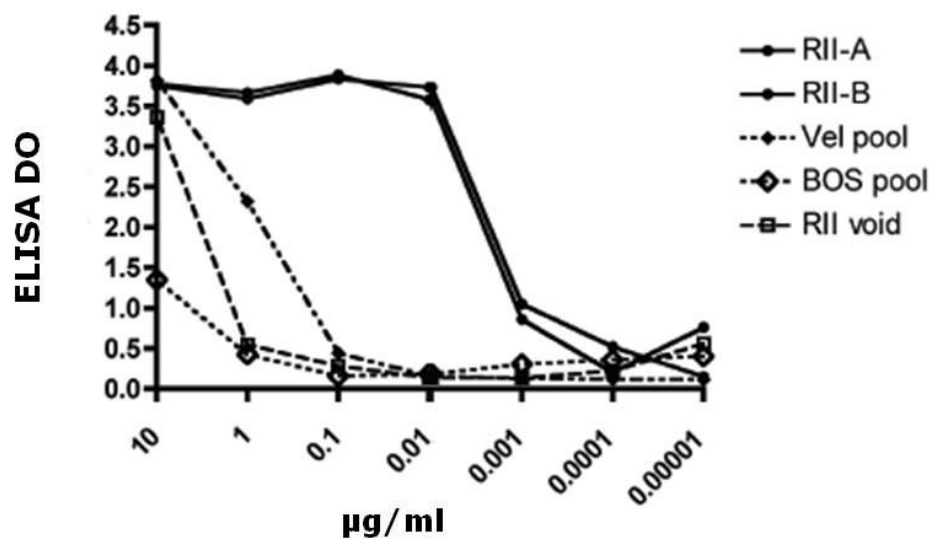


Figure 15A: Réactivité des anticorps anti-RII purifiés par ELISA

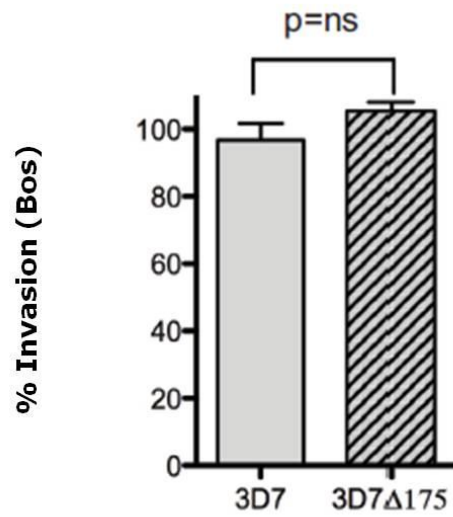


Figure 15B: Inhibition de l'invasion des érythrocytes normaux (10 µg/ml)

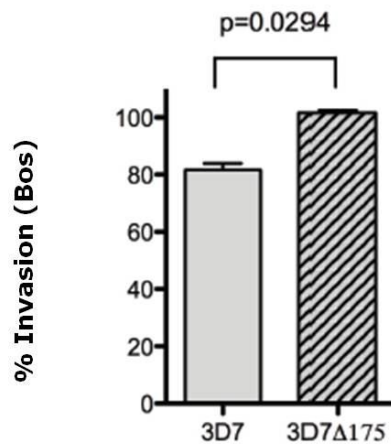


Figure 15C: Inhibition de l'invasion des érythrocytes traités par chymotrypsine (10 µg/ml)

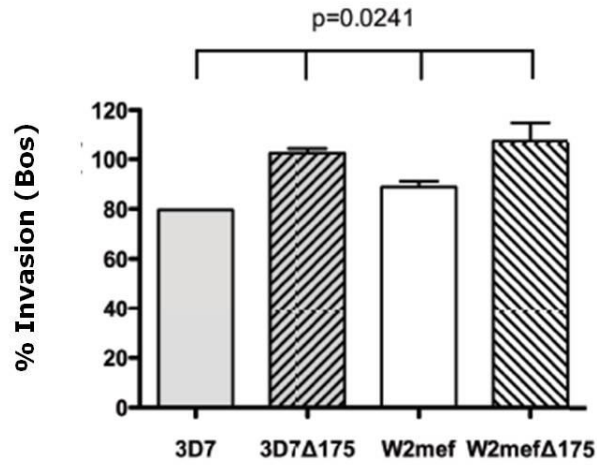


Figure 15D: Inhibition de l'invasion des souches de laboratoire avec des érythrocytes traités par la chymotrypsine (10µg/ml)

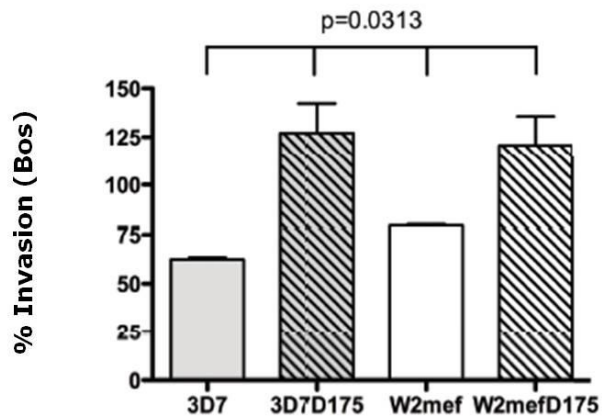


Figure 15E: Inhibition de l'invasion des souches de laboratoire avec des érythrocytes traités par la chymotrypsine (50µg/ml)

4.4.3. Association entre les voies d'invasion et l'inhibition des anticorps anti-RII

Pour déterminer le rôle des voies d'invasion dans l'inhibition des anticorps anti RII nous avons élargi les expériences à un plus grand nombre d'échantillons *ex vivo* (n = 66), qui ont été collectés durant trois saisons de transmission (2009-2011). Durant ces trois années 66 échantillons ont donné des résultats interprétables dont les parasitémies ont été lues au microscope optique et par cytométrie de flux. La répartition de ces échantillons par année est faite comme suit: 27 en 2009, 22 en 2010 et 17 en 2011.

Les tests d'inhibition de l'invasion ont été effectués avec des globules rouges non traités et des globules rouges traités par la chymotrypsine avec une concentration d'anticorps anti-RII de 10 µg/ml. Nous avons observé une variation de l'inhibition avec le mélange d'immunoglobulines provenant de sérums de patients vivant à Vélingara, cependant cette inhibition n'augmente pas significativement lorsque les érythrocytes ont été traités avec la chymotrypsine (Paired t test, $p = 0.2237$) [Figure 16A]. A l'opposé, une variation dans l'inhibition avec les anticorps purifiés par affinité a été observée aussi bien avec les globules rouges non traités que ceux traités avec la chymotrypsine (paired t test, $p=0.0098$) (Figure 16B).

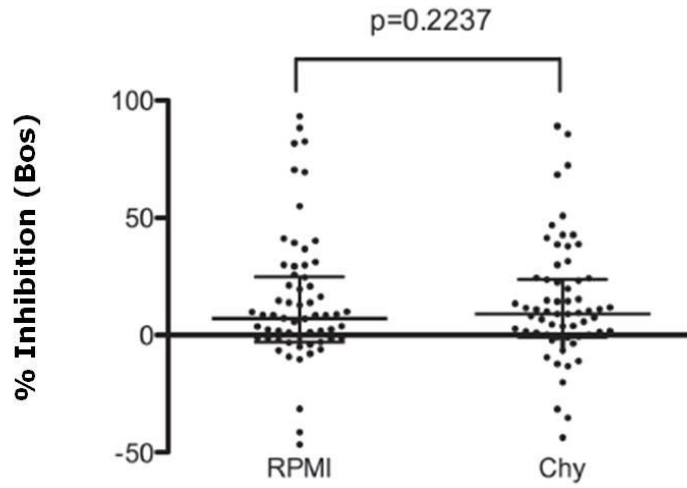


Figure 16A: Inhibition de l'invasion avec des IgG provenant de Vélingara

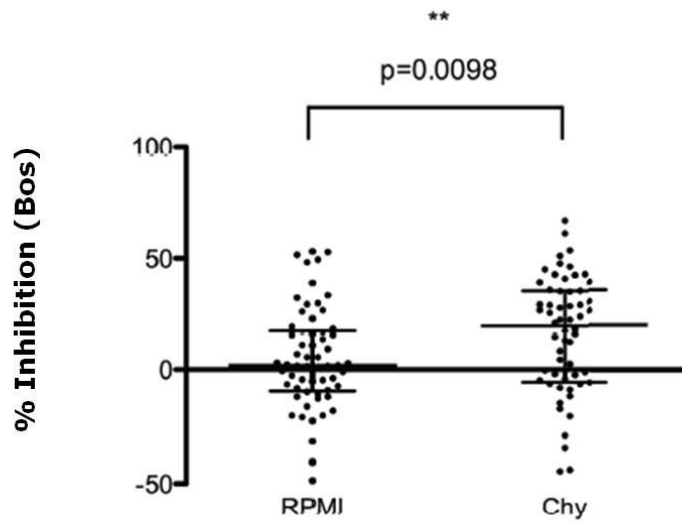


Figure 16B: Inhibition de l'invasion avec des IgG anti-RII

Ensuite nous avons cherché à savoir si les variations pouvaient être dues aux voies alternatives d'invasion en mesurant l'utilisation de la voie d'invasion après traitement enzymatique et en associant les niveaux d'invasion avec ceux de l'inhibition des anticorps anti-RII (Figure 17 A).

Nous avons observé une variation des voies d'invasion utilisées par les souches de terrain circulant à Thiès ce qui concorde avec les résultats d'études précédentes [75 ; 90]. Cependant nous n'avons pas retrouvé de différence significative de l'utilisation des voies d'invasion au cours des années, ce qui suggère que les voies d'invasion utilisées dans une zone peuvent être stables au cours du temps (Figure 17B).

Selon les résultats des tests d'invasion 60,6 % (n = 40) des souches sont acide sialique dépendantes, déterminé par un taux d'invasion supérieur à 50 % avec les globules rouges traités avec la neuraminidase (taux d'invasion mesuré par microscopie optique). Lorsque nous avons comparé l'inhibition des anticorps anti-RII des souches acide sialique dépendantes avec celle des souches acide sialique indépendantes (en utilisant le seuil de 50 %), nous n'avons pas observé de différence entre les taux d'inhibition (Mann whitney U-test, p = NS) [17C, 17D]. Pour déterminer s'il y a une différence entre les souches très acide sialique dépendantes et les souches faiblement acide dépendantes, nous avons divisé les données en quartile et fixé le percentile 25th pour les souches dépendantes et 75th pour les souches indépendantes, pour les niveaux d'inhibition des anticorps anti-RII. Avec des globules rouges non traités et traités par la chymotrypsine nous n'avons pas observé de différence significative de l'inhibition de l'invasion des anticorps anti RII (Mann-Whitney U-test, p=0,1238).

En 2011 nous avons testé des concentrations de 10µg/ ml et 50µg/ml, cependant, même avec 50µg/ml nous n'avons pas observé de différence d'inhibition des anticorps anti RII aussi bien avec les globules rouges non traités qu'avec les globules rouges traités avec la chymotrypsine la taille de l'échantillon étant trop faible, nous n'avons pas pu faire des analyses statistiques rigoureuses.

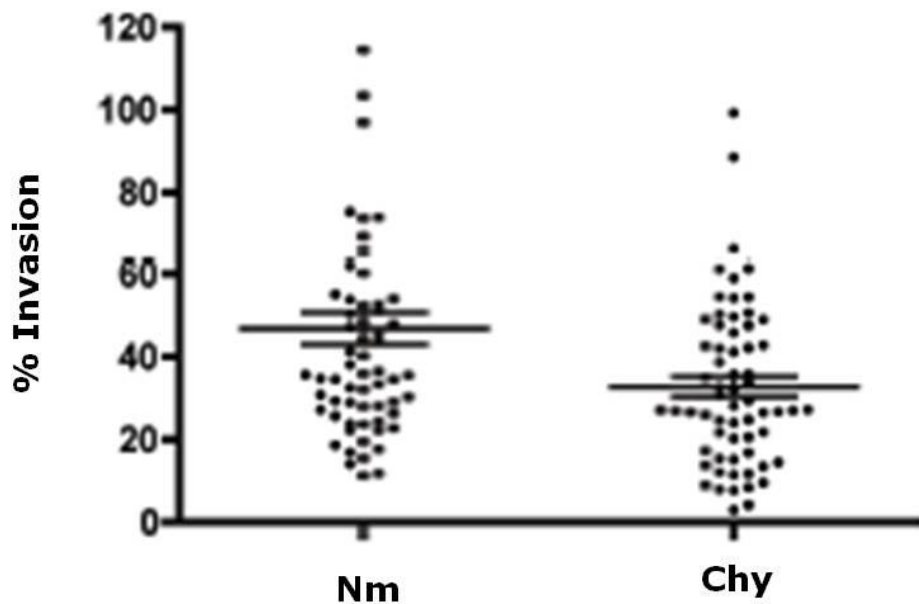


Figure 17A: Pourcentage de l'invasion avec des érythrocytes traités par des enzymes

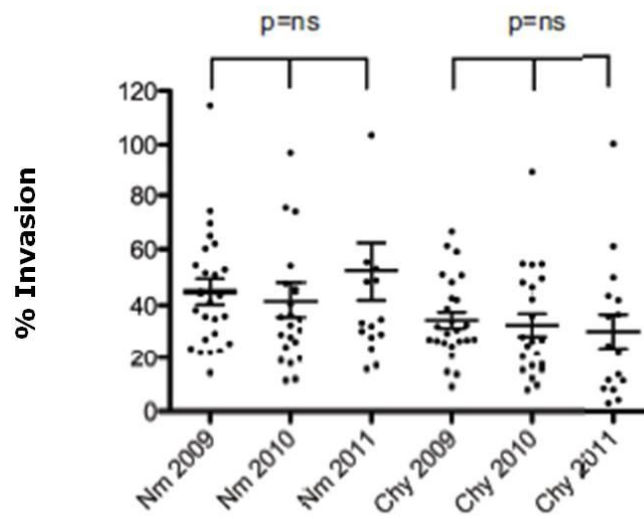


Figure 17B: Pourcentage de l'invasion avec des érythrocytes traités par des enzymes au cours des années

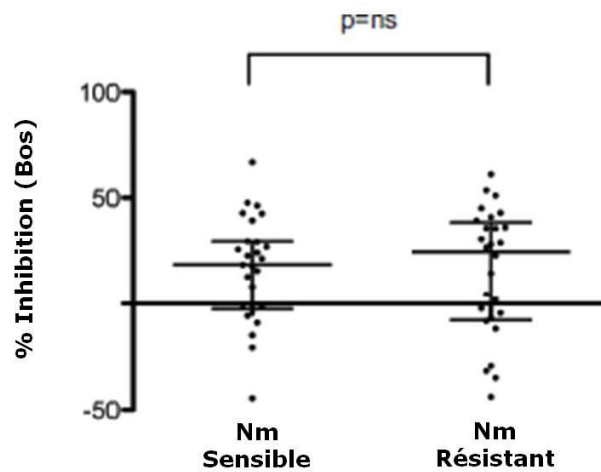


Figure 17C: Inhibition de l'invasion par les anti-RII par les érythrocytes traités par neuraminidase

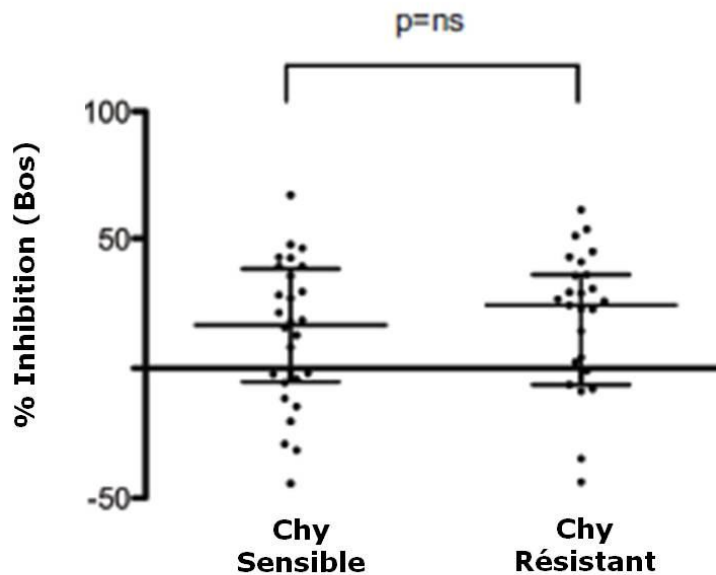


Figure 17D: Inhibition de l'invasion par les anti-RII par les érythrocytes traités par chymotrypsine

4.4.4. Association entre la réactivité des anticorps et l'inhibition des anticorps anti-RII

Pour déterminer si les titres d'anticorps anti RII des patients pris individuellement sont corrélés soit aux voies d'invasion utilisées ou à l'inhibition des anticorps anti RII, nous avons mesuré la réactivité des anticorps par ELISA et comparé les DO avec les pourcentages d'invasion et d'inhibition de l'invasion pour les patients vivant à Thiès, pour lesquels ces données sont disponibles. Nous n'avons pas noté d'association significative avec le test Spearman aussi bien pour les titres en anticorps anti RII que pour les voies d'invasion (Neuraminidase ou chymotrypsine) ou l'inhibition des anticorps anti RII (données non présentées).

5. Discussion

Dans le but de détecter les allèles d'EBA-175 (F-fragment, C-fragment) et déterminer leur prévalence à Thiès une PCR nichée a été effectuée. Les résultats ont montré la présence de ces allèles avec une prédominance de l'allèle F (67,45 %). Nos résultats concordent avec ce qui a été retrouvé à Bakoumba, au Gabon, avec une étude réalisée chez les enfants où, le fragment F était prédominant [61]. La même tendance a été décrite au Nigéria, en Gambie, au Gabon et en Afrique du Sud [10]. En dehors de l'Afrique, dans le nord du Laos, l'allèle F était prédominant [157 ; 21].

Cependant, au Soudan, le fragment C était prédominant et à Attapeu, dans le sud du Laos, une étude a montré une distribution égale des deux fragments [10 ; 157]. De manière surprenante, notre étude est différente de ce qui a été décrit dans deux études au Sénégal [44 ; 67], cependant notre étude a utilisé un plus grand nombre d'échantillons, en effet une étude a montré qu'à Thiès et Pikine l'allèle F est prédominant alors qu'à Kaolack et Passy l'allèle C est prédominant [4], une autre étude a montré une légère prédominance de l'allèle F à Kaolack [146]. Une étude conduite au Ghana a montré chez des enfants atteints de paludisme sévère une prédominance de l'allèle F [36], et il a été noté que le fragment C était associé de manière significative à la sévérité de la maladie. Ces résultats ont montré que la distribution des allèles d'EBA-175 est différente selon les zones géographiques. Selon Binks et al, des différences génétiques selon les populations humaines peuvent être la raison de la sélection de ces allèles [21], alors qu'Okenu et al ont montré que les anticorps dirigés contre les allèles F ou C peuvent être hétérologues ou homologues [111]. L'interaction entre le mérozoite et le globule rouge est nécessaire pour l'invasion érythrocytaire. Plusieurs couples ligands/récepteurs ont été découverts. Le système ABO est le plus connu en pratique médicale et est le

plus mystérieux des polymorphismes génétiques chez les humains. La relation entre le système ABO et les maladies a fait l'objet d'études depuis plusieurs années spécialement, celle entre le paludisme et les groupes sanguins, ceci du fait de l'interaction entre *Plasmodium* et les groupes sanguins. Les sujets du groupe O représentent 59, 8% de notre population d'étude. Dans l'hémisphère Sud la distribution des groupes A et O est généralement la même que celle du paludisme en milieu tropicale [39].

En effet, au Sénégal, dans la population générale, nous avons noté une prédominance du groupe O.

On pense que la distribution des allèles des groupes sanguins ABO, a été faite sous la pression de *Plasmodium*. En effet la distribution des groupes sanguins a montré que le groupe O est relativement plus représenté dans les zones où le paludisme est prévalent. Dans les régions où la maladie est ou était endémique, le groupe O représente la majorité, comme dans le Sud-Est du Nigéria, au Kenya/Kiyuki et dans la zone Amérique centrale / Bassin de l'Amazonie, où les prévalences sont respectivement de 87, 60 % et 90 % [39].

Par contre dans les zones indemnes de paludisme, telles que la Suède (62%), la Suisse (60%), la République Tchèque (70%) et le Portugal (65%), les groupes non O représentent la majorité [39]. En Asie la prévalence du groupe O augmente chez les populations lorsque l'on s'approche de l'Equateur. En effet, en Chine Beijing, (qui est une zone froide) la prévalence du groupe O est de 29% par contre à Canton (une zone tropicale), le groupe O représente 46 % [39]. Plusieurs études se sont focalisées sur l'association entre le paludisme et les groupes sanguins et ont montré que les sujets du groupe O sont protégés contre les formes sévères [128 ; 27 ; 160 ; 129 ; 74 ; 42]. Ainsi, si la survie est associée au groupe O, alors la distribution mondiale des groupes ABO est cohérente avec la pression de sélection exercée par le paludisme.

La répartition des allèles d'EBA-175 selon le groupe sanguin a montré une prédominance du génotype F dans chaque groupe sanguin. Des infections mixtes ont été notées dans les groupes O et B. Dans le groupe AB, il n'y a pas d'infections mixtes, mais la faible représentation pourrait en être la raison (< 5 %). Notre population d'étude est composée de patients souffrant de paludisme simple à *P. falciparum*, ce qui fait qu'on n'a pas pu rechercher une corrélation entre la sévérité de l'infection et les allèles ou les groupes sanguins.

Il n'y a pas eu de corrélation entre les allèles EBA-175 et le sexe, la parasitémie, la température ou l'âge, cependant il a été rapporté une corrélation entre l'allèle C et la gravité de l'affection [36].

Dans notre site d'étude (Thiès) la transmission du paludisme est modérée avec des fluctuations saisonnières. Nos résultats montrent une corrélation négative avec l'âge ($P= 0.011 < 0.05$). En zone d'endémie, la plupart des individus développent une réponse immunitaire qui contrôle le développement du parasite, mais ne l'élimine pas de la circulation sanguine. En zone de transmission stable l'immunité augmente en fonction de l'âge et la morbidité diminue en fonction de l'âge. Cette immunité est acquise naturellement (i), est efficace chez les adultes après une exposition ininterrompue et intense (ii), est perdue après une interruption de l'exposition (iii) est spécifique de l'espèce (iv) et un peu du stade et (v) est acquise à un taux dépendant du degré d'exposition.

Cette étude a montré une prédominance de l'allèle F dans une zone hypoendémique du Sénégal aussi, il serait intéressant de déterminer leur prévalence dans d'autres zones d'endémicité différente et surtout chez des patients présentant un paludisme grave et rechercher leur relation avec les antigènes érythrocytaires pouvant servir de récepteurs dans l'invasion érythrocytaire, ceci pour mieux cerner le rôle de ces allèles dans la pathogénie du paludisme.

Après avoir déterminé la prévalence des allèles de la région III d'EBA-175, nous avons mis au point un protocole de mesure de la parasitémie par cytométrie de flux, ce travail est présenté dans chapitre suivant.

Nous avons mis au point une méthode utilisant la cytométrie de flux pour mesurer les déterminants de la virulence de *P. falciparum* à savoir le PMR et le SI. Cette méthode utilisant la SYBR Green permet de mesurer avec précision la parasitémie et de distinguer les érythrocytes mono, doublement et triplement infectés. Les valeurs obtenues sont comparables à celles de la microscopie optique, tout en faisant gagner du temps, et réduit la subjectivité liée au manipulateur. Le SYBR Green est directement ajouté aux érythrocytes infectés, avec peu de manipulations, et il n'y a pas d'étape de fixation qui est requise pour le propidium iodide. SYBR Green I émet une fluorescence sur le canal isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Il se fixe préférentiellement sur l'ADN double brin, avec une affinité 11 fois plus élevée que pour l'ADN simple brin [169], et a une faible affinité pour l'ARN. Les réticulocytes contiennent de l'ARN, alors que les érythrocytes sont dépourvus d'ADN et d'ARN [104]. Puisque le SYBR Green I se fixe uniquement sur l'ADN double brin, toute fluorescence détectée est due à l'ADN du *Plasmodium*.

La précision avec laquelle la cytométrie de flux donne une résolution des pics des érythrocytes multi-infectés, nécessite que les cultures soient au stade d'anneaux (rings). Puisque dans les cultures au cours de la transition anneaux âgés à trophozoïtes nouvellement formés, le parasite commence à reproduire son ADN. La cytométrie de flux est incapable de faire la distinction entre la fluorescence d'un érythrocyte contenant trois parasites au stade ring et celle d'un érythrocyte contenant un trophozoïte nouvellement formé. L'exigence d'avoir des stades anneau peut facilement être obtenue pour les souches de laboratoire en culture *in vitro* par synchronisation avec du sorbitol [87]. Cependant les parasites *ex vivo* sont

presque toujours au stade d'anneau puisque les trophozoïtes âgés et les schizontes sont séquestrés *in vivo* et le sang collecté chez les patients est constitué exclusivement de parasites au stade anneau.

Un des défis pour l'adaptation de cette méthode pour les essais *ex vivo* avec des isolats non cultivés est que certaines souches ne se développent pas de manière synchrone comme les souches de laboratoire adaptées en culture durant le premier cycle d'invasion. Une petite proportion de parasites ne complète pas son cycle de ré-invasion comme stade anneau et vont au contraire s'arrêter aux stades trophozoïte et schizonte. Ces parasites peuvent facilement être éliminés de l'analyse en séparant les érythrocytes infectés du donneur des érythrocytes accepteurs en marquant ces derniers avec un colorant tel que le FITC [88].

Mesurer le nombre total de mérozoïtes qui envahit de manière efficace plutôt que le nombre total d'érythrocytes parasités fournit des données plus compréhensibles sur la nature de l'invasion érythrocytaire. Comme le PMR, des connaissances sur le nombre d'érythrocytes multi-infectés permet une estimation du SI, qui est l'index mesurant la préférence des parasites pour les érythrocytes.

D'autres applications *ex vivo* de cette méthode incluent mesurer:

- L'inhibition de l'invasion érythrocytaire par des anticorps
- La capacité de *Plasmodium* à envahir les érythrocytes d'âges différents en faisant un co-marquage avec des marqueurs permettant de déterminer l'âge des érythrocytes tels que CD71 et la phosphatidyl sérine (PS) [6 ; 81].

En mesurant les érythrocytes nouvellement parasités au stade d'anneau, notre méthode peut séparer les parasites nouvellement formés et les parasites en cours de croissance. Ceci n'est pas possible avec les autres méthodes permettant une

analyse à haut débit, qui dépendent de marqueurs métaboliques telles que la méthode standard utilisant l'hypoxhantine tritié.

Le temps mis par la cytométrie de flux pour déterminer la parasitémie et les érythrocytes multi-infectés présente des avantages par rapport à la microscopie optique qui prend beaucoup de temps, spécialement pour les cultures avec des parasitémies faibles, ce qui est souvent le cas pour les isolats de terrain durant le premier cycle de ré-invasion. La facilité, la spécificité et la commodité présentées par notre méthode utilisant la cytométrie de flux et le SYBR Green I, la rend adaptée non seulement au laboratoire, mais aussi sur le terrain. Le développement futur de cette méthode dans une expérience utilisant des plaques de 96 puits va encore accroître l'utilisation de la méthode.

Après avoir mis au point ce protocole, qui nous permet de déterminer la parasitémie dans un délai plus court et moins fastidieux que la microscopie, nous avons étudié la capacité des anticorps dirigés contre EBA-175 à inhiber l'invasion érythrocytaire.

Dans cette étude nous avons trouvé que les anticorps dirigés contre la région II d'EBA-175 sont acquis aussi bien par les sujets vivant en zone hypoendémique que ceux vivant en zone hyperendémique et que l'acquisition de ces IgG est âge dépendante à Vélingara.

A Thiès, la majorité des patients sont adultes avec une moyenne d'âge de 21 ans alors qu'à Vélingara elle est de 12 ans. A Vélingara l'acquisition de ces anticorps est faite beaucoup plutôt et est plus intense qu'à Thiès, ce qui est tout à fait normal vu l'intensité de l'exposition (TIE à Thiès < 5 à Vélingara ~ 100). Malgré la différence d'endémicité le niveau de positivité n'est pas très variable entre ces deux régions, ce qui est différent de ce qui a été retrouvé par d'autres études [111 ;

110]. En effet, une étude faite dans une région holoendémique au Kenya a trouvé un taux de positivité des anticorps RII de 98,7% [**110**], alors qu'une étude faite en Gambie chez les enfants et au Nigéria chez les adultes a montré un taux de positivité de 43 et environ 70 % respectivement [**111**]. Nos résultats montrent une prévalence des anticorps plus faible dans les deux zones (35 %), ce qui pourrait s'expliquer par une diminution de la prévalence du paludisme au Sénégal, mais aussi par le fait que notre population d'étude soit constituée de patients présentant un syndrome palustre simple et non des patients asymptomatiques. Quelques fois, les différences dans la réactivité des anticorps peuvent être dues à la qualité de la protéine utilisée par ELISA, le repliement de la protéine exprimée chez la bactérie peut mettre en évidence des épitopes qui physiologiquement ne sont pas intéressants mais peuvent conduire à des réactivités élevées lors de leur dosage par ELISA. Cependant la protéine RII que nous avons utilisée a été validée et présente un repliement correct comme l'a montré la structure en crystal de la protéine RII d'EBA-175 [**14 ; 95**].

Puisque les vaccins sont conçus pour protéger les individus contre les souches de terrain, il est impératif d'évaluer l'efficacité de l'invasion chez les souches de terrain en présence d'anticorps anti EBA-175RII présents chez les sujets vivant en zone d'endémie. Alors qu'un petit nombre d'études se sont focalisées sur des anticorps purifiés par affinité pour tester l'inhibition de l'invasion érythrocytaire, notre étude s'est intéressée aux anticorps anti-RII avec lesquels nous avons testé *ex vivo* des souches de terrain provenant de patients symptomatiques. Dans cette étude, les souches ont été testées avec des concentrations de 10µg/ml et 50µg/ml qui correspondent à des concentrations physiologiques dont l'intervalle est compris entre 10 et 100 µg/ml [**52**]. D'autres ont utilisé des anticorps humains purifiés par affinité qu'ils ont testés sur d'autres ligands d'invasion à des concentrations similaires et ont observé des degrés d'inhibition variables. Nous avons montré pour

la première fois une inhibition élevée des souches de terrain lorsque le répertoire des ligands de l'invasion est réduit. Ceci supporte l'hypothèse selon laquelle l'interruption de l'interaction entre EBA-175 et la glycopherine A en conjonction avec les autres voies d'invasion peut être une stratégie viable pour inhiber de manière significative le développement des stades sanguins [76 ; 96 ; 114 ; 117].

Nous avons trouvé que les voies d'invasion utilisées par les souches isolées à Thiès sont stables durant les trois années. De plus la dépendance à l'acide sialique des souches de terrain associée à la voie EBA-175/GPA n'est pas corrélée avec l'inhibition fonctionnelle par les anticorps anti-RII. Ceci semble être du au fait que cette voie est un phénotype complexe résultant de la contribution de plusieurs interactions ligands récepteurs, ce qui remet en question le fait que le couple EBA-175/GPA soit considérée comme la principale voie d'invasion [15]. D'autres ont observé un manque de corrélation entre la voie d'invasion et l'inhibition lors d'études utilisant des concentrations élevées d'anticorps et des souches de laboratoire [76 ; 96 ; 107]. Nous avons retrouvé des niveaux similaires d'inhibition des souches de laboratoire 3D7 et W2mef avec les anticorps anti-RII avec les globules rouges dont le nombre de récepteurs est réduit par traitement avec la chymotrypsine (Figure 16C).

Il est impératif de mettre au point un vaccin anti paludique efficace contre toutes les souches de *P. falciparum*. Le vaccin le plus avancé actuellement est le RTS,S qui est dirigé contre le stade sporozoite et en phase III d'essais cliniques. Dans une étude récente effectuée chez les enfants ce vaccin a montré une efficacité de 30% dans une analyse à visée thérapeutique [3]. Bien que de tels résultats soient prometteurs, le but d'atteindre l'immunité protectrice stérile est loin d'être atteint. Devant un tel défi, il y a un regain d'intérêt pour le développement de vaccins dirigés contre les stades érythrocytaires spécialement qui transcendent les souches et sera basé sur la combinaison d'antigènes des stades érythrocytaires [117 ; 127].

Bien qu'un vaccin recombinant de la région II d'EBA-175 soit en phase I d'essais cliniques [53] peu de candidats vaccins du stade érythrocytaire ont dépassé la phase I des essais cliniques, ce qui est largement dû aux faibles niveaux de protection et l'immunité spécifique des allèles [127 ; 154 ; 165 ; 145 ; 147 ; 148]. Dans cette étude nous avons montré que les anticorps acquis naturellement par les sujets vivant en zone d'endémie contre la région II d'EBA-175 peuvent inhiber l'invasion érythrocytaire des souches de terrain de *P. falciparum* à des degrés variables cependant cette inhibition n'est pas complète. Alors que nous avons conclu que la différence dans l'utilisation des voies d'invasion n'est pas la raison primaire de la différence d'inhibition, il sera important de déterminer si la variation d'expression des protéines de l'invasion ou des séquences de RII de ces isolats cliniques ou alors d'autres facteurs peuvent influencer l'activité fonctionnelle des anticorps anti-RII. A notre connaissance, c'est la première fois qu'il est rapporté une inhibition de l'invasion érythrocytaire par des anticorps acquis naturellement contre EBA-175 *ex vivo* sur des souches de terrain. Nos résultats suggèrent que des anticorps sont produits contre la région II d'EBA-175 chez les sujets vivant en zone d'endémie et que cette région peut être un antigène efficace s'il est utilisé en association avec d'autres antigènes dans un vaccin [120 ; 76 ; 96 ; 117].

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le moyen le plus efficace, pour lutter contre une maladie infectieuse, est la vaccination, cependant à ce jour il n'existe aucun vaccin efficace contre le paludisme. Ceci est dû à l'existence de plusieurs stades parasitaires et donc à plusieurs antigènes difficile à identifier. Chaque stade de développement du *Plasmodium* comprend plusieurs antigènes dont certains sont en cours d'études pour leur utilisation en temps que vaccin.

Nous nous sommes intéressés à un antigène du stade mérozoite qui intervient dans l'invasion érythrocytaire et qui fait l'objet de plusieurs études ces dernières années dans le but de son développement en tant que vaccin antipaludique.

Plusieurs protéines de ce gène sont immunogènes chez les sujets vivant en zone d'endémie, parmi elles la région III qui est dimorphique et la région II qui est le ligand de la glycophorine A.

En vue de déterminer la prévalence des allèles de la région III du gène *EBA-175*, un génotypage a été réalisé sur 129 échantillons composés d'hommes et de femmes âgés de 1 à 79 ans et les résultats ont montré la présence des deux allèles à Thiès. D'après nos résultats, la répartition des allèles de la région III est variable selon les régions, dans notre étude nous avons trouvé une prévalence plus élevée pour l'allèle F à Thiès (67, 5%) qui est zone hypoendémique, et cette tendance a été retrouvée par d'autres études à Pikine (62%) et à Thiès (76 %) alors que dans deux zones hyperendémiques (Vélingara 51% et Passy 53 %) l'allèle C qui a été retrouvé associé à la sévérité du paludisme est prédominant. La prévalence de ces allèles est différente selon les pays et les régions et semble stable dans une zone au cours des années.

Les facteurs qui influencent la sélection de ces allèles sont inconnus à ce jour et plusieurs hypothèses ont été proposées; l'intensité de la transmission, le statut immunitaire, ou alors les spécificités génétiques de l'hôte. Les fonctions de la région III restent inconnues à ce jour, et le rôle de cette région dans l'invasion érythrocytaire n'est pas encore bien établi. Avec l'hypothèse selon laquelle le dimorphisme est dû à une sélection diversifiée; le polymorphisme pourrait être une stratégie pour échapper au système immunitaire. Parmi les facteurs chez l'hôte pouvant sélectionner ces allèles les antigènes des groupes sanguins pourraient jouer un rôle important étant donné les interactions entre les mérozoïtes et les globules rouges, ainsi il serait intéressant d'étudier la distribution de ces allèles chez les patients de groupes différents et la sévérité des symptômes.

Nous avons aussi recherché une relation entre les allèles de la région III et les groupes sanguins sur la même population d'étude et nos résultats n'ont pas montré d'association entre les groupes sanguins et la prévalence des allèles mais notre population d'étude était constituée de patients atteints de paludisme simple à *P. falciparum*, il serait intéressant de mener cette étude chez des patients atteints de paludisme simple et de paludisme sévère.

Afin d'améliorer et de faciliter la détermination du taux d'érythrocytes infectés par *P. falciparum* chez les patients et lors des expériences d'invasion et d'inhibition de l'invasion nous avons mis au point un protocole de lecture par la cytométrie de flux et utilisant comme colorant le SYBR-Green I, ceci dans le but de réduire le temps passé lors de la lecture et la subjectivité lors de la détermination de la parasitémie par microscopie optique. Nos résultats ont montré une bonne concordance avec la microscopie optique et nous a permis de passer à notre troisième projet d'étude. D'autres méthodes de détermination de la parasitémie sont nécessaires pour améliorer la lecture et déterminer la parasitémie dans un délai plus court, parce que cette méthode bien que plus rapide que la microscopie,

le temps passé à la cytométrie de flux est assez long surtout lorsque le nombre d'échantillons à lire est considérable.

Nous avons recherché l'inhibition de l'invasion érythrocytaire par les anticorps dirigés contre la région II d'Erythrocyte Binding Antigen 175 de *P. falciparum*. Pour cela, nous avons réalisé des expériences d'invasion et d'inhibition de l'invasion ex vivo.

Nos résultats ont montré une faible prévalence de ces anticorps dans notre population d'étude (zones hypoendémique et hyperendémique) et une inhibition de l'invasion érythrocytaire par ces anticorps mais qui ne dépend pas de la voie acide sialique.

Le faible taux de positivité (~ 35%) peut s'expliquer par le fait que les sujets chez qui nous avons dosé les anticorps sont symptomatiques donc à priori ne présentent pas assez d'immunité pour avoir une protection clinique contre le paludisme. Cependant nous avons retrouvé une acquisition de ces anticorps qui est dépendante de l'âge à Vélingara qui est une zone hyperendémique et pas à Thiès qui est une zone hypoendémique. Lorsque la transmission est intense, l'immunité est acquise plus rapidement du fait de l'exposition plus fréquente et à plusieurs souches de *Plasmodium*.

D'après notre étude, les voies d'invasion ne semblent pas être la cause primaire des différences dans les taux d'invasion notés avec les souches de terrain, donc il est possible que le polymorphisme dans la région RII soit responsable de ces différences. Il est nécessaire de faire des études fonctionnelles avec des souches différentes pour confirmer cette hypothèse.

Cette étude a montré la présence des deux allèles de la région III d'EBA-175 à Thiès avec une prédominance de l'allèle F.

Nous avons également retrouvé des anticorps dirigés contre la région II d'EBA-175 aussi bien en zone hypoendémique qu'en zone hyperendémique et que ces anticorps peuvent inhiber l'invasion érythrocytaire, donc cette région peut être utilisée en association avec d'autres antigènes dans un vaccin contre le paludisme. La recherche vaccinale bien qu'intense est actuellement loin d'atteindre l'objectif qui est de mettre au point un vaccin efficace contre le paludisme, et doit certainement se tourner vers l'association d'antigènes pour atteindre une efficacité requise. Le fait que des vaccins soient en phase d'essais cliniques avancés laisse présager que le plus dur du travail a été fait et que l'espoir est permis dans ce domaine.

Bibliographie

1. **Adams JH, Fang X, Kaslow DC, Miller LH. (1992).** Identification of a cryptic intron in the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein gene. *Molecular and biochemical parasitology*,. 56(1): p. 181-3.
2. **Adams JH, Sim BK, Dolan SA, Fang X, Kaslow DC, Miller LH (1992).** A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7085-708
3. **Agnandji ST, Lell B, Soulanoudjingar SS, Fernandes JF, Abossolo BP, et al. (2011)** First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *N Engl J Med* 365: 1863–1875
4. **Ahouidi A, Bei AK, Neafsey DE, Sarr O, Volkman S, Milner D, Cox-Singh J, Ferreira MU, Ndir O, Premji Z, Mboup S, Duraisingh MT (2010).** Population genetic analysis of large sequence polymorphisms in *Plasmodium falciparum* bloodstage antigens. *Infect Genet Evol* 10: 200-206.
5. **Airds I, Bentall HH, Roberts JAF (1953).** A relationship between cancer of the stomach and the ABO blood groups. *Br Med J* 1: 799-801.
6. **Aminoff D (1988).** The role of sialoglycoconjugates in the aging and sequestration of red cells from circulation. *Blood Cells*;14:229–257.
7. **Athreya BH and Coriell LL (1967).** Relation of blood groups to infection: Aa survey and review of data suggesting possible relationship between malaria and blood groups. *Am J Epidemiol* 86: 292-304.
8. **Bannister LH., Mitchell GH. (1989)** The fine structure of secretion by *Plasmodium knowlesi* merozoites during red cell invasion. *J Protozool*; 36 : 362-7.
9. **Ballou W. R., Cahill C. P. (2007).** Two decades of commitment to malaria vaccine development: GlaxoSmithKline Biologicals. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*77, 289–295.
10. **Barnwell JW and Galinski MR (1998).** Invasion of vertebrate cells: erythrocytes. In Sherman IW (ed.) *Malaria: parasite biology, pathogenesis and protection*. Washington DC, ASM Press. p. 93-120.
11. **Barragan A, Kremsner PG, Wahlgren M, Carlson J (2000)** Blood group A antigen is a coreceptor in *Plasmodium falciparum* rosetting. *Infect Immun* 68: 2971-2975.
12. **Barragan A, Klremssner PG, Wahlgre M, Carlson J (2003)** Blood group A antigen as a coreceptor in *P. falciparum* parasites. *J Infect Dis* 188: 153-164.

13. **Baruch DI, Pasloske BL, Singh HB, Bi X, Ma XC, et al. (1995).** Cloning the *P. falciparum* gene encoding pfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell* 82: 77–87.
14. **Batchelor JD., JA Zahm., and NH Tolia (2011).** Dimerization of *Plasmodium vivax* DBP is induced upon receptor binding and drives recognition of DARC. *Nature structural & molecular biology*, 18(8): p. 908-14.
15. **Baum J, Maier AG, Good RT, Simpson KM, Cowman AF. (2005).** Invasion by *P. falciparum* merozoites suggests a hierarchy of molecular interactions. *PLoS Pathog*, 1(4): p. e37.
16. **Baum J., Thomas AW and Conway. D. J. (2003).** Evidence for diversifying selection on erythrocyte-binding antigens of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *Genetics*, 163(4): p. 1327-36.
17. **Baum J, Maier AG, Good RT, Simpson KM, and Cowman AF. (2005)** Invasion by *P. falciparum* merozoites suggests a hierarchy of molecular interactions. *PLoS Pathog* 1(4): p. e37.
18. **Bei AK., DeSimone TM, Badiane AS., Ahouidi AD., Dieye T., Ndiaye D., Sarr O., Ndir O., Mboup S and M T. Duraisingh. (2010).** A flow cytometry-based assay for measuring invasion of red blood cells by *Plasmodium falciparum*. *Am J Hematol*, 85(4): p. 234-7.
19. **Bei AK., Membi CD., Rayner JC., Mubi M., Ngasala B., Sultan AA., Premji Z., Duraisingh MT. (2007).** Variant merozoite protein expression is associated with erythrocyte invasion phenotypes in *Plasmodium falciparum* isolates from Tanzania. *Mol. Biochem. Parasitol.* 153:66–71
20. **Bhakdi SC., Sratongno P., Chiuma P., Rungruang T., Chuncharunee A., Neumann HP., Malasit P., Pattanapanyasat K. (2007).** Re-evaluating acridine orange for rapid flow cytometric enumeration of parasitemia in malaria-infected rodents. *Cytometry A*;71:662–667.
21. **Binks RH., Baum J., Oduola AM., Arnot DE., Babiker HA., Kremsner PG., Roper C., Greenwood BM., Conway DJ. (2001).** Population genetic analysis of the *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen-175 (eba-175) gene. *Mol Biochem Parasitol*, 114(1): p. 63-70.
22. **Blackman MJ., Heidrich HG., S. Donachie., J. S. McBride and Holder A. A. (1990).** A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. *J. Exp. Med.* 172:379-382.

23. **Bongfen SE., Ntsama PM., Offner S., Smith T., Felger I., Tanner M., Alonso P.,Nebie I., Romero JF., Silvie O. (2009).** The N-terminal domain of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein represents a target of protective immunity. *Vaccine*.27:328–335.
24. **Bouharoun-Tayoun H., Oeuvray C., Lunel F., Druuihe P. (1995).** Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *J. Exp. Med.*; 182: 409–18.
25. **Bull PC., Lowe BS., Kortok M., Molyneux CS., Newbold CI et al. (1998).** Parasite antigens on the infected red cell are targets for naturally acquired immunity to malaria. *Nature Medicine* 4: 358–360.
26. **Camus D., and Hadley T.J. (1985).** A *Plasmodium falciparum* antigen that binds to host erythrocytes and merozoites. *Science*. 230:553–556.
27. **Carlson J., Wahlgren M (1992).** *Plasmodium falciparum* erythrocyte rosetting is mediated by promiscuous lectin-like interactions *J Exp Med* 176: 1311-1317.
28. **Cavanagh DR., Dodoo D., Hviid L., Kurtzhals JA., Theander TG., Akanmori BD., Polley S., Conway DJ., Koram K., Mcbride JS. (2004)** Antibodies to the N-terminal block 2 of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 are associated with protection against clinical malaria. *Infection and Immunity*; 72:6492–6502.
29. **Chelimo K., Ofulla AV., Narum DL., Kazura JW., Lanar DE et John CC. (2005)** Antibodies to *Plasmodium falciparum* antigens vary by age and antigen in children in a malaria-holoendemic area of Kenya. *Pediatr Infect Dis J*. 2005 Aug;24(8):680-4.
30. **Chotivanich K., Udomsangpetch R., Simpson JA., Newton P., Pukrittayakamee S., Looareesuwan S., White NJ. (2000)** Parasite multiplication potential and the severity of falciparum malaria. *J Infect Dis*;181:1206–1209.
31. **Chulay JD., Lyon JA., Haynes JD., Meierovics AI., Atkinson CT., Aikawa M (1987)** Monoclonal antibody characterization of *Plasmodium falciparum* antigens in immune complexes formed when schizonts rupture in the presence of immune serum. *J Immunol* 139: 2768-2774
32. **Conway D.J. (1997).** Natural selection on polymorphic malaria antigens and the research for a vaccine. *Parasito today*, 13(1): p. 26-29.
33. **Cooke BM., Lingelbach K., Bannister LH. (2004).** Protein trafficking in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Trends Parasitol* ; 20 : 581-9

34. **Coppi A., Natarajan R., Pradel G., Bennett B.L., James E.R., Roggero M.A., Corradin G., Persson C., Tewari R. and Sinnis P. (2011).** The malaria circumsporozoite protein has two functional domains each with distinct roles as sporozoites journey from mosquito to mammalian host. *J Exp Med* 208:341-36.
35. **Cowman AF and Crabb BS (2006)** Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* 124: 755-766.
36. **Cramer JP., Mockenhaupt FP., Möhl I., Dittrich S., Dietz E., Otchwemah RN., Ehrhardt S., Bienzle U., Jelinek T (2004)** Allelic dimorphism of the erythrocyte binding antigen-175 (eba-175) gene of *Plasmodium falciparum* and severe malaria: Significant association of the C-segment with fatal outcome in Ghanaian children. *Malar J* 3: 11.
37. **Crewther, P. E., Culvenor, J. G., Silva, A., Cooper, J. A. and Anders, R. F. (1990).** *Plasmodium falciparum*: two antigens of similar size are located in different compartments of the rhoptry. *Exp. Parasitol.* 70, 193-206.
38. **Crosnier C., Bustamante LY., Bartholdson SJ., Bei AK., Theron M., Uchikawa M., Mboup S., Ndir O., Kwiatkowski DP., Duraisingh MT., Rayner JC., Wright GJ (2011)** Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Nature* 480: 534-53
39. **Cserti CM and Dzik WH (2007)** The ABO blood group system and *Plasmodium falciparum* malaria. *American Society of Hematology* 110: 2250-2258.
40. **Daugherty JR., Murphy CI., Doros-Richert LA., Barbosa A., Kashala LO., Ballou WR., Snellings NJ., Ockenhouse CF., Lanar DE. (1997).** Baculovirus-mediated expression of *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen 175 polypeptides and their recognition by human antibodies. *Infect Immun*, 65(9): p. 3631-7.
41. **Deans A-M., Nery S., Conway DJ., Kai O., Marsh K., Rowe JA. (2007).** Invasion pathways and malaria severity in Kenyan *Plasmodium falciparum* clinical isolates. *Infect Immun*;75:3014–3020.
42. **Deepa V., Alwar A., Rameshkumar K and Ross C (2011)** ABO blood groups and malaria related clinical outcome. *J Vector Borne Dis* 48: 7-11.
43. **Deloron P. & Chougnet C (1992).** Is immunity to malaria really short-lived? *Parasitol. Today* 8, 375–378
44. **Dittrich S., Schwobel B., Jordan S., Vanisaveth V., Rattanaxay P., Christophel EM., Phompida S., Jelinek T (2003)** Distribution of the two forms of *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen-175 (eba-175) gene in Lao PDR. *Malar J* 2: 23.

45. **Dolan SA., Miller LH., and Wellem TE. (1990).** Evidence for a switching mechanism in the invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *J. Clin. Invest.* 86:618–624
46. **Dolo AD., Modiano O., Doumbo A., Bosman T., Sidibe MM., Keita S., Naitza K., Robson J., and Crisanti A. (1999).** Thrombospondin related adhesive protein (TRAP), a potential malaria vaccine candidate. *Parasitologia* 41:425-428.
47. **Duan J., Mu J., Thera MA., Joy D., Kosakovsky Pond SL., Diemert D., Long C., Zhou H., Miura K., Ouattara A., Dolo A., Doumbo O., Su X., Miller L. (2008).** Population structure of the genes encoding the polymorphic *P. falciparum* apical membrane antigen1: implications for vaccine design. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(22):7857-62
48. **Duffy PE., Craig AG and Baruch DI. (2001).** Variant proteins on the surface of malaria-infected erythrocytes--developing vaccines. *Trends Parasitol.* 17(8): 354-356
49. **Duraisingh MT., Maier AG., Triglia T and Cowman AF (2003).** Erythrocyte-binding antigen 175 mediates invasion in *Plasmodium falciparum* utilizing sialic acid-dependent and –independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(8): p. 4796-801.
50. **Duraisingh MT., Triglia T., Ralph SA., Rayner JC., Barnwell JW., McFadden GI., Cowman AF. (2003)** Phenotypic variation of *Plasmodium falciparum* merozoite proteins directs receptor targeting for invasion of human erythrocytes. *EMBO J.* 22:1047–1057
51. **Edelman RS., Hoffman L., Davis JR., Beier M., Sztein M.B., Losonsky G., Herrington DA., Eddy HA., Hollingdale MR., Gordon DM and Clyde DF. (1993).** Long-term persistence of sterile immunity in a volunteer immunized with X-irradiated *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J. Infect. Dis.* 168:1066–1070
52. **Egan AF., Burghaus P., Druilhe P., Holder A. A and Riley E. M. (1999).** Human antibodies to the 19kDa C-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 inhibit parasite growth in vitro. *Parasite immunology*, 21(3): p. 133-9.
53. **El Sahly HM., Patel SM., Atmar RL., Lanford TA., Dube T., D Thompson ; Sim BKL., Long C and Keitel WA. (2010)** Safety and immunogenicity of a recombinant nonglycosylated erythrocyte binding antigen 175 Region II malaria vaccine in healthy adults living in an area where malaria is not endemic. *Clin Vaccine Immunol* 17: 1552–1559
54. **Elliott SR., Kuns RD., and Good MF. (2005).** Heterologous immunity in the absence of variant-specific antibodies after exposure to subpatent infection with blood-stage malaria. *Infect. Immun.* 73:2478-2485.
55. **Engwerda C.R. & Good, M.F. (2005).** Interactions between malaria parasites and the host immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 17, 381–387

56. **Fernandez V., Hommel M., Chen Q., Hagblom P., Wahlgren M (1999)** Small, clonally variant antigens expressed on the surface of the *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte are encoded by the rif gene family and are the target of human immune responses. *J Exp Med* 190: 1393–1404.
57. **Fidock DA., Bottius E., Brahim K., Moelans., II, Aikawa M., Konings RN., Certa U., Olafsson P., Kaidoh T., Asavanich A., Guérin-Marchand C & Druilhe P. (1994a).** Cloning and characterization of a novel *Plasmodium falciparum* sporozoite surface antigen, STARP. *Mol Biochem Parasitol*; 64:219-232.
58. **Fidock DA., Sallenave-Sales S., Sherwood JA., Gachih GS., Ferreira-da-Cruz MF., Thomas AW & Druilhe P. (1994b)** Conservation of the *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein gene, STARP, in field isolates and distinct species of Plasmodium. *Mol Biochem Parasitol*; 67:255-267.
59. **Fischer PR and Boone P (1998)** Short report: Severe malaria associated with blood group. *Am J Trop Med Hyg* 58:122-123.
60. **Galinski MR., Medina CC., Ingravallo P., and Barnwell JW. (1992).** A reticulocyte-binding protein complex of *Plasmodium vivax* merozoites. *Cell* 69, 1213–1226.
61. **Gaur D., Mayer DC., Miller LH and (2004).** Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium merozoites*. *Int J Parasitol* 34: 1413-1429.
62. **Genton B., Betuela I., Felger I., Al-Yaman F., Anders R. F., Saul A., Rare L., Baisor M., Lorry K., Brown GV., Pye D., Irving DO., Smith T. A., Beck HP., and Alpers MP. (2002).** A recombinant blood-stage malaria vaccine reduces *Plasmodium falciparum* density and exerts selective pressure on parasite populations in a phase 1-2b trial in Papua New Guinea. *J. Infect. Dis.* 185:820–827.
63. **Gilson PR., Nebl T., Vukcevic D., Moritz RL., Sargeant T., Speed TP., Schofield L., Crabb BS. (2006)** Identification and stoichiometry of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Cell. Proteomics.* 5:1286–1299.
64. **Goel VK., Li X., Chen H., Liu SC., Chishti AH., Oh SS. (2003)** Band 3 is a host receptor binding merozoite surface protein 1 during the *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:5164–5169.
65. **Good MF., Kaslow DC., Miller LH (1998)** Pathways and strategies for developing a malaria blood-stage vaccine. *Annu Rev Immunol* 16: 57–87.
66. **Harris P.K., Yeoh S., Dluzewski AR., O'Donnell RA., Withers-Martinez C., Hackett F., Bannister LH., Mitchell GH., and Blackman MJ. (2005).** Molecular identification of a malaria merozoite surface sheddase. *PLoS Pathog.* 1, 241–251.

67. **Heidari A., Keshavarz H., Dittrich S., Jelinek T (2009)** Allelic dimorphism of the *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Binding Antigen-175 (EBA-175) Gene in the Southeast of Iran. *Iranian J Parasitol* 4: 17-22.
68. **Hoffman SL., Oster CN., Plowe CV., Woollett GR., Beier JC., Chulay JD., Wirtz RA., Hollingdale MR and Mugambi M. (1987).** Naturally acquired antibodies to sporozoites do not prevent malaria: vaccine development implications. *Science* 237:639–642.
69. **Hoffman SL., Isenbarger D., Long GW., Sedegah M., Szarfman A., Waters L., Hollingdale MR., van der Miede PH., Finbloom DS., and W. R. Ballou. (1989).** Sporozoite vaccine induces genetically restricted T cell elimination of malaria from hepatocytes. *Science* 244:1078–1081
70. **Hoffman SL., Goh LM., Luke TC., Schneider I., Le TP., Doolan DL., Sacci J., de La Vega P., Dowler M., Paul C., Gordon DM., Stoute JA., Church LW., Sedegah M., Heppner DG., Ballou WR., and T. L. Richie. (2002).** Protection of humans against malaria by immunization with radiation- attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J. Infect. Dis.* 185: 1155–1164.
71. **Hui GS., Gosnell WL., Case SE., Hashiro C., Nikaido C., Hashimoto A and Kaslow DC. (1994)** Immunogenicity of the C-terminal 19-kDa fragment of the Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 (MSP1), YMSP1(19) expressed in *S. cerevisiae*. *J Immunol.* 15; 153(6):2544-53.
72. **Iyer, J., Grüner AC, Rénia L, Snounou G, Preiser PR. (2007).** Invasion of host cells by malaria parasites: a tale of two protein families. *Molecular microbiology*, 65(2): p. 231-4
73. **Izumiya S., Omura M., Takasaki T., Ohmae H., Asahi H. (2009).** *Plasmodium falciparum*: Development and validation of a measure of intraerythrocytic growth using SYBR Green I in a flow cytometer. *Exp Parasitol*;121:144 150
74. **Jallow M., Teo YY., Small KS., Rockett KA., Deloukas P., Kwiatkowski DP et al. (2009).** Wellcome Trust Case Control Consortium; Malaria Genomic Epidemiology Network Genome-wide and fine-resolution association analysis of malaria in West Africa. *Nat Genet* 41: 657-665.
75. **Jennings CV., Ahoundi AD., Zilversmit M., Bei AK., Rayner J., Sarr O., Ndir O., Wirth DF., Mboup S., Duraisingh MT. (2007).** Molecular analysis of erythrocyte invasion in *Plasmodium falciparum* isolates from Senegal. *Infect Immun*, 75(7): p. 3531-8.

76. **Jiang L., Gaur D., Mu J., Zhou H., Long C A., and Miller L H. (2011).** Evidence for erythrocyte-binding antigen 175 as a component of a ligand-blocking blood-stage malaria vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(18): p. 7553-8.
77. **John CC., O'Donnell, R.A., Sumba PO., et al., (2004).** Evidence that invasion-inhibitory antibodies specific for the 19-kDa fragment of the merozoite surface protein-1 (MSP-119) can play a protective role against Blood-stage *Plasmodium falciparum* infection in individuals in a malaria endemic area of Africa. *J Immunol* 173, 666-672.
78. **John CC, Moormann AM, Pregibon DC, Sumba PO, McHugh MM, Narum DL, Lanar DE, Schlachter MD, Kazura JW. (2005).** Correlation of high levels of antibodies to multiple pre erythrocytic *Plasmodium falciparum* antigens and protection from infection. *Am J Trop Med Hyg.*; 73(1):222-8.
79. **John CC., Zickafoose JS., Sumba PO., King CL., Kazura JW. (2003).** Antibodies to the *Plasmodium falciparum* antigens circumsporozoite protein, thrombospondin-related adhesive protein, and liver-stage antigen 1 vary by ages of subjects and by season in a highland area of Kenya. *Infect Immun* 71:4320 –5
80. **Jones TR., Narum DL., Gozalo AS et al. (2001).** Protection of Aotus monkeys by *Plasmodium falciparum* EBA- 175 region II DNA prime-protein boost immunization regimen. *J Infect Dis*, 183(2): p. 303-312.
81. **Kahlenberg A., Walker C., Rohrlick R. (1974)** Evidence for an asymmetric distribution of phospholipids in the human erythrocyte membrane. *Can J Biochem*;52:803–806.
82. **Kain KC., Orlandi PA., Haynes JD., Sim KL., Lanar DE (1993)** Evidence for twostage binding by the 175-kD erythrocyte binding antigen of *Plasmodium falciparum*. *J Exp Med* 178: 1497-1505.
83. **Kaslow DC (2002).** Transmission-blocking vaccines. *Chem Immunol*, 80:287-3
84. **Kaviratne M., Khan SM., Jarra W., Preiser PR (2002)** Small Variant STEVOR Antigen Is Uniquely Located within Maurer's Clefts in *Plasmodium falciparum*-Infected Red Blood Cells. *Eukaryot Cell* 1: 926–935
85. **Kester KE., Cummings JF., Ofori-Anyinam O et al. (2009).** Randomized, double-blind, phase 2a trial of *falciparum* malaria vaccines RTS,S/AS01B and RTS,S/AS02A in malaria-naive adults: safety, efficacy, and immunologic associates of protection. *J Infect Dis* ;200:337-46.
86. **Kraemer SM and J. D. Smith. (2006).** A family affair: var genes, PfEMP1 binding, and malaria disease. *Curr. Opin. Microbiol.* 9: 374–380.

87. **Lambros C., Vanderberg JP. (1979)** Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol*;65:418–420.
88. **Lamont G, Saul A, Kidson C.** *Plasmodium falciparum*: Assay of invasion of erythrocytes. *Exp Parasitol* 1981;51:74–79.
89. **Langhorne J., Cross C., Seixas E., Li C., von der Weid T (1998)** A role for B cells in the development of T cell helper function in a malaria infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 1730–1734
90. **Lantos PM., Ahoundi AD., Bei AK., Jennings CV., Sarr O., Ndir O., Wirth DF., Mboup S., Duraisingh MT. (2009).** Erythrocyte invasion profiles are associated with a common invasion ligand polymorphism in Senegalese isolates of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*, 136(1): p. 1-9.
91. **Lanzilotti R and Coetzer, T.L. (2006).** The 10kDa domain of human erythrocyte protein 4.1 binds the *Plasmodium falciparum* EBA-181 protein. *Malar. J.* 5:100
92. **Lell B., May J., Schmidt-Ott RJ., Lehman LG., Luckner D., Greve B., Matousek P., Schmid D., Herbich K., Mockenhaupt FP., Meyer CG., Bienzle U., Kremsner PG (1999)** The role of red blood cell polymorphisms in resistance and susceptibility to malaria. *Clin Infect Dis* 28: 794-799.
93. **Li C., Corraliza I., and J. Langhorne. (1999).** A defect in interleukin-10 leads to enhanced malarial disease in *Plasmodium chabaudi* infection in mice. *Infect. Immun.* 67:4435-4442.
94. **Liang H., and B.K. Sim. (1997).** Conservation of structure and function of the erythrocyte457 binding domain of *Plasmodium falciparum* EBA-175. *Molecular and biochemical parasitology*, 84(2): p. 241-5.
95. **Lin DH., Malpede BM., Batchelor JD., Tolia NH. (2012).** Crystal and solution structures of *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding antigen 140 reveal determinants of receptor specificity during erythrocyte invasion. *The Journal of biological chemistry*, 287(44): p. 36830-6.
96. **Lopatnicki S., Maier A G., Thompson J., Wilson D W., Tham W-H., Triglia T., Gout A., Speed T P., Beeson J G., Healer J and Cowman A F. (2011).** Reticulocyte and erythrocyte binding-like proteins function cooperatively in invasion of human erythrocytes by malaria parasites. *Infection and immunity*, 79(3): p. 1107-17.
97. **Loscertales M-P and Brabin BJ (2006)** Phenotypes and malaria related outcomes in mothers and babies in The Gambia: a role for histo-blood groups in placental malaria? *Malaria J* 5: 1-6.

98. **Maher B. (2008)** Poll results: look who's doping. *Nature*;452 (7188):674-5.
99. **Malkin EM., Diemert DJ., McArthur JH., Perreault JR., Miles AP., et al. (2005)** Phase 1 clinical trial of apical membrane antigen 1: an asexual blood-stage vaccine for *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun* 73: 3677–3685
100. **Mayer DC., Jiang L., Achur RN., Kakizaki I., Gowda DC., Miller LH. (2006)** The glycoporphin C N-linked glycan is a critical component of the ligand for the *Plasmodium falciparum* erythrocyte receptor BAEBL. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:2358–2362.
101. **Miller LH., Baruch DL., Marsh K., Doumbo OK (2002)** The pathogenic basis of malaria. *Nature* 415: 673–679.
102. **Mitchell G.H., Thomas A.W., Margos G., Dluzewski A.R., and Bannister LH. (2004).** Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. *Infect. Immun.* 72:154–158.
103. **Miura K., Keister DB., Muratova OV., Sattabongkot J., Long CA., and A Saul. (2007)** Transmission-blocking activity induced by malaria vaccine candidates Pfs25/Pvs25 is a direct and predictable function of antibody titer. *Malaria J* 6: 107.
104. **Mons B. (1990).** Preferential invasion of malarial merozoites into young red blood cells. *Blood Cells*;16:299–312
105. **Moulds JM and Moulds JJ (2000)** Blood group associations with parasites, bacteria and viruses. *Transfusion Med Rev* 14: 302-311.
106. **Mourant AE., Kopec AC., Domaniewska-Sobczak K (1976)** The Distribution of the Human Blood Groups and other Polymorphisms. 2nd ed. *Oxford University Press, London*, pp. 705-709.
107. **Narum DL., Haynes JD., Fuhrmann S., Moch K., Liang H., Hoffman SL., and Sim BK. (2000).** Antibodies against the *Plasmodium falciparum* receptor binding domain of EBA-175 block invasion pathways that do not involve sialic acids. *Infection and immunity*, 68(4): p. 1964-6.
108. **Narum DL., Ogun SA., Thomas AW and Holder AA. (2000).** Immunization with parasite-derived apical membrane antigen 1 or passive immunization with a specific monoclonal antibody protects BALB/c mice against lethal *Plasmodium yoelii yoelii* YM blood-stage infection. *Infect. Immun.* 68, 2899-2906
109. **Ndungu FM., Bull PC., Ross A., Lowe BS., Kabiru E., Marsh K. (2002)** Naturally acquired immunoglobulin (Ig)G subclass antibodies to crude asexual *Plasmodium falciparum* lysates: evidence for association with protection for IgG1 and disease for IgG2. *Parasite Immunol* 24: 77–82.

110. **Ohas EA., Adams JH., Waitumbi JN., Orago ASS., Barbosa A., Lanar DE., and Stoute JA. (2004).** Measurement of antibody levels against region II of the erythrocyte-binding antigen 175 of *Plasmodium falciparum* in an area of malaria holoendemicity in western Kenya. *Infection and immunity*, 72(2): p. 735-41.
111. **Okenu DM., Riley EM., Bickle QD., Agomo PU., Barbosa A., Daugherty JR., Lanar DE., Conway DJ (2000)** Analysis of human antibodies to erythrocyte binding antigen 175 of *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* 68 (10): 5559-5566.
112. **Organisation Mondiale de la Santé (OMS). 2011.** Rapport 2011 sur le paludisme dans le monde.
http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/fr/index.html
Consulté le 12 Décembre 2012.
113. **Organisation Mondiale de la Santé (OMS). 2012.** Rapport 2012 sur le paludisme dans le monde.
http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/en/index.html
Consulté le Février 2013.
114. **Ord RL., Rodriguez M., Yamasaki T., Takeo S., Tsuboi T and Lobo CA. (2012).** Targeting sialic acid dependent and independent pathways of invasion in *Plasmodium falciparum*. *PLoS one*, 7(1): p. e30251.
115. **Orlandi PA., Klotz FW., and Haynes JD. (1992).** A malaria invasion receptor, the 175-kilodalton erythrocyte binding antigen of *Plasmodium falciparum* recognizes the terminal Neu5Ac (alpha 2-3) Gal- sequences of glycoporphin A. *J. Cell. Biol.* 116:901-909.
116. **Osier FH., Fegan G., Polley SD., Murungi L., Verra F., Tetteh KKA., Lowe B., Mwangi T., Bull PC., Thomas AW., Cavanagh DR., McBride JS., Lanar DE., Mackinnon MJ., Conway D J and Marsh K. (2008).** Breadth and magnitude of antibody responses to multiple *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with protection from clinical malaria. *Infection and immunity*, 76(5): p. 2240-8.
117. **Pandey AK., Reddy KS., Sahar T., Gupta S., Singh H., Reddy EJ., Asad M., Siddiqui FA., Gupta P., Singh B., More KR., Mohammed A., Chitnis CE., Chauhan VS., Gaur D. (2013).** Identification of a Potent Combination of Key *Plasmodium falciparum* Merozoite Antigens That Elicit Strain-Transcending Parasite-Neutralizing Antibodies. *Infection and immunity*, 81(2): p. 441-51.
118. **Pasquetto V., Fidock DA., Gras H., Badell E., Eling W., Ballou WR., Belghiti J., Tartar A and Druilhe, P (1997).** *Plasmodium falciparum* sporozoite invasion is inhibited by naturally acquired or experimentally induced polyclonal antibodies to the STARP antigen. *Eur J. Immunol* 27(10): 2502-2513

119. **Pathirana SL., Alles HK., Bandara S., Phone-Kyaw M., Perera MK., Wickremasinghe AR., Mendis KN., Handunnetti SM (2005)** ABO blood-group types and protection against severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Ann Trop Med Parasitol* 99: 119-124.
120. **Persson KEM., McCallum FJ., Reiling L., Lister N A., Stubbs J., Cowman AF., Marsh K., and Beeson JG. (2008)**. Variation in use of erythrocyte invasion pathways by *Plasmodium falciparum* mediates evasion of human inhibitory antibodies. *The Journal of clinical investigation*, 118(1): p. 342-51.
121. Programme National de Lutte contre le paludisme du Sénégal (PNLP). Rapport 2008.
122. Programme National de Lutte contre le paludisme du Sénégal (PNLP). **Rapport 2010**. <http://www.pnlp.sn/Rapports/>
Consulté le 25 Mars 2013.
123. Programme national de Lutte contre le paludisme du Sénégal (PNLP). 2010. Plan Stratégique National 2011-2015.
124. **Polley SD., Mwangi T., Kocken CH., Thomas AW., Dutta S., Lanar DE., Remarque E., Ross A., Williams TN., Mwambingu G., Lowe B., Conway DJ., Marsh K. (2004)** Human antibodies to recombinant protein constructs of *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1 (AMA1) and their associations with protection from malaria. *Vaccine.*;23:718–728
125. **Pombo DJ., Lawrence G., Hirunpetcharat C., Rzepczyk C., Bryden M., Cloonan N., Anderson K., Mahakunkijcharoen Y., Martin LB., Wilson D., Elliott S., Elliott S., Eisen DP., Weinberg JB., Saul A., Good MF. (2002)** Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. *Lancet* 360, 610–617
126. **Richards JS., Stanistic DI., Fowkes FJ., Tavul L., Dabod E., Thompson JK., Kumar S., Chitnis CE., Narum DL., Michon P., Siba PM., Cowman AF., Mueller I., Beeson JG. (2010)** Association between naturally acquired antibodies to erythrocyte-binding antigens of *Plasmodium falciparum* and protection from malaria and high-density parasitemia. *Clin Infect Dis.* 15;51(8):e50-60.
127. **Richards JS and JG Beeson (2009)**. The future for blood-stage vaccines against malaria. *Immunology and cell biology*, 87(5): p. 377-90.
128. **Rowe A., Obeiro J., Newbold CI., Marsh K (1995)** *Plasmodium falciparum* rosetting is associated with malaria severity in Kenya. *Infect Immun*; 63: 2323-2326.

129. **Rowe JA., Handel IG., Thera MA., Deans AM., Lyke KE., Koné A., Diallo DA., Raza A., Kai O., Marsh K., Plowe CV., Doumbo OK., Moulds JM. (2007)** Blood group O protects against severe *Plasmodium falciparum* malaria through the mechanism of reduced rosetting. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 17471-17476.
130. **Sarthou JL., Angel G., Aribot G., Rogier C., Dieye A., Toure-Balde A., Diatta B., Seignot P., Roussilhon C (1997).** Pronostic value of anti-*Plasmodium falciparum*-specific immunoglobulin G3, cytokines and their soluble receptors in West African patients with severe malaria. *Infect Immun* 65: 3271-3276.
131. **Scarselli E., R Tolle., O Koita., M Diallo., H M Müller., K Früh., O Doumbo., A Crisanti and H Bujard (1993).** Analysis of the human antibody response to thrombospondin-related anonymous protein of *Plasmodium falciparum*. *Infect. Immun.* 61(8):3490.
132. **Schofield L., Villaquiran J., Ferreira A., Schellekens H., Nussenzweig RS., and V Nussenzweig. (1987).** Gamma-interferon, CD8₊ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites. *Nature* 330:664– 666.
133. **Schwartz E., Sadetzki S., Murad H., Raveh D (2001)** Age as a risk factor for severe *Plasmodium falciparum* malaria in nonimmune patients. *Clin Infect Dis* 33: 1774-1777.
134. **Serjeantson SW (March 1989).** A selective advantage for the Gerbich-negative phenotype in malarious areas of Papua New Guinea. *P N G Med J* 32 (1): 5–9.
135. **Sigler CL., Leland P., and Hollingdale MR. (1984).** In vitro infectivity of irradiated *Plasmodium berghei* sporozoites to cultured hepatoma cells. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33:544–547
136. **Sim BKL. (1994).** *Plasmodium falciparum*: further characterization of a functionally active region of the merozoite invasion ligand EBA-175. *Exp. Parasitol.* 78:259–268.
137. **Sim BK. (1995).** EBA-175: an erythrocyte-binding ligand of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today*;11(6):213–217.
138. **Sim BK. (1998).** Delineation of functional regions on *Plasmodium falciparum* EBA-175 by antibodies eluted from immune complexes. *Molecular and biochemical parasitology*, 95(2): p. 183-92.
139. **Sim BKL., Chitnis CE., Wasniovska K., Hadley TJ., and Miller, L.H. (1994).** Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Science.* 264:1941–1944.
140. **Sim BK., Narum DL., Liang H., Fuhrmann SR., Obaldia N III., Gramzinski R, Aguiar J, Haynes JD., Moch JK., and Hoffman SL. (2001).** Induction of biologically active antibodies in mice, rabbits, and monkeys by *Plasmodium falciparum* EBA-175 region II DNA vaccine. *Mol Med*, 7(4): p. 247-54.

141. **Sim BK., Orlandi PA., Haynes JD., Klotz FW., Carter JM., Camus D., Zegans ME and Chulay, J. D. (1990).** Primary structure of the 175K *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen and identification of a peptide which elicits antibodies that inhibit malaria merozoite invasion. *J Cell Biol*, 111(5 Pt 1): p. 1877-84.
142. **Simpson JA., Silamut K., Chotivanich K., Pukrittayakamee S., White NJ. (1999)** Red cell selectivity in malaria: A study of multiple-infected erythrocytes. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 93:165–168.
143. **Singh AP., Buscaglia CA., Wang Q., Levay A and Nussenzweig DR et al., (2007).** *Plasmodium* circumsporozoite protein promotes the development of the liver stages of the parasite. *Cell*, 131: 492-504.
144. **Singh AP., Puri SK., Chitnis CE (2002)** Antibodies raised against receptor-binding domain of *Plasmodium knowlesi* Duffy binding protein inhibit erythrocyte invasion. *Mol Biochem Parasitol* 121: 21–31.
145. **Sirima SB., Cousens S., and Druilhe P., (2011).** Protection against malaria by MSP3 candidate vaccine. *The New England journal of medicine*, 365(11): p. 1062-4.
146. **Soulama I., Bigoga JD., Ndiaye M., Bougouma EC., Quagraine J., Casimiro PN., Stedman TT., Sirima SB (2011)** Genetic diversity of polymorphic vaccine candidate antigens (Apical Membrane Antigen-1, Merozoite Surface Protein-3, and Erythrocyte Binding Antigen-175) in *Plasmodium falciparum* Isolates from Western and Central Africa. *Am J Trop Med Hyg* 84:276-284.
147. **Spring MD., Chelimo K., Tisch DJ., Sumba PO., Rochford R., Long CA., Kazura JW., Moormann AM. (2010).** Allele specificity of gamma interferon responses to the carboxyl-terminal region of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 by Kenyan adults with naturally acquired immunity to malaria. *Infection and immunity*, 78(10): p. 4431-41.
148. **Spring MD., Cummings JF., Ockenhouse CF., Dutta S., Reidler R., Angov E., Bergmann-Leitner E, Stewart VA., Bittner S., Joumpan L., Kortepeter MG., Nielsen R., Kryzycz U., Tierney E., Ware LA., Dowler M., Hermsen CC., Sauerwein RW., de Vlas SJ., Ofori-Anyinam O., Lanar DE., Williams JL., Kester KE., Tucker K., Shi M., Malkin E., Long C., Diggs CL., Soisson L., Dubois MC., Ballou WR., Cohen J., Heppner DG Jr. (2009).** Phase 1/2a study of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen-1 (AMA-1) administered in adjuvant system AS01B or AS02A. *PloS one*, 4(4): p. e5254.
149. **Stanisic DI., Richards JS., McCallum FJ., Michon P., King CL., Schoepflin S., Gilson PR., Murphy VJ., Anders RF., Mueller I., Beeson JG. (2009)** Immunoglobulin G subclass specific responses against *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with control of parasitemia and protection from symptomatic illness. *Infect Immun.* 77(3):1165-74.

150. **Stowers AW., Kennedy MC., Keegan BP., Saul A., Long CA., Miller LH. (2002)** Vaccination of monkeys with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 confers protection against bloodstage malaria. *Infect Immun*;70: 6961–6967.
151. **Suwancharoen C., Putaporntip C., Rungruang T., Jongwutiwes S. (2011)** Naturally acquired IgG antibodies against the C-terminal part of *Plasmodium falciparum* sporozoite threonine-asparagine-rich protein in a low endemic area. *Parasitol Res.* 109(2):315-20.
152. **Tapchaisri P., Chomcharn Y., Poonthong C., Asavanich A., Limsuwan S., Maleevan O., Tharavanij S., Harinasuta T. (1983)** Anti-sporozoite antibodies induced by natural infection. *Am J Trop Med Hyg.* 32(6):1203–1208.
153. **Tham WH., Wilson DW., Lopaticki S., Schmidt CQ., Tetteh-Quarcoop PB., Barlow PN., Richard D., Corbin JE., Beeson JG., Cowman AF (2010)** Complement receptor 1 is the host erythrocyte receptor for *Plasmodium falciparum* PfRh4 invasion ligand. *PNAS* 107: 17327-17332.
154. **Thera M.A., Doumbo OK., Coulibaly D., Laurens MB., Ouattara A., et al., (2011).** A field trial to assess a blood-stage malaria vaccine. *The New England journal of medicine*, 365(11): p. 1004-13.
155. **Tolia NH., Enemark EJ., Sim BKL and Joshua-Tor L. (2005).** Structural basis for the EBA-175 erythrocyte invasion pathway of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Cell*, 122(2): p. 183-93.
156. **Torii M., Adams JH., Miller LH., Aikawa M. (1989)** Release of dense granules during erythrocyte invasion by *Plasmodium knowlesi*. *Infect Immun*; 57 : 3230-3.
157. **Toure FS., Bisseye C., Mavoungou E (2006)** Imbalanced distribution of *Plasmodium falciparum* EBA-175 genotypes related to clinical status in children from Bakoumba, Gabon. *Clin Med Res* 4: 7-11.
158. **Touré FS., Mavoungou E., Ndong JM., Tshipamba P., Deloron P (2001)** Erythrocyte binding antigen (EBA-175) of *Plasmodium falciparum*: improved genotype determination by nested polymerase chain reaction. *Trop Med Int Health* 6: 767-769.
159. **Triglia T., Duraisingh MT., Good RT., and Cowman, A.F. (2005).** Reticulocyte-binding protein homologue 1 is required for sialic acid-dependent invasion into human erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* 55:162–174.
160. **Udomsangpetch R., Todd J., Carlson J (1993)** The effects of hemoglobin genotype and ABO blood group on the formation of rosettes by *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Am J Trop Med Hyg* 48: 149-153.

161. **Uneke CJ (2007)** *Plasmodium falciparum* malaria and ABO blood group: is there any relationship? *Parasitol Res* 100: 759-765.
162. **Ware LA., Kain KC., Sim BKL, Ha.ynes JD., Baird JK., Lanar DE (1993)** Two alleles of the 175-kilodalton *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen. *Mol Biochem Parasitol* 60: 105-109.
163. **Warsame M., Wernsdorfer WH., Perlmann H., Lebbad M., Ericsson O., Matola YG., Troye-Blomberg M., Perlmann P., Berzins K (1997)** A malariometric survey in a rural community in the Muheza district, Tanzania: age profiles in the development of humoral immune responses. *Acta Trop* 68: 239-253.
164. **Weiss WR., Sedegah M., Beaudoin RL., Miller LH., and M. F. Good. (1988).** CD8_ T cells (cytotoxic/suppressors) are required for protection in mice immunized with malaria sporozoites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:573–576
165. **White N.J., (2011).** A vaccine for malaria. *The New England journal of medicine*, 365(20): p. 1926-7.
166. **Williams T.N. (2006).** Human red blood cell polymorphisms and malaria. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 388–394.
167. **Wykes MN., Liu XQ., Beattie L., Stanisic DI., Stacey KJ., Smyth MJ., Thomas R., and M. F. Good. (2007).** *Plasmodium* strain determines dendritic cell function essential for survival from malaria. *PLoS Pathog.* 3: e96.
168. **Xie L., Li Q., Johnson J., Zhang J., Milhous W., Kyle D. (2007).** Development and validation of flow cytometric measurement for parasitaemia using autofluorescence and YOYO-1 in rodent malaria. *Parasitology* 134:1151 1162.
169. **Zipper H., Brunner H., Bernhagen J., Vitzthum F. (2004).** Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucl Acids Res* ; 32:e103.

THESE DE DOCTORAT

Auteur: Aida Sadikh Badiane

Soutenue le 30 Décembre 2013 à l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar/Sénégal

TITRE: Etude du polymorphisme génétique et de l'immunité humorale induite par le candidat vaccin Erythrocyte Binding Antigen 175 (EBA 175)

JURY:

Président :	Professeur: Souleymane Mboup	FMPO / UCAD
Membres:	Professeur Daouda Ndiaye	FMPO / UCAD (Rapporteur)
	Professeur Tandakha Ndiaye Dièye	FMPO/ UCAD (Rapporteur)
	Professeur Alioune Dièye	FMPO/ UCAD (Examineur)
	Professeur Omar Ndir	FMPO/ UCAD (Directeur de thèse)
	Professeur Manoj Duraisingh	HSPH / Harvard (Co-directeur)

Résumé

Le paludisme continue de causer un problème de santé publique en Afrique. La prise en charge repose sur un diagnostic rapide et un traitement efficace. Malgré une recherche intense, un vaccin n'est toujours pas disponible. Un grand nombre d'antigènes sont des candidats vaccins, parmi lesquels, ceux du stade sanguin.

Plusieurs antigènes du stade asexué sont des candidats vaccins, parmi lesquels on retrouve les ligands parasitaires intervenant dans le processus d'invasion, dont Erythrocyte Binding Antigen 175 (EBA-175) qui est la principale voie d'invasion acide sialique dépendante. La région III de cet antigène présente des allèles dimorphiques appelés allèles F et C et leur association avec la sévérité de la symptomatologie a été décrite. Cependant, le rôle de ce dimorphisme dans les interactions hôte-parasite, telle que l'efficacité de l'invasion érythrocytaire en fonction du génotype reste inconnu à ce jour. La région II de cet antigène est un candidat vaccin majeur et des anticorps sont acquis par les sujets vivant en zone d'endémie, mais leur présence ne signifie pas qu'ils sont protecteurs.

C'est dans ce contexte que nous nous sommes fixés comme objectifs de: 1) Déterminer la prévalence des allèles de la région III (RIII) d'EBA-175 de *P. falciparum* et des antigènes ABO du système sanguin humain en fonction de ces allèles. 3) Faire une étude comparative de la détermination du taux d'érythrocytes infectés entre la cytométrie de flux et la microscopie optique. 4) Rechercher l'inhibition de l'invasion érythrocytaire de *Plasmodium falciparum* par les anticorps dirigés contre la région II d'EBA-175 chez l'homme.

Les anticorps ont été recherchés par ELISA, le génotypage par PCR nichée, les tests d'invasion et d'inhibition de l'invasion ont été réalisés par culture et la lecture par microscopie et par cytométrie de flux.

Le génotypage de la région III a montré une prévalence de 67,45 % pour l'allèle F, 27,90 % pour l'allèle C et 4,65 % présentaient à la fois les deux allèles. La distribution des groupes sanguins se présentaient comme suit, 59,8% pour le groupe O, 19,7% pour le groupe A, 17,2% pour le groupe B and 3,3% pour le groupe AB. Aucune corrélation n'a été retrouvée entre les allèles de la région III d' EBA-175 et les groupes sanguins ou la parasitémie. Aucune corrélation n'a été retrouvée entre les allèles de la région III d' EBA-175 et les groupes sanguins ou la parasitémie. Une étude plus étendue incluant plusieurs zones du Sénégal avec différente endémicité est nécessaire pour déterminer la prévalence des allèles de cette région III.

La mise au point d'un protocole de lecture de la parasitémie par cytométrie flux pour rendre la lecture de la parasitémie après les tests d'invasion et d'inhibition de l'invasion plus aisée et moins subjectifs que la lecture par microscopie a montré une bonne concordance entre ces deux méthodes

Nos résultats ont montré que les anticorps dirigés contre la région RII de *P. falciparum* inhibent de manière significative l'invasion érythrocytaire des souches de terrain, mais cette inhibition n'est pas dépendante de la voie d'invasion utilisant l'acide sialique. Cette étude est la première réalisée avec des souches de terrain et cherchant un lien entre l'inhibition et la voie d'invasion utilisée par *Plasmodium*.

Nos travaux indiquent qu'EBA-175 peut être utilisé comme vaccin du stade érythrocytaire chez l'homme, mais en association avec d'autres antigènes en raison de l'existence des voies alternatives d'invasion.

Mots clés: *Plasmodium*- Immunité- Erythrocyte Binding Antigen-175- Antigènes érythrocytaires-Cytométrie de flux