



HAL
open science

**REPONSES DES ANTICORPS
ANTI-PLASMODIAUX DIRIGÉES CONTRE UN
PANEL D'ANTIGÈNES ET LEUR EFFET À L'ISSUE
DU TRAITEMENT CONTRE LE PALUDISME
SIMPLE EN CÔTE D'IVOIRE**

Serge Stéphane Yao

► **To cite this version:**

Serge Stéphane Yao. REPONSES DES ANTICORPS ANTI-PLASMODIAUX DIRIGÉES CONTRE UN PANEL D'ANTIGÈNES ET LEUR EFFET À L'ISSUE DU TRAITEMENT CONTRE LE PALUDISME SIMPLE EN CÔTE D'IVOIRE. Immunologie. Université Félix Houphouët-Boigny (Abidjan, Côte d'Ivoire), 2018. Français. NNT : . tel-02396377

HAL Id: tel-02396377

<https://theses.hal.science/tel-02396377>

Submitted on 6 Dec 2019

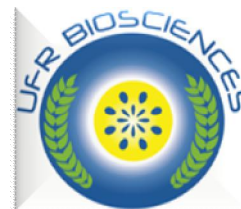
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



REPUBLIQUE DE CÔTE D'IVOIRE
Union-Discipline-Travail

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique



Laboratoire de
Pharmacodynamie-Biochimique

Année Universitaire
2017-2018

THESE

Présentée pour l'obtention du Titre de Docteur de
L'Université Félix HOUPHOUËT- BOIGNY

Spécialité : Biologie fonctionnelle et moléculaire
Option : Parasitologie

M. YAO Serge Stéphane

Numéro d'ordre
2138/2018

REPONSES DES ANTICORPS ANTI-PLASMODIAUX DIRIGÉES CONTRE UN PANEL D'ANTIGÈNES ET LEUR EFFET À L'ISSUE DU TRAITEMENT CONTRE LE PALUDISME SIMPLE EN CÔTE D'IVOIRE

Soutenue publiquement
Le 13 Octobre 2018

Commission du jury

M. KOUASSI Kouassi Philippe	Professeur Titulaire	UFHB	Président
M. DJAMAN Allico Joseph	Professeur Titulaire	UFHB	Directeur
M. TOURE André Offianan	Maître de Recherches	IPCI	Co-directeur
M. KOUDOU Guibéhi Benjamin	Maître de Conférences	UNA	Rapporteur
Mme YAPO CREZOIT Antoinette	Maître de Recherches	IPCI	Examineur



DEDICACES

A mon Dieu Psaume 107(4-7)

« Ils erraient dans le désert, ils marchaient dans la solitude, sans trouver une ville où ils puissent habiter. Ils souffraient de la faim et de la soif ; leur âme était languissante. Dans leur détresse, ils crièrent à l'Eternel, et il les délivra de leurs angoisses ; il les conduisit par le droit chemin, pour qu'ils arrivassent dans une ville habitable ». Oui mon Dieu je me retrouve dans ces paroles saintes. Voici le fruit des efforts fournis à la mesure des talents que tu as daignés m'accorder et des nombreuses grâces liées à ce travail.

A mes défunts grands-parents maternels

Vous aviez été les premiers à me conduire sur la route de l'école. Oui Grand-père ANE Yao, je me souviens de mes premiers pas à l'Ecole Primaire Catholique d'Arrah et tu as ménagé assez d'efforts pour me conduire sur cette voie de l'éducation mais Dieu voulant aujourd'hui tu es loin de moi. Saches que du fond de mon cœur, je te serai toujours reconnaissant. A toi ma grand-mère TANOH Comoé Anne dès le décès de ton mari, tu avais pris la relève dans ma scolarisation. Oui et cela jusqu'à l'université. Mais hélas ton départ prématuré a laissé un grand vide dans mon cœur. Vos conseils et vos soucis permanents du travail bien fait ont forgé cet homme que je suis devenu. Votre affection ne m'a jamais fait défaut. Ce modeste travail est l'occasion pour moi de vous signifier ma gratitude. Nous aurions voulu vous voir là assis en ce jour solennel. Mais Dieu en a décidé autrement. Dormez en paix très chers grands-parents, et que Dieu vous accorde le repos éternel.

Amen!

A ma mère

Je te remercie pour tout ce que tu as fait pour moi et que tu continues de faire pour moi. En plus d'être ma mère, je t'ai toujours prise comme ma grande sœur et d'ailleurs, cela se traduit par cette appellation « TANTIE » quand je dois t'appeler. Je prie Dieu, qu'il te donne longue vie, pleine santé et de bonheur, que tu puisses profiter pleinement de ma réussite.

A mes oncles

YAO Messou, Dr ETTIEN Yapo, ANE Koffi. Vous avez été tous des piliers dans ma vie et surtout pour ma réussite. C'est avec vous que j'ai vécu la plupart du temps. Vos conseils, vos soutiens financiers m'ont aidé dans ma vie scolaire et estudiantine. Cela m'a permis de mieux

comprendre la vie dans toute son intégralité. L'occasion est pour moi, aujourd'hui, de vous dire sincèrement merci pour tout et à vos familles respectives. Que Dieu vous le rende au centuple et vous accorde une longue vie.

A Ma fiancée Victoire Laure Kouamé Aya

Tu as su me supporter pendant cette période si difficile. Tu m'as accepté comme tel et tu m'as aimé malgré ma situation socio-économique difficile. Pour toutes les marques d'affection qui se sont épanchées de ton cœur, pour tes prières discrètes et pour les nombreux sacrifices que tu as dû consentir pendant toutes ces longues années, que Notre Dame des Victoires continue de t'assister tous les jours de ta vie! Saches que je n'oublierai jamais ton aide et je prie le bon Dieu pour qu'Il te donne une longue vie et beaucoup de sa grâce pour que nos futurs enfants bénéficient des fruits de notre réussite.

REMERCIEMENTS

Au terme de cette thèse, je me permets de prendre quelques temps pour exprimer mes sincères remerciements à tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont accompagné et soutenu pour mener à bien ce travail de recherche. En effet, ce travail n'aurait pu se réaliser correctement sans la présence de ces personnes qui m'ont entouré.

*Je remercie le Professeur **ABOU KARAMOKO**, Président de l'Université Félix Houphouët Boigny (UFHB), qui a accepté de m'accueillir depuis le Master dans cette Université qu'il dirige.*

*Je tiens à remercier le Professeur **Paul Essetchi KOUAMELAN**, Directeur de l'UFR Biosciences (UFHB) qui a bien voulu accepter mon inscription en thèse au sein de son établissement et faciliter la collaboration de cette thèse avec l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.*

*Je tiens à remercier le Professeur **DOSSO Mireille**, Professeur Titulaire de Bactériologie-Virologie, Directeur de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI), pour m'avoir accueilli au sein de son institut de recherche de renommée internationale et me permettre de m'initier à la recherche depuis le Master et réaliser ce travail de thèse.*

*L'occasion est pour moi, aujourd'hui, d'exprimer mes sincères remerciements au Professeur **DJAMAN Allico Joseph**, Professeur Titulaire de Biochimie-Parasitologie, Directeur du Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique (UFHB), Chef du département de Biochimie Clinique et Fondamentale de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, pour la confiance qu'il m'a accordée en m'acceptant dans son Laboratoire et en acceptant d'être le Directeur de cette thèse. Merci cher Maître pour avoir minutieusement suivi ce travail pendant ces années de thèse. La rigueur, le souci du détail, l'esprit d'ouverture, et l'humilité dont vous avez fait preuve au cours de votre supervision m'ont convaincu de votre grandeur d'âme et de votre culture scientifique. J'ai toujours reçu de vous une attention particulière quand j'en exprimais le besoin. Merci pour vos conseils et nombreux mots d'encouragement.*

*Je remercie le Docteur **TOURE André Offianan**, Maître de Recherche en Parasitologie-Mycologie, chef de Département de Parasitologie-Mycologie à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, mon co-directeur de thèse. Votre présence et votre disponibilité quotidienne dans l'élaboration et la conduite de ce travail de thèse, les discussions toujours éclairantes ont été pour moi très enrichissantes et une source de motivation. Votre aide et votre soutien financier*

à chaque étape de ce long travail et surtout dans mes inscriptions, m'ont permis d'apprécier votre côté social. Je ne connaissais ni l'Afrique, ni la Côte d'Ivoire, ni les moustiques, ni le paludisme encore moins le Plasmodium, avant de venir dans votre laboratoire. Vous m'avez permis de faire des découvertes passionnantes pendant ces années de recherches. Vous m'avez permis de découvrir plusieurs villes de la Côte d'Ivoire et plusieurs capitales Africaines. Je tiens à vous remercier de m'avoir permis de participer et de m'avoir initié aux communications scientifiques tant au plan national qu'international. Merci infiniment cher Maître. Que Dieu vous le rende au centuple.

Monsieur **KOUASSI Kouassi Philippe**, Professeur Titulaire au Laboratoire de Zoologie et Biologie Animale de l'UFR Biosciences à l'Université Félix Houphouët Boigny. Votre rigueur dans le travail et votre grande culture scientifique fait de vous une référence dans le domaine des sciences biologiques. Je suis très honoré qu'un Scientifique de votre rang soit le Président de mon jury. Veuillez trouver ici ma très grande reconnaissance.

Je remercie monsieur le Docteur **KOUDOU Guibéhi Benjamin**, Maître de Conférences à L'UFR/SN à l'Université Nangui Abrogoua (UNA), Chercheur associé au Centre Suisse de Recherches Scientifiques de Côte d'Ivoire (CSRS). Toute ma reconnaissance pour vos critiques et commentaires dont vous avez fait preuve lors du jugement de ce travail, surtout ceux relatifs à la pertinence des tests statistiques utilisés dans ce travail.

Je suis très sensible à l'honneur que me fait le Professeur **YAPI Houphouët Félix**, Professeur Titulaire de Biochimie au Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique à l'Université Félix Houphouët Boigny (UFHB) en acceptant d'être l'un des rapporteurs de cette thèse. Vous êtes actuellement le Directeur de Cabinet du Ministre de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique, malgré vos contraintes extra-universitaires, vous avez accepté de juger cette thèse. Je vous remercie pour l'ensemble de vos remarques et réflexions ainsi que pour votre disponibilité qui m'a permis de partager et d'enrichir mes connaissances. Je tiens à vous assurer de ma grande estime et de ma profonde gratitude.

Toute ma gratitude et mes remerciements au Docteur **YAPO CREZOIT Antoinette**, Maître de Recherche, Chef d'Unité du Pôle de Biologie de l'Immunité de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI). Je vous dis sincèrement merci de votre disponibilité avec laquelle vous avez accepté de participer au jury de thèse, en étant l'examineur. Votre contribution aussi bien dans la forme que dans le fond m'a été très précieuse.

*Je tiens à remercier le Docteur **Ronan JAMBOU**, Directeur de Recherche à l'Institut Pasteur Paris (IPP) pour les échanges, les suggestions et contributions qui m'ont permis d'améliorer notablement ce travail de recherche.*

*Je suis extrêmement reconnaissant au Docteur **BEOUROU Sylvain**, Maître de Recherche en parasitologie à l'IPCI. Vous m'avez fait l'honneur de me faire découvrir l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Merci cher Maître pour vos encouragements pendant ces années de recherches. Sachez que j'ai appris beaucoup de choses auprès de vous. J'ai été beaucoup émerveillé par votre rigueur dans le travail bien fait, par votre passion pour Plasmodium et votre soutien moral à tous les étudiants du laboratoire de Paludologie. Docteur, trouvez ici l'expression de ma reconnaissance et mon profond respect.*

*Je remercie le Docteur **AKO Berenger Aristide**, Chargé de Recherche à l'unité de paludologie de l'IPCI. Vous avez été un modèle pour moi dans la recherche. Dès mon inscription en Master 2, vous m'avez appris à avoir une passion pour la recherche et surtout à développer mon esprit critique. J'ai appris auprès de vous à transformer les résultats bruts sous formes de résultats finis. Merci pour l'aide supplémentaire que vous m'avez accordée pendant la phase d'analyse statistique de mes données. Vous m'avez accordé de votre temps pour les discussions qui ont été sources de réflexions utiles et qui m'ont aidé dans la rédaction des articles de cette thèse ; et pour toute l'aide que vous avez apportée dans la valorisation de ce travail de thèse. Que Dieu le tout puissant, vous assiste toujours et en tout lieu.*

*Au Docteur **TUO Karim**, Chargé de Recherche à l'Unité de Parasitologie de l'IPCI. Depuis votre soutenance de thèse en 2015, vous m'avez passé le flambeau. Cher frère, merci pour les encouragements à mon endroit. Votre soutien sans faille m'a été utile durant ce parcours. Reconnaissez-vous en ce travail !*

*Au Docteur **KOFFI David**, Attaché de Recherche à l'Unité de Mycologie de l'IPCI. Je n'avais aucune notion de l'immunologie, cette science dont j'ai voulu depuis longtemps m'imprégner. Merci de m'avoir appris les techniques d'ELISA. Vos conseils m'ont été d'une importance capitale dans la réalisation des travaux de cette thèse. Vous avez été une source d'inspiration et un guide pour moi pendant ce travail. Depuis Lille (France), vous avez toujours accepté d'avoir des entretiens avec moi via internet, à des heures tardives, pour la compréhension du sujet. Merci pour tous les efforts que vous avez faits depuis l'élaboration du sujet, du protocole et des résultats. Ce travail est aussi le vôtre.*

Au Docteur N'GUESSAN Landry, Médecin à l'unité de Parasitologie et sous-chef de l'URAP (IPCI), merci infiniment pour le soutien moral au cours de ces années de thèse. Merci beaucoup pour ton aide inestimable dans la collecte des échantillons. Ta grande connaissance dans le domaine Des essais cliniques a facilité la récolte de nos échantillons. Merci pour les conseils que vous m'avez donnés pendant que nous étions sur le terrain. Merci Docteur.

Aux Docteurs Franck REMOUE et Anne POINSIGNON, tous deux chercheurs à l'IRD (Institut de Recherche pour le Développement) à Montpellier (France) et associés à l'IPR (Institut Pierre Richet) de Bouaké. Vous avez apprécié les résultats de cette thèse que j'ai eu à présenter au cours d'un congrès scientifique organisé par le PNL. Par la suite, vous m'avez permis de séjourner dans votre Institut de Recherche à Bouaké. Ce petit temps passé dans votre laboratoire m'a permis d'apprendre auprès de vous d'autres techniques et d'avoir plus la passion pour l'immunologie parasitaire. J'ai été surpris par votre simplicité mais avec une rigueur scientifique dans le travail. Merci Franck et surtout à Anne pour les critiques et suggestions qui m'ont permis d'améliorer le manuscrit. Je souhaite que cette collaboration qui est née entre l'Unité de Paludologie (IPCI) et votre unité à l'IPR soit plus intense et forte.

Au Docteur AKA Kouamé Emmanuel, Médecin ayant effectué ses travaux de thèse de médecine au laboratoire de Paludologie de l'IPCI. C'est avec vous que j'ai été sur le terrain pour la récolte des échantillons en tant que médecin de l'étude. Merci pour votre implication pendant cette phase de ma thèse. Que Dieu vous bénisse!

*Ma thèse, avant d'évoluer vers un long travail de rédaction, a aussi été une aventure sur le terrain aux Centres de Santé Urbains de Libreville de Man et Dar-Es-Salam de Bouaké. Je remercie tout le personnel des deux centres de santé particulièrement le Docteur **KINIFO Lawson Viviane**, Médecin Chef du centre Santé de Libreville de Man, aux infirmiers de ce centre pour leur implication effective dans cette étude.*

Un grand merci également aux participants de cette étude et surtout à leurs parents pour leur compréhension et aussi pour leur rôle joué pendant la récolte des échantillons.

*Je tiens à remercier du plus profond du cœur le Père **Pierre-Richard ATCHEDAN**, vicaire à la paroisse saint Pierre d'Anomanbo pour tout le soutien spirituel et moral qu'il m'a apporté pendant mes années de thèse. Que le Seigneur Jésus Christ vous soutienne et vous assiste dans votre tâche si difficile.*

*Je suis très reconnaissant aux amis, étudiants de thèse et de Master, stagiaires au Département de Parasitologie-Mycologie (IPCI) que sont : **BABA Coulibaly, ADJI Eric, GNONDJUI Alloh Albert, ATTEMENE Serge David, MELKI Jihen, ISSA Mahamat, KOUI Tosséa Stéphane, N'DOCHO Assi Tanguy, KOFFI Attoungbré Clément, N'DRI Kouadio Borel, KONAN Alliali Serge-Hervé.** Merci pour vos marques d'attention à ce travail de thèse qui m'a été confié. Que Dieu vous soutienne également dans cette mission si pénible dans laquelle vous vous êtes engagés. Ne baissez jamais les bras car au bout de l'effort se trouve la récompense.*

*Je n'oublie pas l'ensemble du personnel du Département de Parasitologie-Mycologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire et plus particulièrement le **Dr IRA Bonouman, le Dr ANGORA Etienne, Madame DIOMANDE** et les ingénieurs des techniques sanitaires : Messieurs **Issiaka Bassinka** (anciennement à l'IPCI), **SOUMAHORO Adama, Madame SYLLA née THANON Karidja et Mademoiselle KOUAKOU Larissa.***

*Je tiens à remercier du fond du coeur tout le personnel du Département des Virus Epidémiques (DVE) à l'IPCI avec à sa tête le **Docteur ADJOGOUA Edgard**, chargé de Recherche à l'IPCI, chef de département Des Virus Epidémiques, particulièrement le **Dr AKRAN**, et **Monsieur TIEMOKO**, technicien du département pour le soutien qu'ils m'ont apporté lors de mon passage dans leur département. Que Dieu vous donne une longue vie et une santé de fer.*

Je remercie le réseaux des Instituts Pasteurs pour l'aide qu'ils nous ont apporté pendant ces travaux de thèse.

*Je remercie les enseignants chercheurs du laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique (UFHB), messieurs **N'GUESSAN Jean David, YAPI Houphouët Félix, BIDIE Alain dit Philippe, Yapo Adou Francis**, Professeurs Titulaires. Merci pour la qualité des enseignements que vous avez dispensé pendant mon parcours universitaire.*

*Je tiens à dire également merci à mes Maîtres, les **Docteurs, BAHI Calixte, COULIBALY Founzégué, OUATTARA Karamoko, TREBISSOU Johnson, YEO Dodéché, KRA Adou Mathieu, BAGRE Issa**, Maîtres de Conférences au laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique à l'UFHB. Merci pour vos qualités scientifiques que vous apportez à tout moment aux étudiants du laboratoire.*

*Je ne vous remercierai jamais assez pour vos démarches scientifiques et intellectuelles dont vous faites preuves au cours des enseignements. Je veux nommer, mes Maîtres, les **Docteurs :***

AHUA Maximin, BLA Kouakou Brice, DJYH Bernard Nazaire, SOUMAHORO Thes Marie, KOUASSI Kouakou Serges, OUATTARA Sitapha, enseignants chercheurs du laboratoire de Pharmacodynamie-Biochique, Maîtres Assistants à l'UFHB.

Je suis entièrement reconnaissant aux Docteurs AGRE Josette Epse Kouadio, KOUASSI Konan, PAKORA Gilles Alex, Assistants à l'UFHB, vous avez été pour moi des aînés parfaits qui ont su guider mes pas dans et en dehors de la science. Merci infiniment.

Aux Docteurs AKAKPO Akué Joel, ASSOHOU-Luty Constance, KIPRE Roland, Chargés de recherches au Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique à l'UFHB, merci pour tous les axes de recherches que vous développez au sein du laboratoire.

A Monsieur DAGNOGO Olefongo, ingénieur au laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique, cher grand frère merci pour tout.

Je tiens à remercier toute la famille N'GUESSAN et particulièrement les demoiselles KOUAME Affoué Valérie, KOUAME Akassi Reine et COULIBALY Tatiana. Merci pour vos soutiens spirituels et vos marques d'attention pendant mes années de thèse.

Je ne saurai terminer cette étape de remerciements sans dire un sincère merci à ces différentes familles pour leur soutien spirituel, moral et financier :

Monsieur et Madame ASSANDE Kouadio

Monsieur et Madame NOUGBOU Assamoi

Monsieur et Madame MORO Martin

Monsieur et Madame N'GUESSAN Kouamé

Monsieur et Madame BOUADOU Jean

Monsieur et Madame AFFIAN Fernand

AVANT-PROPOS

L'émergence et l'extension de la résistance aux dérivés de l'artémisinine observées en Asie du Sud-Est constituent un problème de santé publique. L'efficacité des antipaludiques est influencée par plusieurs facteurs dont l'état immunitaire du patient.

C'est dans ce cadre que ce travail de thèse a été initié au laboratoire de pharmacodynamie-Biochimique et au Département de Parasitologie-Mycologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI). Il s'inscrit dans le programme de recherche du Département de Parasitologie-Mycologie de l'IPCI. L'objectif de ce présent travail est de contribuer à une meilleure prise en charge du paludisme en Côte d'Ivoire à travers une meilleure connaissance de l'association entre la réponse immune dirigée contre un panel d'antigènes et l'issue du traitement du paludisme simple à *P. falciparum* avec les Combinaisons Thérapeutiques à base de dérivés de l'Artemisininine.

TABLE DES MATIERES

	Page
DEDICACES.....	I
REMERCIEMENTS.....	III
AVANT-PROPOS.....	IX
LISTE DES FIGURES.....	XIII
LISTE DES TABLEAUX.....	XIV
ABREVIATIONS.....	XV
INTRODUCTION.....	1
I-GENERALITES.....	5
I-1-Généralités sur le paludisme.....	6
I-1-1-Pathologie.....	6
I-1-1-1-Définition.....	6
I-1-1-2-Historique de la maladie.....	6
I-1-1-3-Répartition géographique et épidémiologie du paludisme.....	6
I-1-2-Parasite et vecteur.....	7
I-1-2-1-Parasite.....	7
I-1-2-2-Vecteur du paludisme.....	10
I-1-2-3-Cycle biologique du parasite.....	11
I-1-3-Manifestation clinique du paludisme.....	18
I-1-3-1-Accès palustre de primo-invasion à <i>Plasmodium falciparum</i>	18
I-1-3-2-Invasion.....	18
I-1-3-3-Accès palustre à fièvre périodique.....	19
I-1-3-4-Paludisme grave.....	19
I-1-3-5-Autres complications.....	20
I-1-4-Familles antipaludiques.....	21
I-1-4-1-Traitement spécifique.....	22
I-1-5-Directives de traitement et de prévention du paludisme en Côte d'Ivoire.....	26
I-1-5-1-Traitement.....	26
I-1-5-2-Prévention ou chimioprophylaxie antipaludique.....	26

I-2-Immunité antipaludique.....	27
I-2-1-Immunité cellulaire	29
I-2-2-Immunité humorale	31
I-3-Antigènes de stades asexués	33
I-3-1-Antigènes pré-érythrocytaires	35
I-3-1-1-Circum sporozoite Protein.....	35
I-3-1-2-Liver Stage Antigen 3	35
I-3-1-3-Sporozoite And Liver Stage Antigen	35
I-3-2-Antigènes érythrocytaires	35
I-3-2-1-Glutamate Rich Protein	35
I-3-2-2-Apical Membran Antigen 1	36
I-3-3-Thérapie vaccinale	36
II-MATERIEL & METHODES	38
II-1-Type et sites d'étude	39
II-2-Période d'étude	41
II-3-Population d'étude	41
II-3-1-Taille de l'échantillon	43
II-3-2-Traitement des patients	43
II-4-Procédures biologiques	44
II-4-1-Goutte Epaisse et Frottis Sanguin	44
II-4-2- Biologie Moléculaire (PCR).....	45
II-4-3-Technique immuno-enzymatique ELISA	53
II-5-1-Principe	53
II-5-2-Préparation de la solution de lavage.....	53
II-5-3-Préparation de la solution de saturation	53
II-6-Considérations éthiques et réglementaires	55
II-7-Analyses statistiques	55
III-RESULTATS	57
III-1-Association entre les réponses d'anticorps dirigées contre les antigènes et l'issue du traitement aux Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine à Man	58
III-1-1- Caractéristiques des patients à l'inclusion	58
III-1-2-Comparaison de la proportion des répondeurs entre J0 et J7	62

III-1-3-Distribution de la réponse moyenne spécifique à chaque antigène en fonction du temps de clairance parasitaire	64
III-1-4-Relation entre l'âge et le niveau d'anticorps moyen spécifique à chaque antigène à J0	64
III-1-5-Analyse du profil des anticorps spécifiques aux antigènes à J0 et à J7	67
III-1-6-Corrélation entre les réponses anticorps, l'âge et la densité parasitaire des patients à l'inclusion	69
III-1-7- Association entre le niveau de réponse anticorps spécifique aux antigènes et l'issue du traitement	71
III-1-8-Réponse thérapeutique à J42 dans les deux bras de traitement	71
III-2-Comparaison du niveau de réponse spécifique dirigée contre les antigènes candidat vaccin de <i>Plasmodium falciparum</i> dans deux faciès épidémiologiques différents	75
III-2-1-Caractéristiques de la population d'étude	75
III-2-2-Proportion des réponders aux différents antigènes à Man et Bouaké	77
III-2-3-Comparaison du niveau moyen de réponse spécifique à chaque antigène en fonction des sites d'étude.....	77
III-2-4-Distribution globale des réponses moyennes spécifiques à chaque antigène à J0 et J7 par site d'étude.....	80
III-2-5-Niveau moyen d'anticorps spécifique à chaque antigène stratifié par le sexe et par site d'étude.....	83
III-2-6-Niveau moyen de réponse anticorps spécifique à chaque antigène en fonction des sites stratifié par tranche d'âge.....	85
IV-DISCUSSION	87
V- CONCLUSION ET PERSPECTIVES	96
VI-REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	99
ANNEXES	129

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1 : Répartition géographique du paludisme dans le monde.....	9
Figure 2 : Cycle de vie du <i>Plasmodium falciparum</i>	12
Figure 3 : Invasion des érythrocytes par des mérozoïtes de <i>Plasmodium falciparum</i>	16
Figure 4 : Répertoire d'antigènes à potentiel vaccinal contre le paludisme	34
Figure 5 : Localisation des sites d'étude	42
Figure 6 : Profil de l'essai clinique de Man	59
Figure 7 : Profil de l'essai clinique des patients de Bouaké	60
Figure 8 : Réponses spécifiques à chaque antigène avant le traitement sur les deux sites.....	81
Figure 9 : Réponses spécifiques à chaque antigène après le traitement sur les deux sites	822

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau I: Médicaments antipaludiques	24
Tableau II: Séquences des amorces des PCR	48
Tableau III: Composition du milieu réactionnel de la PCR	49
Tableau IV : Programme d'amplification de la PCR 1	50
Tableau V: Programme d'amplification de la PCR 2	50
Tableau VI: Description de l'issue des antipaludiques selon l'OMS	51
Tableau VII : Séquences des peptides utilisés et lieu de sécrétion	52
Tableau VIII : Caractéristiques des patients à l'inclusion	61
Tableau IX : Proportions des répondeurs aux jours 0 et 7	63
Tableau X : Distribution de la réponse moyenne spécifique à chaque antigène en fonction du temps de clairance parasitaire	65
Tableau XI : Relation entre l'âge et le niveau d'anticorps spécifique à chaque antigène	66
Tableau XII : Niveau moyen de réponse anticorps spécifiques aux antigènes avant et après le traitement	68
Tableau XIII : Corrélation entre les anticorps spécifiques aux antigènes, l'âge et la densité parasitaire à l'inclusion	70
Tableau XIV : Réponse thérapeutique dans les deux bras de traitement (AS+AQ et AL)	72
Tableau XV : Comparaison des réponses des anticorps des patients traités à l'artéméther-luméfanantrine et ayant une réponse clinique et parasitologique adéquate ou un échec thérapeutique	73
Tableau XVI : Comparaison des réponses des anticorps des patients traités à artésunate-amodiaquine et ayant une réponse clinique et parasitologique adéquate ou un échec thérapeutique	74
Tableau XVII: Caractéristiques de la population d'étude	76
Tableau XVIII : Proportions des répondeurs à chaque antigène sur les deux sites	78
Tableau XIX : Niveau moyen d'anticorps spécifique à chaque antigène en fonction du site d'étude ..	79
Tableau XX : Niveau moyen d'anticorps spécifique à chaque antigène stratifié par le sexe et par site d'étude	84
Tableau XXI : Distribution du niveau moyen de réponse spécifique à chaque antigène par site en fonction des groupes d'âge	86

ABREVIATIONS

ABRA :	Acid Basic Repeat Antigen
ADCI :	Antibody-Dependent Cellular Inhibition
ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
AL :	Artéméther-Luméfantrine
AMA-1 :	Apical Membrane Antigen 1
AQ :	Amodiaquine
AS + SP :	Artésunate plus Sulfadoxine-Pyriméthamine
AS +MQ :	Artésunate plus Méfloquine
ASAQ :	Artésunate plus Amodiaquine
BSA :	Bovine Serum Albumin
CellTOS :	Cell-Traversal protein for Ookinètes and Sporozoites
CMH :	Complexe Majeur d’Histocompatibilité
CQ :	Chloroquine
CSP :	Circumsporozoïte Protein
CSUL :	Centre de Santé Urbain de Libreville
CTA :	Combinaison Thérapeutique à base d’Artémisinine
DARC :	Duffy Antigen Receptor for Chemokines
DO :	Densité Optique
DP :	Densité Parasitaire
DP :	Dihydroartemisinine Pipéraquine
EBA-175 :	Erythrocyte Binding Antigen-175
EDTA :	Ethylene Diamine Tetraacetic
ECT :	Echec Clinique Tardif
ELISA :	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPT :	Echec Parasitologique Tardif
ETP :	Echec Thérapeutique Précoce
G6PD :	Glucose–6–Phosphate Déshydrogénase
GAG :	Glycosaminoglycanes
GE/FS :	Goutte Epaisse/Frottis Sanguin

GLURP :	Glutamate Rich protein
H₃PO₄ :	Trihydrogénophosphate (Acide ortho phosphorique)
HbF :	Hémoglobine Fœtale
HbS/C/E :	Hémoglobinoses S/C/E
HRP :	Histidin Rich Protein
IFN-γ :	Interféron gamma
IgG :	immunoglobuline G
IL :	Interleukine
IPCI :	Institut Pasteur de Côte d'Ivoire
IPR :	Institut Pierre Richet
kDa :	Kilodalton
LSA :	Liver Stage Antigen
MESH :	merozoïte surface sheddase
MII :	Moustiquaires Imprégnés d'Insecticides
MILDA :	Moustiquaires Imprégnés d'Insecticides à Longue Durées d'Actions
MSP1 :	Merozoïte Surface Protein 1
MSP1,2,3 :	Merozoïte Surface Protein1, 2, 4
NANP :	Asn-Asp-Asn-Pro
NK :	Natural Killer
NVDP :	Asn-Val-Asp-Pro
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PBS :	Phosphate Buffered Saline
Pf155/RESA :	Antigène <i>Plasmodium falciparum</i> 155/Roseting Erythrocyte Surface Antigen
Pf332 :	<i>Plasmodium falciparum</i> 322
PfEMP1 :	<i>Plasmodium falciparum</i> Erythrocyte Membrane Protein
PNLP :	Programme National de Lutte contre le Paludisme
PvDBP :	<i>Plasmodium vivax</i> Duffy – Binding Protein
PVE :	Paludisme Viscéral Evolutif
RCPA :	Réponse Clinique Parasitologique Adéquate
RtDO :	Ratio Densité Optique
SALSA :	Sporozoïtes And Liver Stage Antigen

SERA :	Serin-Rich-Antigen
SP :	Sulfadoxine – Pyriméthamine
SPILF :	Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française
SSP :	Sporozoïte Surface Protein
Th1/2 :	T Helper 1/2 (encore appelé lymphocytes T Helper 1 et 2)
TMB :	Tétra Méthyl Benzidine
TIE :	Taux d’Inoculation Entomologique
TNF-α :	Tumor Necrosis Factor alpha
TRAP :	Thrombospondin – Related Anonymous Protein
T$\gamma\delta$:	Lymphocytes T gamma/delta
UPAL :	Unité de Paludologie
WHO :	World Health Organization

INTRODUCTION

Le paludisme est causé par un parasite intracellulaire obligatoire du genre *Plasmodium*. C'est la maladie parasitaire la plus répandue dans le monde. L'espèce *Plasmodium falciparum* est la plus redoutable parmi les cinq espèces infectant l'homme (Snow *et al.*, 2005). Il est responsable de 445 000 décès en 2017, majoritairement des enfants de moins de 5 ans. La région OMS d'Afrique demeure la plus touchée avec environ 91% des cas de décès (WHO, 2017). En Côte d'Ivoire, le paludisme constitue 33 % des motifs de consultation et la première cause d'hospitalisation dans les centres de santé. Les femmes enceintes et les enfants de moins de cinq ans sont les populations les plus atteints. En 2017, 3,5 millions de cas de paludisme ont été enregistrés avec 3200 cas de décès (WHO, 2017). Suite au développement et à l'augmentation de la résistance de *P. falciparum* à certaines molécules usuelles telles que la chloroquine, la sulfadoxine peryméthamine, les Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA) ont été recommandées depuis 2001 par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme traitement de première ligne contre le paludisme simple à *Plasmodium falciparum* dans tous les pays endémiques (WHO, 2015). Ainsi, la Côte d'Ivoire a adopté depuis 2005 les associations Artesunate + Amodiaquine (AS + AQ) et Artemether + Lumefantrine (AL), pour le traitement du paludisme simple à *P. falciparum* en première intention (PNLP, 2008). Les CTA et les autres mesures de préventions telles que les MILDA (Moustiquaires Imprégnés à Longue Durées d'Actions) ont conduit à une réduction significative de l'incidence du paludisme et de la mortalité, en particulier, en Afrique subsaharienne (WHO, 2014). Malheureusement, ces progrès peuvent être remis en cause par l'émergence et l'extension de la résistance aux dérivés de l'artémisinine observées en Asie du Sud-Est (Dondorp *et al.*, 2011 ; Ashley *et al.*, 2014). La cause prédominante de l'échec du traitement est la résistance du parasite au principe actif du médicament, ou dans le cas d'une thérapie combinée, une résistance à un ou plusieurs des composants actifs. Cependant, il existe une importante variabilité interindividuelle dans le mécanisme de la clairance parasitaire. L'efficacité des antipaludiques est influencée par des facteurs tels que le stade de vie du parasite, le profil pharmacocinétique et les niveaux de réponses immunitaires du patient (Nébié *et al.*, 2008 ; White, 2011). Les résidents des régions d'endémie palustre développent une immunité naturelle qui leur confère une protection partielle contre le paludisme à *P. falciparum*. Cette immunité est lentement mise en place après des infections répétées (Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1990 ; Gonçalves *et al.*, 2014 ; Galatas *et al.*, 2016). Ces individus peuvent tolérer des parasitémies élevées. Dans les zones où la transmission est faible, le paludisme clinique a été associé à de faibles densités parasitaires (Gatton & Cheng, 2004). Il a été démontré que les mécanismes de l'immunité antiparasitaire sont différents chez

des personnes vivant dans des zones à transmission différente (**Reyburn et al., 2005 ; Boutlis et al., 2006 ; Fowkes et al., 2016**). La clairance parasitaire est plus lente en milieu de faible transmission et relativement rapide dans les zones à forte transmission, ce qui suggère que l'immunité acquise contribue à l'élimination des parasites (**Stepniewska et al., 2010**). Cependant, l'association entre les niveaux des immunoglobulines (IgG) spécifiques à *P. falciparum* et la réduction du risque d'infection du paludisme fait débat (**Bejon et al., 2011 ; Wilson et al., 2013 , Biswas et al., 2014**). Les anticorps contre les antigènes de *P.falciparum* ciblent le stade des sporozoïtes conduisant à une réduction subséquente de la transmission et de l'infection. Dans ce cas, la multiplication des parasites est réduite de même que les signes cliniques du paludisme (**Fowkes et al., 2010 ; Chan et al., 2014**). L'efficacité du traitement s'améliore avec l'âge et l'intensité de la transmission, suggérant que l'acquisition de l'immunité peut jouer un rôle dans la détermination de l'efficacité du traitement antipaludique (**Staedke et al., 2004 ; Francis et al., 2006 ; Greenhouse et al., 2009**). A ce sujet, des travaux antérieurs réalisés en Afrique principalement dans les zones à forte transmission ont noté des associations diverses entre l'immunité et l'efficacité du traitement avec la sulfadoxine pyriméthamine, la chloroquine et les CTAs (**Van Geertruyden et al., 2009 ; Borrmann et al., 2011 ; Diarra et al., 2012**).

Le génome de *Plasmodium falciparum* contient 14 chromosomes avec plus de 5000 gènes qui codent pour divers enzymes et protéines de transport, dont certaines ont été identifiées comme candidat vaccin. Plus de 40 protéines de mérozoïtes impliquées dans l'invasion ont été identifiées, dont la plupart ont été considérés comme des cibles de l'immunité acquise (**Doolan, 2011**). Le rôle des anticorps particulièrement les immunoglobulines (IgG), dans la protection contre l'infection palustre a été démontré par les expériences de transfert passif de plasma provenant d'individus vivant en zone d'endémie à des personnes naïves non exposées (**Bouharoun-Tayoun et al., 1990 ; Sarr et al., 2011**).

L'infection palustre induit la production d'anticorps contre les antigènes candidats vaccins comprenant les antigènes pré-érythrocytaires (CSP, LSA3, SALSA, etc.) et érythrocytaires (AMA1, GLURP, Extrait total de schizonte 07/03). Plusieurs études séro-épidémiologiques ont montré que les antigènes précités joueraient un rôle prépondérant dans l'acquisition de l'immunité protectrice contre le paludisme et ont été associés avec un risque réduit des signes cliniques du paludisme (**Polley et al., 2004 ; Osier et al., 2008 ; Diop et al., 2014 ; Adu et al., 2016**).

En Côte d'Ivoire, pays d'endémie palustre, la transmission est hétérogène avec des caractéristiques épidémiologiques différentes d'une zone à une autre pouvant influencer la réponse immune de l'hôte. A Man, la transmission est intense, pouvant présager d'un niveau important d'anticorps produits par les patients. A Bouaké, la transmission est hétérogène et le taux d'innoculation entomologique (0,05 p/h/n) faible trouvé dans le quartier Dar-Es-Salam (Bouaké) contraste avec la prévalence élevée du paludisme dans cette zone (**Anonyme-1, 2017**) avec une incidence du paludisme de plus de 250 cas pour 1000 (**Anonyme-2, 2015**). Les marqueurs sérologiques pourraient permettre de déterminer le niveau réel de transmission du paludisme à Dar-es-Salam. L'apport de la réponse immune dans l'issue du traitement et l'effet du faciès épidémiologique sur la réponse immune en Côte d'Ivoire méritent d'être analysés. Dans le cadre de ces travaux, les questions de recherche suivantes ont été abordées :

- La réponse immune contre les antigènes de *P. falciparum* favoriserait-elle l'issue du traitement du paludisme à *P. falciparum* avec les CTA ?
- Le niveau d'anticorps contre les antigènes de *Plasmodium falciparum* serait-il plus important à Man (Ouest) qu'à Bouaké (Centre) de la Côte d'Ivoire ?

En rapport avec ces questions de recherche, les hypothèses suivantes ont été émises :

- La réponse immune favoriserait une réponse rapide du traitement avec les CTA
- L'intensité de la réponse immune serait plus importante à Man (Ouest) qu'à Bouaké (Centre) de la Côte d'Ivoire

L'objectif général de cette étude est de contribuer à une meilleure prise en charge du paludisme en Côte d'Ivoire à travers une meilleure connaissance de l'association entre la réponse immune dirigée contre un panel d'antigènes et l'issue du traitement du paludisme simple à *P. falciparum* avec les CTA. Il s'agit plus spécifiquement de :

- Comparer les réponses anticorps dirigées contre les antigènes de *P. falciparum* entre les patients ayant une Réponse Clinique Parasitologique Adéquate (RCPA) et ceux présentant un échec thérapeutique aux CTA d'une part et d'autre part en fonction de l'évolution de la clairance parasitaire pendant le traitement avec les CTA
- Comparer les réponses anticorps dirigées contre les antigènes candidats vaccins de *P. falciparum* chez des patients vivants dans deux faciès épidémiologiques différents de la Côte d'Ivoire (Man et Bouaké).

I- GENERALITES

I-1-Généralités sur le paludisme

I-1-1-Pathologie

I-1-1-1-Définition

Le paludisme (palud=marais) ou malaria (mauvais air) est une maladie fébrile provoquée par un protozoaire du genre *Plasmodium* appartenant au phylum des Apicomplexa et transmis à l'homme par la piqûre d'un moustique vecteur du genre *Anopheles* dont seule la femelle transmet la maladie (Saye, 2006).

I-1-1-2-Historique de la maladie

Le paludisme est connu par ses manifestations cliniques depuis l'antiquité. Les termes italiens *Mal'aria* « mauvais air » ou encore latin *paludis*, « marais » furent décrits, entre autres, par Hippocrate (460-377 av JC), qui établit d'ailleurs une relation pertinente entre la date et le lieu où les malades vivent lorsqu'ils succombent. En Chine, dès le IV^e siècle, le *Qinghaosu* ou *Artemisia annua* était connu pour ses vertus fébrifuges. En 1620, Don Francisco Lopez, père jésuite, reconnaît les vertus curatives de la poudre d'écorce du quinquina (Rocco, 2006). En 1880, Alphonse Laveran, médecin militaire français, observe en Algérie des éléments cellulaires intra-érythrocytaires n'appartenant à aucune lignée hématologique ; l'hématozoaire du paludisme est découvert. En 1897, le britannique Sir Ronald Ross, médecin de l'armée des Indes prouve le rôle des moustiques dans la transmission du paludisme aviaire, et Giovanni-Battista Grassi en 1898 en Italie, démontre que l'anophèle est le vecteur du paludisme humain. La phase de division dans le foie ne sera identifiée que bien plus tard en 1948 par Short et Garnham. Ils permettent ainsi de compléter la connaissance du cycle du parasite et d'expliquer les rechutes de la maladie observées dans certains cas. La seconde guerre mondiale empêchant l'accès aux plantations indonésiennes de quinquina ouvrait la voie du développement et de l'utilisation des premiers anti-malariques de synthèse (amino-4-quinoléines). La lutte contre le vecteur devenait possible grâce à la découverte des insecticides à action rémanente qui permirent l'éradication de l'affection dans des régions d'Europe encore atteintes, et dans certaines îles. (Malvy et al., 2000).

I-1-1-3-Répartition géographique et épidémiologie du paludisme

Le paludisme sévit dans plus de 100 pays tropicaux et subtropicaux, notamment en Afrique subsaharienne, en Asie, dans le Pacifique, en Amérique latine (figure 1). Les estimations font état de 216 millions d'épisodes de paludisme dans le monde. Plus de 90 % des cas ont eu lieu dans la région Afrique et 7 % dans la région Asie du Sud-Est (WHO, 2017). À l'échelle

mondiale, 70 % des décès imputables au paludisme ont concerné des enfants de moins de 5 ans et 445 000 cas de décès ont été enregistrés. *P. falciparum* est l'espèce la plus redoutable avec 99% de décès qui lui sont attribués. La région OMS d'Afrique demeure la plus touchée avec environ 91% des cas de décès (**WHO, 2017**).

I-1-2-Parasite et vecteur

I-1-2-1-Parasite

Il existe plus de 140 espèces de *Plasmodium* inféodées à diverses espèces animales mais seulement 4 espèces sont responsables du paludisme humain. Il s'agit de *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), *Plasmodium malariae* (*P. malariae*), *Plasmodium ovale* (*P. ovale*) et *Plasmodium vivax* (*P. vivax*) qui diffèrent entre elles par des critères biologiques, cliniques, répartition géographique et leur capacité à développer des résistances aux antipaludiques. *Plasmodium knowlesi*, généralement retrouvé dans la nature chez les singes macaques, a été identifié comme étant la cinquième espèce de *Plasmodium* causant le paludisme chez l'homme en Asie du Sud-Est (**White, 2008 ; Bronner et al., 2009**). Quarante-vingt-cinq pourcent (95%) des cas de paludisme recensés à travers le monde sont dus à *P. falciparum* et *P. vivax*. Les infections à *P. falciparum* sont très répandues dans les grandes régions de l'Afrique subsaharienne et dans les pays d'Asie de l'Est. Près de 60 à 80 % des accès palustres dans le monde sont dus à *P. falciparum* (**Vangapandu et al., 2007 ; de Gentile, 2008 ; Schlitzer, 2008 ; Hay et al., 2009**). *P. vivax* et *P. ovale*, quant à eux, sont responsables des rechutes tardives plusieurs mois et/ou années après l'épisode initial de la maladie. De ces 5 espèces, *P. falciparum* est l'agent causal des formes cliniques potentiellement mortelles du paludisme. C'est encore elle qui présente une résistance clinique à la plupart des antipaludiques disponibles sur le marché (**Pages et al., 2007 ; Das et al., 2009**). Toutefois, de plus en plus, *P. vivax* est impliqué dans des cas de paludisme grave (**Picot et al., 2009 ; Kochar et al., 2009**) et de chimiorésistance (**Barnadas et al., 2008 ; Marfurt et al., 2008 ; Teka et al., 2008**). Bien qu'une similitude élevée soit retrouvée entre les gènes fonctionnels de *P. falciparum* et de *P. vivax*, il existe cependant, plusieurs traits caractéristiques distincts entre ces deux parasites (**Das et al., 2009**). Le contrôle de ce fléau mondial qu'est le paludisme, se heurte à la résistance du parasite à la plupart des antipaludiques disponibles sur le marché, d'une part (**Hayton et al., 2008 ; Plowe, 2009**) et du vecteur (anophèles femelle) aux insecticides, d'autre part (**Brooke et al., 2008 ; Awolola et al., 2009**). Cette résistance des anophèles aux insecticides a profondément perturbé les programmes nationaux et régionaux de lutte anti vectorielle (**Talisuna et al., 2007 ; Hayton**

et al., 2008 ; Plowe, 2009). L'apparition et la propagation des souches résistantes de *Plasmodium* aux principaux antipaludiques a pour conséquence l'augmentation notable de la morbidité et de la mortalité palustre. Ces conséquences sont, en autres, les anémies sévères, les faibles poids à la naissance et l'accroissement du portage des gamétocytes (*Pongtavornpinyo et al., 2009 ; Rogers et al., 2009*). Ainsi, la recherche de nouvelles approches préventives et thérapeutiques est nécessaire.

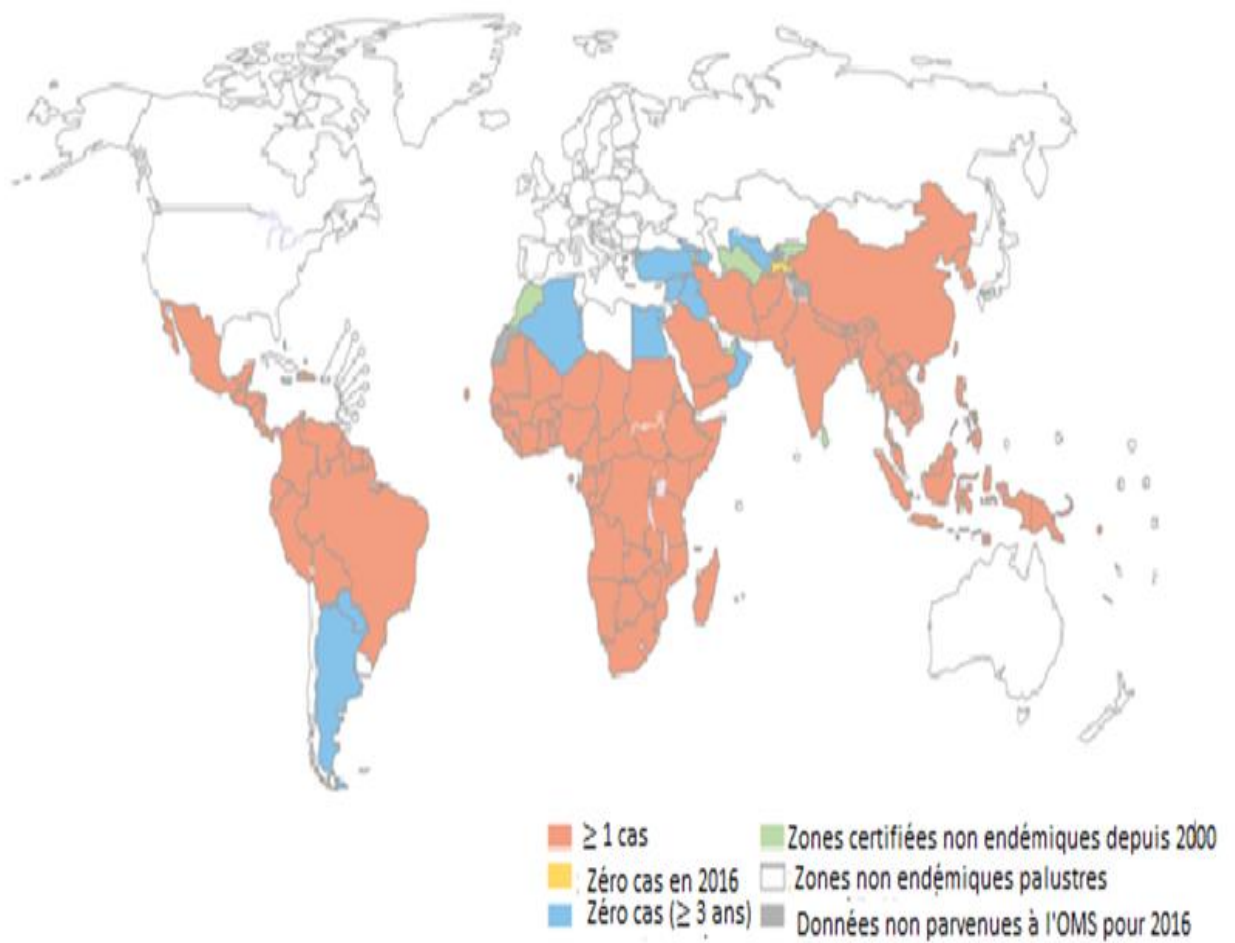


Figure 1 : Répartition géographique du paludisme dans le monde
(**Rapport OMS, 2017**)

I-1-2-2-Vecteur du paludisme

Le vecteur du paludisme humain est l'anophèle femelle, moustique appartenant à l'ordre des Diptères, à la famille des *Culicidae*, à la sous famille des *Anophelinae* et au genre *Anopheles*. (Du grec « *Anôphelês* », signifie « inutile » par la combinaison du « *an* » traduisant le privatif et de « *ôphelês* » qui signifie « utile »).

La transmission de la maladie à l'homme se fait principalement par la piqûre infestante du moustique pendant son repas sanguin. Seule la femelle est hématophage. L'étude du cycle nocturne d'agressivité des moustiques montre des pics d'activité est situé entre 0 h-2 h pour *Cx. pipiens* et 2 h- 4 h pour *An. gambiae*. Ces heures coïncident avec la période où l'homme est profondément endormi. L'activité maximale de ces espèces de moustiques à cette période démontre à quel point ces espèces sont inféodées aux habitudes de l'homme pour la recherche de leur repas de sang (Ntonga *et al.*, 2017).

Dans la littérature, environ 500 à 600 espèces d'anophèles sont décrites, mais seules 70 à 80 soit 10% d'entre elles sont vectrices de parasites (dont *Plasmodium*) à l'homme (Pages *et al.*, 2007 ; Boëte, 2009).

Les principaux vecteurs du paludisme sont, pour l'Afrique : *Anopheles gambiae* ss., *An. arabiensis*, *An. funestus*, *An. nili* et *A. moucheti*. D'autres tels que : *An. melas*, *An. merus*, *An. paludis*, *An. pharoensis*, *An. hancocki* sont des vecteurs d'importance locale, dits "secondaires" (pour l'Afrique centrale). Pour la zone américaine : *An. darlingi*, *An. albimanus*, *An. pseudopunctipennis*, *An. quadrimaculatus*.

Chacune de ces espèces a des exigences écologiques particulières. Par exemple, *An. gambiae* se développe plutôt dans de petites collections d'eaux claires, ensoleillées et sans végétation tandis qu'*An. arabiensis*, colonise les environnements plus secs jusqu'en bordure du Sahara. Quant aux autres espèces, *An. funestus* peuple les marais à végétation dressée ; *An. nili* se développe sur les bords des rivières à courant rapide et *An. moucheti* se développe dans les fleuves à courant lent, dans le bloc forestier d'Afrique centrale. D'autres espèces telles qu'*An. melas* et *An. merus*, se développent dans les eaux saumâtres des zones côtières (Esnault *et al.*, 2008). Au Malawi, des observations cytogénétiques et moléculaires ont permis la mise en évidence d'une nouvelle sous-espèce d'*Anopheles giles*, un des vecteurs majeurs de paludisme en Afrique, provisoirement nommé *funestus-like* (Spillings *et al.*, 2009). Le développement, la longévité et la distribution des anophèles dépendent du climat et de la

température avec un optimum entre 20 et 30°C pour une durée de vie de l'ordre de 30 jours (**Pascual et al., 2009**). Les femelles s'accouplent généralement une seule fois au cours de leur vie, contrairement aux mâles et conservent le sperme dans des spermathèques tout au long de leur vie pour féconder tous les lots d'œufs successifs. Pour cela, elles ont besoin d'un repas sanguin (prélevé chez l'homme et certains mammifères) tous les 2 à 3 jours pour la maturation des œufs et la ponte (cycle gonotrophique). Hormis ce besoin, les moustiques adultes (mâles et femelles) se nourrissent principalement de nectar. La recherche de l'hôte se fait à distance en remontant les émissions de gaz carboniques (CO₂), puis à proximité en fonction des odeurs corporelles. Elles représentent un hôte définitif pour les parasites du genre *Plasmodium* tandis que l'homme constitue l'hôte intermédiaire (**Jason Pitts et al., 2006 ; Pages et al., 2007**).

I-1-2-3-Cycle biologique du parasite

Les plasmodies sont des parasites intracellulaires obligatoires des vertébrés transmis à l'homme par la piqûre infestante d'un anophèle femelle. Le cycle biologique de transmission du *Plasmodium* est un processus complexe nécessitant l'interaction entre l'hôte vertébré (**homme** = hôte intermédiaire) hébergeant la multiplication asexuée (**schizogonie**), le **parasite**, et le **moustique vecteur** (hôte définitif) chez lequel se déroule la reproduction sexuée (sporogonie) et un environnement propice. Selon **Bousema & Drakeley (2011)** ; on peut résumer cette transmission en quatre phases cycliques : 1) le développement du parasite chez l'homme jusqu'au stade gamétoocyte qui comprend deux cycles asexués dont le premier se passe dans les cellules du foie (cycle schizogonique exo-érythrocytaire intra-hépatique) au cours duquel on n'observe pas de manifestations cliniques (phase d'incubation) et l'autre, intra-érythrocytaire (cycle schizogonique intra-érythrocytaire) correspondant à la phase de manifestations cliniques, 2) la transmission du parasite de l'homme au moustique vecteur, 3) le développement du parasite au sein du moustique vecteur (cycle sporogonique) et 4) la transmission du moustique vecteur à l'homme (**Figure 2**).

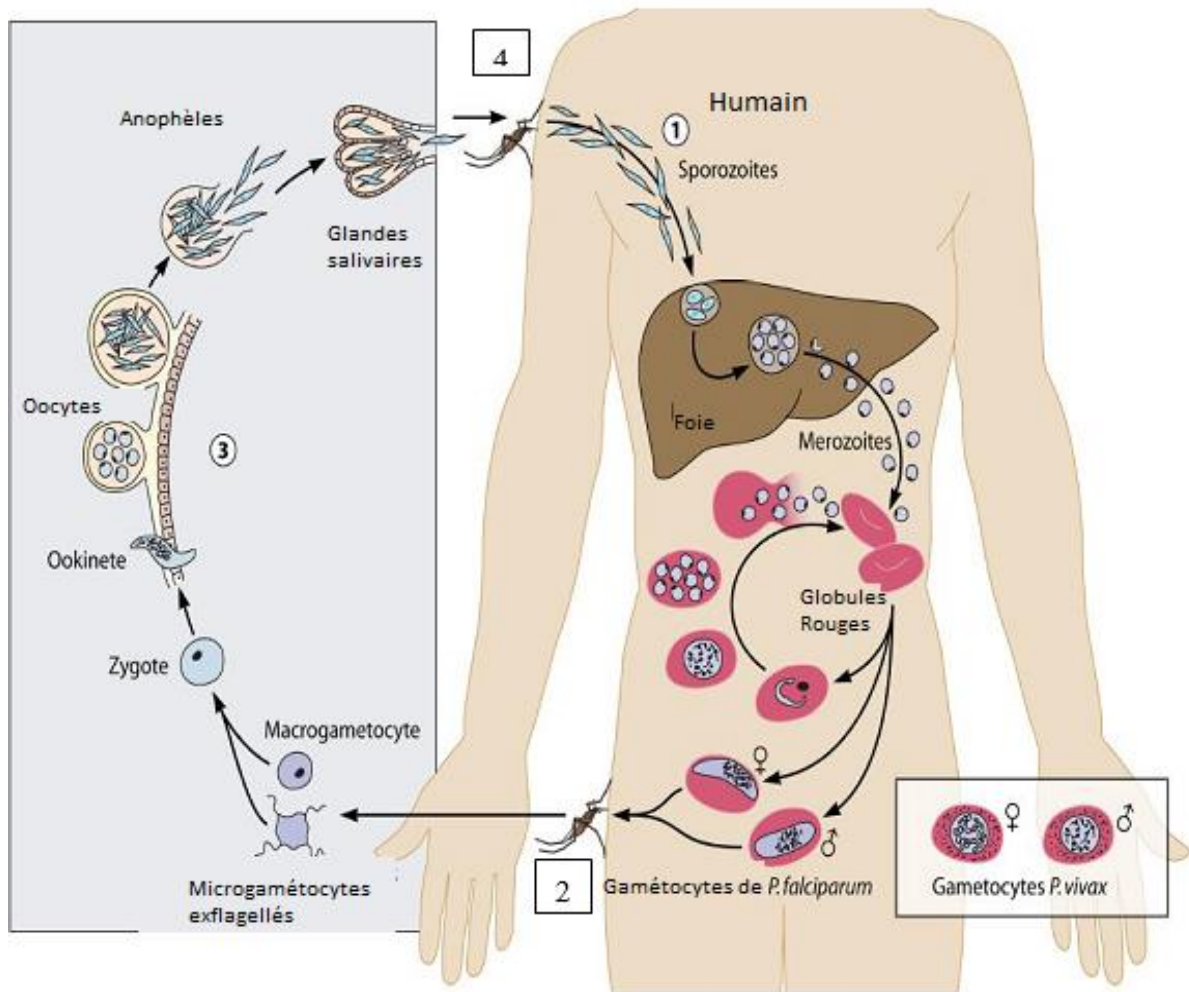


Figure 2 : Cycle de vie du *Plasmodium falciparum*

(Source : **Bousema & Drakeley, 2011**)

- 1) le développement du parasite chez l'homme
- 2) la transmission du parasite de l'homme au moustique vecteur
- 3) le développement du parasite au sein du moustique vecteur (cycle sporogonique)
- 4) la transmission du moustique vecteur à l'homme

Cycles asexués chez l'hôte vertébré (Homme)

Encore appelé phase asexuée ou schizogonie, le cycle chez l'homme comporte deux phases : une phase tissulaire ou exo-érythrocytaire et une phase sanguine ou intra-érythrocytaire :

Phase tissulaire ou cycle exo-érythrocytaire ou Schizogonie pré-érythrocytaire

Pendant le repas sanguin, les moustiques du genre *Anophèle* femelles infestés inoculent à l'homme des sporozoïtes dans un capillaire sanguin par leur salive (Prudêncio *et al.*, 2006 ; Rowe *et al.*, 2009). Le nombre de sporozoïtes inoculés est estimé entre 20 et 200 (Yamauchi *et al.*, 2007). Ces sporozoïtes, formes extracellulaires issus d'un processus complexe de développement chez le moustique et qui sont destinés à infecter les cellules du foie des mammifères (Aly *et al.*, 2009), restent environ une demi-heure dans la peau, la lymphe et le sang. Au cours de leur migration vers le foie, beaucoup sont détruits par les macrophages, mais certains parviennent à gagner les cellules du foie. Dans les hépatocytes, les sporozoïtes se multiplient et évoluent en **schizontes pré-érythrocytaires** ou « corps bleus » (formes multinucléées) après 1 à 2 semaines de maturation. Ces schizontes éclatent et libèrent dans le sang, des milliers de **mérozoïtes** variant selon l'espèce (40 000 pour *P. falciparum*, 15 000 pour *P. ovale*, 10 000 pour *P. vivax* et environ 2 000 pour *P. malariae*) qui initieront la phase érythrocytaire. Il faut noter que la schizogonie hépatique est unique dans le cycle du fait que les hépatocytes ne peuvent être infectés que par des sporozoïtes (Prudêncio *et al.*, 2006 , Tardieux *et al.*, 2008). A l'image d'autres stades invasifs des Apicomplexa, les sporozoïtes pénètrent activement dans les cellules hôtes (Ménard *et al.*, 2008). Des expériences indiquent que les sporozoïtes passent d'abord par plusieurs cellules de l'hôte (Tardieux *et al.*, 2008) et hépatocytes avant leur développement (Mota *et al.*, 2004). L'invasion des hépatocytes se fait soit à travers la membrane plasmique ou soit par la formation d'une vacuole essentielle à sa différenciation (Silvie *et al.*, 2004). Des travaux scientifiques montrent que cette invasion des hépatocytes par des sporozoïtes est médiée par l'interaction entre la « Circumsporozoïte Protein » pour CSP (protéine majeure exprimée à la surface des sporozoïtes) ; la « Thrombospondin – Related Anonymous Protein » pour TRAP ; exprimée également à la surface des sporozoïtes ; les CD81 (tétraspanine) ; cell-traversal protein for ookinètes and sporozoites (CeTOS), et (les glycosaminoglycanes (GAG) des sinusoides hépatiques) (Silvie *et al.*, 2008). Siau *et al.*, (2008) ont montré *in vitro* qu'un changement de température est nécessaire à l'infectiosité des hépatocytes par les sporozoïtes. De ces expériences, on peut émettre l'hypothèse que l'infectiosité des hépatocytes est favorisée entre autre, par le

changement de température de l'anophèle femelle (< 37°C dans les glandes salivaires) à l'hôte vertébré (37°C).

Au cours de la phase hépatique, certains parasites restent quiescents dans les hépatocytes, sans se transformer en corps bleu donnant ainsi naissance à des hypnozoïtes responsables des accès de reviviscence tardifs à distance de la piqûre initiale dans les infections à *P. vivax* et *P. ovale* (**Prudêncio et al., 2006 ; De Gentile, 2008 ; Picot, 2009**). Contrairement à *P. ovale* et *P. vivax*, *P. falciparum* et *P. malariae* ne possèdent pas de formes de persistance hépatique (hypnozoïtes), l'évolution se faisant d'un seul tenant. Cette phase de multiplication est asymptomatique (période d'incubation) et dure de 8 à 15 jours selon les espèces (**de Gentile, 2008**).

Phase sanguine ou cycle asexué intra-érythrocytaire

La phase érythrocytaire est initiée par l'invasion aléatoire des hématies saines par des mérozoïtes (formes extracellulaires du parasite) libérés suite à la rupture des schizontes hépatiques. C'est un processus complexe faisant intervenir de multiples interactions entre ligands et récepteurs (**Rayner et al., 2009 ; Tamez et al., 2009**). L'invasion des hématies qui se fait grâce à un processus parasitaire actif (endocytose) dure environ 30 secondes et se passe en cinq phases : a)- la phase de contact entre le manteau glycoprotéique du mérozoïte (Merozoite Surface Protein 1 pour MSP1) et la surface de l'hématie ; b)- une phase de réorientation de la région apicale du mérozoïte au contact de la membrane de l'hématie ; c)- la libération d'une sérine protéase « merozoite surface sheddase (MESH ; en vert sur le schéma) suivie de l'amorce de l'invagination de l'hématie; d)- l'invagination avec détachement progressif du manteau glycoprotéique et e)- l'endocytose avec formation de la vacuole parasitophore (**figure 3**). Au sein de la vacuole parasitophore, le parasite se différencie en trophozoïte jeune, puis en trophozoïte âgé, stade à partir duquel une intense phase répllicative de l'ADN commence. Il donne alors naissance au schizonte érythrocytaire, ce dernier après segmentation montre une forme caractéristique de rosace, puis libère des mérozoïtes au nombre de 16 à 32 pour *P. falciparum* ; 16 à 20 pour *P. vivax* ; 8 à 16 pour *P. ovale* et 6 à 12 pour *P. malariae*) qui rapidement réinfectent de nouvelles hématies saines. (**O'Donnell et al., 2005 ; Silvie et al., 2008 ; Rowe et al., 2009**).

Spécifiquement l'infection de l'érythrocyte humain par *Plasmodium vivax* nécessite obligatoirement la présence d'un antigène à la surface des globules rouges ; appelé, « Duffy Antigen Receptor for Chemokines (DARC). L'interaction entre *P. vivax* et l'érythrocyte est

médiée par une protéine de liaison ; le « *Duffy – Binding Protein* » (PvDBP) (Rayner, 2009). Chaque cycle schizogonique (ou endoérythrocytaire) dure 48 heures (fièvre tierce) pour *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale* ou 72 heures (fièvre quarte) pour *P. malariae*. Seule cette phase sanguine est responsable des manifestations cliniques observées au cours du paludisme. Après plusieurs schizogonies, un petit pourcentage de mérozoïtes ne se multiplient pas après invasion des érythrocytes, mais plutôt, se différencient dans les hématies parasitées en formes sexuées (gamétocytes). Ces gamétocytes (mâles et femelles) ne peuvent poursuivre leur développement que s'ils sont ingérés au cours d'un repas sanguin par un anophèle femelle (Prudêncio *et al.*, 2006 ; Rowe *et al.*, 2009).

Cycle chez l'Anophèle femelle (cycle sexué ou sporogonie)

La transmission de *Plasmodium* nécessite son développement chez le vecteur (Dinglasan *et al.*, 2007). De ce fait, le cycle sexué ou sporogonique où le parasite passe par plusieurs stades de développement successifs se déroule chez les femelles de certaines espèces d'anophèles. Lors d'un repas sanguin sur un individu infecté, l'anophèle femelle ingère les différents stades du parasite. Les éléments asexués (mérozoïtes, trophozoïtes et schizontes) sont digérés dans l'estomac du moustique. Seuls les gamétocytes mâles (microgamétocytes) et gamétocytes femelles (macrogamétocytes) poursuivront leur développement. Ceux-ci parviennent dans l'estomac du moustique et se transforment en gamètes. Le gamète mâle subit un processus d'exflagellation, à la suite duquel les gamètes femelles sont fécondés. Il en résulte un zygote appelé ookinète. Selon Hirai *et al.* (2009), l'étape de la fertilisation est considérée comme étant le talon d'Achille du cycle représentant ainsi, une cible vaccinale. Environ 24 heures après la formation du zygote, l'ookinète mature mobile traverse d'abord la matrice péritrophique, puis l'épithélium stomacal avant de se différencier en oocystes. Cette phase diploïde est brève et s'achève par une division méiotique laquelle est suivie de plusieurs mitoses aboutissant au développement de sporoblastes, puis de sporozoïtes après une dizaine de jours. L'éclatement de l'oocyste libère ces éléments haploïdes (5000 à 10000 sporozoïtes) mobiles dans l'hémolymphe et gagnent préférentiellement les glandes salivaires de l'anophèle par leurs propres moyens d'où ils pourront être à nouveau injectés avec la salive lors d'une nouvelle piqûre infestante. La reconnaissance et l'invasion des glandes salivaires du moustique se fait à travers l'interaction entre les protéines de surface de ces glandes salivaires et la TRAP exprimée à la surface des sporozoïtes (Vlachou *et al.*, 2006 ; De Gentile 2008).

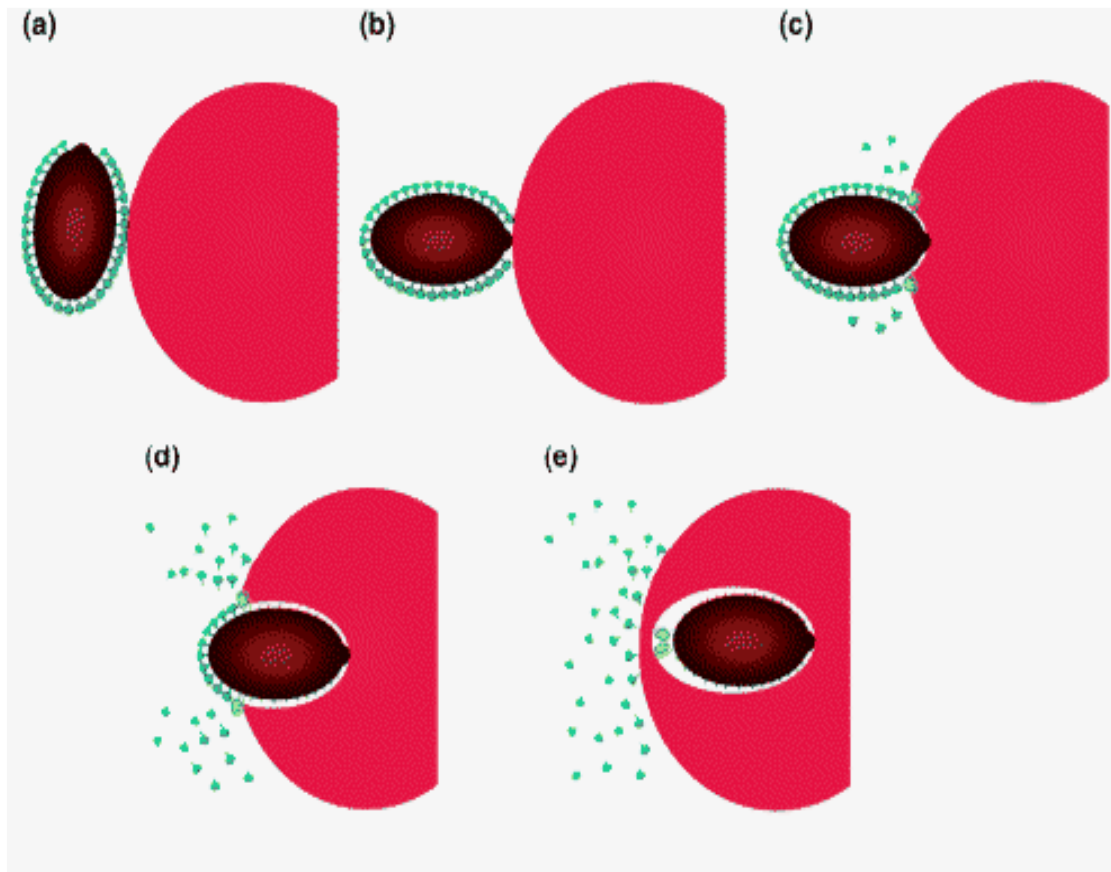


Figure 3 : Invasion des érythrocytes par des mérozoïtes de *Plasmodium falciparum* (O'Donnell *et al.*, 2005).

- (a) : phase de contact, (b) : phase de réorientation,
(c) : phase de libération d'une serine protéase,
(d) : phase d'invagination, (e) : phase d'endocytose.

La durée du cycle sporogonique, le passage obligatoire pour la transmission du parasite d'un hôte à un autre, varie de 10 à 40 jours en fonction de la température extérieure et de l'espèce plasmodiale (**Pages *et al.*, 2007 ; Picot *et al.*, 2009**). Des expériences montrent que la sporogonie peut être interrompue si la charge parasitaire d'entrée est élevée (**Dawes *et al.*, 2009**).

I-1-3-Manifestation clinique du paludisme

Les manifestations cliniques du paludisme sont diverses dans leur expression et leur gravité et dépendent à la fois du parasite (espèce plasmodiale et densité parasitaire) et de son hôte (réceptivité génétique et état immunitaire). Elles vont de l'accès fébrile aigu en passant par un paludisme sub-aigu à un paludisme chronique. Certains tableaux cliniques sont communs à toutes les espèces plasmodiales avec quelques nuances dans l'intensité des signes selon le parasite en cause (par exemple le paludisme pernicleux, le paludisme viscéral évolutif et la fièvre bilieuse hémoglobinurique pour *P. falciparum*, la néphrite quartane pour *P. malariae*). Ainsi, on observe des accès palustres simples qui comprennent la primo-invasion et les accès de reviviscence schizogonique à fièvre périodique. Lorsque les *Plasmodium* commencent à gagner le sang et à s'y multiplier, apparaissent des symptômes peu évocateurs avec, surtout, une fièvre généralement modérée (38°C à 38,5° C) sans périodicité particulière, accompagnée fréquemment de troubles digestifs à type d'embarras gastrique (Vangapandu *et al.*, 2007 ; De Gentile, 2008).

I-1-3-1-Accès palustre de primo-invasion à *Plasmodium falciparum*

L'accès palustre de primo-invasion à *P. falciparum*, apparaît chez un sujet neuf, non immun, c'est-à-dire chez l'enfant de 4 mois à 4 ans autochtone d'une zone d'endémie, mais peut aussi s'observer à tout âge.

Incubation : elle correspond à la durée de la phase pré-érythrocytaire hépatique (7 à 12 jours pour *P. falciparum*) après la piqûre infestante d'un anophèle femelle sans aucun trouble ; elle est totalement asymptomatique. Les symptômes commencent à apparaître pendant la phase érythrocytaire lorsque les *Plasmodium* gagnent le sang (hématies) et s'y multiplient. Après une période d'incubation muette, apparaît un tableau clinique qui n'évoque pas d'emblée un paludisme. Le signe cardinal est marqué par l'apparition d'une fièvre brutale, continue, souvent accompagnée d'un malaise général avec myalgies, céphalées, et parfois troubles digestifs (anorexie, douleurs abdominales, nausées, vomissements et même parfois diarrhée). On parle alors « d'embarras gastrique fébrile » (Vangapandu *et al.*, 2007 ; De Gentile, 2008).

I-1-3-2-Invasion

La fièvre sans périodicité régulière est continue et associée à un malaise général, des courbatures, des céphalées, des nausées ou des vomissements et parfois des diarrhées. A ce stade, le diagnostic sera apporté par le frottis sanguin et la goutte épaisse qui montrent le

Plasmodium. En l'absence de traitement, la fièvre persiste avec des rémissions et des recrudescences pendant 8 à 15 jours. La fièvre peut devenir intermittente, tous les deux ou trois jours accompagnée alors d'une splénomégalie. Le risque de passage à l'accès pernicieux est permanent s'il s'agit d'un *Plasmodium falciparum*.

I-1-3-3-Accès palustre à fièvre périodique

L'expression de cette forme clinique correspond à la triade symptomatique classique décrite de l'accès palustre : frissons, chaleur, sueurs survenant tous les 2 jours (pour *P. falciparum*, *P. ovale* et *P. vivax*) ou 3 jours (*P. malariae*). L'accès est souvent précédé d'une phase prodromique, toujours identique chez un même patient, qui associe lassitude et troubles digestifs. L'accès débute classiquement le soir et dure une dizaine d'heures, associant successivement :

Phase de frissons : elle dure environ une heure, le patient subit de violents frissons correspondant à une élévation de température ($\geq 37^{\circ}\text{C}$) accompagnée de splénomégalie et d'hypotension artérielle.

Phase de chaleur : elle dure 2 à 4 heures, la température peut dépasser 40°C avec une peau sèche et brûlante. Le malade rejette ses draps. Cette phase s'accompagne de céphalées et de douleurs abdominales.

Phase de sueurs : elle dure 2 à 4 heures et se caractérise par des sueurs profuses qui abaissent la température corporelle (voire hypothermie parfois). Elles (sueurs) annoncent la fin de l'accès palustre et s'accompagnent d'une sensation de bien-être et de délivrance. Le malade émet des urines foncées avec une remontée de la pression artérielle (**Roe et al., 2009 ; Kaur , 2009 ; Soulama et al., 2009**).

Le cycle érythrocytaire détermine le rythme des accès palustres. Ainsi, les accès survenant tous les deux jours correspondant à une schizogonie de 48 heures (fièvre tierce bénigne pour *P. vivax* et *ovale* ou fièvre tierce maligne pour *P. falciparum*). De même, la fièvre tierce quarte est déterminée par la survenue des accès palustres tous les trois jours correspondant à une schizogonie de 72 heures

I-1-3-4-Paludisme grave

La gravité du paludisme à *P. falciparum* varie d'une zone à l'autre et il est possible que des parasites plus ou moins virulents puissent exister. Il n'existe pas, pour l'instant, de marqueur

de virulence pouvant être utilisé pour typer les isolats sauvages de parasites, mais plusieurs associations entre certains génotypes MSP1 et MSP2 et des cas de paludisme grave ont été décrits (Snounou & White, 2004).

Les complications graves du paludisme sont dues à *P. falciparum* chez un sujet non immun (jeune enfant en zone d'endémie, femme enceinte, expatrié, voyageur) et sont potentiellement mortelles. Le décès, quand il survient, est secondaire à la défaillance aiguë d'une ou de plusieurs grandes fonctions, et ce, parfois même si la mise en place d'un traitement étiologique s'avère efficace. Seule l'instauration rapide d'une réanimation adaptée peut alors sauver le malade. Par conséquent, la connaissance des critères OMS, 2000 de gravité du paludisme est d'une importance capitale pour l'identification des patients qui nécessitent une hospitalisation en urgence ou dans une Unité de Soins Intensifs. Un paludisme grave peut donc prendre différentes formes cliniques dont la plus importante est l'atteinte cérébrale entraînant 10 à 30% de mortalité (WHO, 2009 ; WHO, 2013).

On regroupe sous le terme de **neuropaludisme (cerebral malaria chez les anglo-saxons)** toutes les manifestations neurologiques, conséquences de l'atteinte cérébrale au cours de l'accès palustre. Il associe des troubles de la conscience (pouvant aller jusqu'au coma), prostration, convulsions avec des perturbations viscérales multiples (anémie sévère, insuffisance rénale, oedème pulmonaire...) (WHO, 2009).

Le syndrome du paludisme cérébral est complexe. Il est peu probable qu'une seule hypothèse soit responsable de la pathogenèse. Les données actuelles indiquent l'implication des hypothèses mécanique ou de séquestration, inflammatoire et d'hémostase.

I-1-3-5-Autres complications

Les complications graves du paludisme sont dues à *P. falciparum* :

Paludisme viscéral évolutif ou paludisme chronique

Le paludisme viscéral évolutif (PVE) s'observe chez les sujets mal prémunis exposés aux réinfections. L'apparition de la chloroquino-résistance, l'inobservance fréquente de la prophylaxie et l'automédication en zone d'endémie, sont à l'origine du paludisme viscéral évolutif. Les signes cliniques sont généralement frustes et la gravité tient au retard diagnostique. Les principaux symptômes se constituent progressivement avec anémie clinique avec pâleur, souffle systolique fonctionnel, parfois œdème des membres inférieurs, asthénie, splénomégalie sensible souvent volumineuse et une fièvre modérée inexplicée. Un

diagnostic précoce et le traitement permettent une sédation des symptômes et une normalisation des paramètres biologiques sans séquelles. Les autres espèces plasmodiales peuvent aussi provoquer, mais plus rarement, un paludisme chronique mais sans risque d'aggravation mortelle. Non traité, le PVE évolue vers un état de cachexie palustre (**Ouattara et al., 2008**).

Fièvre bilieuse hémoglobinurique

Peu fréquente, la fièvre bilieuse hémoglobinurique est une complication du paludisme à *P. falciparum*. Cliniquement, elle se caractérise par une fièvre, un ictère hémolytique grave (mortalité supérieure à 30%) d'origine immuno-allergique, une hémoglobinurie macroscopique suite à une importante hémolyse intravasculaire donnant l'aspect d'urines rouge, une anémie et une insuffisance rénale. Elle est déclenchée par la prise de quinine chez certains individus sensibilisés (des cas ont été décrits après prise de méfloquine ou d'halofantrine). Son traitement est surtout symptomatique visant à corriger l'anémie et l'insuffisance rénale.

Plasmodium vivax et *ovale* sont caractérisés par la fréquence des accès de reviviscence pendant deux à trois ans après l'infestation. La fièvre périodique de ces accès à un rythme de tierce.

Plasmodium malariae se distingue par le rythme de quarte des accès fébriles et ses rechutes possibles à long terme (plus de 5 ans). Il est aussi responsable d'une complication rénale sévère que l'on rencontre parfois chez l'enfant, la néphrite quartane (**Oumar et al., 2007**).

Quelques cas documentés de la fièvre bilieuse hémoglobinurique sont rapportés : 1 en Angleterre (**Khan et al., 2009**), 3 à Bamako (Mali) (**Oumar et al., 2007**), 1 en Guinée-Bissau (**Bouldouyre et al., 2006**), 9 au Burundi (**Gobbi et al., 2005**), 41 en Côte d'Ivoire (**Daubrey-Potey et al., 2004**), 3 à Dielmo (Sénégal) (**Rogier et al., 2003**) etc.

I-1-4-Familles antipaludiques

Dans la déclaration des chefs d'états et de gouvernement africains lors du sommet africain sur l' « Initiative Faire Reculer le Paludisme en Afrique » (Roll Back Malaria en anglo saxon) tenu à Abuja le 25 avril 2000 ; l'objectif qu'au moins 60% des paludéens aient accès à un traitement rapide, adéquat et abordable dans un délai de 24 heures après l'apparition des symptômes a été fixé. Dans cette optique, des engagements ont été pris d'octroyer les ressources nécessaires pour la mise en œuvre durable des mesures prévues dans le cadre de

l'Initiative Faire Reculer le Paludisme (WHO, 2000). En réponse à l'émergence de la chimiorésistance de *Plasmodium* à la monothérapie, l'OMS recommande l'utilisation des Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA). Un guide thérapeutique à l'attention des pays endémiques a été rédigé à cet effet, exposant les lignes directrices pour aider à la formulation des politiques et protocoles de traitement des cas de paludisme simples et compliqués en fonction des réalités épidémiologiques locales (WHO, 2006 ; WHO, 2009). En accord avec les objectifs d'Abuja, la plupart des pays d'endémie palustre dispose d'un « Programme National de Lutte contre le Paludisme » (PNLP) qui édicte les stratégies en matière de prévention et de prise en charge des cas de paludisme. Les pays non endémiques ne sont pas en marge de cette mise à jour et ont pour la plupart révisé leur protocole de prévention et de traitement du paludisme d'importation à l'image de la France qui a révisé le document de consensus de 1999 en 2007 (Anonyme-2, 2008), des Etats-Unis d'Amérique (Kevin et al., 2007), du Royaume-Uni (Lalloo et al., 2007) ; de l'Australie (Leggat, 2008).

I-1-4-1-Traitement spécifique

Le traitement rapide et efficace des cas de paludisme est un élément fondamental de la lutte antipaludique pour sauver des vies (surtout les enfants de moins de cinq ans) en Afrique subsaharienne où, la plupart des infections paludéennes sont dues à *P. falciparum* et donc sont potentiellement mortelles (Greenwood et al., 2005 ; WHO, 2006). Il implique des mesures complémentaires aussi bien que des médicaments antipaludiques. Les patients infectés par *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale* peuvent être traités en dehors des formations sanitaires en externe. Il est important que les patients infectés par *P. falciparum* reçoivent rapidement un traitement antipaludique sans délai, et ils doivent être admis généralement dans un hôpital pour être observés afin de détecter d'éventuelles complications. Ceci est particulièrement vrai pour les enfants de moins de cinq ans, les femmes enceintes et les sujets non-immuns provenant de pays impaludés.

Le traitement du paludisme fait appel à différents antipaludiques qui possèdent des mécanismes d'action différents. L'arsenal thérapeutique utilisé dans le traitement du paludisme est très réduit à cause de la chimiorésistance. Par conséquent, le choix du traitement est basé sur la fréquence des cas de résistances dans la zone considérée, et sur l'importance d'éventuels effets indésirables provoqués par certains antipaludiques. Les antipaludiques sont classés soit en fonction de leur origine (Tableau I) : naturelle (quinine et dérivés du qinghaosu issus des plantes) ou de synthèse (notamment les amino-4-quinoléines).

Ils peuvent également être classés selon leur action sur diverses formes évolutives du parasite chez l'homme. Parmi eux, on distingue les schizontocides, actifs sur les stades asexués intra-érythrocytaires et les gamétocytocides (amino-8-quinoléines), actifs aussi bien sur les gamétocytes sanguins que sur les stades intra-hépatiques (hypnozoïtes). Enfin, ils peuvent être classés suivant leur mode d'action rapide (quinines et amino-4-quinoléines) pour lesquels l'apparition de la chimiorésistance est longue et les antipaludiques d'action lente (antifoliques et antifoliniques) dont l'usage génère beaucoup plus vite la chimiorésistance rendant inefficaces certains traitements (**Pradines et al., 2003 ; Oliver et al., 2008**).

En réponse à l'augmentation croissante de la résistance de *P. falciparum* principalement aux antipaludiques, l'OMS a recommandé aux pays d'endémie palustre qui observent une résistance aux monothérapies classiques, telles la chloroquine (CQ), l'amodiaquine (AQ) ou la sulfadoxine-pyriméthamine (SP), d'utiliser des combinaisons thérapeutiques (CT ou ACT en anglais), de préférence celles qui contiennent des dérivés de l'artémisinine, contre le paludisme à *P. falciparum* non compliqué (**WHO, 2006 ; WHO, 2008**). L'antipaludique à associer aux dérivés de l'artémisinine doit avoir une efficacité thérapeutique en monothérapie supérieure à 80% dans la zone cible. Les options thérapeutiques actuellement recommandées par l'OMS sont les suivantes: artéméther-luméfántrine (AL); artésunate plus amodiaquine (AS + AQ); artésunate plus sulfadoxine-pyriméthamine (AS + SP); artésunate plus méfloquine (AS + MQ) ; dihydroartémisinine associée à la pipéraquline (DP). En outre, on évoque la possibilité d'association de l'artésunate à la primaquine en combinaison thérapeutique (**White, 2008**). La standardisation à large échelle de cette association en zone d'endémie palustre pourrait entraîner de graves effets secondaires compte tenu de la prévalence élevée du déficit en G6PD (**Nkhoma et al., 2009**). Il est bien connu que le paludisme aigu et chronique peut entraîner une anémie. De ce fait, le traitement d'un accès palustre simple avec cette association (AS + PQ ou AS + dapsonne) sur terrain de déficit en G6PD, peut conduire à la mort par anémie sévère et/ou insuffisance rénale (**Petres et al., 2009**). La généralisation de telles combinaisons thérapeutiques, exigerait par mesure de sécurité, la mise en place des moyens de détection efficaces et simples des déficits en G6PD dans les pays d'endémie palustre.

Tableau I: Médicaments antipaludiques
(Danis, 2003 ; Olivier *et al.*, 2008)

Origine	Dérivés	Molécules	Actions	Sites d'action
Antipaludiques naturels	Alcaloïdes du quiquina	Quinine Quinidine Cinchonine Cinchonidine	Schizontocides sanguins (action rapide)	Vacuole digestive
	Qinghaousu (armoïse)	Artémisinine Artémether Artésunate	Schizontocides sanguins (action rapide)	Vacuole digestive
Antipaludiques de synthèse	Amino-4-quinoléines	Chloroquine Amodiaquine Aopyroquine	Schizontocides sanguins (action rapide)	Vacuole digestive
	Aryl-Amino-Alcools	Méfloquine Halofantrine	Schizontocides sanguins (action rapide)	Vacuole digestive
	Antifoliques et antifoliniques	Sulfamides (sulfadoxine, sulfaméthoxazole) Sulfones (dapsone) Pyriméthamine Proguanil	Schizontocides sanguins et sporontocides (action lente)	Cytoplasme
	Naphtoquinone	Atovaquone	Schizontocides sanguins (action lente)	Mitochondrie
	Antibiotiques et divers	Cyclines (tétracycline, doxycycline) Macrolides Fluoroquinolones Hydroxynaphtoquinones	Schizontocides sanguins	Ribosome
	Amino-8-quinoléine	Primaquine Tafénoquine Quinocide Bulaquine Pamaquine Plasmocide	Gamétocytocides et schizontocides tissulaires	Mitochondrie

Des études de sécurité et de tolérance de l'artémether-luméfantrine menées auprès des milliers de patients n'ont révélé que des effets secondaires mineurs ou modérés, même après administrations répétées (**Sagara et al., 2008 ; Falade et al., 2009 ; Barnes et al., 2009 ; Abdulla et al., 2009**). Sa biodisponibilité est améliorée lorsqu'elle est administrée avec un repas riche en lipides (**Djimé et al., 2009**). Ces différentes études montrent l'innocuité de l'association Artémether-Luméfantrine (AL) chez les enfants. Une étude d'embryotoxicité d'une dose des dérivés de l'artémisinine (artésunate, dihydroartémisinine, et artémether) administrée aux rats et singes (12 mg/kg pendant 12 jours ou plus) dans la période d'organogénèse a entraîné des malformations et des morts d'embryons (**Clarke, 2009**). Chez l'humain, l'étude auprès de 62 femmes enceintes soudanaises ayant reçu de l'artésunate au cours du premier trimestre de la grossesse avec suivi prospectif de leurs enfants au cours de la première année de naissance n'a rien révélé de particulier (**Adam et al., 2009**). Bien que ces résultats soient encourageants, ils ne doivent pas être extrapolés vu le nombre très limité de l'effectif de femmes suivies.

Comme dans la prise en charge des affections bactériennes, l'association médicamenteuse d'antipaludiques vise à améliorer l'efficacité du traitement (dans certains cas, par synergie potentialisatrice ou par effet additif de deux médicaments ou plus). La combinaison thérapeutique reste en théorie, le moyen le plus satisfaisant pour retarder l'émergence des résistances aux différentes composantes de l'association. Les dérivés de l'artémisinine tels que l'artésunate ont une demi-vie très courte avec une activité antiplasmodiale très rapide. D'où, l'importance de les protéger contre la résistance en les associant avec d'autres médicaments antipaludiques (**Pradines et al., 2003 ; WHO, 2006**).

Idéalement le régime thérapeutique doit être :

- Sûr et bien toléré (pas d'effets secondaires sérieux, ni d'évènements fatals adverses)
- Stable (pas de problème de stockage en termes d'humidité et de température)
- Efficace (taux de guérison au moins égale à 75 à 90%)
- Etre administré par voie orale, rectale ou parentérale (régime utilisable en toute circonstance)
- Disponible en monodose (pour minimiser l'inobservance du traitement, possibilité d'administration par des illettrés à domicile, ou à défaut un régime simple court ≤ 3 jours)

-Efficace contre tous les stades de développement du parasite (l'effet gamétocytocide pourrait réduire la transmission si le médicament est utilisé à large spectre)

-Non susceptible d'induire la résistance (le médicament doit en tout cas minimiser le développement ou le taux d'acquisition de la résistance par les parasites)

-Avoir un mode d'action indépendant et accessible à tous (coût et disponibilité géographique) **(WHO, 2006)**.

L'utilisation de l'artémisinine dans la prise en charge du paludisme simple offre un gain sur la mortalité en empêchant la maturation des parasites, responsables de la cytoadhérence facteur de gravité, par la destruction des formes jeunes **(Dondorp, 2008)**.

I-1-5-Directives de traitement et de prévention du paludisme en Côte d'Ivoire

I-1-5-1-Traitement

➤ Paludisme simple

Le traitement de première intention du paludisme simple en Côte d'Ivoire se fait par :

-Les combinaisons artesunate + amodiaquine ou artémether + luméfantrine.

-En cas d'échec ou de contre-indication ou d'indisponibilité de l'une ou l'autre des combinaisons ci-dessus, l'alternative est la quinine orale.

➤ Paludisme grave

Le traitement initial utilisé pendant le paludisme grave est l'artesunate injectable ou artémether injectable ou la quinine injectable.

➤ Paludisme chez la femme enceinte

En raison du risque élevé de paludisme grave pendant la grossesse, le paludisme de la femme enceinte est une urgence qui requiert une prise en charge rapide et efficace. Chez la femme enceinte, seule la quinine est préconisée quel que soit le type de paludisme et quel que soit l'âge de la grossesse.

I-1-5-2-Prévention ou chimioprophylaxie antipaludique

La chimio prophylaxie antipaludique permet d'éviter l'infection en cas de pénétration du parasite dans l'organisme, grâce à l'utilisation de médicaments préventifs. Elle n'est pas systématique et ne s'adresse qu'à des catégories de populations bien définies. En Côte

d'Ivoire, comme dans tout autre pays endémique palustre, la chimioprophylaxie est indiquée seulement pour les femmes enceintes et les personnes en provenance d'une zone sans transmission de paludisme.

Chez la femme enceinte, en plus de la prise en charge de la grossesse, le régime chimioprophylactique retenu est le **traitement préventif intermittent (TPI)** avec la **Sulfadoxine-Pyriméthamine (SP)** administrée par voie orale à raison de 3 doses (une dose =3 comprimés) pendant la grossesse au 2^{ème} et au 3^{ème} trimestre **(PNLP, 2013)**.

La première dose est administrée à partir de la 16^{ème} semaine de grossesse ou dès l'apparition des mouvements actifs foetaux. Les autres doses sont administrées à un mois d'intervalle de la précédente. Chez la femme enceinte séropositive au VIH sous prophylaxie au cotrimoxazole, il n'est pas recommandé d'administrer la SP en TPI, car le cotrimoxazole a des effets anti-palustres prouvés. L'administration de la SP est déconseillée au premier trimestre de la grossesse à cause du risque tératogène lié à la sulfadoxine.

Chez les sujets provenant des zones non impaludées : traitement préventif à base de méfloquine ou d'atovaquone-proguanil ou de doxycycline 100 mg. Pour les séjours de moins de 6 mois en zone d'endémie palustre, il est recommandé d'administrer un traitement préventif à base Atovaquone+ Proguanil, Méfloquine ou Doxycycline **(PNLP, 2013)**.

La principale intervention de lutte antivectorielle en Côte d'Ivoire est basée sur la distribution de moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (MILDA). Les MILDA sont distribuées dans des campagnes de masse et également via des canaux de routine (pendant les consultations prénatales et pendant les naissances). La couverture nette en Côte d'Ivoire était de 67 % en 2012, mais la campagne de masse la plus récente en 2014/2015 avait un taux de couverture autour de 76 % avec environ 60 % comme taux d'utilisation **(Anonyme-5, 2017)**.

I-2-Immunité antipaludique

La protection immune contre *P. falciparum* en zone d'endémie palustre résulte de l'exposition répétée au parasite et augmente avec l'âge des sujets **(Courtin et al., 2009 ; Dent et al., 2009 ; Doolan et al., 2009)**. Elle baisse au contraire avec l'âge lorsque l'exposition diminue **(O'Meara et al., 2008)**. Les conséquences d'une exposition répétée sont l'atténuation de l'impact clinique de la maladie. Le rôle de l'immunité se situerait à cheval entre les manifestations du paludisme et leurs conséquences sur les différentes populations à risque.

Dans les zones où la transmission du paludisme est intense et pérenne, il s'établit progressivement chez l'hôte un état de tolérance à la présence du parasite se traduisant par une faible parasitémie (immunité antiparasitaire), d'une part, et l'absence de symptômes (immunité clinique), d'autre part. Cet état est appelé «état d'immunité relative ou de prémunition ». C'est un état équilibre de « paix armée » entre le parasite et son hôte dont la rupture bascule en faveur de l'un ou de l'autre. Son acquisition est lente et semble dépendre d'une pression régulière du parasite sur le système immunitaire de l'hôte. Les individus prémunis sont aussi identifiés par le terme « d'hyper-immuns » (**Djimde et al., 2003 ; Biswas et al., 2008**).

En zone d'endémie palustre ; les enfants en bas âge (6 mois à 5 ans) sont les plus touchés par le paludisme.

L'absence de paludisme au cours des premiers mois de vie (paludisme congénital) est un phénomène rare contrastant avec un taux élevé d'infection placentaire. Cela s'explique par la transmission transplacentaire d'anticorps anti palustre maternels, d'une part, (**Duffy PE, 2007 ; Malthotra et al., 2009**), et la présence de l'hémoglobine fœtale (HbF) qui inhibe le développement de *P. falciparum* dans les hématies, d'autre part, (**Shear et al., 1998**). On ne connaît que peu de choses sur les mécanismes effecteurs de la réponse immune chez l'homme, et ceci parce qu'il est difficile de définir des critères épidémiologiques, cliniques ou parasitologiques simples susceptibles de caractériser cet état de prémunition et de définir clairement quels sont les individus "protégés" (**Baird et al., 2007**). Outre les facteurs immunologiques de résistance au paludisme, s'ajoutent des facteurs génétiques qui confèrent une protection contre le paludisme grave. Au nombre de ces facteurs, on peut citer des facteurs érythrocytaires tels que le groupe sanguin O qui protège contre les formes sévères par l'inhibition de la formation de rosettes (**Rowe et al., 2007 ; Rowe et al., 2009**), les hémoglobinoses S, C, E (HbS, HbC, HbE) (**May et al., 2007 ; Verra et al., 2007**) ; les thalassémies (modifications de synthèse des chaînes de globine) (**Enevold et al., 2007**) ; le déficit en Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase (G6PD) (**Guindo et al., 2007**) ; l'absence de l'antigène *Duffy* sur certains érythrocytes (**Rayner et al., 2009**) et des facteurs non érythrocytaires : le groupe HLA (**Zhang et al., 2009**). S'agissant du rôle protecteur du groupe sanguin O, une autre étude cas-témoin (cas = paludisme sévère et contrôle = paludisme simple et enfants non-malades) réalisée au auprès de 567 enfants Maliens a révélé la présence de 21% de rosettes dans le groupe sanguin O d'enfants atteints de paludisme sévère contre 44 à 45% dans le groupe contrôle (**Rowe et al., 2007**).

Quoique non stérilisante, cette immunité confère aux enfants d'une région endémique une protection clinique alors que chez l'adulte elle permet un contrôle de la charge parasitaire et réduit de façon significative la susceptibilité à la maladie. L'immunité acquise contre le paludisme est la résultante de deux composantes à savoir l'immunité cellulaire et l'immunité humorale.

I-2-1-Immunité cellulaire

Les mécanismes immunitaires qui conduisent à la suppression des parasites impliquent plusieurs types de cellules du système immunitaire. On y distingue principalement les lymphocytes cytotoxiques CD8⁺ et CD4⁺ ainsi que les lymphocytes T gamma/delta (T $\gamma\delta$) et NK (Natural Killer). Les cellules effectrices comme les macrophages et les monocytes CD4⁺ et CD8⁻ interviennent également dans cette immunité.

Il a été démontré que les CD8⁺ cytotoxiques jouent un rôle important dans l'immunité contre les stades pré érythrocytaires grâce aux molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ainsi, des études ont démontré l'existence d'une spécificité entre lymphocytes T CD8⁺ et antigènes de stade pré-érythrocytaires et ont permis la caractérisation d'épitopes T restreints aux molécules du CMH de classe I (**Hill et al., 1992 ; Aidoo et al., 2000**). Les lymphocytes T CD8⁺ reconnaissent à cet effet les molécules antigéniques parasitaires associées aux molécules de classe I du CMH présentes à la surface des cellules hépatiques. Activés par les épitopes T parasite, les lymphocytes T CD8⁺ produisent de l'interféron gamma (IFN- γ) lequel induit à son tour la production de monoxyde d'azote (NO) par les hépatocytes et les macrophages conduisant à la lyse des hépatocytes infectés par *Plasmodium*. De plus, le transfert de lymphocytes T CD8⁺ d'une souris immunisée à une souris naïve a montré que l'immunité protectrice contre le paludisme impliquait les cellules T CD8⁺ contre les stades pré-érythrocytaires (**Weiss et al., 1988**).

L'action cytotoxique directe des cellules T CD8⁺ sur les stades érythrocytaires est encore mal connue et serait probablement limitée par l'absence de molécule du CMH de classe I à la surface des globules rouges. Cependant, les lymphocytes CD8⁺ de phénotype T2 agirait comme des immunosuppresseurs ou en tant que cellules anti-inflammatoires par la production de cytokines helper. Ainsi, chez des sujets immuns, des cellules T2 seraient impliquées dans des mécanismes d'immuno-suppression (**Mshana et al., 1993**). D'autre part, Riley et collaborateurs constatent en 1993, que des cellules T CD8⁺ restreintes à l'haplo type HLADQ

du CMH de classe II proliféraient en présence de MSP1, une protéine à la surface du mérozoïte.

Les cellules Th1 produisent l'interleukine 2 (IL-2), l'INF- γ et de la lymphotoxine. Elles sont les premières à déclencher la réponse immunitaire à médiation cellulaire et l'activation des macrophages. Les cellules Th2 produisent l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-10 et l'IL-13. Celles-ci stimulent la croissance des mastocytes et des éosinophiles et la production d'immunoglobulines par les cellules B. Ainsi l'IL-4 stimule la production d'IgE (Finkelman *et al.*, 1990) et l'IL-10 la production d'IgG, d'IgM et d'IgA. A l'inverse des cellules CD8+, les CD4+ agiraient à la fois contre les stades pré-érythrocytaires et érythrocytaires. La sous population Th1 reconnaît spécifiquement des épitopes T de la CSP (Plebanski *et al.*, 1997) et éliminerait les hépatocytes infectées par cytotoxicité dépendante de l'INF- γ et du Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α). De même, il a été démontré que le transfert de lymphocytes Th1 à des souris leur conférerait une protection à la réinfection par des sporozoïtes de *P. yoelii* (Del Giudice *et al.*, 1990) alors que l'immunisation de souris avec un peptide synthétique correspondant à un épitope de la protéine SSP2 (TRAP) de *P. yoelii* induit une immunité protectrice stérilisante médiée par les cellules T CD4+ et dépendante de l'INF- γ (Wang *et al.*, 1996). En outre, l'injection de cellules T CD4+ spécifiques de *Plasmodium chabaudi* à des souris déficientes en T CD4+ et T CD8+ permet à ces dernières de contrôler l'infection par élimination des stades érythrocytaires grâce à la production de NO (Gysin 1992).

Les cellules NK productrices d'INF- γ et les lymphocytes (T $\gamma\delta$) producteurs d'INF- γ et de TNF- α jouent aussi un rôle dans les mécanismes anti-parasitaires. Les cellules NK interviendraient comme cellules effectrices ou régulatrices de l'immunité contre le paludisme. Chez des souris normales et déficientes en cellules NK, il a été démontré que le groupe déficient développait des parasitémies plus élevées (Solomon *et al.*, 1985).

Ainsi, les cellules NK activées par l'IL-12 seraient cytotoxiques contre les stades pré érythrocytaires et érythrocytaires par l'intervention directe ou non de l'INF- γ . Cependant, les mécanismes impliquant les cellules tueuses NK ne sont pas encore clairement élucidés.

Quant aux cellules T $\gamma\delta$, elles augmenteraient en nombre considérable chez l'homme ou chez le modèle animal lors d'infections par *Plasmodium*. Ces cellules prolifèrent en présence d'antigènes parasitaires, secrètent le TNF- α , l'INF- γ et l'IL-1 (Goodier *et al.*, 1993) et activent les macrophages dans le même but d'éliminer les parasites. *In vitro*, les cellules T $\gamma\delta$

d'individus n'ayant jamais été exposés au parasite inhibent la réplication des stades érythrocytaires de *P. falciparum* (Elloso *et al.*, 1994). *In vivo*, leur transfert à des souris non immunes inhibe le développement des stades pré érythrocytaires (Tsuji *et al.*, 1995).

I-2-2-Immunité humorale

Cette immunité est de type non stérilisant, s'acquiert après plusieurs années d'exposition au parasite en zone endémique et est dépendante de la souche plasmodiale en cause. Les premiers types d'études pour comprendre le rôle des anticorps dans la protection contre l'infection furent les transferts passifs d'immunoglobulines. D'autres réalisés sur le modèle murin ont clairement établi que les IgG contrôlaient la parasitémie et prévenaient la mort de l'animal (Potocnjak *et al.*, 1980). Par ailleurs, chez l'Homme, le transfert d'IgG purifiées à partir d'adultes immuns africains a permis à des enfants thaïlandais non immuns souffrant d'accès palustre de lutter efficacement contre les manifestations cliniques du paludisme et de réduire sensiblement leur charges parasitaires (Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1990).

Par ailleurs, Holligdale *et al.* (1984) ont démontré que des anticorps dirigés contre les sporozoïtes inhibent ou réduisent *in vitro* l'infectivité des sporozoïtes. Une étude expérimentale réalisée par Egan *et al.* (1993) a démontré *in vivo* que des volontaires immunisés avec des sporozoïtes irradiés (clone 3D7 de souche NF54) ont été protégés contre l'infection à *P. falciparum* transmise par *Anopheles stephensis* infecté avec des souches de *P. falciparum* homologues aussi bien qu'hétérologues.

Du point de vue de la relation spécifique entre anticorps et antigène dans l'immunité protectrice, des études ont démontré que des anticorps dirigés contre le Pf155/RESA, antigène parasite de la membrane érythrocytaire, sont efficaces dans l'inhibition de l'invasion du globule rouge par le mérozoïte (Wahlin *et al.*, 1984) et protègent *in vivo* des singes *Aotus* (Berzins *et al.*, 1991). Cliniquement, des études ont confirmé l'action d'anticorps dirigés contre les antigènes MSP3 et GLURP dans la protection contre les manifestations cliniques du paludisme (Hogh *et al.*, 1992 ; Dziegiel *et al.*, 1993 ; Dodoo *et al.*, 2000 ; Soe *et al.*, 2004).

Sur le plan épidémiologique, une association négative entre charge parasitaire et IgG a été démontrée chez des enfants vivant en zone endémique au Liberia et au Burkina Faso suggérant la capacité des anticorps d'individus vivant en région endémique à inhiber la prolifération de *Plasmodium* (Hogh *et al.*, 1992 ; Nébié *et al.*, 2003). Les anticorps ant sporozoïtiques sont détectés chez des individus vivant en région endémique, leur taux

évoluant avec l'âge (Nardin *et al.*, 1982) et le niveau de transmission (Nébié *et al.*, 2003 ; Singer *et al.*, 2003). Au Burkina Faso, Aucan *et al.* (2000) ont montré une association négative entre le titre d'anticorps anti-RESA et anti-MSP2 avec des charges parasitaires faibles évoquant une suppression parasitaire dépendante des immunoglobulines.

Une large gamme d'immunoglobulines participerait aux mécanismes de protection, les plus importantes seraient les sous classes cytophiliques IgG1 et IgG3.

En effet, les sous classes non cytophiliques (IgG2, IgG4 ou IgM) sont plus abondants chez des individus cliniquement non protégés contre le paludisme alors qu'IgG1 et principalement IgG3 sont plus abondantes au sein d'individus protégés (Bouharoun-Tayoun & Druilhe 1992).

Cependant, les immunoglobulines n'agiraient pas toutes seules dans la neutralisation des parasites, mais coopèreraient avec des cellules immunitaires dont les monocytes ou autres globules blancs s'activant comme cellules effectrices (Groux & Gysin 1990 ; Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1990). Le mécanisme coopératif entre immunoglobulines et monocytes est le principal mécanisme de neutralisation parasitaire quoique les anticorps soient, dans de rares cas, capables eux-mêmes d'être des inhibiteurs comme dans le cas des anticorps anti-Pf155/RESA et anti-Pf332 inhibant *in vitro* l'invasion érythrocytaire par le mérozoïte (Ahlborg *et al.*, 1993). Les expériences *in vitro* de l'ADCI (Antibody-Dependent Cellular Inhibition) ont démontré que les anticorps cytophiliques dirigés contre les antigènes MSP3 et GLURP étaient capables d'inhiber l'invasion de l'érythrocyte par le mérozoïte ou de neutraliser les parasites circulants en présence de monocytes (Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1990). Ces mécanismes dépendent d'une étroite coopération entre les IgG cytophiliques et les cellules effectrices, par l'intermédiaire des récepteurs FcγR. La neutralisation parasitaire dans ce cas paraît principalement soutenue par des facteurs solubles (TNF-α et NO) secrétés par les monocytes. Ces facteurs solubles bloquent la division des parasites intra-érythrocytaires des globules rouges avoisinant en agissant sur le parasite à son stade mononuclé (Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1995). Les monocytes ont été également reconnus capables de phagocytose sur des globules rouges infectés et opsonisés alors que les lymphocytes sont capables de tuer les parasites via des anticorps spécifiques (Brown & Smalley, 1981). Cependant, la complexité de cette réponse immune est telle qu'il existerait des immunoglobulines à effet non protecteur. En effet, les IgG2 et les IgG4 ont un effet inhibiteur sur l'opsonisation, ou sont prépondérantes dans les préparations d'IgG ou elles inhibent l'ADCI (Groux & Gysin, 1990

; Bouharoun-Tayoun & Druilhe, 1992). En outre, il a été démontré que les IgG1 anti-RESA et anti-MSP-2, ainsi que les IgG3 anti-exo antigènes augmentent, quant à elles, le risque de survenue de manifestations cliniques du paludisme (Dubois *et al.*, 1993 ; Chumpitazi *et al.*, 1996).

Il a été suggéré que la réponse immunitaire peut influencer le développement gamétocytaire au niveau de l'Homme (Piper *et al.*, 1999) ou d'empêcher le développement sporogonique au niveau du vecteur (Rener *et al.*, 1983 ; Vermeulen *et al.*, 1985 ; Carter *et al.*, 1990 ; Roeffen *et al.*, 1995 ; Gozar *et al.*, 1998). L'immunité naturelle dirigée contre les stades sexués contribue, par conséquent, au contrôle de la transmission de la maladie en réduisant ou en bloquant le transfert du parasite de l'Homme au vecteur.

I-3-Antigènes de stades asexués

La synthèse antigénique chez *Plasmodium* est spécifique au stade de développement quoique certaines protéines soient synthétisées de façon continue. Au cours du développement du stade asexué intra-érythrocytaire, deux pics de synthèse antigénique se produisent. Le premier a lieu entre la 20^{ème} et la 28^{ème} heure au cours de la transition de la forme annulaire au trophozoïte. Le second pic se produit entre la 32^{ème} et la 48^{ème} heure de la schizogonie. Des antigènes de stades hépatiques et érythrocytaires sont aujourd'hui mieux connus et constituent des cibles potentielles d'anticorps neutralisant. Parmi les plus importants (Figure 4), nous pouvons citer des antigènes du sporozoïte comme CSP (Circum sporozoïte protein), TRAP (Trombosponding Related Anonymous Protein), SSP (Infected Hepatocyte Sporozoïte Surface Protein), LSA (Liver Stage Antigen) certains de l'apex du mérozoïte comme AMA-1 (Apical Membrane Antigen), EBA-175 (Erythrocyte Binding Antigen-175) et Pf155/RESA (*Plasmodium falciparum* 155/Rosetting Erythrocyte Surface Antigen). D'autres sont à la surface du mérozoïte comme MSP1, MSP2, MSP4 (Merozoïte Surface Protein1, 2, 4), certains de la vacuole parasitophore tels que GLURP (Glutamat Rich Protein), MSP3 (Merozoïte Surface Protein3), SERA (Serin-Rich-Antigen), ABRA (Acid Basic Repeat Antigen) ou ceux à la surface de la membrane érythrocytaire tels que PfEMP1 (*Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1) et Pf332 (*Plasmodium falciparum* 322). Six antigènes ont été particulièrement étudiés dans notre thèse.

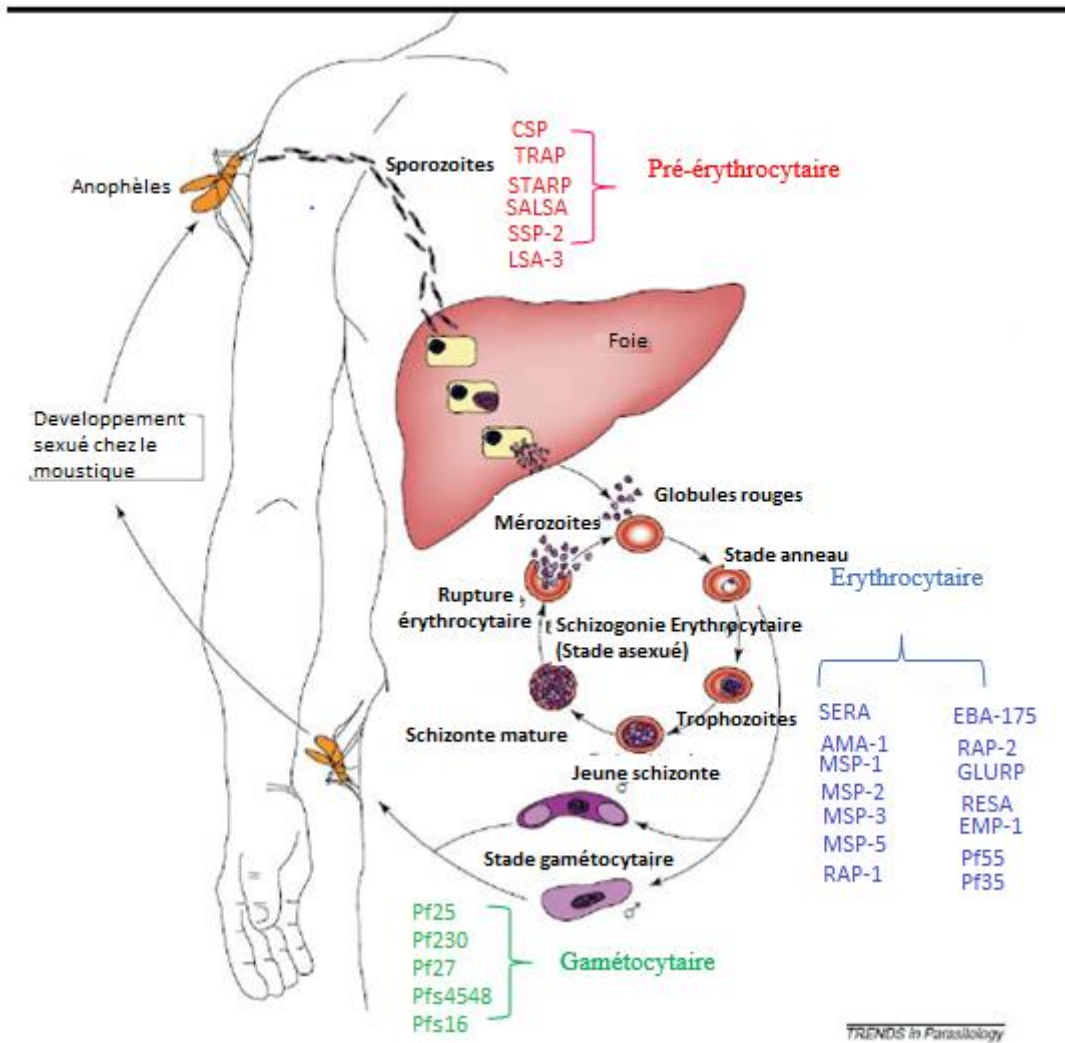


Figure 4 : Répertoire d'antigènes à potentiel vaccinal contre le paludisme (Thera *et al.*, 2011).

I-3-1-Antigènes pré-érythrocytaires

I-3-1-1-Circum sporozoite Protein

La Circum sporozoite Protein (CSP) et le Trombosponding Related Anonymous Protein (TRAP) sont des protéines présentes dans les micronèmes de l'ookinète et apparaissent ultérieurement à la surface d'autres stades du parasite au cours desquels elles jouent un rôle fonctionnel dans l'invasion cellulaire (**Cerami et al., 1992**) grâce à leurs domaines adhésifs. Des expériences ont montré que la présence des deux protéines est essentielle pour la mobilité de l'ookinète, son passage à travers l'estomac et la transition à l'oocyste (**Dessens et al., 1999 ; Templeton et al., 2000**).

I-3-1-2-Liver Stage Antigen 3

La Liver Stage Antigen 3 (LSA3) est un antigène exprimé au stade pré-érythrocytaire (**Daubersies et al., 2000**). Elle est reconnue comme un antigène protecteur contre les infections palustres chez les humains. Cet antigène fortement conservé de 200 kDa est exprimé à la fois aux stades des sporozoïtes et hépatiques (**Daubersies et al., 2000 ; Perlaza et al., 2003**). Elle possède un effet protecteur chez la souris et chez le chimpanzé en induisant des réponses immunitaires contre les protéines parasitaires natives et qui se sont révélées durables (jusqu'à 10 mois). (**Benmohamed et al., 2000**).

I-3-1-3-Sporozoïte And Liver Stage Antigen

Le Sporozoïte And Liver Stage Antigen (SALSA) est une protéine exprimée sur la surface de la membrane des sporozoïtes et aussi pendant la phase hépatique de *Plasmodium falciparum*. La synthèse de SALSA augmente tout au long de la phase hépatique. Les études ont montré que les anticorps dirigés contre l'antigène SALSA réduisent significativement l'invasion des sporozoïtes (**Bottius et al., 1996 ; Pasquetto et al., 1997**).

I-3-2-Antigènes érythrocytaires

I-3-2-1-Glutamate Rich Protein

La glutamate rich protein (GLURP) est présente dans la vacuole parasitophore du schizonte hépatique, du schizonte érythrocytaire et du mérozoïte (**Borre et al., 1991**). C'est une protéine de 220-kD non transmembranaire (absence de séquence membranaire intégrale comme pour la CS et MSP-1). Elle contient une région répétitive R2 (705-1178) reconnue par les cellules T et B, une région répétitive R1 (489-705) et une non répétitive R0 (94-489) dans sa région

N-terminale. La forte prévalence d'anticorps anti-glurp en région endémique stipule que la protéine est hautement immunogène (**Borre et al., 1991**).

I-3-2-2-Apical Membran Antigen 1

AMA1 est une protéine membranaire de type 1 initialement localisée dans le micronème (organelle présente dans la région apicale du mérozoïte). AMA1 est exprimée essentiellement pendant la phase asexuée ou sanguine de *P. falciparum* (**Bannister et al., 2003 ; Silvie et al., 2004b ; Remarque et al., 2008**). AMA1 est un polypeptide de 83 kDa qui est transformé par une dégradation protéolytique en une molécule de 66 kDa avant d'être exportée à la surface du mérozoïte lors de la rupture des schizontes (**Narum et al., 1994 ; Howell et al., 2003**). La protéine se subdivise en trois domaines (DI, DII et DIII) sur la base des ponts disulfures (**Hodder et al., 1996**) et de sa structure cristalline (**Pizarro et al., 2005**). La protéine est appâtée au stade tardif du mérozoïte ou au cours de l'invasion érythrocytaire (**Howell et al., 2001**). Elle jouerait un rôle lors de la réorientation du mérozoïte au cours de laquelle, les organites apicaux sont alignés sur la membrane des érythrocytes (**Mitchell et al., 2004**). PfAMA1 pourrait également être impliqué dans l'invasion des hépatocytes (**Sylvie et al., 2004a**). PfAMA1 jouerait un rôle dans l'invasion érythrocytaire par l'intermédiaire de son domaine DIII (**Kato et al., 2005**). PfAMA1 présente de nombreux polymorphismes dans ses trois domaines DI, DII et DIII.

I-3-3-Thérapie vaccinale

Un vaccin efficace contre le paludisme serait une avancée majeure pour l'éradication de la maladie. Cependant, sa mise au point s'avère très compliquée. Ceci est en partie lié aux différentes formes que prend le parasite au cours de son cycle, et au polymorphisme observé pour la plupart des antigènes (**Mahajan et al. 2005**). A ce jour, aucun vaccin efficace n'est disponible mais plusieurs candidats vaccins ciblant des antigènes de différents stades parasitaires sont en cours d'évaluation. La figure 4 répertorie et regroupe par stade parasitaire les différents antigènes susceptibles de constituer des candidats vaccins (**Thera et al., 2011**) Trois phases du développement parasitaire sont ainsi ciblées par les vaccins en cours d'élaboration :

- ❖ La phase pré-érythrocytaire pour bloquer l'infection humaine par les moustiques infectants ; parmi les candidats vaccins en cours d'évaluation, le vaccin RTS,S/AS basé sur la protéine Surface Circumsporozoite (CSP) est le plus avancé. Des essais cliniques ont été réalisés en 2014, en phase 3 sur 11 sites d'études dans 7 pays Africains : Kenya

(Kilifi, Siaya et Kombewa), Tanzanie (Bagamoyo et Korogwé), Malawi (Lilongwé), Gabon (Lambarené), Mozambique (Manhica), Burkina Faso (Nanoro) et Ghana (Kintampo et Agogo). Les premiers résultats révèlent une efficacité de 57 % chez les enfants de 5 à 17 mois (Agnandji *et al.*, 2011 ; RTS,S ; 2015) et 35 % en moyenne chez les nouveaux nés de 6 à 12 semaines (Agnandji *et al.*, 2012). Ce vaccin induit une réponse humorale et cellulaire avec un titre élevé d'anticorps qui peut bloquer l'infection du parasite au niveau du foie.

- ❖ La phase sanguine (mérozoïte) pour éliminer les parasites et bloquer l'infection des hématies ; un candidat vaccin, FMP2.1/AS02A, est une protéine recombinante, basée sur l'antigène 1 de la membrane apicale (AMA-1). Ce vaccin fut l'objet d'un essai clinique en phase 2 au centre du Mali, à Bandiagara. Les résultats de la phase 1 ont montré une bonne immuno-tolérance et une immunogénéicité chez les volontaires vaccinés. Les auteurs ont également montré que ce vaccin ne protégeait pas significativement les individus vaccinés (48,4 % d'incidence du paludisme) par rapport aux témoins non vaccinés (54,4 % d'incidence du paludisme) (Thera *et al.*, 2011).
- ❖ La phase sexuée pour interrompre le cycle de transmission et limiter la propagation de la maladie. Ces derniers sont appelés vaccins bloquant la transmission. Les antigènes candidats vaccins sont entre autres : Pf25, Pf230, Pfs4548 et Pfs16.

II-
MATERIEL & METHODES

II-1-Type et sites d'étude

Il s'agit d'une étude transversale réalisée au cours de deux essais cliniques évaluant l'efficacité et la tolérance des associations Artésunate + Amodiaquine (AS+AQ) et Artémether Luméfantrine (AL) sur les patients présentant un paludisme simple à *Plasmodium falciparum*. Au cours de cette étude, un suivi clinique et parasitologique des patients a été effectué pendant 42 jours après traitement. Le recrutement des patients s'est déroulé dans deux centres de santé : Le Centre de Santé Urbain de Libreville (Man) et le Centre de Santé Urbain de Dar-Es-Salam (Bouaké). Man et Bouaké sont deux villes de la Côte d'Ivoire présentant des caractéristiques éco-climatiques différents (**Figure 5**). Ces sites ont été choisis parcequ'ils enregistrent des données plus ou moins repertoriées de prévalence clinique du paludisme en Côte d'Ivoire. Man et Bouaké sont des sites d'essai clinique de l'Unité de Paludologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Depuis plus d'une dizaine d'années, Man est également l'un des sites sentinelles du PNLP à l'instar de Yamoussoukro, Abengourou, Korhogo, Abidjan et San-Pédro. Bouaké a été récemment identifiée avec d'autres villes que sont : Daloa, Bouna, Odienné, Adzopé et Aboisso comme sites sentinelles du PNLP.

-Site Man

Man est située à 578 km d'Abidjan dans la zone forestière avec un relief montagneux. La ville de Man se trouve à l'Ouest de la Côte d'Ivoire à 7 ° 24 'de latitude Nord, 7 ° 33 'de longitude Ouest, avec une population d'environ 188 704 habitants (**Anonyme-3, 2014**). Elle est relativement homogène, composée majoritairement de Dan (Yacouba), de Wê (wobé, guéré) et Toura, et de populations venues d'autres régions du pays et des pays voisins (Guinée et Libéria). La population est majoritairement jeune. La principale activité des populations est l'agriculture surtout la culture du riz, du café et du cacao, dont la récolte et la traite se situent de Décembre à Avril. La ville de Man compte plusieurs établissements sanitaires publics notamment un centre antituberculeux, un centre hospitalier régional, un centre de protection maternelle et infantile, un centre de santé intégré, deux centres sanitaires urbains et plusieurs dispensaires. Le paludisme constitue la première cause de consultation et d'hospitalisation dans les formations sanitaires de Man. La mortalité et la morbidité liées au paludisme y sont importantes selon les données du PNLP.

La prévalence du paludisme est élevée à Man avec une incidence qui est plus de 200 ‰ (Deux cent pour mille) (**Anonyme-2, 2015**). *Plasmodium falciparum* est l'espèce plasmodiale la plus dominante avec plus de 95% des infections chez les enfants de moins de cinq ans

(**Offianan et al., 2014**). On y trouve plusieurs espèces anophéliennes telles que *An. gambiae*, (espèce majoritaire avec plus de 76%), *An. funestus* (plus de 16 %), *An. nili*, *An. pharoensis*, *An. Anuoliris*, etc. Le nombre de piqûres par personne et par nuit (taux d'inoculation entomologique, TIE) dû à *An. gambiae* est de 4,21 p/p/n (**Anonyme-1, 2017**). Les stratégies de lutte antipaludique sont fondées principalement sur les moustiquaires imprégnées d'insecticide avec un niveau d'utilisation qui reste assez faible et le traitement des cas cliniques.

-Site de Bouaké

Bouaké est la deuxième grande ville de la Côte d'Ivoire localisée dans la partie centrale du pays. Les coordonnées géographiques sont : 7°44'N latitude, 5°41'W longitude. La population de la ville de Bouaké est estimée à environ 608 138 habitants (**Anonyme-3, 2014**). La température moyenne journalière varie entre 23,7 et 33,8 °C et la pluviométrie annuelle est estimée à environ 1334 mm/an. Le climat est tropical et humide caractérisé par deux saisons bien définies : une saison sèche allant de Novembre à Février et une longue saison des pluies de Mars à Octobre. Bouaké est situé dans la zone pré-forestière (zone transitoire de la savane du Nord et de la forêt du Sud) (**Diakité et al., 2010**). La transmission du paludisme est comparable à celle du Nord (6 à 8 mois) (**Koffi et al., 2009**). La ville de Bouaké compte plusieurs établissements sanitaires publics, notamment un centre antituberculeux, un centre hospitalier universitaire, plusieurs centres sanitaires urbains et plusieurs dispensaires. La population de Bouaké est caractérisée par une grande hétérogénéité. Deux grands groupes ethniques se partagent la ville, les Baoulés autochtones et les Malinkés venus du Nord du pays. De par sa situation centrale dans le pays et de son importance économique, on retrouve à Bouaké des populations venues des autres régions et des ressortissants de plusieurs Etats d'Afrique de l'Ouest. Les espèces anophéliennes rencontrées à Bouaké sont : *An. gambiae*, (espèce majoritaire avec plus de 80%), *An. funestus* (> 16 %), *An. Pharoensis*, *An. anuoliris*, *An. nilli* etc. Le nombre de piqûres par personne et par nuit (taux d'inoculation entomologique, TIE) dû à *An. gambiae* à Dar-Es-Salam est de 0,05 p/p/n (**Anonyme-1, 2017**). *Plasmodium falciparum* est l'espèce plasmodiale la plus dominante avec plus de 95% des infections chez les enfants de moins de cinq ans (**Anonyme-2, 2015**).

Comme à Man, le paludisme constitue la première cause de consultation et d'hospitalisation dans les formations sanitaires de Bouaké avec une incidence qui est plus de 250 ‰ (Deux

cinquante pour mille) (**Anonyme-2, 2015**). La mortalité et la morbidité liées au paludisme y sont importantes selon les données du PNLP.

II-2-Période d'étude

Le recrutement des patients s'est déroulé l'un de Janvier à Mai 2016 dans le Centre de Santé Urbain de Libreville (CSUL) de Man et l'autre d'Avril à Juin 2016 dans le Centre de Santé de Dar-Es-Salam. L'étude immunologique s'est déroulée dans les Départements de Parasitologie-Mycologie et des Virus Epidémiques de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire de Juillet à Septembre 2016.

II-3-Population d'étude

L'étude se rapportant à l'association entre le niveau de réponse anticorps dirigée contre les antigènes de *P. falciparum* et l'issue du traitement aux CTA a inclus les patients de l'essai clinique conduit à Man.

Pour l'étude de comparaison des niveaux de réponses anticorps dans deux (2) faciès épidémiologiques, les patients inclus provenaient de deux essais cliniques portant sur les deux CTA conduits à Man et à Bouaké. Les patients inclus dans notre étude sont constitués d'adultes et d'enfants reçus en consultation et présentant un paludisme simple à *Plasmodium falciparum* sur chaque site d'étude. De plus, chaque patient inclus a répondu aux critères suivants selon les directives du traitement du paludisme (protocole des études efficacité thérapeutique des antipaludiques de 42 jours de l'OMS) (**WHO, 2009**) :

- un âge supérieur 6 mois avec une température corporelle $\geq 37,5$ °C,
- une infection mono-spécifique à *P. falciparum*, confirmée par une goutte épaisse (GE) et un frottis sanguin (FS) avec une densité parasitaire initiale comprise entre 2 000 et 200 000 parasites asexués/ μ L,
- un taux de l'hémoglobine ≥ 8 g/dL,
- la capacité de prendre les médicaments par voie orale.

Enfin un consentement éclairé a été obtenu auprès de chaque patient ou du parent/tuteur légal après avoir été informés du déroulement de l'étude par les investigateurs.

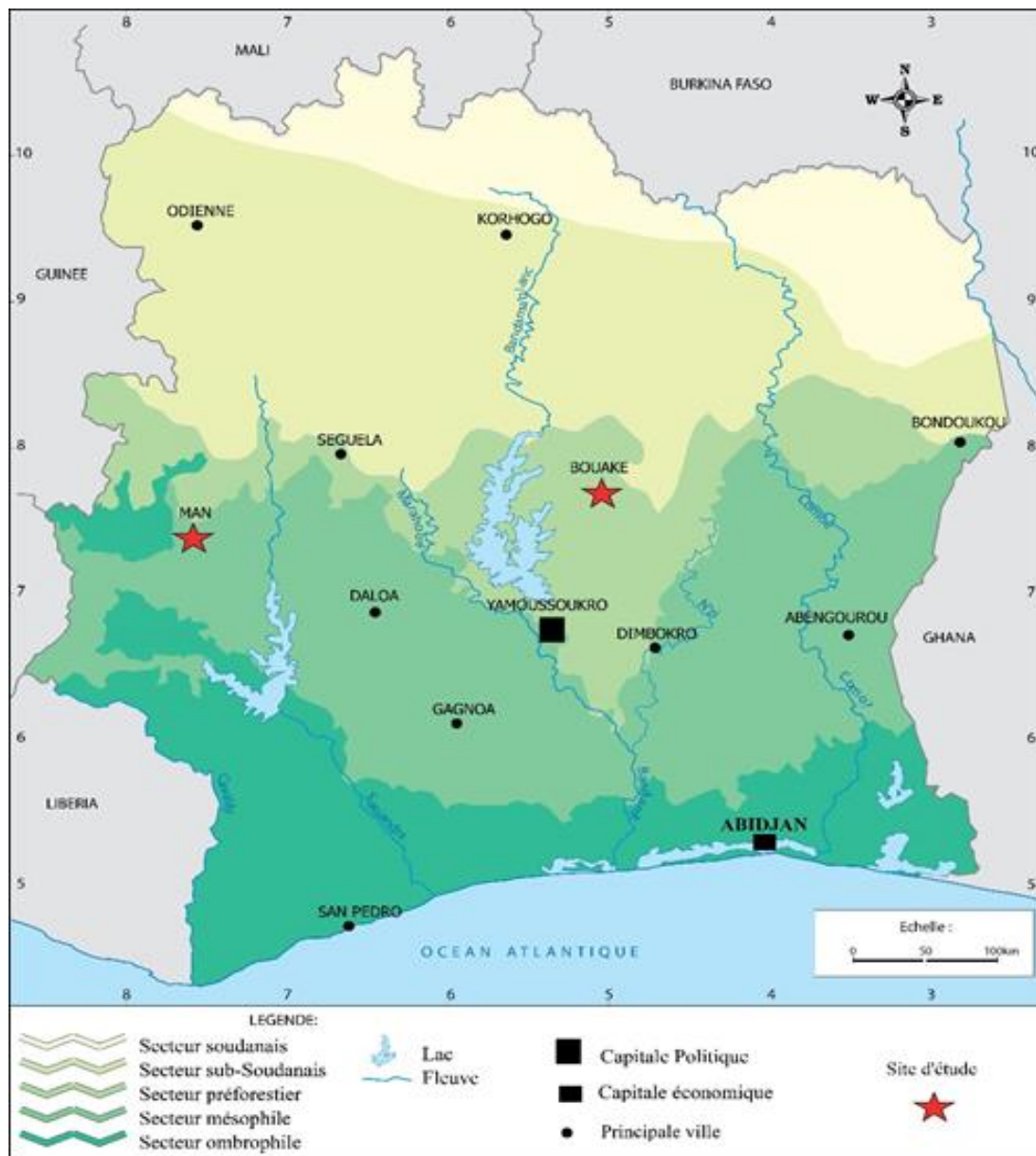


Figure 5 : Localisation des sites d'étude
 Source (CCT, réalisation Guy Pacôme, Mai 2018)

II-3-1-Taille de l'échantillon

Le calcul de la taille de notre échantillon (n) a été fait sur la base des paramètres suivants :

- un taux d'échec thérapeutique attendu (p) inférieur à 15%,
- une précision souhaitée (i) de 10%
- un risque d'erreur alpha (α) de 5% ce qui correspond à un intervalle de confiance (IC) de 95% et un écart centré réduit (z) de 1,96.

$$n = \frac{z^2 \times p(1-p)}{i^2} \quad n = \frac{1,96^2 \times 0,15(1-0,15)}{0,1^2} = 50$$

La taille de l'échantillon a été d'au moins 50 patients dans chaque bras. Mais, en considérant un taux de perdu de vue et d'exclu de 10%, notre échantillon a été ramené à 60 patients par bras. Au total 120 patients par site ont été recrutés pour les études d'essais cliniques.

II-3-2-Traitement des patients

Chaque patient inclus dans l'étude était randomisé dans chaque groupe thérapeutique (AS+AQ ; Winthrop, Sanofi Aventis et AL ; Coartem®, Novartis) de façon aléatoire par tirage au sort. Les médicaments ont été administrés en fonction du poids corporel des patients, pendant 3 jours consécutifs, comme suit :

Dans le groupe AS + AQ

5 à < 9 kg,	1 comprimé de 25 / 67,5 mg
9 à < 18 kg,	1 comprimé de 50 / 135 mg
18 à < 36 kg,	1 comprimé de 100 / 270 mg
≥ 36 kg,	2 comprimés 100 / 270 mg

Dans le groupe AL (les comprimés étaient de 20/ 120 mg)

5 à 9 kg,	1 comprimé par dose et par jour
10 à 14kg,	1 comprimé par dose, 2 fois/ jour
15-24 kg,	2 comprimés par dose, 2 fois/ jour
25-34 kg,	3 comprimés par dose, 2 fois/ jour

≥ 35 kg, 4 comprimés par dose et 2 fois/ jour

II-4-Procédures biologiques

II-4-1-Goutte Epaisse et Frottis Sanguin

Les prélèvements de sang veineux ont été effectués pour la réalisation de la goutte épaisse et du frottis sanguin (GE/FS) à l'inclusion pour la mise en évidence de la biomasse parasitaire et de l'espèce plasmodiale et à J7 après le traitement pour évaluer la qualité de ce traitement. Aux jours 1, 2, 3, 14, 21, 28, 35 et 42, la goutte épaisse et le frottis sanguin ont été réalisés à partir du sang capillaire. Avant la réalisation de la goutte épaisse (GE) et du frottis sanguin (FS) au bout du doigt, une lame propre est étiquetée. La pulpe du doigt majeur gauche du patient est désinfectée à l'aide d'un tampon alcoolisé. Après le séchage de l'alcool, le doigt est légèrement massé dans le sens terminal pour ramener le sang au niveau de la pulpe du doigt sans toucher à la partie désinfectée. A l'aide du vaccinostyle, la partie de la pulpe du doigt désinfecté est piquée sur le côté, puis le sang est recueilli. Le doigt est déposé délicatement sur la lame étiquetée. Cette première goutte a servi de réaliser la goutte épaisse ; une seconde goutte sur la même lame a été nécessaire pour réaliser le frottis sanguin mince. Les gouttes épaisses et les frottis minces sont bien séchés, puis avec un crayon le code anonyme, la date, le jour du suivi et l'heure de prélèvement sont notés sur la lame du patient. Les lames sont ensuite plongées pendant 20 à 30 minutes dans une solution de Giemsa 10% préparée extemporanément chaque jour. Elle est ensuite examinée pour le comptage des plasmodies à la GE et l'identification de l'espèce plasmodiale au frottis sanguin mince. Les gouttes épaisses et frottis sanguin ont été examinés à immersion au grossissement X1000 pour identifier les espèces. La densité parasitaire (DP) est calculée selon la formule ci-dessous : $DP (\mu L) = N \times 8.000 / X$

DP : densité parasitaire ;

N : nombre de parasites comptés ;

X : nombre de leucocytes comptés.

L'étalement est considéré comme négatif lorsque l'examen de 1000 leucocytes ou 100 champs contenant au moins 10 globules blancs par champ ne met en évidence aucune forme asexuée de plasmodies (**OMS, 2003**).

Il faut noter que deux lectures des lames ont été effectuées par un personnel qualifié, expérimenté et dans le cas où il y'a une discordance de 20% de différence pour la densité parasitaire, un troisième lecteur intervient pour une vérification.

La clairance parasitaire a été évaluée à partir de la densité parasitaire. Elle s'est effectuée par jour de suivi.

II-4-2- Biologie Moléculaire (PCR)

La PCR a été réalisée à partir de confettis faits aux jours d'inclusion et d'échec (repositivation de la goutte épaisse) avec les échantillons de sang total provenant des participants. Cette technique a permis de faire la distinction entre une réinfestation et une recrudescence de l'infestation initiale ([Offianan et al., 2014](#)). Le gène *msp2* (*Merozoit Surface Protein 2*) a été utilisé. Les profils génétiques ont été (électrophorégramme) entre le jour d'inclusion (J0) des patients et le jour de la répositivation pour les deux sous-familles alléliques 3D7 et FC27 du gène *msp2*. En cas de profils identiques, on parle de recrudescence. En cas de profils non identiques (différents), il s'agit de réinfestation. La méthode s'est déroulée en trois étapes :

Confection des confettis :

Environ 5 mL de sang veineux ont prélevés chez les patients et recueillis dans un tube EDTA, aux jours d'inclusion et d'échec chez les patients inclus dans l'étude présentant un échec au traitement.

Pour la confection des confettis, 3 gouttes de 20 à 50 µl (chacune) de sang parasité ont été déposés sur un papier filtre Whatman 3MM®. Le sang est séché à la température ambiante pendant 40 minutes. A l'aide d'un stylo à bille, les inscriptions se référant à l'individu sont mentionnées sur un bord du papier filtre. Chaque confetti est mis dans un étui stérile contenant du gel silicate et conservé à l'abri de l'humidité.

L'extraction de l'ADN de *P. falciparum* a été réalisée au kit Qiagen selon la procédure du fabricant à partir du papier-filtre Whatman. La méthode s'est déroulée en trois étapes:

Première étape : Phase de lyse cellulaire. Les confettis découpés sont placés dans un tube Eppendorf 1,5 mL auquel sont ajoutés 180 µL de tampon ATL (tampon de lyse cellulaire) et 20 µL de protéinase K. Après homogénéisation du tube au vortex pendant quelques secondes, il est placé sur un mixeur à 56° C pendant une heure à 900 tr/min. Au cours de cette période d'une heure, le tube est vortexé pendant quelques secondes par intervalle de 10 min. Il est

ensuite sorti du mixeur et centrifugé pendant 10 secondes pour permettre le mélange des gouttelettes d'eau déposées sur le couvercle du tube au reste du contenu du tube. Un volume de 200 µL du tampon AL (Tampon de lyse) est ajouté au tube dont le contenu est homogénéisé à la main pendant quelques secondes. La solution est ensuite placée sur le mixeur à 70° C pendant 10 min à 900 trs/min avec homogénéisation au vortex toutes les 3 min. Cette phase s'est terminée par une seconde centrifugation pendant 10 secondes dans le but d'obtenir un mélange homogène. Le lysat est transféré avec prudence sans mouiller le bord du tube dans une colonne fermée, puis centrifugé à 8000 trs/min pendant 1min. La colonne est placée dans un tube à collection de 2 mL.

Deuxième étape : Phase de lavage. Un volume de 500 µL de Buffer AW1 (Tampon de lavage 1) est mis dans la microcolonne, puis centrifugé à 8000 trs/min pendant 1min. Ensuite, la colonne est placée dans un tube à collection de 2 mL, puis 500 µL de Buffer AW2 (Tampon de lavage 2) sont ajoutés, puis centrifugé à nouveau à 8000 trs/min pendant 1min. Une deuxième centrifugation à 14000 trs/min pendant 3min a été nécessaire afin de sécher la membrane de la colonne dont le filtre permet de retenir l'ADN.

Troisième étape : Phase d'éluion. La colonne est placée dans un tube Eppendorf de 1,5 mL stérile et le tube à collection contenant l'impureté est jetée. Un volume de 100 µL de Buffer AE est ajouté au centre de la membrane et incubé. Le tube est incubé à la température ambiante (15-25° C) pendant 1 min. Parfois, le Buffer AE (Tampon) a été remplacé par de l'eau distillée. Dans ce cas, le temps d'incubation a été de 5 min. Après l'incubation, la solution est centrifugée à 14000 trs/min pendant 1min. et a permis d'éluier l'ADN qui est récupéré dans le tube Eppendorf de 1,5 mL. Les extraits d'ADN sont conservés à -20 ° C.

Amplification de gène *msp2*

La PCR a été réalisé à partir d'un volume réactionnel de 25 µL par microtube. Ce milieu comporte un couple d'amorces à une concentration initiale de 10 µM chacune, de l'eau stérile, 5µl de kit "SolisBiodyne" d'amplification *HotPFMMasterMix 5X* (contenant la polymérase, les bases azotées, le MgCl₂ et le tampon) et 5 µL d'ADN (**Tableaux II, IV et V**). Le programme de polymérisation (**Tableau III**) a été effectué dans un thermocycleur de type *Applied BioSystem*.

Electrophorèse des produits d'amplification d'ADN

Une électrophorèse a été réalisée avec un gel à 2 % d'agarose contenant du *SyberSafe*. A cet effet, 8 μ L de chaque produit d'amplification ont été mélangés à 2 μ L de tampon de charge. Ce mélange a été déposé dans les puits de migration du gel. La migration des produits d'amplification a été réalisée simultanément avec celle d'un marqueur de poids moléculaire (*SmartLadder* 100-1000pb), d'un témoin positif et d'un témoin négatif. Cette migration s'est faite à 135 volts pendant 20 min. À la fin de l'électrophorèse, le gel d'agarose a été placé dans un lecteur de gel et la taille de l'amplicon a été comprise entre 300 et 800 pb. Il faut noter que pour la PCR, les tests ont été repris trois fois afin de confirmer les résultats obtenus.

Tableau II: Séquences des amorces des PCR

Gène	Amorces	Séquence (5'→3')	Taille (pb)
MSP2	M2-OF	ATGAAGGTAATTAAAACATTGTCTATT ATA	30
	M2-OR	CTTTGTTACCATCGGTACATTCTT	24
3D7	M2-FCF	AATACTAAGAGTGTAGGTGTCARATGCT CCA	30
	M2-FCR	TTTTATTTGGTGCATTGCCAGAACTTG AAC	29
FC27	M2-ICF	AGFAGTATGGCAGAAAGTAAKCCTYCT ACT	30
	M2-ICF	GATTGTAATTCGGGGGATTCAGTTTGT TCG	30

Tableau III: Composition du milieu réactionnel de la PCR

Volume/Echantillon (μl)			
Réactifs	PCR 1	PCR 2 - 3D7	PCR 2 - FC27
Eau de Biologie moléculaire	10	13	13
Amorce M2-OF (10 μM)	2,5		
AmorceM2-OR (10 μM)	2,5		
Amorce M2-FCF (10 μM)		2,5	
Amorce M2-FCR (10 μM)		2,5	
Amorce M2-ICF (10 μM)			2,5
Amorce M2-ICF (10 μM)			2,5
5X FIREPol Master Mix	5	5	5
Volume Mix	20	23	23
ADN/Amplicons	5	2	2
Volume Total	25	25	25

Tableau IV : Programme d'amplification de la PCR 1

CYCLES	T°C	Temps
Dénaturation initiale	94	5 min
Dénaturation	94	15 s
Hybridation	61	90 s
Elongation	72	2 min
Elongation finale	72	10 mn

Tableau V: Programme d'amplification de la PCR 2

CYCLES	T°C	Temps
Dénaturation initiale	94	5 min
Dénaturation	94	30 s
Hybridation	58	30 s
Elongation	70	1 min
Elongation finale	72	7 mn

La classification de la réponse thérapeutique a été faite selon les critères de l’OMS (**WHO, 2009**) (**Tableau VI**)

Tableau VI: Description de l'issue des antipaludiques selon l'OMS

Issue du traitement antipaludique		Descriptions
Eches Thérapeutiques	Echec Thérapeutique Précoce (ETP)	Apparition des signes du paludisme grave aux jours 1, 2, 3 DP à J2 > DP à J0 quelle que soit la température Présence de parasites à J3 avec $T^{\circ} \geq 37,5^{\circ}\text{C}$ DP à J3 $\geq 25\%$ de la DP à J0
	Echec Clinique Tardif (ECT)	Apparition des signes du paludisme grave après J3 avec une parasitémie sans qu’aucun critère d’ETP n’ait été satisfait auparavant Présence de parasites avec une Température $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ entre J4 et J42 sans qu’aucun critère d’ETP n’ait été satisfait auparavant
	Echec Parasitologique Tardif (EPT)	Présence de parasites entre J7 et J42, avec une Température $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ sans qu’aucun critère d’ETP ou d’ECT n’ait été satisfait auparavant.
	Réponse Clinique Parasitologique Adéquate (RCPA)	Absence de parasite à J42 quelle que soit la température axillaire, sans qu’aucun critère d’ETP, d’ECT ou d’EPT n’ait été satisfait auparavant.

Tableau VII : Séquences des peptides utilisés et lieu de sécrétion

Peptides	Séquence N-terminal à C-terminal	g /mol	Etape du cycle de vie	Espèce plasmodiale	références
CSP	ANPNANPNANPNANPNVDPNVDP	2557,67	sporozoïte	<i>P. falciparum</i>	(Greenwood et al., 2005)
LSA3	VLEESQVNDDIFNSLVKSVQQEQQHNC	3230,53	Phase hépatique	<i>P. falciparum</i>	
SALSA	SAEKKDEKEASEQGEESHKKENSQESAC	3123,24	sporozoïte et phase hépatique		
GLURP	EDKNEKGQHEIVEVEEILC	2241,47	trophozoïte		
AMA1	<i>YKDEIKKEIERESKRIKLNNDNDEGNKKIIPRIFISDDKDSL</i>		trophozoïte	<i>P. falciparum</i>	

II-4-3-Technique immuno-enzymatique ELISA

Pour ce présent travail, environ 500 µL d'échantillons de sérum de chaque participant ont été collectés au jour 0 avant le traitement et au 7^{ème} jour après le traitement. Ces échantillons de sérum ont été conservés dans des microtubes puis conservés à -20°C jusqu'à la réalisation des tests ELISA.

Le matériel technique était composé de chaîne d'ELISA classique (Annexe). Le réactif était essentiellement constitué d'antigènes parasitaires : SALSA, LSA3, AMA1, GLURP, CSP et l'Extrait total de schizonte 07/03. Ils ont été fournis par l'Institut Pasteur de Dakar. Les séquences d'antigènes utilisées sont réportés dans le **tableau VII**.

II-4-3-1-Principe

La technique ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) est un test immuno-enzymatique utilisé pour la mesure quantitative d'une protéine cible dans des échantillons biologiques tels que le sérum, le plasma, le surnageant d'une culture cellulaire.

II-4-3-2-Préparation de la solution de lavage

La solution de lavage est composée de Phosphate Buffered Saline (PBS) obtenue à partir de pastilles et de l'eau distillée (2 pastilles dans 1 litre d'eau distillée). Un millilitre de la solution de Tween® 20 est mis dans 1 L de PBS 1 X. La solution obtenue est la solution de lavage (PBS1X 0,1% Tween 20).

II-4-3-3-Préparation de la solution de saturation

La solution de saturation a été obtenue à partir de la solution de lavage (PBS 1X 0,1% Tween 20) et du BSA (Bovine Serum Albumin). A cette solution (50 mL), on y ajoute 0,5 gramme du BSA. La solution de saturation est composée donc de PBS 1X 0,1% Tween 1% BSA.

Le test d'ELISA a été réalisé avec les plaques 96 puits Maxisorp®, Nunc sur lesquelles sont notées le type d'antigène et la date de la manipulation. Sur chaque plaque, ont été utilisés systématiquement les sérums d'individus naïfs comme témoins négatifs et le sérum hyper immun comme témoin positif. La réalisation du test est passée par plusieurs étapes successives. Tous les échantillons ont été testés en duplicata. Les différentes étapes du test sont :

Fixation des antigènes dans les plaques : 100 µL/puits de chaque antigène candidat vaccin de *P. falciparum*, ont été dilués à 1µg/mL dans du tampon de carbonate à pH = 9,6. Quant à

l'Extrait total de schizonte 07/03, il a été dilué à une concentration 1 µL/1,2 mL. Les plaques ont été incubées à 4°C pendant une nuit.

Lavages des plaques : Après avoir sorti les plaques du réfrigérateur, 3 lavages ont été effectués avec 180 µL PBS 1X 0,1% Tween 20/puits pour éliminer l'excès d'antigènes. Les plaques sont ensuite vidées et tapotées sur du papier absorbant pour les sécher.

Saturation des plaques : Les sites non spécifiques ont été saturés avec 110 µL de la solution PBS 1X 0,1% Tween 1% BSA. Les plaques saturées ont été recouvertes avec des papiers adhésifs et incubées à 37°C pendant 1 heure. Après cette incubation, les plaques sont retirées, vidées et lavées avec du Tampon PBS 1X 0,1% Tween 20. Trois lavages ont été nécessaires.

Incubation des sérums : Les échantillons de sérum à tester, les témoins positifs et négatifs ont été dilués aux 1/100 et 1/200 à partir de la solution de saturation (PBS 1X 0,1% Tween 20 1% BSA). Cent (100) µL de chaque échantillon dilué et les témoins positifs et négatifs ont été distribués dans les puits en duplicata. Le tout est mis en incubation à 37°C pendant 1 heure. Les plaques sont lavées (4 lavages) après leur retrait de l'incubateur.

Incubation du conjugué (anti-immunoglobuline G couplée à la peroxydase) : Après ces lavages, 100 µL de l'anti-human IgG dilué à 1/7000^{ème} dans PBS 1X 0,1% Tween 1% BSA sont distribués dans chaque puits. Les plaques ont été ensuite incubées à nouveau à 37°C pendant 30 minutes.

Révéléateur : Après cette incubation, 4 lavages sont faits avec 180 µL/puits de PBS 1X 0,1% Tween 20. Un mélange à volume égal de chaque solution du TetraMéthylBenzidine (TMB Eurobio®) ; (peroxidase substrate & peroxidase substrate =solution B) a été effectué dans un tube falcon stérile. Dans chaque puits, sont transférés 100 µL de cette solution de TMB ainsi préparée. L'apparition d'une coloration bleue est stoppée par l'ajout de 100 µL/puits de l'acide ortho phosphorique (H₃PO₄) à 1M (solution d'arrêt).

Lecture et analyses des résultats : Les densités optiques (DO) mesurées par spectrophotométrie à 450 nm avec 620 nm comme référence ont servi à l'expression des résultats sous forme de ratio DO (rtDO) qui correspond au rapport de la DO de l'échantillon sur celle d'un témoin négatif systématique.

Un pool de sérums recueillis chez les sujets hyper-immuns vivants dans le village Dielmo (Sénégal) choisi pour sa forte spécificité en anticorps anti-*P. falciparum* (Aribot *et al.*, 1996 ; Perraut *et al.*, 2003 ; Koffi *et al.*, 2015) a été utilisé comme témoin positif et a permis la

validation inter-essais des résultats. Les patients ayant des $rtDO > 2$ ont été considérés comme répondeurs, ce qui correspond à la moyenne des contrôles naïfs additionnée de 2 écarts types soit une positivité de plus de 95 %.

Il faut noter que les tests ont été repris trois fois afin de confirmer les résultats obtenus pour la reproductibilité du test.

II-5-Considérations éthiques et réglementaires

Cette étude a eu l'approbation du Comité National d'Ethique et de Recherche (CNER), N° 049/MSRS/CNER-dkn. Elle a été réalisée conformément à la déclaration d'Helsinki. Les enfants qui ne sont pas majeurs et qui savent lire et écrire, un assentiment leur a été demandé en plus du consentement d'un parent ou d'un représentant légal. Par ailleurs lors de la signature des consentements, il a été demandé à tous les participants de ces études, un accord pour l'utilisation ultérieure de leurs échantillons. La prise en charge médicale des participants était entièrement gratuite et l'anonymat a été garanti durant toutes les analyses de laboratoire.

II-6-Analyses statistiques

Le logiciel GraphPad Prism 5 a été utilisé pour les analyses.

Les moyennes géométriques, les standards de déviations et les intervalles de confiance à 95% ont été déterminés. L'âge des patients a été catégorisé en tranche d'âge : [0 - 5[ans, [5-15 [ans et ≥ 15 ans.

Test de Mann Whitney (t Test, données non paramétriques et non appariées).

Ce Test a été utilisé dans plusieurs cas dans notre étude pour les comparaisons des moyennes ci-dessous :

- Les moyennes des niveaux de réponses entre les patients RCPA versus ceux ayant fait échecs aux traitements.
- Les moyennes des niveaux de réponses entre les patients ayant une clairance parasitaire de 24 heures versus ceux ayant une clairance parasitaire de plus de 24 heures.
- Les moyennes des niveaux de réponses entre les patients provenant de Man versus ceux provenant de Bouaké.

- Les moyennes des niveaux de réponses dirigés contre chaque antigène par sexe et par site d'étude.
- Les moyennes des niveaux de réponses des patients de la même tranche d'âge par site d'étude.

Comparaison des moyennes des niveaux de réponses moyens à J0 et à J7 des patients inclus à Man.

Les différences entre les niveaux moyens de réponse des patients à Man à J0 et à J7 ont été estimées en utilisant **le Test de Wilcoxon** (données non paramétriques et appariés).

Le Test de kruskall Wallis a été utilisé, d'une part, pour comparer les niveaux moyens de réponses par tranches d'âges et, d'autre part, pour la comparaison du niveau moyen de réponse spécifique à chaque antigène par site d'étude (données non paramétriques ; comparaisons de plus de deux moyennes).

Comparaison des proportions de répondeurs à chaque antigène entre J0 et J7.

Le Test de Chi² (échantillons appariés) : si le nombre de paires discordantes ≥ 10 : test de Mac Nemar avec la fonction `mcnemar` ou si $n < 10$: test Mac Nemar avec correction de continuité avec la fonction `mcnemar.test` a été utilisé.

Comparaison des proportions de répondeurs à chaque antigène entre les deux sites d'étude (Man et Bouaké).

Le test du X² (Chi²) sans correction de continuité (Correction de Yates) pour $n \geq 5$ et avec correction de Yates pour $n < 5$ a été utilisé pour déterminer si les proportions des répondeurs à chaque antigène entre les deux sites d'étude (Man et Bouaké) peuvent être considérées comme étant égales (hypothèse nulle H₀) ou si les proportions des repondeurs à chaque antigène sont différentes selon le site d'étude.

Corrélation entre les réponses anticorps, la densité parasitaire et l'âge

Le test de Sperman a été utilisé pour établir la corrélation entre les réponses anticorps antigènes, la densité parasitaire et l'âge. Le seuil de significativité a été fixé à 5 %.

III- RESULTATS

Pour une meilleure clarté, les résultats sont scindés en deux parties :

- la première partie a concerné l'évaluation de la relation entre les réponses anticorps dirigées contre les antigènes de *P. falciparum* et l'issue du traitement aux Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine,
- la deuxième partie s'est intéressée à la comparaison de la réponse immune humorale dirigée contre les antigènes candidat vaccin de *P. falciparum* chez des patients vivants dans deux faciès épidémiologiques différents (Man et Bouaké).

III-1-Association entre les réponses d'anticorps dirigées contre les antigènes et l'issue du traitement aux Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine à Man

III-1-1- Caractéristiques des patients à l'inclusion

Sur un total de 843 sujets fébriles reçus en consultation à Man, 120 ont été inclus et randomisés. En définitive, 59 patients ont été suivis jusqu'à J42 dans le bras AS+AQ contre 58 dans le bras AL. Les examens biologiques à J0 et les contrôles à J7 ont permis de retenir 56 et 55 sérums disponibles pour la réalisation des analyses immunologiques dans le bras AS+AQ et AL, respectivement (**Figure 6**). L'âge moyen des 120 sujets inclus était de 6,8 et 12,14 ans respectivement dans le bras AS+AQ et dans le bras AL ($p = 0,001$). La température corporelle moyenne était $38,42 (^{\circ}\text{C}) \pm 0,4710$ et $38,31 \pm 0,4446$ respectivement dans le bras AS+AQ et dans le bras AL. La densité parasitaire moyenne était plus élevée dans le bras AS+AQ ($37\,935 \pm 6271$ parasites asexués/ μL de sang) que dans le bras AL (16031 ± 3058 parasites asexués/ μL de sang).

Sur un total de 601 sujets fébriles reçus en consultation à Bouaké, 120 ont été inclus et randomisés. En définitive, 55 patients ont été suivis jusqu'à J42 dans le bras AS+AQ contre 58 dans le bras AL. Les examens biologiques à J0 et les contrôles à J7 ont permis de retenir 19 et 21 sérums disponibles pour la réalisation des analyses immunologiques dans le bras AS+AQ et AL, respectivement (**Figure 7**).

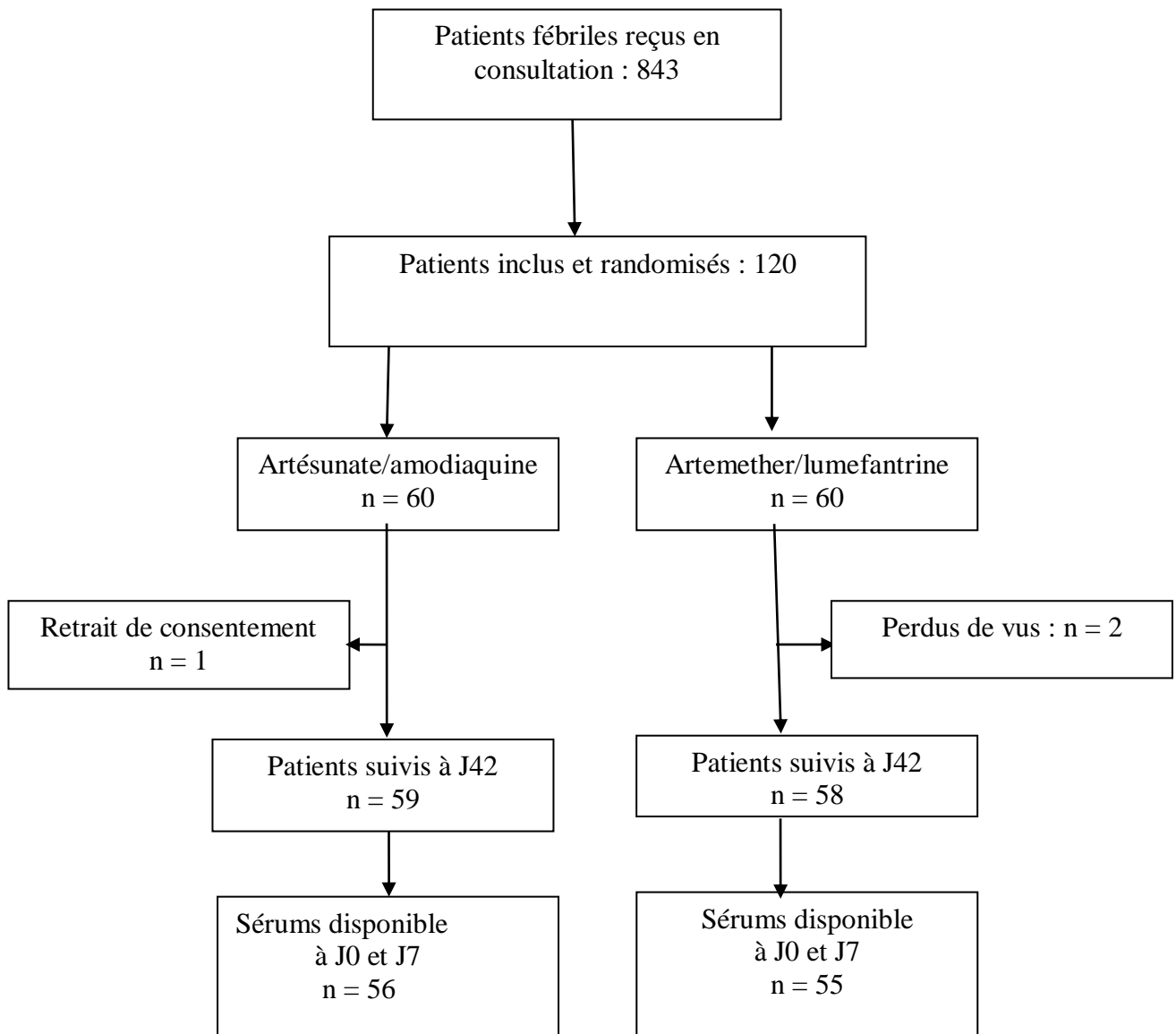


Figure 6 : Profil de l'essai clinique des patients de Man

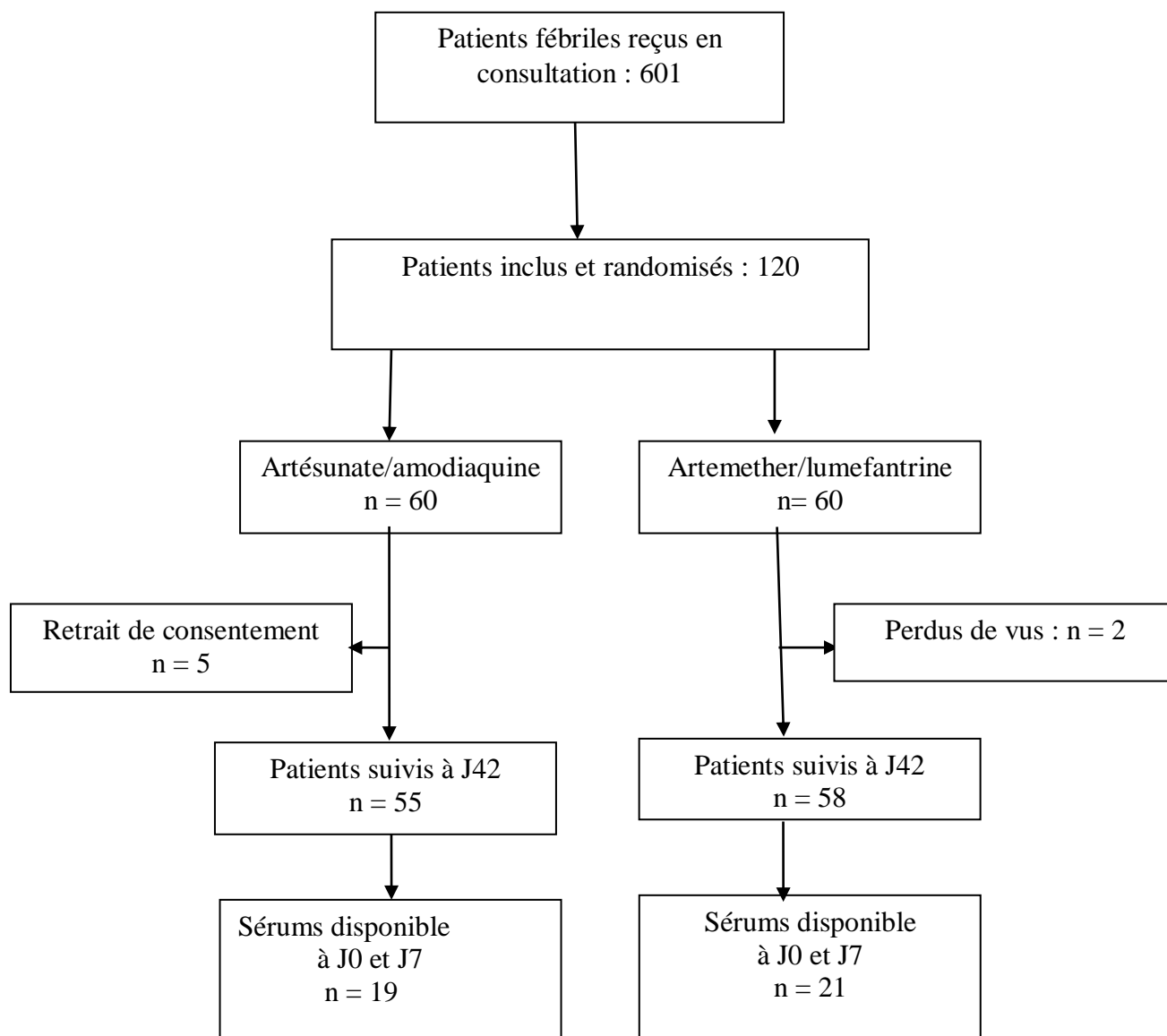


Figure 7 : Profil de l'essai clinique des patients de Bouaké

Tableau VIII : Caractéristiques des patients à l'inclusion

PARAMETRES	Antipaludiques		<i>p-value</i>	Chi ²	ddl
	AS + AQ	AL			
Age moyen (années)	6,8	12,14	0,001 [§]		
Nombre de sujets inclus	60	60			
6 mois à 5 ans	34	20	0,01 [*]	6,59	1
5 ans à 15 ans	21	22	0,84 [*]	0,03	1
≥ 15 ans	5	18	0,004 [*]	9,09	1
Genre (H/F)	32/28	29/31			
Hommes [n (%)]	32 (53,33)	29 (48,33)			
Femmes [n (%)]	28 (46,67)	31 (51,67)			
Poids moyen	23,76	32,47	0,29 [§]		
Température corporelle [°C, moy. (SD)]	38,42 ± 0,4710	38,31 ± 0,4446	0,60 [§]		
(Min-Max)	(38,20-38,43)	(38,30-38,55)			
Densité Parasitaire [parasite/μL, moy. (SD)]	37 935 ± 6271	16031 ± 3058	0,0092 [§]		
(Min-Max)	(2100-177866)	2013–156230)			

* Tests de chi 2 sans correction de continuité (Correction de Yates) pour $n \geq 5$ et avec correction de Yates pour $n < 5$ a été utilisé, [§] Test de Man Whitney ont été utilisé respectivement pour la comparaison des proportions et des moyennes, significatifs pour $p < 0,05$

III-1-2-Comparaison de la proportion des répondeurs entre J0 et J7

La proportion des répondeurs a été supérieure à 50% pour tous les antigènes testés, aussi bien à J0 qu'à J7 à l'exception de l'antigène LSA3 à J7. Ces proportions ont varié de 53,1% (Ac-SALSA) à 74,7 % (Ac-AMA1) à J0, puis de 44,1% (LSA3) à 76,5% pour Ac-Sch 07/03 (**Tableau IX**). Toutefois, les proportions des répondeurs des antigènes GLURP et AMA1 ont été plus élevée à J0 qu'à J7 ($p = 0,0001$; $\text{Chi}^2 = 10,33$ pour GLURP et $p < 0,00001$; $\text{Chi}^2 = 20,5$ pour AMA1). Pour l'Extrait total sch 07/03, la proportion des répondeurs a été plus élevé à J7 qu'à J0 ($p < 0,0001$; $\text{Chi}^2 = 18,88$). Par contre, avec les antigènes CSP cette proportion est restée la même entre J0 et J7 ($p = 0,2926$; $\text{Chi}^2 = 3,37$). Il en va de même avec LSA3 ($p = 0,0699$; $\text{Chi}^2 = 0,01$), SALSA ($p = 0,111$; $\text{Chi}^2 = 2,13$).

Tableau IX : Proportions des répondeurs aux jours 0 et 7

		Proportion des répondeurs (%)				
	Antigènes	Jour 0 n (%)	Jour 7 n (%)	p-Value	Chi ²	ddl
Pré-erythrocytaire	CSP	67/111 (60,3)	63/111 (56,7)	0,06	3,37	1
	SALSA	59/111 (53,1)	68/111 (61,2)	0,14	2,13	1
	LSA3	61/111 (54,9)	49 /111 (44,1)	0,91	0,01	1
Erythrocytaire	GLURP	80/111 (72,0)	62/111 (55,8)	0,001	10,33	1
	AMA1	83/111 (74,7)	73/111 (65,7)	< 0,00001	2,13	1
	Extrait Sch 07/03	74/111 (66,6)	85/111 (76,5)	< 0,0001	20,05	1

Le Test de Chi² (échantillons appariés) : si le nombre de paires discordantes ≥ 10 : test de Mac Nemar avec la fonction `mcnemar` ou si $n < 10$: test Mac Nemar avec correction de continuité avec la fonction `mcnemar.test` a été utilisé, significatif pour $p < 0,05$.

III-1-3-Distribution de la réponse moyenne spécifique à chaque antigène en fonction du temps de clairance parasitaire

Chez 36,03% des sujets suivis une clairance parasitaire a été obtenue en 24 h contre 63,97% chez qui cette clairance a été obtenue en 48 ou 72 h après le traitement (Tableau VI). La parasitémie a été moins importante chez les patients ayant eu une clairance parasitaire en 24 h par rapport aux patients dont le temps de la clairance parasitaire a été supérieure ou égale à 48 h ($p < 0,0001$). Les niveaux moyens d'anticorps dirigés contre les antigènes AMA1 (3,74 vs 2,85 $p = 0,0067$), GLURP (7,95 vs 4,13 ; $p = 0,0036$), LSA (2,71 vs 2,19 ; $p = 0,0086$), et SALSA (2,90 vs 2,04 ; $p = 0,0110$) sont plus élevés chez les patients ayant une clairance parasitaire en 24 h (**Tableau X**).

III-1-4-Relation entre l'âge et le niveau d'anticorps moyen spécifique à chaque antigène à J0

La relation entre le niveau d'anticorps et l'âge a été évaluée en catégorisant la population d'étude par tranche d'âge. Les niveaux moyens de réponse spécifiques aux antigènes étaient plus élevés chez les patients avec un âge supérieur ou égal à 15 ans comparé aux enfants de moins de 5 ans. Pour GLURP, il était de 9,64 vs 3,43 ; pour CSP, 3,93 vs 2,37 ; pour SALSA, 2,92 vs 2,35. En définitive, Il a été remarqué que les niveaux moyens d'anticorps spécifiques aux antigènes CSP ($p = 0,0241$), GLURP ($p = 0,0009$) et SALSA ($p = 0,0025$) augmentent significativement avec l'âge (**Tableau XI**).

Tableau X : Distribution de la réponse moyenne spécifique à chaque antigène en fonction du temps de clairance parasitaire

		Temps de clairance parasitaire de J0 à J3		p-value
		24 heures	> 24 heures	
	Effectifs de patients	40 (36,03%)	71 (63,97%)	-
Pré-erythrocytaire	CSP	2,62 ± 0,51	2,85 ± 0,58	0,1384
	SALSA	2,90 ± 0,57	2,04 ± 0,21	0,0110
	LSA3	2,71 ± 0,67	2,19 ± 0,37	0,0086
Erythrocytaire	GLURP	7,95 ± 2,93	4,13 ± 1,91	0,0036
	AMA1	3,74 ± 0,69	2,85 ± 0,37	0,0064
	Extrait Sch 07/03	2,35 ± 0,31	2,33 ± 0,14	0,5187
	Moy. Géom. DP (Min-Max) (parasites asexués/ μ L de sang)	4977 (3937-6291)	18 270 (13460-24798)	< 0,0001

Test de Mann Whitney a été utilisé, significatif pour $p < 0,05$

Moy. Géom. DP (Min-Max) : Moyenne Géométrique de la densité parasitaire (Minimum – Maximum)

Tableau XI : Relation entre l'âge et le niveau d'anticorps spécifique à chaque antigène

	Antigène	Groupe d'âge (Années)	Effectifs	RtDO (J0) Moy. Géo. (95% IC)	p-value
Pré-erythrocytaire	CSP	[0 - 5[56	2,37 (1,94 – 2,90)	0,0241
		[5 - 15[33	2,83 (2,20 – 3,65)	
		≥ 15	22	3,93 (2,77 – 5,58)	
	SALSA	[0 - 5[56	1,91 (1,67 – 2,18)	0,0025
		[5 - 15[33	2,74 (2,13 – 3,52)	
		≥ 15	22	2,92 (2,19 – 3,91)	
	LSA3	[0 - 5[56	2,35 (1,92 – 2,86)	0,9115
		[5 - 15[33	2,34 (1,88 – 2,90)	
		≥ 15	22	2,45 (1,59 – 3,79)	
Erythrocytaire	AMA1	[0 - 5[56	3,50 (2,92 – 4,19)	0,1716
		[5 - 15[33	2,96 (2,18 – 4,02)	
		≥ 15	22	2,61 (1,80 – 3,77)	
	GLURP	[0 - 5[56	3,43 (2,54 – 4,62)	0,0009
		[5 - 15[33	7,11 (4,66 – 10,86)	
		≥ 15	22	9,64 (15,49 – 16,92)	
	Extrait sch07/03	[0 - 5[56	2,20 (1,97 – 2,45)	0,3096
		[5 - 15[33	2,55 (2,26 – 2,88)	
		≥ 15	22	2,40 (1,80 – 3,18)	

Le Test de Kruskal Wallis a été utilisé (comparaison de plus de deux moyennes), significatif pour $p < 0,05$

RtDO (J0) : ratio de la densité optique à J0

Moy. Géo. : Moyenne Géométrique

III-1-5-Analyse du profil des anticorps spécifiques aux antigènes à J0 et à J7

Il en ressort que les réponses anticorps diminuent significativement à J7 pour les antigènes GLURP (5,23 à 2,82 ; $p = 0,0013$), AMA1 (3,14 à 2,68 ; $p = 0,0002$) et LSA (3 2,37 à 1,84 ; $p < 0,0001$). A l'inverse, les niveaux moyens de réponse spécifiques aux antigènes SALSA (2,32 à 2,53 ; $p = 0,0152$) et Extrait total de schizonte 07/03 (2,34 à 2,76 ; $p < 0,0001$) augmentent significativement à J7 (**Tableau XII**).

Tableau XII : Niveau moyen de réponse anticorps spécifiques aux antigènes avant et après le traitement

			Moyenne Géométrique des niveaux moyens d'anticorps (IC 95%)		
	Antigènes	Effectifs à J0 et à J7	Jour 0	Jour 7	P-value
Pré-erythrocytaire	CSP	111	2,7 (2,4 – 3,2)	2,5 (2,2- 2,9)	0,1235
	SALSA	111	2,3 (2,0 – 2,6)	2,5 (2,2 – 2,9)	0,0152
	LSA3	111	2,3 (2,0 – 2,7)	1,8 (1,6 – 2,1)	<0,0001
Erythrocytaire	GLURP	111	5,2 (4,1 – 6,6)	2,8 (2,2 – 3,6)	0,0013
	AMA1	111	3,1 (2,7 – 3,6)	2,7 (2,3 – 3,09)	0,0002
	Sch 07/03	111	2,3 (2,1 – 2,6)	2,7 (2,5 – 3,0)	< 0,0001

Le Test de Wilcoxon a été utilisé, significatif pour $p < 0,05$.

III-1-6-Corrélation entre les réponses anticorps, l'âge et la densité parasitaire des patients à l'inclusion

Les niveaux moyens de réponses dirigées contre les CSP ($\rho = 0,302$; $p < 0,05$), GLURP ($\rho = 0,342$; $p < 0,05$) et SALSA ($\rho = 0,268$; $p < 0,05$) à l'inclusion étaient positivement corrélés avec l'âge (faible corrélation) (**Tableau XIII**).

La corrélation entre les niveaux de réponses spécifiques à chaque antigène et la densité parasitaire à l'inclusion n'était pas significative ($P > 0,05$). Toutefois, l'anticorps spécifique à l'antigène GLURP et l'âge ont été négativement corrélés avec la densité parasitaire respectivement ($\rho = - 0,265$; $\rho = - 0,245$) ; ($p < 0,05$).

L'inter relation entre les anticorps dirigés contre les antigènes a montré une corrélation entre certaines réponses dirigées contre certains antigènes à l'inclusion des patients. La réponse anticorps dirigée contre l'antigène CSP était positivement corrélée avec les niveaux de réponses dirigées contre les antigènes AMA1 ($\rho = 0,268$), GLURP ($\rho = 0,262$) et SALSA ($\rho = 0,261$) ; $p < 0,05$). Le niveau de réponse dirigée contre l'antigène AMA1 était positivement corrélé avec les niveaux de réponses spécifiques aux antigènes LSA3 ($\rho = 0,263$) ; SALSA ($\rho = 0,269$) et notamment avec CSP ($\rho = 0,268$) ; ($p < 0,05$). L'anticorps spécifique à l'antigène SALSA était positivement corrélé avec les anticorps spécifiques aux antigènes GLURP ($\rho = 0,378$), LSA3 ($\rho = 0,191$), CSP ($\rho = 0,261$) et AMA1 ($\rho = 0,269$) ; ($p < 0,05$). Le niveau moyen d'anticorps spécifique à l'antigène LSA3 était positivement corrélé avec les anticorps spécifiques aux antigènes AMA1, SALSA et Sch07/03 (**Tableau XIII**).

Tableau XIII : Corrélation entre les anticorps spécifiques aux antigènes, l'âge et la densité parasitaire à l'inclusion

		Age (Années)	DP_0	Rt_AMA1_O	Rt_CSP_0	Rt_Glurp_0	Rt_LSA3_0	Rt_07/03_0	Rt_SALSA_0
DPM_0	ρ	-0,245							
	P	0,00951							
Rt_CSP_0	ρ	0,302	-	0,268					
	P	0,00126	-	0,00449					
Rt_Glurp_0	ρ	0,342	-0,265	-	0,262				
	P	0,00024	0,00493	-	0,00549				
Rt_LSA3_0	ρ	-	-	0,263	-	-			
	P	-	-	0,00537	-	-			
Rt_Sch 07/03_0	ρ	-	-	-	-	-	0,312		
	P	-	-	-	-	-	0,00085		
Rt_SALSA_0	ρ	0,268	-	0,269	0,261	0,378	0,191	-	
	P	0,00446	-	0,00426	0,00565	0,00004	0,0444	-	

Le Test de corrélation de Sperman a été utilisé. Significatif, $p < 0,05$

$\rho = \text{rho}$

DPM : Densité parasitaire moyenne

Rt : Ratio de la densité optique

III-1-7- Association entre le niveau de réponse anticorps spécifique aux antigènes et l'issue du traitement

Pour analyser la relation entre l'issue du traitement et la réponse spécifique aux antigènes, les niveaux moyens d'anticorps contre chaque antigène à J0 et J7 en fonction de l'efficacité du traitement pour chaque CTA ont été comparés. Les patients ont été catégorisés en deux groupes selon l'issue du traitement : les patients ayant une réponse clinique parasitologique adéquate (RCPA) et ceux présentant un échec au traitement au cours du suivi.

Dans le bras de traitement AL, seul le niveau moyen de réponse dirigée contre CSP à J0 était significativement plus élevé chez les patients ayant une RCPA que chez les patients présentant un ET (2,76 vs 1,17 ; $p = 0,0097$) (**Tableau XV**).

Par contre dans le bras AS+AQ, à J7, l'analyse a montré que le niveau moyen de réponse dirigée contre GLURP est plus élevé chez les patients avec une RCPA que chez les patients présentant un ET ($p = 0,0259$). Le niveau moyen d'anticorps spécifique à l'Ag LSA3 à J0 a été plus important chez les patients présentant un ET que celui produit par les patients ayant une RCPA ($p = 0,0079$) ((**Tableau XVI**).

III-1-8-Réponse thérapeutique à J42 dans les deux bras de traitement

La RCPA à J42 a été de 91,7% et 90,00% sans correction PCR respectivement dans les bras AS+ AQ et AL et de 96,7% après correction PCR en intention de traiter (ITT) dans les deux bras (**Tableau XIV**).

Dans l'analyse per protocole, la RCPA était de 93,2% sans correction PCR dans les deux bras et de 98,3% et 100% respectivement dans les bras AS + AQ et AL après correction PCR.

Au total, 8 patients ont présenté un ET dont 4 patients (6,8%) et 4 patients (6,9%) respectivement dans le bras ASAQ et AL. Dans le bras ASAQ, les patients ont tous présenté un Echech Clinique Tardif (ECT) dont 3 échecs à J35 et un échec à J28. Dans le bras AL, un Echech Parasitologique Tardif (EPT) à J14, 3 Echechs Cliniques Tardifs dont 2 cas à J28 et un cas à J35 (**Tableau XIV**).

Tableau XIV : Réponse thérapeutique dans les deux bras de traitement (AS+AQ et AL)

Sujets inclus et suivis	ASAQ (%)	AL (%)	p-value	Chi 2	ddl
	Analyse en intention de Traiter				
Patients enrôlés	60	60			
Patients vus à J42	59/60 (98,3)	58/60 (96,7)	0,55	0,34	1
PDV, Violation, RC	01/60 (1,7)	02/60 (03,3)	1	0	1
ET à J42	05/60 (08,3)	06/60 (10)	0,75	0,10	1
RCPA à J42	55/60 (91,7)	54/60 (90)	0,75	0,10	1
ET à J42 après PCR	02/60 (3,3)	02/60 (3,3)	1	0	1
RCPA à J42 après PCR	58/60 (96,7)	58/60 (96,7)	1	0	1
	Analyse en per-protocole				
Patients vus à J42	59	58			
ET à J42	04/59 (06,8)	04/58 (06,8)	1	0	1
RCPA à J42	55/59 (93,2)	54/58 (93,2)	0,98	0,0006	1
ET à J42 après PCR	01/59 (1,7)	00/58 (0)	1	0	1
RCPA à J42 après PCR	58/59 (98,3)	58/58 (100)	0,31	0,99	1

RCPA : réponse clinique et parasitologique adéquate

ET : échec thérapeutique

PDV : perdus de vue

RC : rétrait de consentement

ddl : Degré de Liberté

Le Test de Chi 2 sans correction de continuité (Correction de Yates) pour $n \geq 5$ et avec correction de Yates pour $n < 5$ a été utilisé, significatif pour $p < 0,05$.

Tableau XV : Comparaison des réponses des anticorps des patients traités à l'artéméther-luméfanantrine et ayant une réponse clinique et parasitologique adéquate ou un échec thérapeutique

Antigènes	Artéméther-luméfanantrine		p-Value
	ET N = 4	RCPA N = 52	
Ac-AMA1 à J0	3,81 (1,15-12,60)	2,82 (2,21-3,60)	0,2571
Ac-AMA1 à J7	2,80 (0,93-8,41)	2,79 (2,25-3,45)	0,4494
Ac-CSP à J0	1,17 (1,03-1,33)	2,76 (2,24-3,40)	0,0097
Ac-CSP à J7	1,75 (0,74-4,07)	3,10 (2,46-3,86)	0,0807
Ac-LSA3 à J0	2,42 (0,54-10,69)	2,11 (1,72-2,60)	0,4431
Ac-LSA3 à J7	2,08 (0,47-9,15)	1,74 (1,37-2,21)	0,3572
Ac-GLURP à J0	3,93 (0,30-52,18)	6,92(4,68-10,22)	0,1865
Ac-GLURP J7	1,39 (0,70-2,74)	2,09 (1,40-3,13)	0,2728
Ac-Extrait 07/03 à J0	2,33 (1,37-3,96)	2,58 (2,24-2,96)	0,3995
Ac-Extrait 07/03 à J7	3,17 (1,21-8,26)	3,00 (2,62-3,44)	0,3632
Ac-SALSA à J0	2,42 (1,17-5,01)	2,48 (2,08-2,96)	0,4620
Ac-SALSA à J7	2,08 (1,20-3,63)	2,40 (1,97-2,94)	0,3513
Moy. Géo de l'âge (Min-Max)	2,38 (0,41-13,17)	8,97 (6,63-11,61)	0,1250
Moy. Géo. (Min-Max) De la densité parasitaire à J0 (Pa/μL de sang)	12908 (1384-120374)	8256 (6169-11049)	0,4375

Test de Mann Whitney a été utilisé, significatif pour $P < 0,05$

RCPA : réponse clinique et parasitologique adquate

ET : échec thérapeutique

Pa : parasites asexués par μL

Moy. Géo. : Moyenne Géométrique

Tableau XVI : Comparaison des réponses des anticorps des patients traités à artésunate-amodiaquine et ayant une réponse clinique et parasitologique adéquate ou un échec thérapeutique

Antigènes	Artésunate -amodiaquine		p-Value
	ET N = 4	RCPA N = 51	
Ac-AMA1 à J0	3,46 (1,23-9,74)	3,44 (2,9-4,13)	0,4871
Ac-AMA1 à J7	2,21 (1,01 4,81)	2,62 (2,15-3,18)	0,3020
Ac-CSP à J0	2,40 (0,7-8,28)	3,00 (2,40-4,82)	0,5595
Ac-CSP à J7	2,82 (0,55-14,57)	2,1 (1,67-2,63)	0,5380
Ac-LSA3 à J0	5,6 (4,67-6,71)	2,49 (2,01-3,07)	0,0079
Ac-LSA3 à J7	2,13 (0,80-0,71)	1,90 (1,58-2,29)	0,3075
Ac-GLURP à J0	1,92(0,48-7,77)	4,35 (3,30-5,73)	0,0659
Ac-GLURP à J7	1,25 (0,85-1,84)	4,33 (3,14-5,97)	0,0259
Ac-Extrait 07/03 à J0	2,67(2,06-3,47)	2,11 (1,88-2,356)	0,0561
Ac-Extrait 07/03 à J7	2,82 (2,12-3,74)	2,51 (2,49-2,80)	0,1424
Ac-SALSA à J0	1,73 (1,13-2,65)	2,21 (1,85-2,64)	0,2743
Ac-SALSA à J7	1,88 (0,46-7,43)	2,78 (2,22-3,47)	0,1574
Moy. Géo. de l'âge moyen (ans ; Min-Max)	3,66 (1,65-8,10)	3,92 (2,94-5,23)	0,3125
Moy. Géo. de la densité parasitaire J0 (Min-Max) (Pa/µL de sang)	11127 (1377-89942)	15820 (10566-23686)	0,1250

Test de Mann Whitney a été utilisé, significatif pour $P < 0,05$

RCPA : réponse clinique et parasitologique adéquate

ET : échec thérapeutique

Pa : parasites asexués par µL

III-2-Comparaison du niveau de réponse spécifique dirigée contre les antigènes candidat vaccin de *Plasmodium falciparum* dans deux faciès épidémiologiques différents

III-2-1-Caractéristiques de la population d'étude

Sur 240 patients inclus dans les deux essais cliniques (Man et Bouaké), 151 patients ont fait l'objet de l'étude immunologique, 111 sujets (73,50 %) à Man et 40 patients (26,50 %) à Bouaké ont donné leur accord à participer à l'étude. Il faut noter qu'à Bouaké, certains patients ayant donné leur accord à participer à l'étude immunologique, ont eu une mauvaise qualité de leur sérum. Ainsi, les échantillons de sérum de ces patients ont été retirés dans le but de ne pas biaiser les résultats. Le sexe ratio est de 0,88 (71/80) en faveur des femmes. L'âge moyen des patients était de 5,92 (5,05 – 6,92) ans et il était similaire dans les deux sites d'étude. Il en va de même des proportions des patients âgés de moins de 5 ans sur les deux sites ($p = 0,05$; $\chi^2 = 3,84$ et $ddl = 1$). Ces patients représentent 45,69% (69/151) de la population d'étude (**Tableau XVII**).

La densité parasitaire moyenne de la population d'étude était de 18321 (14604 – 22984) parasites asexués / μ L de sang. Elle était significativement plus élevée à Bouaké qu'à Man ($p < 0,0001$) respectivement 67786 (51336 – 89507) et 11434 (8984 – 14553) parasites asexués / μ L de sang (**Tableau XVII**).

Tableau XVII: Caractéristiques de la population d'étude

Caractéristiques	Sites d'étude		Total	p-value	Chi 2	ddl
	Man	Bouaké				
Nombre de patients (%)	111 (73,50)	40 [¥] (26,50)	151			
Nombre d'enfants ≤ 5 ans	56 (52,28%)	13 (32,50%)	69 (45,69 %)	0,05*	3,84	1
Moy. Géo. DP (Pa/μL de sang) (Min – Max)	11434 (8984 – 14553)	67782 (51336–89507)	18321 (14604 –22984)	< 0,0001 [§]		
Sexe ratio (M/F)	58/53	13/27	71/80			
Moy. Géo. Age (ans ; Min-Max)	5,60 (4,57-6,86)	6,93 (5,55-8,66)	5,92 (5,05-6,95)	0,0984 [§]		
Patients sous AL	56	21	77			
Patients sous AS + AQ	55	19	74			

AL : Artéméther luméfantrine ; AS+AQ : Artésunate amodiaquine ; ddl : Degré de liberté

Moy. Géo. DP Moy : Moyenne Géométrique de la densité parasitaire ; Pa/μL : parasites asexués par microlitre

¥: Nombre de participant à l'étude immunologique faible à cause de la qualité de certains échantillons de sérum et au refus de participer de certains patients à l'étude

* Test de chi 2 sans correction de continuité (Correction de Yates) pour $n \geq 5$ et avec correction de Yates pour $n < 5$ utilisé pour la comparaison des proportions, significatif pour $P < 0,05$

§ Test de Mann Whitney utilisé pour la comparaison des moyennes, significatif pour $P < 0,05$

III-2-2-Proportion des répondeurs aux différents antigènes à Man et Bouaké

Il en ressort que la proportion des répondeurs a été supérieure à 50% pour tous les antigènes testés, aussi bien à Man qu'à Bouaké. A Man, elle variait de 53,1% (Ac-SALSA) à 74,7 % (Ac-AMA1). Quant à Bouaké, elle oscillait entre 55% (Ac-LSA3) et 95 %. (Ac-GLURP). Les proportions ont été plus élevées à Bouaké qu'à Man pour les antigènes GLURP ($p = 0,002$; $\chi^2 = 9,05$) et l'Extrait total de schizonte ($p = 0,001$; $\chi^2 = 10,07$). Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes de patients (Bouaké et Man) pour les antigènes CSP ($p = 0,81$; $\chi^2 = 0,05$), AMA1 ($p = 0,32$; $\chi^2 = 0,98$), LSA3 ($p = 0,99$; $\chi^2 = 0$), SALSA ($p = 0,11$; $\chi^2 = 2,46$). (**Tableau XVIII**).

III-2-3-Comparaison du niveau moyen de réponse spécifique à chaque antigène en fonction des sites d'étude

Il ressort de cette analyse que les niveaux moyens de réponses spécifiques à GLURP et à l'Extrait total étaient plus élevés à Bouaké qu'à Man respectivement 9,68 (IC 95 % : 6,88 – 13,61) vs 5,25 (IC 95 % : 4,14 – 6,60) ; $p = 0,034$; 2,90 (IC 95 % : 2,61 – 3,21) vs 2,34 (IC 95 % : 2,15 – 2,54) ; $p = 0,0019$. Par contre, aucune différence significative n'a été observée entre les deux sites pour les antigènes AMA1 ($p = 0,080$), CSP ($p = 0,2641$), LSA3 ($p = 0,3906$), SALSA; ($p = 0,1901$) (**Tableau XIX**).

Tableau XVIII : Proportions des répondeurs à chaque antigène sur les deux sites

		Répondeurs (Man) n (%)	Répondeurs (Bouaké) n (%)	p- value	Chi 2	ddl
Pré- erythrocytaire	CSP	67/111 (60,40)	25/40 (62,50)	0,81	0,05	1
	SALSA	59/111 (53,15)	27/40 (67,50)	0,11	2,46	1
	LSA3	61/111 (54,95)	22/40 (55,00)	0,99	0	1
Erythrocytaire	GLURP	80/111 (72,07)	38/40 (95,00)	0,002	9,05	1
	AMA1	83/111 (74,77)	33/40 (82,50)	0,32	0,92	1
	Sch 07/03	74/111 (66,66)	37/40 (92,50)	0,001	10,07	1

La Séropositivité a été définie par $rtDO > 2$

Le Test de chi 2 sans correction de continuité (Correction de Yates) pour $n \geq 5$ et avec correction de Yates pour $n < 5$ a été utilisé, significatif pour $p < 0,05$

Tableau XIX : Niveau moyen d'anticorps spécifique à chaque antigène en fonction du site d'étude

	Antigènes	Moyenne Géométrique des niveaux moyens d'anticorps (95 % IC) (Min-Max)		
		Bouaké	Man	P-value
Pré-erythrocytaire	CSP	2,55 (2,05 – 3,16)	2,76 (2,72- 3,63)	0,2641
	SALSA	2,54 (2,16 – 2,99)	2,31(2.2 – 2,9)	0,1901
	LSA3	2,84 (2,10 – 3,85)	2,36 (2,05- 2,73)	0,3906
Erythrocytaire	GLURP	9,68 (6,88 – 13,61)	5,25 (4,14 – 6,60)	0,034
	AMA1	3,97 (3,18 – 4,95)	3,14(2,72 – 3,63)	0,080
	Sch 07/03	2,90 (2,61 – 3,21)	2,34 (2,06 – 2,66)	0,0019

Test de Mann Whitney a été utilisé, significatif pour $p < 0,05$

III-2-4-Distribution globale des réponses moyennes spécifiques à chaque antigène à J0 et J7 par site d'étude

A Bouaké, les niveaux moyens de réponse spécifiques aux antigènes à J0 étaient de 9,68 pour GLURP, 2,55 pour CSP, 2,84 pour LSA3, 2,90 pour l'extrait total de schizonte 07/03 et de 2,54 pour l'antigène SALSA.

A Man, les réponses spécifiques aux antigènes étaient à J0 de 5,23 pour GLURP ; 2,76 pour CSP ; 2,36 pour LSA3 ; 2,34 pour l'extrait total de schizonte 07/03 et 2,31 pour SALSA.

En définitive, le niveau moyen de réponse dirigée contre GLURP a été significativement plus élevé que les anticorps spécifiques aux antigènes CSP, LSA3, Extrait total de schizonte 07/03, et SALSA à J0 ($p < 0,05$; Test de Kruskal-Wallis, Dunn's comparaison multiple) aussi bien à Man qu'à Bouaké (**Figure 8**).

A Bouaké, les niveaux moyens de réponse spécifiques aux antigènes à J7 étaient de 10,42 pour GLURP, 2,43 pour CSP, 3,05 pour LSA3, 2,89 pour l'extrait total de schizonte 07/03 et de 2,59 pour l'antigène SALSA.

A Man, les réponses spécifiques aux antigènes étaient à J7 de 2,82 pour GLURP ; 2,52 pour CSP ; 1,83 pour LSA3 ; 2,76 pour l'extrait total de schizonte 07/03 et 2,59 pour SALSA.

En définitive, le niveau moyen de réponse dirigée contre GLURP a été significativement plus élevé que les anticorps spécifiques aux antigènes CSP, LSA3, Extrait total de schizonte 07/03, et SALSA à J7 à Bouaké ($p < 0,05$ Test de Kruskal-Wallis, Dunn's comparaison multiple), mais à Man le niveau moyen de réponse dirigé l'antigène GLURP a été plus élevé que l'anticorps spécifique à l'antigène LSA ($p > 0,05$ Test de Kruskal-Wallis, Dunn's comparaison multiple (**Figure 9**)).

Aucune différence statistique n'a été observée entre les niveaux moyens de réponses spécifiques aux antigènes AMA1 et GLURP au niveau de chaque site (Man et Bouaké) ($p > 0,05$).

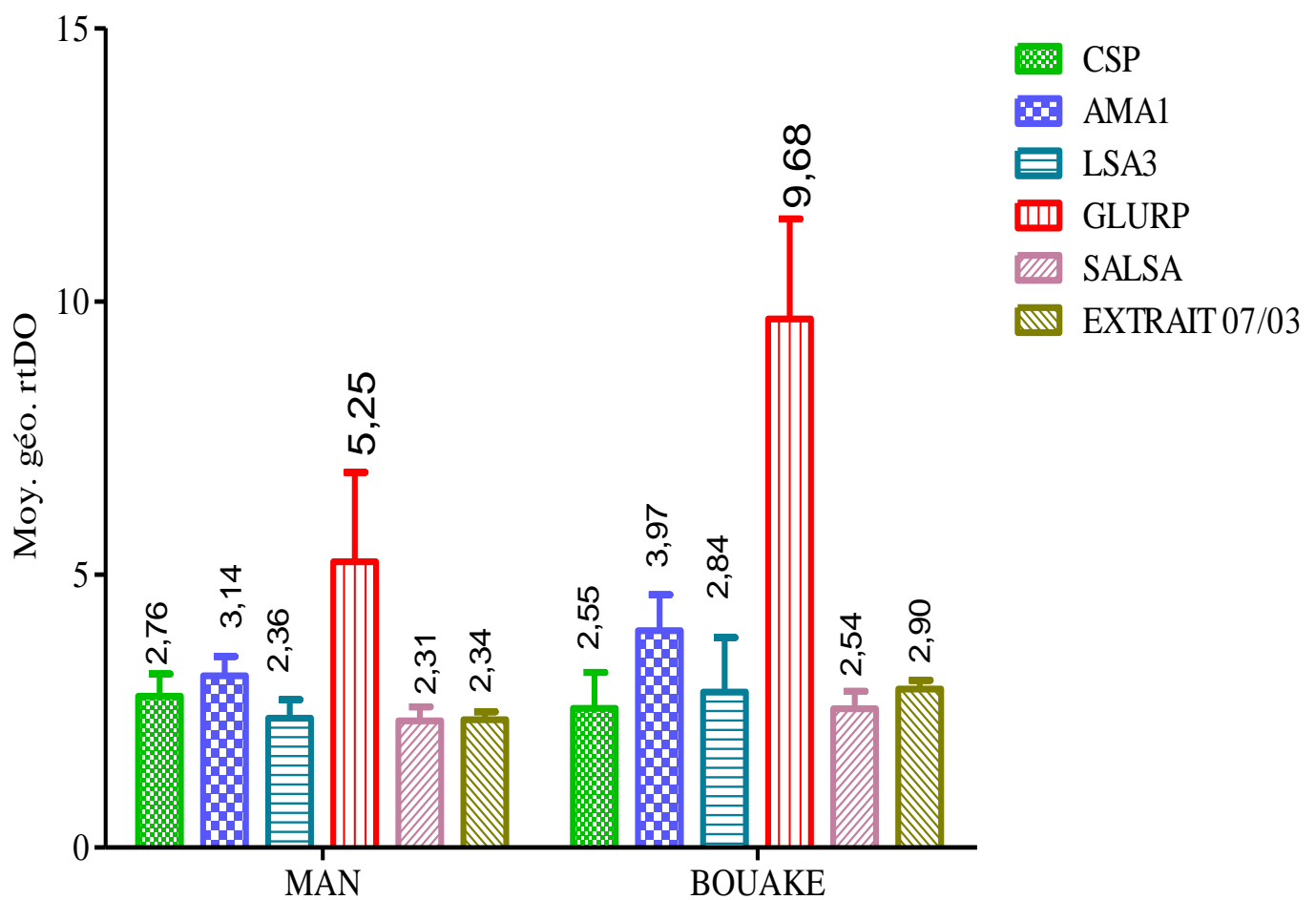


Figure 8: Réponses spécifiques à chaque antigène avant le traitement (J0) sur les deux sites

Test de Kruskal Wallis utilisé pour la comparaison des niveaux moyens de réponses spécifiques à chaque antigène par site, significatif pour $p < 0,05$.

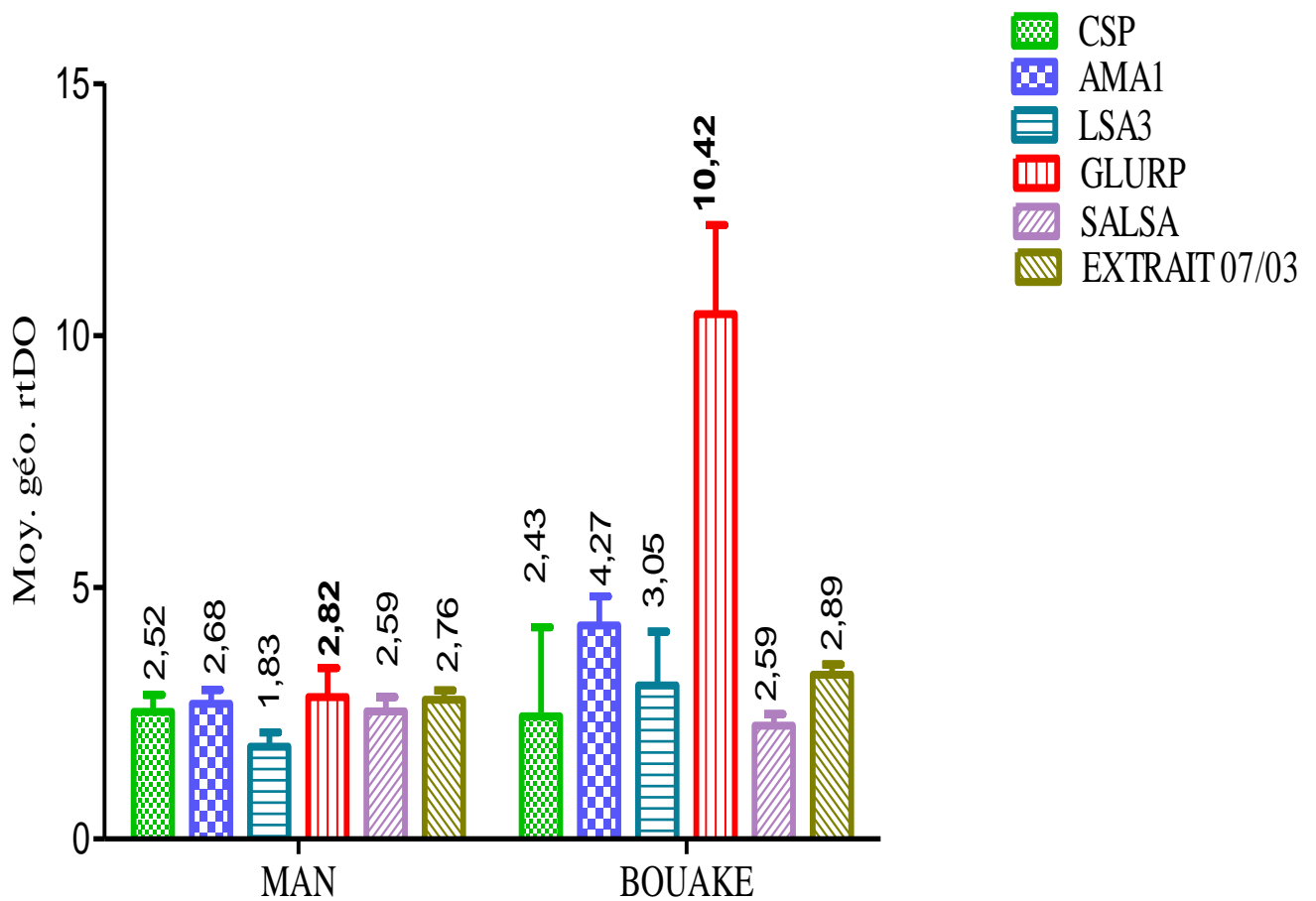


Figure 9 : Réponses spécifiques à chaque antigène après le traitement (J7) sur les deux sites

Test de Kruskal Wallis utilisé pour la comparaison des niveaux moyens de réponses spécifiques à chaque antigène par site d'étude, significatif pour $p < 0,05$.

III-2-5-Niveau moyen d'anticorps spécifique à chaque antigène stratifié par le sexe et par site d'étude

La population masculine était de 52,25 % à Man contre 32,50 % à Bouaké. 47,75 % de la population féminine ont été recrutés à Man contre 67,50 % à Bouaké. L'âge des patients était similaire à Man et Bouaké selon le sexe ($p > 0,05$) (**Tableau XX**).

Le niveau moyen d'anticorps spécifique à l'antigène SALSA produit par les femmes était plus élevé que celui des hommes à Man respectivement 2,65 (IC 95% : 2,17 – 3,19) vs 2,06 (IC : 1,79 – 2,36) ; $p = 0,0326$. Les niveaux moyens d'anticorps spécifiques aux antigènes GLURP et Extrait total produits par les femmes de Bouaké étaient significativement plus élevés que ceux induits par celles à Man respectivement 10,87 (IC 95 % : 7,20 -16,42) vs 5,76 (IC 95 % : 4,16 – 7,91) ; $p = 0,0079$ et 2,84 (IC 95% : 2,51 – 3,21) vs 2,36 (2,10 – 2,65) ; $p = 0,0076$ (**Tableau XX**).

Tableau XX : Niveau moyen d'anticorps spécifique à chaque antigène stratifié par le sexe et par site d'étude

	MAN		BOUAKE		Test Mann Whitney (Moyenne Géométrique à 95% IC)			
	H (A)	F (B)	H (C)	F (D)	p (A vs B)	p (C vs D)	p (A vs C)	p (B vs D)
Effectif (%)	58 (52,25)	53 (47,75)	13 (32,50)	27 (67,50)				
Age moyen (Moy. Géo ans ± SD)	8,73 ± 1,33	10,64 ± 1,34	6,84 ± 1,04	9,72 ± 1,64	0,1850	0,1387	0,2931	0,1689
CSP	2,75 (2,21 – 3,42)	2,77 (2,28 – 3,37)	2,65 (1,54 – 4,56)	2,50 (1,93 – 4,18)	0,3952	0,3428	0,4059	0,2508
AMA1	2,96 (2,41 – 3,63)	3,35 (2,72 – 4,14)	3,84 (2,56 – 5,76)	4,03 (3,03 – 5,35)	0,2686	0,4426	0,1782	0,2048
LSA3	2,34 (1,95 – 2,80)	2,40 (1,91 – 3,01)	2,84 (1,63 – 4,95)	2,85 (1,93 – 4,18)	0,8943	0,4942	0,2961	0,2606
GLURP	4,78 (3,40 – 6,71)	5,76 (4,16 – 7,91)	2,65 (2,16 – 3,25)	10,87 (7,20 -16,42)	0,1606	0,2220	0,0892	0,0079
SALSA	2,06 (1,79 – 2,36)	2,63 (2,17 – 3,19)	2,65 (2,16 – 3,25)	2,49 (1,98 – 3,12)	0,0326	0,1665	0,0235	0,4134
Extrait 07/03	2,32 (2,05 -2,63)	2,36 (2,10 – 2,65)	3,03 (2,44 – 3,21)	2,84 (2,51 – 3,21)	0,4576	0,3752	0,0619	0,0076

Test de Mannv Whitney a été utilisé, significatif, $p < 0,05$

H (A) : Homme à Man ; F (B) : Femme à Man H (C) : Homme à Bouaké ; F (D) : Femme à Bouaké

III-2-6-Niveau moyen de réponse anticorps spécifique à chaque antigène en fonction des sites stratifié par tranche d'âge

Cette analyse a montré que les niveaux moyens d'anticorps spécifiques aux antigènes GLURP, SALSA et Extrait total de schizonte 07/03 produits par les enfants les moins âgés (0 à 5 ans) de Bouaké, sont significativement plus élevés que ceux produits par leurs homologues de Man respectivement 7,99 (3,91-16,33) vs 3,45 (2,54-4,62) ; $p = 0,0106$; 2,49 (1,94-3,20) vs 1,91 (1,67-2,18) ; $p = 0,0165$; 2,91 (2,38-3,56) vs 2,20 (1,97-2,45), $p = 0,0121$ (**Tableau XXI**).

Pour la tranche d'âge de 5 à 15 ans, seul le niveau d'anticorps spécifique à l'extrait 07/03 produit par les enfants de Bouaké sont significativement plus élevé que celui produit par ceux de Man 2,88 (2,52-3,29) vs 2,55 (2,26-2,88), $p = 0,0453$. Aucune différence n'a été observée entre les réponses spécifiques à chaque antigène produit par les enfants les plus âgés (> 15 ans) sur les deux sites (**Tableau XXI**).

Tableau XXI : Distribution du niveau moyen de réponse spécifique à chaque antigène par site en fonction des groupes d'âge

	[0 à 5[ans			[5 - 15 [ans			≥ 15 ans		
Sites	Bouaké	Man	p	Bouaké	Man	p	Bouaké	Man	p
Effectif	13	56		24	33		3	22	
Age moyen (ans, ±SD)	3,75±1,48	2,78±1,38	0,0149	9,58±2,76	9,24±2,91	0,2867	34,50±16,23	27,77±12,06	0,3349
CSP	2,89 (1,67-5,02)	2,37 (1,94-2,90)	0,3217	2,28 (1,89-2,76)	2,83 (2,19-3,65)	0,1375	3,86 (2,97-5,02)	3,93 (2,77-5,58)	0,4144
AMA1	3,11 (2,32-4,15)	3,50 (2,92-4,19)	0,2450	4,56 (3,31-6,30)	2,96 (2,17-4,02)	0,0695	4,07 (2,90-5,84)	2,61 (1,80-3,77)	0,7545
LSA3	2,96 (1,70-5,15)	2,35 (1,92-2,86)	0,3035	2,70 (1,79-4,07)	2,34 (1,88-2,90)	0,4073	4,06 (1,67-9,83)	2,45 (1,59-3,79)	0,44
GLURP	7,99 (3,91-16,33)	3,45 (2,54-4,62)	0,0106	11,29 (7,48-17,06)	7,11 (4,66-10,86)	0,0643	5,78 (2,08-6,07)	9,64 (5,49-16,92)	0,053
SALSA	2,49 (1,94-3,20)	1,91 (1,67-2,18)	0,0165	2,49 (1,98-3,12)	2,74 (2,13-3,52)	0,4167	3,72 (2,65-4,76)	2,92 (2,19-3,91)	0,8347
Extrait 07/03	2,91 (2,38-3,56)	2,20 (1,97-2,45)	0,0121	2,88 (2,52-3,29)	2,55 (2,26-2,88)	0,0453	2,97 (1,63-9,83)	2,39 (1,80-3,18)	0,4674

Test de Mann Whitney a été utilisé, significatif pour $p < 0,05$

IV - DISCUSSION

La première partie de notre étude avait pour but d'évaluer la contribution des réponses anticorps dirigées contre un panel d'antigènes dans la réponse aux Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine chez des patients atteints du paludisme simple à *P. falciparum* à Man. La densité parasitaire moyenne obtenue au cours de notre étude a été de 26337 ± 3698 parasites asexués/ μ L de sang à l'inclusion. Les résultats obtenus indiquent que les enfants de moins de 5 ans ont été majoritairement atteints du paludisme. En zone d'endémicité palustre, la mise en place de l'immunité labile se fait avec l'âge c'est-à-dire que les plus jeunes sont moins bien protégés que les grands enfants ou les adultes (**Grobusch et al., 2005**). Ces plus jeunes enfants acquièrent cette immunité au cours des différents épisodes palustres (**Gupta et al., 1999**).

L'étude indique, en effet, que les réponses spécifiques aux antigènes CSP, GLURP et SALSA augmentent avec l'âge (**Greehouse et al., 2011**). Cela du fait de la répétition des infections du paludisme à *P. falciparum* (**Gupta et al., 1999**). Les études de **Diarra et al. (2012)** et de **Mbengue et al. (2016)** ont montré que les enfants âgés de plus de 10 ans répondent mieux aux antigènes GLURP, MSP1-19 et MSP3 que les plus jeunes enfants.

En outre, les données suggèrent qu'à l'inclusion des patients (J0), au contraire des antigènes CSP, LSA3, SALSA et l'Extrait total de schizonte 07/03, l'antigène GLURP a été capable d'induire une réponse au cours de l'infection palustre. L'accès palustre avec la présence du parasite au stade de trophozoïtes dans le sang au moment du recrutement de nos patients, l'absence des protéines pré érythrocytaires ou hépatiques (CSP, LSA3, SALSA) et la présence d'antigène tel que GLURP (antigène érythrocytaire) justifieraient les variations des niveaux d'anticorps entre les antigènes testés. Cette variation pourrait être due à l'expression différente des antigènes testés au cours du cycle de *Plasmodium falciparum* (**Barry et al., 2014 ; Theisen et al., 2014**). En l'absence des parasites à J7, le niveau de réponse spécifique à l'antigène GLURP était faiblement élevé par rapport aux niveaux de réponse spécifique aux autres antigènes. L'antigène GLURP est décrit comme étant très immunogène. Les résultats obtenus concordent avec ceux de **Mbengue et al. (2016)** qui ont montré que l'antigène GLURP était le plus immunogène au cours du paludisme urbain à Dakar (Sénégal). La clairance parasitaire a été obtenue en 24h pour 36,03 % des patients contre 63,96 % des patients qui ont eu une clairance parasitaire qui a excédé 24h (48 à 72h). Aucun des patients de notre étude n'a présenté des parasites à J3 et la clairance parasitaire était en moyenne 48h.

Il faut noter que le retard de la clairance parasitaire à J3 est un indicateur de la résistance aux dérivés de l'artémisinine. C'est cet indicateur qui a permis de mettre en évidence l'émergence de la résistance aux dérivés de l'artémisinine en Asie du Sud-Est et de suivre son expansion (WHO, 2011 ; Kheang *et al.*, 2017). Celle trouvée dans notre travail est bien inférieure à celle observée en Asie du Sud-Est. Les niveaux moyens de réponses dirigées contre les antigènes AMA1, GLURP, LSA3, et SALSA ont été plus importants avec le temps de clairance parasitaire de 24 h. Les données suggéraient que le temps de clairance parasitaire au cours du traitement avec les CTA serait associé avec un niveau élevé des réponses dirigées principalement contre les antigènes AMA1, GLURP, LSA3, et SALSA. Nos résultats montrent clairement une contribution positive de la réponse immune humorale dans l'élimination rapide des parasites au cours du traitement avec les CTAs. Les travaux de Koffi *et al.* (2015) ont montré que les réponses dirigées contre les antigènes LSA3, PmCSP, AMA1, MSP4, SALSA sont associées à un temps de clairance parasitaire plus rapide.

Les niveaux moyens d'anticorps spécifiques aux antigènes GLURP, AMA1 et LSA3 diminuent significativement au 7^{ème} jour de suivi démontrant leur contribution à l'élimination des parasites au cours du traitement avec les CTA. Ces antigènes auraient donc un effet protecteur dans la population d'étude.

Dans cette présente étude, 8 patients ont présenté un échec au traitement dont 4 dans chaque bras de traitement. Après correction par PCR, 1 seul cas de recrudescence a été observé dans le bras AS + AQ ; les autres étant des cas de réinfestation. Pour investiguer si le niveau d'anticorps spécifique à chaque antigène était associé à l'échec au traitement (AS+AQ ou AL), nous avons comparé les niveaux d'anticorps spécifiques à chaque antigène à J0 et J7 chez les patients ayant fait un échec au traitement par rapport à ceux ayant présenté une réponse clinique parasitologique adéquate (RCPA). Les résultats ont montré qu'avec l'association AL, seul le niveau d'anticorps spécifiques à l'antigène CSP à J0 était élevé chez les patients ayant présenté une réponse clinique parasitologique adéquate comparé au groupe de patient ayant fait un échec au traitement. Dans le bras AS + AQ, à J7 une différence significative a été marquée avec la réponse dirigée contre l'antigène GLURP entre ces deux groupes de patients. Mieux à J0, le niveau d'anticorps spécifique à l'antigène GLURP était plus élevé chez les patients ayant une RCPA comparés à ceux ayant présenté un échec. Ces résultats suggéraient que les anticorps spécifiques aux antigènes CSP et GLURP agiraient en synergie et seraient donc associés avec un faible risque d'échec thérapeutique au cours du

traitement du paludisme avec ces deux CTA. Ces anticorps auraient un effet protecteur contre les échecs aux traitements aux CTA. Plusieurs études en zone d'endémicité palustre en Afrique ont abouti à la même conclusion. Les travaux d'**Enevold et al. (2007)** et de **Diarra et al. (2012)** ont montré que l'anticorps anti-GLURP serait associé avec un risque d'échec thérapeutique au cours du traitement du paludisme avec la sulfadoxine-pyriméthamine ou l'amodiaquine. Il jouerait par conséquent un rôle protecteur. **Adu et al. (2016)** ont montré dans leur étude que le niveau d'anticorps dirigé contre l'antigène GLURP-R2 serait associé à la protection contre le paludisme. Cependant, nos résultats diffèrent de ceux de **Keh et al. (2012)** qui ont montré que seul le niveau de réponse spécifique à l'antigène AMA1 protégerait contre les échecs au traitement parmi huit antigènes testés au cours du traitement du paludisme avec les molécules Amodiaquine et Sulfadoxine-pyriméthamine. Les travaux respectifs de **Pinder et al. (2006)** et d'**Aubouy et al. (2007)** ont montré que le niveau de réponse dirigée contre l'antigène MSP1-19 protégerait contre les échecs aux traitements avec la chloroquine. La différence entre nos résultats et les leurs pourrait être attribuée au régime thérapeutique différent utilisé pour les traitements pendant ces études, à la pharmacocinétique des molécules. En plus de la susceptibilité intrinsèque du médicament au parasite, de la réponse immune, il existe d'autres facteurs pouvant également influencer l'issue du traitement. On peut citer entre autres :

Les facteurs génétiques, la densité parasitaire initiale élevée, la pharmacocinétique et la pharmacodynamie du médicament, des facteurs intrinsèques de l'hôte et de certaines maladies chroniques, les antigènes des leucocytes humains (HLA).

Dans les pays où la transmission du paludisme est endémique et intense telle que la Côte d'Ivoire, le développement et l'acquisition de l'immunité antipalustre sont graduellement mis en place après plusieurs années suivant la répétition de l'infection palustre et cette immunité anti plasmodiale augmente avec l'âge (**Crompton et al., 2010**). Le niveau de transmission est souvent déterminé par les analyses parasitologiques ou entomologiques, notamment en utilisant la goutte épaisse et la PCR, mais aussi les marqueurs sérologiques. L'acquisition de l'immunité anti-palustre varie en fonction du niveau de transmission. Ainsi, la deuxième partie de notre thèse, avait pour but de cartographier le niveau de réponse dirigée contre les antigènes de *P. falciparum* chez des patients atteints du paludisme simple dans deux faciès épidémiologiques différents (Man et Bouaké).

Il est démontré que la transmission du paludisme est intense à Man, cette dernière est souvent hétérogène à Bouaké situé au centre du pays à la lisière entre la zone forestière et la savane. Il pourrait exister des microfaciès à Bouaké où la transmission est intense comme à Man. Les précédents travaux de l'institut Pierre Richet de Bouaké non encore publiés montrent un taux d'inoculation entomologique bas à Bouaké (Dar-Es-Salam) contrastant avec la prévalence du paludisme à Dar-Es-Salam, quartier Ouest de Bouaké (**Anonyme 1, 2017**).

Les marqueurs sérologiques peuvent permettre d'évaluer le niveau de transmission du paludisme dans une région donnée. Ils seraient plus déterminants que les examens parasitologiques ou entomologiques. Ces marqueurs pourraient nous aider à déterminer le niveau réel de transmission du paludisme dans le quartier de Dar Es Salam. Les résultats obtenus montrent que les proportions des répondants aux antigènes GLURP et l'extrait total de schizonte 07/03 ont été plus élevés chez les patients de Bouaké que chez les malades de Man. De même, les niveaux moyens de réponses spécifiques aux antigènes GLURP et Extrait total de sch 07/03 ont été significativement plus élevés à Bouaké qu'à Man. Les variations de la production du niveau d'anticorps anti-GLURP et anti-Extrait total de schizonte 07/03 observées chez les individus peuvent refléter un certain nombre de facteurs comme par exemple, les niveaux d'expositions et d'intensité de transmission à travers les zones d'étude. En effet, le risque de faire le paludisme est élevé chez les populations vivants dans les zones à forte intensité de transmission (**Rono et al., 2015**) et est faible dans les zones à faible intensité (**Doolan et al., 2009**).

Les réponses dirigées contre les antigènes GLURP, SALSA et Extrait total de schizonte 07/03 induites chez les plus jeunes enfants (0 à 5 ans) de Bouaké ont été plus élevées que celles induites par leurs homologues de Man. Le niveau de réponse spécifique à l'antigène Extrait total de sch 07/03 produit par les enfants de Bouaké de la tranche d'âge 5 à 15 ans était significativement plus élevé que celui produit par les enfants de cette même tranche d'âge à Man. En effet, le contact permanent de l'hôte au parasite et aussi aux piqûres des moustiques entraîneraient un développement rapide de l'acquisition d'une meilleure immunité de l'hôte (**Marsh et al., 1999 ; Doolan et al., 2009**). Des études réalisées par deux équipes, l'une au Gabon et l'autre en Ouganda ont montré que les niveaux de réponses dirigées contre les antigènes AMA1 et PfRh5 étaient élevés dans les zones d'étude avec une forte prévalence du paludisme et seraient de bons indicateurs pour la surveillance du paludisme dans ces zones (**Yeka et al., 2015 ; Imboumy-Limoukou et al., 2016**).

Nos résultats montreraient que le niveau de transmission est plus élevé à Bouaké dans le quartier de Dar Es Salam qu'à Man. Cette différence pourrait s'expliquer par le niveau d'exposition aux piqûres de moustiques plus élevés à Bouaké qu'à Man à cause du niveau de résistance des vecteurs aux insecticides plus élevé à Bouaké qu'à Man (Zoh *et al.*, 2018). Les résultats de leurs travaux indiquent un niveau élevé de résistance d'*An.gambiae (s.l.)* aux huit insecticides utilisés à Bouaké au cours de leur étude avec un taux de mortalité allant de 0 à 73 %.

Les sujets de Bouaké seraient donc plus en contact avec le parasite et les moustiques que ceux de Man. Cependant, certains facteurs pourraient expliquer les différences du niveau de réponses immunes observées sur les deux sites d'étude. En effet, le temps minimal depuis la dernière infection clinique du paludisme avant le recrutement, les facteurs génétiques des individus, la différence entre les souches parasitaires prédominantes dans les zones d'étude pourraient être à l'origine de la différence observée entre les niveaux moyens de réponses dirigées contre les antigènes GLURP et Extrait total de sch 07/03 entre les patients des deux sites. Autre raison, le biais de sélection dans la taille de l'échantillon pourrait être à l'origine de cette différence observée. Il faut ajouter à ces facteurs la migration des populations. Les patients pourraient provenir d'une zone à transmission intense et séjourner dans le quartier Dar-Es-Salam de Bouaké durant la période de l'étude. En effet, une étude réalisée chez les enfants maliens de 3 à 11 ans a montré que les proportions des répondeurs et les niveaux d'anticorps spécifiques aux antigènes AMA1, EBA-175, MSP1, MSP2 augmentent significativement en fonction des souches parasitaires plus particulièrement (FCR3, PC26, KN1068) et le nombre de souches parasitaires après la saison de transmission (Zeituni *et al.*, 2013).

L'utilisation effective de la moustiquaire imprégnée d'insecticides entraîne une baisse de l'immunité. Le niveau d'utilisation de cette stratégie chez nos patients pourrait expliquer la différence des résultats obtenus sur les sites.

Une autre raison montrant la différence entre les niveaux de réponses spécifiques aux antigènes GLURP et Extrait total de sch 07/03 produits par les malades à Man et Bouaké pourrait s'expliquer par la différence de la période de recrutement des malades sur les sites. Pour Man, la période du projet était de Janvier à début Mai, période de la saison sèche alors qu'à Bouaké les patients inclus ont été recrutés en période de saison pluvieuse c'est-à-dire entre Avril et Juin. En effet, la saison pluvieuse favorise la multiplication des moustiques à

travers les flaques d'eau. La transmission du paludisme est élevée après la période qui précède juste la saison pluvieuse et influence le niveau de réponse spécifique aux antigènes candidats vaccin de *P. falciparum*. Ce niveau de réponse dirigée contre les antigènes est important pendant ou juste après la période de forte transmission et chute pendant la période de faible transmission (Nébié *et al.*, 2008 ; Zeituni *et al.*, 2013). L'équipe de Nébié dans leurs travaux indique que, le niveau d'anticorps anti-GLURP est fortement associé avec la réduction du risque de l'incidence du paludisme.

La variation obtenue entre les niveaux de réponses spécifiques aux antigènes GLURP et Extrait total de sch 07/03 chez les patients sur les deux sites pourrait être due à la présence de certains helminthes tels que *Schistosoma haematobium* chez les patients de Man. En effet, les travaux de Raso *et al.* (2004) et (2005) et de Yapi *et al.* (2014) ont rapporté que la ville de Man serait un foyer des helminthes. En effet, les travaux d'Ateba-Ngoa *et al.* (2014) au Gabon qui ont montré que la présence de *Schistosoma haematobium* dans le sang du sujet au cours du paludisme pourrait avoir un impact sur la réponse immune humorale dirigée contre les antigènes candidats vaccins de *P.falciparum*. Dans le même sens, les résultats des travaux réalisés au Sénégal par Courtin *et al.* (2011) ont montré que les niveaux d'IgG1 dirigés contre MSP-1 et GLURP sont plus faibles chez les individus porteurs d'helminthes (*schistosoma haematobium*).

Les réponses spécifiques aux antigènes GLURP et Extrait total de sch 07/03 sembleraient mieux refléter l'intensité de la transmission dans ces deux populations. Les anticorps dirigés contre les antigènes GLURP et Extrait total de sch 07/03 pourraient être des meilleurs indicateurs de la surveillance du paludisme chez ces populations. Par ailleurs, nos résultats diffèrent de ceux obtenus par Koffi *et al.* (2015), dont les travaux, la proportion des répondeurs dirigée contre l'antigène LSA1-41 et le niveau de réponse spécifique à l'antigène Pf13 variaient significativement entre les trois sites d'étude que sont : Abobo, Man, et Korhogo. Cette différence observée entre nos résultats et ceux de Koffi *et al.* (2015) montrerait que le niveau de réponse anticorps antigène de *P. falciparum* varie d'une population à une autre.

Les analyses par site ou inter-sites indiquent que les niveaux de réponses spécifiques aux antigènes AMA1, CSP, LSA3 étaient similaires entre les hommes et les femmes. Par contre, l'étude a montré que le niveau moyen de réponse spécifique à l'antigène SALSA produit par les femmes était plus élevé comparé à celui produit par les hommes sur le site de Man. Les

hormones sexuelles féminines favoriseraient directement l'induction de l'anticorps anti-SALSA. En effet, les récepteurs des stéroïdes sexuels ou des hormones sexuelles féminines telles que l'œstrogène, la progestérone seraient exprimés sur de nombreuses cellules immunitaires (**Klein et al., 2004**). Des travaux antérieurs précisent que chez le rat C57BL/6 infecté par *P. chabaudi*, l'œstrogène est immunogène chez la femelle, ce qui la protégerait contre l'expression des symptômes du paludisme (**Roberts et al., 2001 ; Klein et al., 2004 ; Pamela et al., 2008**). En outre, la testostérone aurait un effet immunosuppresseur chez le mâle en inhibant la production des anticorps contre les antigènes pré-érythrocytaires (**Krucken et al., 2005**). Nos résultats sont contraires à ceux obtenus par **Addai-Mensah et al. (2016)** qui ont montré que les hommes ont plus répondu aux antigènes MSP1-19, MSP3 et AMA1 que les femmes dans la population de leur étude. Cette différence pourrait être attribuée à la différence des antigènes utilisés pour les deux études.

Les niveaux moyens de réponses dirigées contre les antigènes GLURP, SALSA et l'Extrait total de sch 07/03 ont été plus élevés chez les enfants de moins de 5 ans à Bouaké que ceux de Man. La même observation a été notée avec la tranche d'âge de 5 à 15 ans, mais uniquement pour les réponses dirigées contre l'antigène Extrait total de schizonte. Ces résultats indiquent que l'acquisition de l'immunité dirigée contre les antigènes candidats vaccins de *P. falciparum* diffère chez les sujets de même âge vivants dans différentes zones ou dans différents faciès épidémiologiques. Des résultats similaires ont été mis en évidence par **Imboumy-Limoukou et al. (2016)** qui ont montré que les réponses dirigées contre les antigènes PfAMA-1 et PfRh5 étaient différentes chez les sujets de la même tranche d'âge à Franceville et Lastourville, deux villes du Gabon.

Notre travail comporte quelques limites que sont :

La première limite est que le statut VIH de nos patients n'avait pas été réalisé. Des études ont montré que l'infection du VIH pourraient diminuer la réponse des antipaludiques (**Brentlinger et al., 2007**).

La deuxième limite de ce travail est l'absence de différenciation des sous classes IgG. En effet les niveaux de réponses spécifiques aux sous-classes IgG1 ou IgG3 dirigés contre les antigènes donneraient plus d'informations sur la contribution de la réponse immune que les réponses des IgG totaux (**Rogerson et al., 2010**).

Enfin les concentrations des médicaments n'ont pas été déterminées pour juger de l'absorption et de la diffusion des médicaments chez les patients. En effet les phénomènes de mal absorption des médicaments pourraient influencer largement l'issue du traitement.

En fin dans nous avons pas dosé les IgE qui pourraient influencer l'issue du traitement.

Il existe des limites dans la deuxième partie de notre travail notamment le niveau d'utilisation effective de la MILDA, la durée de séjour effectif dans les sites d'étude avant l'inclusion n'ont pas été clairement identifiés.

V- CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le paludisme reste toujours un problème de santé publique dans le monde particulièrement en Afrique subsaharienne. Le niveau de réponse dirigée contre les antigènes de *P. falciparum* joue un rôle important au cours du traitement avec les CTA et permet de déterminer le niveau de transmission du paludisme. Le présent travail avait pour but de déterminer l'apport de la réponse immune dans l'issue du traitement et l'effet du faciès épidémiologique sur la réponse immune en Côte d'Ivoire.

La méthode ELISA a été utilisée pour quantifier le niveau de réponse dirigée contre les antigènes de *P. falciparum*.

A l'issue de cette étude, il ressort que les niveaux moyens de réponse dirigée contre les antigènes AMA1, GLURP, LSA3, et SALSA ont été plus marqués (importants) avec le temps de clairance parasitaire de 24h. Ainsi, ces réponses dirigées contre ces antigènes contribueraient à la clairance parasitaire au cours du traitement. La proportion des répondeurs était élevée pour tous les antigènes dans la population d'étude. La proportion des répondeurs aux antigènes GLURP et AMA1 ont été significativement plus élevées à J0 qu'à J7, contrairement aux réponses dirigées contre les antigènes CSP, SALSA, LSA3 où la différence des proportions de répondeurs n'a pas été significative entre J0 et J7. Quant à l'Extrait total de schizonte 07/03, la proportion des répondeurs a été significativement plus élevée à J7 qu'à J0. L'antigène GLURP a été plus immunogène. Les réponses dirigées contre les antigènes érythrocytaires AMA1, GLURP et un antigène pré-érythrocytaire LSA3 diminuaient significativement à J7 ce qui montrerait que les anticorps dirigés contre ces antigènes auraient un effet protecteur.

La réponse dirigée contre l'antigène CSP a été significativement plus élevée à J0 chez les patients ayant une réponse clinique parasitologique adéquate que ceux ayant fait un échec au traitement dans le bras AL. Dans le bras de traitement AS + AQ, la réponse anticorps spécifique à l'antigène GLURP a été significativement moins importante chez les patients ayant fait un échec thérapeutique par rapport aux patients ayant une réponse clinique parasitologique adéquate. Notre étude a montré que les réponses spécifiques dirigées contre les antigènes CSP et GLURP seraient associées à un faible taux de ré-infestation au cours du traitement avec les CTA donc joueraient un rôle protecteur.

La comparaison des réponses spécifiques dirigées contre les antigènes de *Plasmodium* entre les patients de Man et de Bouaké souffrant du paludisme simple à *Plasmodium falciparum* a montré que la proportion des répondeurs et les niveaux moyens d'anticorps spécifiques aux

antigènes GLURP et l'Extrait total de schizonte ont été significativement plus élevés à Bouaké qu'à Man. De telles observations signifieraient que les antigènes GLURP et Extrait total de schizonte 07/03 seraient des marqueurs sérologiques qui refléteraient mieux l'intensité de la transmission dans les zones d'étude. Les résultats indiquent qu'à Man le niveau d'anticorps spécifique à l'antigène SALSA a été plus élevé chez les femmes que chez les hommes. Les femmes de Bouaké ont plus répondu aux antigènes GLURP et l'Extrait total de schizonte 07/03 que celle de Man. L'étude a noté que l'acquisition de la réponse immune humorale pourrait être différente chez les personnes de mêmes âges vivant dans des zones différentes, particulièrement chez les plus jeunes enfants et selon le sexe.

Au terme de notre étude il est important de faire quelques recommandations aux médecins prescripteurs : de veiller aux respects du protocole du traitement du paludisme surtout chez les enfants de moins 5 ans dont l'immunité n'est pas encore acquise et au PNLN un renforcement des outils de prévention tels que les MILDA et un assainissement du milieu.

En perspectives,

- Cartographier les niveaux de réponses spécifiques dirigées contre les sous-classes (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) contre les antigènes de *Plasmodium* chez des malades sur les sites sentinelles du PNLN
- Réaliser les tests fonctionnels pour évaluer la contribution réelle des anticorps antiparasitaires dans l'efficacité du traitement.
- Réaliser une étude longitudinale sur des individus asymptomatiques (donneurs de sang) pour évaluer la qualité des anticorps antiparasitaires protecteurs.

**VI- REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

Abdulla S., & Sagara I., 2009. Dispersible formulation of artemether/lumefantrine : specifically developed for infants and young children. *Malar. J.*, **8**: 7.

Adam I., Elhassan EM., Omer EM., Abdulla MA., Mahgoub HM., & Adam GK., 2009. Safety of artemisinin during early pregnancy, assessed in 62 Sudanese women. *Ann Trop Med. Parasitol.*, **103**: 205-210.

Addai-Mensah O., Seidel M., Amidu N., Maskus DO., Kapelski S., Breuer G., Franken C., Owusu-Dabo E., Frempong M., Rakotozandrindrainy R, Schinkel H., Reimann A. Klockenbrin T., Barth S., Rainer Fischer R., & Rolf Fendel., 2016. Acquired immune responses to three malaria vaccine candidates and their relationship to invasion inhibition in two populations naturally exposed to malaria *Malar. J.*, **15**: 65

Adu B., Cherif MK., Bosomprah S., Diarra A., Arthur FKN., K. Dickson EK., Corradin G., Cavanagh DR., Theisen M., Sirima SB., Nebie I., & Daniel Dodoo D., 2016. Antibody levels against GLURP R2, SP1 block 2 hybrid and AS202.11 and the risk of malaria in children living in hyperendemic (Burkina Faso) and hypo-endemic (Ghana) areas *Bright Malar. J.*, **15**: 123.

Agnandji S.T., Lell B., Fernandes J.F., Abossolo B.P., Methogo B.G., Kabwende A.L., Adegnika A.A., Mordmuller B., Issifou S., Kremsner P.G., Sacarlal J., Aide P., Lanaspá M., Aponte J.J., Machevo S., Acacio S., Buló H., Sigauque B., Macete E., Alonso P., Abdulla S., Salim N., Minja R., Mpina M., Ahmed S., Ali A.M., Mtoro A.T., Hamad A.S., Mutani P., Tanner M., Tinto H., D'Alessandro U., Sorgho H., Valea I., Bihoun B., Guiraud I., Kabore B., Sombie O., Guiguemde R.T., Ouedraogo J.B., Hamel M.J., Kariuki S., Onoko M., Odero C., Otieno K., Awino N., McMorro M., Muturi-Kioi V., Laserson K.F., Slutsker L., Otieno W., Otieno L., Otsyula N., Gondi S., Otieno A., Owira V., Oguk E., Odongo G., Woods J.B., Ogutu B., Njuguna P., Chilengi R., Akoo P., Kerubo C., Maingi C., Lang T., Olotu A., Bejon P., Marsh K., Mwambingu G., Owusu-Agyei S., Asante K.P., Osei-Kwakye K., Boahen O., Dosoo D., Asante I., Adjei G., Kwara E., Chandramohan D., Greenwood B., Lusingu J., Gesase S., Malabeja A., Abdul O., Mahende C., Liheluka E., Malle L., Lemnge M., Theander T.G., Drakeley C., Ansong D., Agbenyega T., Adjei S., Boateng H.O., Rettig T., Bawa J., Sylverken J., Sambian D., Sarfo A., Agyekum A., Martinson F., Hoffman I., Mvalo T., Kamthunzi P., Nkomo R., Tembo T., Tegha G., Tsidya M.,

Kilembe J., Chawinga C., Ballou W.R., Cohen J., Guerra Y., Jongert E., Lapierre D., Leach A., Lievens M., Ofori-Anyinam O., Olivier A., Vekemans J., Carter T., Kaslow D., Leboulleux D., Loucq C., Radford A., Savarese B., Schellenberg D., Sillman M. & Vansadia P. 2012. A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. *N. Engl. J Med.*, **367** : 2284-2295.

Agnandji S.T., Lell B., Soulanoudjingar S.S., Fernandes J.F., Abossolo B.P., Conzelmann C., Methogo B.G., Doucka Y., Flamen A., Mordmuller B., Issifou S., Kremsner P.G., Sacarlal J., Aide P., Lanaspa M., Aponte J.J., Nhamuave A., Quelhas D., Bassat Q., Mandjate S., Macete E., Alonso P., Abdulla S., Salim N., Juma O., Shomari M., Shubis K., Machera F., Hamad A.S., Minja R., Mtoro A., Sykes A., Ahmed S., Urassa A.M., Ali A.M., Mwangoka G., Tanner M., Tinto H., D'Alessandro U., Sorgho H., Valea I., Tahita M.C., Kabore W., Ouedraogo S., Sandrine Y., Guiguemde R.T., Ouedraogo J.B., Hamel M.J., Kariuki S., Odero C., Oneko M., Otieno K., Awino N., Omoto J., Williamson J., Muturi-Kioi V., Laserson K.F., Slutsker L., Otieno W., Otieno L., Nekoye O., Gondi S., Otieno A., Ogutu B., Wasuna R., Owira V., Jones D., Onyango A.A., Njuguna P., Chilengi R., Akoo P., Kerubo C., Gitaka J., Maingi C., Lang T., Olotu A., Tsofa B., Bejon P., Peshu N., Marsh K., Owusu-Agyei S., Asante K.P., Osei-Kwakye K., Boahen O., Ayamba S., Kayan K., Owusu-Ofori R., Dosoo D., Asante I., Adjei G., Adjei G., Chandramohan D., Greenwood B., Lusingu J., Gesase S., Malabeja A., Abdul O., Kilavo H., Mahende C., Liheluka E., Lemnge M., Theander T., Drakeley C., Ansong D., Agbenyega T., Adjei S., Boateng H.O., Rettig T., Bawa J., Sylverken J., Sambian D., Agyekum A., Owusu L., Martinson F., Hoffman I., Mvalo T., Kamthunzi P., Nkomo R., Msika A., Jumbe A., Chome N., Nyakuipa D., Chintedza J., Ballou W.R., Bruls M., Cohen J., Guerra Y., Jongert E., Lapierre D., Leach A., Lievens M., Ofori-Anyinam O., Vekemans J., Carter T., Leboulleux D., Loucq C., Radford A., Savarese B., Schellenberg D., Sillman M. & Vansadia P. 2011. First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *N. Engl. J. Med.*, **365**: 1863-1875.

Ahlborg N., Flyg B.W., Iqbal J., Perlmann P., & Berzins K., 1993. Epitope specificity and capacity to inhibit parasite growth in vitro of human antibodies to repeat sequences of the *Plasmodium falciparum* antigen Ag332. *Paras. Immunol.*, **15**: 391-400.

- Aidoo MA., Lalvani S.C., Gilbert J.T., Hu P., Daubersies N., Hurt H. C., Whittle P., Druihle A. & Hill V., 2000.** "Cytotoxic T-lymphocyte epitopes for HLA-B53 and other HLA types in the malaria vaccine candidate liver-stage antigen 3." *Infect. Immun.*, **68**: 227-232.
- Aly AS., Vaughan AM., & Kappe SH., 2009.** Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host. *Annu Rev. Microbiol.*, **63** : 195-221.
- Anonyme-1., 2017.** Livre des résumés, quatrième colloque scientifique sur le paludisme, communication-2. p35.
- Anonyme-2., 2015.** Rapport annuel sur la situation sanitaire en Côte d'Ivoire, édition 2015. P210.
- Anonyme-3., 2008.** Collège des Universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales; Société Française de Médecine des Armées; Société Française de Parasitologie; Société Française de Pédiatrie; Société de Médecine des Voyages ; Société de Pathologie Exotique; Société de Réanimation de Langue Française Management and prevention of imported *Plasmodium falciparum* malaria (Revision 2007 of the 1999 Consensus Conference). Long text in French. *Med. Mal. Infect.*, **38**: 68-117.
- Anonyme-4., 2014.** Recensement Général de la population et de l'Habitat. Livre P75.
- Anonyme-5., 2017.** President's malaria initiative Côte d'Ivoire malaria operational plan fy 2017. P 15.
- Aribot G., Rogier C., Sarthou JL., Trape JF., Balde AT, Druilhe P., & Roussilhon C., 1996.** Pattern of immunoglobulin isotype response to *Plasmodium falciparum* bloodstage antigens in individuals living in a holoendemic area of Senegal (Dielmo, West Africa). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **54**: 449-457.
- Ashley EA., Dhorda M., Fairhurst RM., Amaratunga C., Lim P., Suon S., Sreng S., Anderson J.M., Mao S., Sam B., Sopha C., Chuor C.M., Nguon C., Sovannaroeth S., Pukrittayakamee S., Jittamala P., Chotivanich K., Chutasmit K., Suchatsoonthorn C., Runcharoen R, Hien T.T., Thuy-Nhien N.T., Thanh NV., Phu N.H., Htut Y, Han K-T., Aye KH., Mouloud OA., Olaosebikan RR., Folaranmi M., Mayxay M., Khanthavong B., Hongvanthong PN., Newton MA., Onyamboko CI., Fanello OO.,**

Tshefu AK., Mishra N., Valecha N., Phyto AP., Nosten F., Yi P., Tripura R., Borrmann S., Bashraheil M., Peshu J., Faiz MA., Ghose A., Hossain MA., Samad R., Rahman MR., Hasan MM., Islam A., Miotto O., Amato R., MacInnis B., Stalker J., Kwiatkowski DP., Bozdech Z., Jeeyapant A., Cheah PY., Sakulthaew T., Chalk J., Intharabut B., Silamut B., Lee SJ., Vihokhern B., Kunasol C., Imwong C., Tarning J., Taylor WJ., Yeung S., Woodrow CJ., Flegg JA., Das D., Smith J., Venkatesan M., Plowe C.V., Stepniewska K., Guerin PJ., Dondorp AM., NP. & Day. N.J. 2014. White, for the Tracking Resistance to Artemisinin Collaboration (TRAC) al. Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N. Engl. J. Med.*, **371**: 411-423.

Ateba Ngoa U., Zinsou JF., Kassa RFK., Feugap EN., Honkpehedji YJ., Massinga-Loembe M., Moundounga HK., Mouima AMN., Mbenkep LH., Wammes LJ., Mbow M., Kruize Y., Mombo-Ngoma G., Hounkpatin ALB., Agobe JCD., Saadou I., Lell B., Smits H., Kremsner PG., Yazdanbakhsh M., & Adegnika AA., 2014. Assessment of the effect of *Schistosoma haematobium* coinfection on malaria parasites and immune responses in rural populations in Gabon: study protocol *SpringerPlus*, **3**: 388

Aubouy A., Migot-Nabias F., & Deloron P., 2007. Correlations between treatment outcome and both anti-MSP119 antibody response and erythrocyte-related genetic factors in *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect. Gene.t Evol.*, **7**: 147-154.

Aucan C., Traoré Y., Tall F., Nacro B., Traoré-Leroux T., Fumoux F., & Rihet P., 2000. High immunoglobulin G2 (IgG2) and low IgG4 levels are associated with human resistance to *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect. Immun.*, **68**: 1252-1258.

Awolola TS., Oduola OA., Strode C., Koekemoer LL., Brooke B., & Ranson H., 2009. Evidence of multiple pyrethroid resistance mechanisms in the malaria vector *Anopheles gambiae* sensus stricto from Nigeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **103**: 1139-1145.

Baird JK., Snow & RW., 2007. Acquired immunity in a holoendemic setting of *Plasmodium falciparum* and *p. Vivax* malaria. *Am. J. Trop. Med Hyg.*, **76**: 995-996.

Bannister LH., Hopkins JM., Dluzewski AR., Margos G., Williams IT., Blackman MJ., Kocken CH., Thomas AW., & Mitchell GH., 2003. *Plasmodium falciparum* apical

membrane antigen 1 (PfAMA-1) is translocated within micronemes along subpellicular microtubules during merozoite development. *J. Cell. Sci.*, **116**: 3825–3384.

Barnadas C., Ratsimbaoa A., Tichit M., Bouchier C., Jahevitra M., Picot S., & Ménard D., 2008. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine in Madagascar: clinical efficacy and polymorphisms in *pvm-dr1* and *pvcr-t-o* genes. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **52** : 4233-4240.

Barnes KI., Chanda P., & Barnabas G., 2009. Impact of the large-scale deployment of artemether/lumefantrine on the malaria disease burden in Africa: case studies of South Africa, Zambia and Ethiopia. *Malar. J.*, **8**: 8.

Barry AE., & Arnott A., 2014. Strategies for designing and monitoring malaria vaccines targeting diverse antigens. *Front. Immunol.*, **5**: 359

Bejon P., Cook J., Bergmann-Leitner E., Olotu A., Lusingu J., Mwacharo J., Vekemans J., Njuguna P., Leach A., Lievens M., Dutta S., von Seidlein L., Savarese B., Villafana T., Lemnge MM., Cohen J., Marsh K., Corran PH., Angov E., Riley EM., & Drakeley CJ., 2011. Effect of the pre-erythrocytic candidate malaria vaccine RTS,S/AS01E on blood stage immunity in young children. *J. Infect. Dis.*, **204**: 9–18.

Benmohamed L., Thomas A., Bossus M., Brahimi K., Wub-ben J., Gras Masse H., & Druilhe P., 2000. High immunogenicity in chimpanzees of peptides and lipopeptides derived from four new *Plasmodium falciparum* pre-erythrocytic molecules. *Vaccine.*, **18**: 2843–2855.

Berzins K., Perlmann H., Wahlin B., Ekre HP., Høgh B., Petersen E., Welde B., Schoenbecher M., Williams J., Chulay J., & Perlmann P., 1991. "Passive immunization of *Aotus* monkeys with human antibodies to the *Plasmodium falciparum* antigen Pf155/RESA." *Infect. Immunol.*, **59**: 1500-1506.

Biswas S., Choudhary P., Elias SC., Miura K., Milne KH., de Cassan SC., Collins KA., Halstead FD., Bliss CM., Ewer KJ., Osier FH., Hodgson SH., Duncan CJA., O'Hara GA., Long CA., Hill AVS. & Draper, SJ., 2014. Assessment of humoral immune responses to blood-stage malaria antigens following ChAd63-MVA immunization controlled human malaria infection and natural exposure. *PLoS One*, **9** :9.

- Biswas S., Seth RK., Tyagi PK., Sharma SK., & Dash AP., 2008.** Naturally acquired immunity and reduced susceptibility to *falciparum* malaria in two subpopulations of endemic eastern India. *Scand. J. Immunol.*, **67** :177-184.
- Boëte C., 2009.** Anopheles mosquitoes: not just flying malaria vectors... especially in the field. *Trends. Parasitol.*, **25**: 53-55.
- Borre MB., Dziegiel M., Høgh B., Petersen E., Rieneck K., Riley E, Meis JF., Aikawa M., Nakamura K., Harada M., Wind A., Jacobsen PH., Cowland J., Jepsen S., Axelsen NH., & Vuust J., 1991.** "Primary structure and localization of a conserved immunogenic *Plasmodium falciparum* glutamate rich protein (GLURP) expressed in both the preerythrocytic and erythrocytic stages of the vertebrate life cycle." *Mol. Biochem. Parasitol.*, **49**: 119-131.
- Borrmann S., Sasi P., Mwai L., Bashraheil M., Abdallah A., Muriithi S., Fruhauf H., Schaub B., Pfeil J., Peshu J., Hanpithakpong W., Rippert A., Juma E., Tsofa B., Mosobo M., Lowe B., Osier F., Fegan G., Lindegardh N., Nzila A., Peshu N., Mackinnon M., & Marsh K., 2011.** Declining responsiveness of *Plasmodium falciparum* infections to artemisinin-based combination treatments on the Kenyan coast. *PLoS One*, **6**: 11.
- Bottius E., BenMohamed L., Brahim K., Gras H., Lepers JP., Raharimalala L., Aikawa M., Meis, Slierendregt B., Tartar A., Thomas A., & Druilhe P., 1996.** A novel *Plasmodium falciparum* sporozoite and liver stage antigen (SALSA) defines major B, T helper, and CTL epitopes. *J. Immunol.*, **156**: 2874-2884.
- Bouharoun-Tayoun, H., Attanath P., Sabchareon A., Chongsuphajaisiddhi T., & Druilhe P., 1990.** "Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes." *J. Exp. Med.*, **172**: 1633-1641.
- Bouharoun-Tayoun H., & Druilhe P., 1992.** "Antibodies in *falciparum* malaria: what matters most, quantity or quality?" *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.*, **87**: 229-234.

- Bouharoun-Tayoun H., Oeuvray C., Lunel F., & Druilhe P., 1995.** Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *J. Exp. Med.*, **182** :409-418.
- Bouldouyre MA., Dia D., Carmoi T., Fall KB., Chevalier B., & Debonne JM., 2006.** A mild blackwater fever. *Med. Mal. Infect.*, **36** :343-345.
- Bousema T. & Drakeley C., 2011.** Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clin Microbiol. Rev.*, **24** :377-410.
- Boutlis CS., Yeo TW., & Anstey NM., 2006.** Malaria tolerance—for whom the cell tolls? *Trends. Parasitol.*, **22**: 371–377.
- Brentlinger PE., Behrens CB., & Kublin JG., 2007.** Challenges in the prevention, diagnosis, and treatment of malaria in human immunodeficiency virus infected adults in sub-Saharan Africa. *Arch. Intern. Med.*, **167**: 1827–1836
- Bronner U., Divis PC., Farnert A., & Singh B., 2009.** Swedish traveller with *Plasmodium knowlesi* malaria after visiting Malaysian Borneo: a case report. *Malar. J.*, **8** :15.
- Brooke BD., 2008.** kdr: can a single mutation produce an entire insecticide resistance phenotype? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **102** :524-525.
- Brown J., & Smalley ME., 1981.** "Inhibition of the in vitro growth of *Plasmodium falciparum* by human polymorphonuclear neutrophil leucocytes." *Clin. Exp. Immunol.*, **46** : 106-109.
- Carter R., Graves P. M., Keister D. B. & Quakyi I. A. 1990.** "Properties of epitopes of Pfs 48/45, a target of transmission blocking monoclonal antibodies, on gametes of different isolates of *Plasmodium falciparum*." *Parasit. Immunol.*, **12** :587-603.
- Cerami C., Kwakye-Berko F., & Nussenzweig V., 1992.** "Binding of malarial circumsporozoite protein to sulfatides [Gal (3-SO₄) beta 1-Cer] and cholesterol-3- sulfate and its dependence on disulfide bond formation between cysteines in region II." *Mol. Biochem. Parasitol.*, **54** :1-12.

- Chan J-A., Fowkes FJI., & Beeson JG., 2014.** Surface antigens of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes as immune targets and malaria vaccine candidates. *Cell. Mol. Life. Sci.*, **71**: 3633–3657.
- Chumpitazi BF., Lepers J. P., Simon J. & Deloron P., 1996.** "IgG1 and IgG2 antibody responses to *Plasmodium falciparum* exoantigens correlate inversely and positively, respectively, to the number of malaria attacks." *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.*, **14**: 1518-1524.
- Clarke P., 2009.** Control of apoptosis and autophagy by cellular signalling pathways. *F.E.B.S.J.*, **276**: 6049–6426
- Courtin, D., Djilali-Saïah, A., Milet, J., Soulard, V., Gaye, O., Migot-Nabias, F., Sauerwein, R., Garcia, A. & Luty AJF., 2011.** *Schistosoma haematobium* infection affects *Plasmodium falciparum*-specific IgG responses associated with protection against malaria. *Paras. Immunol.*, **33**: 124–131.
- Courtin D., Oesterholt M., Huismans H., Kusi K., Milet J., Badaut C., Gaye O., Roeffen W., Remarque EJ., Sauerwein R., Garcia A., & Luty AJ., 2009.** The quantity and quality of African children's IgG responses to merozoite surface antigens reflect protection against *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS One.*, **4**:10.
- Crompton PD., Kayala MA., Traore B., Kayentao K., Ongoiba A., Weiss GE., Molina DM., Burk CR., Waisberg M., Jasinskas A., Tan X., Doumbo S., Doumtabe D., Kone Y., Narum DL., Liang X., Doumbo OK., Miller LH., Doolan DL., Baldi P., Felgner PL., & Pierce SK., 2010.** A prospective analysis of the Ab response to *Plasmodium falciparum* before and after a malaria season by protein microarray. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **107**: 6958–6963.
- Danis M., 2003.** Avancées thérapeutiques contre le paludisme en 2003. *Med. Trop.*, **63** : 267-270.
- Das A., Sharma M., Gupta B., & Dash AP., 2009.** *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*: so similar, yet very different. *Parasitol. Res.*, **105**: 1169-1171.
- Daubersies P., Millet P., Brahimi K., Langermans JA., Ollomo B., BenMohamed L., Slierendregt B., Eling W., Van Belkum A., Dubreuil G., Meis JF., Guérin-**

- Marchand C., Cayphas S., Cohen J., Gras-Masse H., & Druilhe P., 2000.** Protection against *Plasmodium falciparum* malaria in chimpanzees by immunization with the conserved pre-erythrocytic liver-stage antigen 3. *Nat. Med.*, **6**: 1258–1263.
- Daubrey-Potey T., Die-Kacou H., Kamagate M., Vamy M., Balayssac E., Yavo JC., 2004.** Blackwater fever during antimalarial treatment in Abidjan (West Africa): report of 41 cases. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, **97**: 325-328.
- Dawes EJ., Churcher TS., Zhuang S., Sinden RE., & Basáñez MG., 2009.** Anopheles mortality is both age- and *Plasmodium*-density dependent: implications for malaria transmission. *Malar. J.*, **12**: 228.
- De Gentile L., 2008.** Management of malaria for children in France in 2008. *Arch. Pediatr.*, **15**: 1507-1512.
- Del Giudice G., Tougne C., Louis J. A., Lambert P. H., Bianchi E., Bonelli F., Chiappinelli L. & Pessi A., 1990.** "A multiple antigen peptide from the repetitive sequence of the *Plasmodium malariae* circumsporozoite protein induces a specific antibody response in mice of various H-2 haplotypes." *Eur. J. Immunol.*, **20**: 1619-1622.
- Dent AE., Chelimo K., Sumba PO., Spring MD., Crabb BS., Moormann AM., Tisch DJ., & Kazura JW., 2009.** Temporal stability of naturally acquired immunity to Merozoite Surface Protein-1 in Kenyan adults. *Malar. J.*, **8**: 162.
- Dessens, JT., Beetsma A. L., Dimopoulos G., Wengelnik K., Crisanti A., Kafatos F. C. & Sinden R. E. 1999.** "CTRP is essential for mosquito infection by malaria ookinetes." *Embo. J.*, **18**: 6221-6227.
- Diakité NR., Adja AM., Von Stamm T., Utzinger J., & N'Goran EK., 2010.** Situation épidémiologique avant la mise en eau du barrage hydroagricole de cinq villages de Bouaké, centre Côte-d'Ivoire. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, **103**: 22–28.
- Diarra A., Nebie I., Tiono A., Soulama I., Ouedraogo A., Konate A., Theisen M., Dodoo D., Traore A. & Sirima SB., 2012.** Antibodies to malaria vaccine candidates are associated with chloroquine or sulphadoxine/ pyrimethamine treatment efficacy in children in an endemic area of Burkina Faso. *Malar. J.*, **11**: 79.

- Dinglasan RR., Alaganan A., Ghosh AK., Saito A., van Kuppevelt TH., & Jacobs-Lorena M., 2007.** *Plasmodium falciparum* ookinetes require mosquito mid gut chondroitin sulfate proteoglycans for cell invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**: 15882-15887.
- Diop F., Richard V., Diouf B., Sokhna C., Diagne N., Trape JF., Faye MM., Tall A., Diop G., & Balde AT., 2014.** Dramatic declines in seropositivity as determined with crude extracts of *Plasmodium falciparum* schizonts between 2000 and 2010 in Dielmo and Ndiop, Senegal. *Malar. J.*, **6**: 83.
- Djimdé A., & Lefèvre G., 2009.** Understanding the pharmacokinetics of Coartem. *Malar. J.*, **12**: 4.
- Djimdé AA., Doumbo OK., Traore O., Guindo AB., Kayentao K., Diourte Y., Niare-Doumbo S., Coulibaly D., Kone AK., Cissoko Y., Tekete M., Fofana B., Dicko A., Diallo DA., Wellems TE., Kwiatkowski D., & Plowe CV., 2003.** Clearance of drug-resistant parasites as a model for protective immunity in *Plasmodium falciparum* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **69**: 558-656.
- Dodoo, D., Theisen M., Kurtzhals J. A., Akanmori B. D., Koram K. A., Jepsen S., Nkrumah F. K., Theander TG., & Hviid L., 2000.** "Naturally acquired antibodies to the glutamate-rich protein are associated with protection against *Plasmodium falciparum* malaria." *J. Infect. Dis.*, **181**: 1202-1205.
- Dondorp AM., 2008.** Clinical significance of sequestration in adults with severe malaria. *Transfus. Clin. Biol.*, **15**: 56-57.
- Dondorp AM., Fairhurst RM., Slutsker L., Macarthur JR., Breman JG., Guerin PJ., Wellems TE., Ringwald P., Newman RD., & Plowe CV., 2011.** The threat of artemisinin-resistant malaria. *N. Engl. J. Med.*, **365**: 1073–1075.
- Doolan DL., 2011.** Plasmodium immunomics. *Int. J. Parasitol.*, **41**: 3–20.
- Doolan DL., Dobaño C., & Baird JK., 2009.** Acquired immunity to malaria. *Clin. Microbiol. Rev.*, **22**: 13-36.

- Dubois B., Deloron P., Astagneau P., Chougnet C., & Lepers JP., 1993.** "Isotypic analysis of *Plasmodium falciparum*-specific antibodies and their relation to protection in Madagascar." *Infect. Immun.*, **61**: 4498-5000.
- Duffy PE., 2007.** *Plasmodium* in the placenta: parasites, parity, protection, prevention and possibly preeclampsia. *Parasitology.*, **134**: 1877-1881.
- Dziegiel M., Rowe P., Bennett S., Allen SJ., Olerup O., Gottschau A., Borre M., & Riley E. M., 1993.** "Immunoglobulin M and G antibody responses to *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein: correlation with clinical immunity in Gambian children." *Infect. Immun.*, **61**: 103-108.
- Egan JE., Hoffman SL., Haynes JD., Sadoff JC., Schneider I., Grau GE., Hollingdale MR., Ballou WR., & Gordon DM., 1993.** Humoral immune responses in volunteers immunized with irradiated *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **49**: 166–173.
- Elloso MM., van der Heyde H. C., vande Waa J. A., Manning D. D. & Weidanz WP., 1994.** "Inhibition of *Plasmodium falciparum* in vitro by human gamma delta T cells." *J. Immunol.*, **153**: 1187-1194.
- Enevold A., Alifrangis M., Sanchez JJ., Carneiro I., Roper C., Børsting C., Lusingu J., Vestergaard LS., Lemnge MM., Morling N., Riley E., & Drakeley CJ., 2007.** Associations between alpha+-thalassemia and *Plasmodium falciparum* malarial infection in northeastern Tanzania. *J. Infect. Dis.*, **196**: 451-459.
- Esnault C., Boulesteix M., Duchemin JB., Koffi AA., Chandre F., Dabiré R., Robert V., Simard F., Tripet F., Donnelly MJ., Fontenille D., & Biémont C., 2008.** High genetic differentiation between the M and S molecular forms of *Anopheles gambiae* in Africa. *PLoS ONE.*, **3** : 4.
- Falade C, & Manyando C., 2009.** Safety profile of Coartem: the evidence base. *Malar. J.*, **12**: 6.
- Finkelman FD., Holmes J., Katona IM., Urban JF., Beckmann MP., Park LS., Schooley KA., Coffman RL., Mosmann TR., & Paul WE., 1990.** "Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection." *Annu. Rev. Immunol.*, **8**: 303-333.

- Fowkes FJ., Boeuf P., & Beeson JG., 2016.** Immunity to malaria in an era of declining malaria transmission. *Parasitology.*, **143**:139–153.
- Fowkes FJ., Richards JS., Simpson JA., & Beeson JG., 2010.** The relationship between antimerozoite antibodies and incidence of *Plasmodium falciparum* malaria: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.*, **7**: 1.
- Francis D., Nsobya SL., Talisuna A., Yeka A., Kanya MR., Machekano R., Dokomajilar C., Rosenthal J.P. & Dorsey G., 2006.** Geographic differences in antimalarial drug efficacy in Uganda are explained by differences in endemicity and not by known molecular markers of drug resistance. *J. Infect. Dis.*, **193**: 978–986.
- Galatas B., Bassat Q., Mayor A., 2016.** Malaria parasites in the asymptomatic: looking for the hay in the haystack. *Trends Parasitol.* **32**: 296–308
- Gatton M., & Cheng Q., 2004.** Investigating antigenic variation and other parasite– host interactions in *Plasmodium falciparum* infections in naïve hosts. *Parasitology.*, **128**: 367–376.
- Gobbi F., Audagnotto S., Trentini L., Nkurunziza I., Corachan M., Di Perri G., 2005.** Blackwater fever in children, Burundi. *Emerg. Infect. Dis.*, **11**: 1118-1120.
- Gonçalves BP., Huang CY., Morrison R., Holte S., Kabyemela E., Prevots DR., Fried M. & Duffy PE., 2014.** Parasite burden and severity of malaria in Tanzanian children. *N. Engl. J. Med.*, **370**: 1799–1808.
- Goodier M., Krause-Jauer M., Sanni A., Massougbdji A., Sadeler B. C., Mitchell G. H., Modolell M., Eichmann K. & Langhorne J., 1993.** "Gamma delta T cells in the peripheral blood of individuals from an area of holoendemic *Plasmodium falciparum* transmission." *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **87**: 692-696.
- Gozar MM., Price V. L. & Kaslow D. C., 1998.** "Saccharomyces cerevisiae-secreted fusion proteins Pfs25 and Pfs28 elicit potent *Plasmodium falciparum* transmissionblocking antibodies in mice." *Infect. Immun.*, **66**: 59-64.
- Greenhouse B., Ho B., Hubbard A., Njama-Meya D., Narum DL., Lanar DE., Dutta S., Rosenthal PJ., Dorsey G. & John CC., 2011.** Antibodies to *Plasmodium*

falciparum Antigens Predict a Higher Risk of Malaria but Protection From Symptoms Once Parasitemic *J. Infect. Dis.*, **204**: 19–26.

Greenhouse B., Slater M., Njama-Meya D., Nzarubara B., Maiteki-Sebuguzi C., Clark TD., Staedke SG., Kanya MR., Hubbard A., Rosenthal PJ., & Dorsey G., 2009. Decreasing efficacy of antimalarial combination therapy in Uganda is explained by decreasing host immunity rather than increasing drug resistance. *J. Infect. Dis.*, **199**: 758–765.

Greenwood BM., Bojang K., Whitty CJM., & Targett GAT., 2005. Malaria. *Lancet.*, **365**: 1487–1498.

Grobusch MP., & Kremsner PG., 2005. Uncomplicated malaria. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **295**: 83-104.

Groux H., & Gysin J., 1990. "Opsonization as an effector mechanism in human protection against asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*: functional role of IgG subclasses." *Res. Immunol.*, **141**: 529-542.

Guindo A., Fairhurst RM., Doumbo OK., Wellems TE., & Diallo DA., 2007. X-linked G6PD deficiency protects hemizygous males but not heterozygous females against severe malaria. *PLoS Med.*, **4**: 3.

Gupta S., Snow RW., Donnelly CA., Marsh K., & Newbold C., 1999. Immunity to noncerebral severe malaria is acquired after one or two infections. *Nat. Med.*, **5**: 340-343.

Gysin J., 1992. "Mechanisms of protective immunity against asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* in the experimental host Saimiri." *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, **87**: 407-412.

Hay SI., Guerra CA., Gething PW., Patil AP., Tatem AJ., Noor AM., Kabaria CW., Manh BH., Elyazar IR., Brooker S., Smith DL., Moyeed RA., & Snow RW., 2009. A world malaria map: *Plasmodium falciparum* endemicity in 2007. *PLoS Med.*, **6**: 3.

- Hayton K., & Su XZ., 2008.** Drug resistance and genetic mapping in *Plasmodium falciparum*. *Curr. Genet.*, **54**: 223-239.
- Hill A., Elvin V., Willis AC., Aidoo M., Allsopp CE., Gotch FM., Gao XM., Takiguchi M., Greenwood BM., Townsend AR., McMichael AJ., & Whittle HC., 1992.** "Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria." *Nature.*, **360**: 434-439.
- Hirai M., & Mori T., 2009.** Fertilization is a novel attacking site for the transmission blocking of malaria parasites. *Acta. Trop.*, **114**: 157–161.
- Hodder AN., Crewther PE., Matthew ML., Reid GE., Moritz RL., Simpson RJ., & Anders RF., 1996.** The disulfide bond structure of Plasmodium apical membrane antigen-1. *J. Biol. Chem.*, **271**: 29446-29452.
- Hogh B., Petersen E., Dziegiel M., David K., Hanson A., Borre M., Holm A., Vuust J. & Jepsen S., 1992.** "Antibodies to a recombinant glutamate-rich *Plasmodium falciparum* protein: evidence for protection of individuals living in a holoendemic area of Liberia." *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **46**: 307-313.
- Hollingdale MR., Nardin SEH., Tharavanij, Schwartz AL, & Nussenzweig RS., 1984.** "Inhibition of entry of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* sporozoites into cultured cells; an in vitro assay of protective antibodies." *J. Immunol.*, **132**: 909-913.
- Howell SA., Well I., Fleck SL., Kettleborough C., Collins CR., & Blackman MJ., 2003.** A single malaria merozoite serine protease mediates shedding of multiple surface proteins by juxta membrane cleavage. *J. Biol. Chem.*, **278**: 23890–23898.
- Howell SA., Withers-Martinez C., Kocken CH., Thomas AW., & Blackman MJ., 2001** Proteolytic processing and primary structure of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen-1. *J. Biol. Chem.*, **276**: 31311-31320.
- Imboumy-Limoukou RK., Oyegue-Liabagui SL., Ndidi S., Pegha-Moukandja I., Kouna CL, Galaway F., Florent I., & Lekana-Douki JB., 2016.** Comparative antibody responses against three antimalarial vaccine candidate antigens from urban and rural exposed individuals in Gabon. *Eur. J. Microbiol. Immunol.*, **6**: 287–297.

- Jason Pitts R., & Zwiebel LJ., 2006.** Antennal sensilla of two female anopheline sibling species with differing host ranges. *Malar. J.*, **5**: 26.
- Kato K., Mayer DC., Singh S., Reid M., & Miller LH., 2005.** Domain III of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 binds to the erythrocyte membrane protein Kx. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**: 5552-5557.
- Kaur G., 2009.** Prevalence of clinical malaria among an Orang Asli community in Malaysia. *Southeast Asian. J. Trop. Med. Public. Health.*, **40**: 665-673.
- Keh CE., Jha AR., Nzarubara B., Lanar DE., Dutta S., Theisen M., Rosenthal PJ., Dorsey G., Nixon DF., & Greenhouse B., 2012.** Associations between Antibodies to a Panel of *Plasmodium falciparum* Specific Antigens and Response to Sub-Optimal Antimalarial Therapy in Kampala, Uganda *PLoS ONE.*, **7**: 12.
- Kevin S., Griffith MD., Linda S., Lewis. DVM., Sonja MPH., Monica E., & Parise MD., 2007.** Treatment of Malaria in the United States A Systematic Review. *J.A.M.A.*, **297**: 2264-2277.
- Khan FY., & Al-Haddad D., 2009.** An imported case of *P. falciparum* malaria presenting as black water fever with acute renal failure. *Travel. Med. Infect. Dis.*, **7**: 378-380.
- Kheang ST., Sovannaroth S., Sovann Ek., Chy S., Chhun P., Mao S., Nguon S., Lek DS, Menard D., & Kak N., (2017).** Prevalence of K13 mutation and Day-3 positive parasitaemia in artemisinin-resistant malaria endemic area of Cambodia: across-sectional study *Malar. J.*, **16**: 372.
- Klein SL., 2004.** Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Paras. Immunol.*, **26**: 247-264.
- Kochar DK., Das A., Kochar SK., Saxena V., Sirohi P., Garg S., Kochar A., Khatri MP., & Gupta V., 2009.** Severe *Plasmodium vivax* malaria: a report on serial cases from Bikaner in northwestern India. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **80**: 194-198.
- Koffi A.A., Ahoua A.P.L., Adja M.A., Konan Y.L., Manga L. Bagayoko M., Bitsindou M., 2009.** Profils entomologique du paludisme en Côte d'Ivoire 1956-2009. WHO/ANVR/2009. P 25.

- Koffi D., Touré AO., Varela ML., Vigan-Womas I., Béourou S., Brou S., Ehouman MF., Gnamien L., Richard V., Djaman JA., & Perraut R., 2015.** Analysis of antibody profiles in symptomatic malaria in three sentinel sites of Ivory Coast by using multiplex, fluorescent, magnetic, bead-based serological assay (MAGPIX™) *Malar. J.*, **14**: 509.
- Krucken J, Dkhil MA, Braun JV, Schroetel RM, El-Khadragy M, Carmeliet P., Mossmann H., & Wunderlich F., 2005.** Testosterone suppresses protective responses of the liver to blood-stage malaria. *Infect. Immun.*, **73**: 436–443
- Laloo DG., Shingadia D., Pasvol G., Chiodini PL., Whitty CJ., Beeching NJ., Hill DR., Warrell DA., & Bannister BA., 2007.** HPA Advisory Committee on Malaria Prevention in UK Travellers. UK malaria treatment guidelines. *J. Infect.*, **54**: 111-121.
- Leggat PA 2008.** Trends in antimalarial prescriptions in Australia 2002 to 2005. *J. Travel. Med.*, **15**: 302-306.
- Mahajan RC., Farooq U., Dubey ML., & Malla N., 2005.** Genetic polymorphism in *Plasmodium falciparum* vaccine candidate antigens. *Indian. J. Pathol. Microbiol.*, **48** 429-438.
- Malhotra I., Dent A., Mungai P., Wamachi A., Ouma JH., Narum DL., Muchiri E., Tisch DJ., & King CL., 2009.** Can prenatal malaria exposure produce an immune tolerant phenotype? A prospective birth cohort study in Kenya. *PLoS Med.*, **6**: 7.
- Malvy D., Djossou F., Thiebaut R., & M Le Bras M., 2000.** Plasmodies - Malaria. Formes cliniques, diagnostic. Encycl Méd Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris), *Mal. infect.*, **8** : 16 p.
- Marfurt J., de Monbrison F., Brega S., Barbollat L., Müller I., Sie A., Goroti M., Reeder JC., Beck HP., Picot S., & Genton B., 2008.** Molecular markers of *in vivo* *Plasmodium vivax* resistance to amodiaquine plus sulfadoxine-pyrimethamine: mutations in *pvdhfr* and *pvm-dr1*. *J. Infect. Dis.*, **198**: 409-417.
- Marsh K., & Snow RW., 1999.** Malaria transmission and morbidity. *Parassitologia*. **41**:241–246.

- May J., Evans JA., Timmann C., Ehmen C., Busch W., Thye T., Agbenyega T., & Horstmann RD., 2007.** Hemoglobin variants and disease manifestations in severe *Plasmodium falciparum* malaria. *JAMA.*, **297**: 2220-2226.
- Mbengue B., Kpodji P., Sylla Niang M., Varela ML., Thiam A., Sow A., Ndiaye K., Aidara M., Thiam F., Ndiaye R., Diop G., Nguer CM., Perraut R., & Dièye A., 2016.** Profiles of IgG responses against CSP, GLURP and LSA-3NR2 in urban malaria (Dakar): relations with haemoglobin levels and parasite densities. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, **109**: 91-98.
- Ménard R., Heussler V., Yuda M., & Nussenzweig V., 2008.** *Plasmodium* pre-erythrocytic stages: what's new? *Trends. Parasitol.*, **24**: 564-569.
- Mitchell GH., Thomas AW., Margos G., Dluzewski AR., & 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**: 154-168.
- Mota MM., Giordano S., & Rodriguez A., (2004).** Targeting Plasmodium Host Cells: Survival Within Hepatocytes. *Trends. Mol. Med.*, **10**: 487-492.
- Nardin EH., Nussenzweig V., Nussenzweig RS., Collins WE., Harinasuta KT., Tapchaisri P., & Chomcharn Y., 1982.** "Circumsporozoite proteins of human malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*." *J. Exp. Med.*, **156**: 20-30.
- Narum DL., & Thomas AW., 1994.** Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **67**: 59-68.
- Nébié I., Diarra A., Ouedraogo A., Soulama I., Bougouma EC., Tiono AB., Konate AT., Chilengi R., Theisen M., Dodoo D., Remarque E., Bosomprah S., Milligan P., & Sirima SB., 2008.** Humoral responses to *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens and association with incidence of clinical malaria in children living in an area of seasonal malaria transmission in Burkina Faso, West Africa. *Infect. Immun.*, **76**: 759-766.

- Nébié I., Cuzin-Ouattara N., Diallo D. A., Cousens S. N., Theisen M., Corradin G., Traore A. S. & Esposito F., 2003.** "Humoral responses to defined malaria antigens in children living since birth under insecticide treated curtains in Burkina Faso." *Acta. Trop.*, **88**: 17-25.
- Nkhoma ET., Poole C., Vannappagari V., Hall SA., & Beutler E., 2009.** The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a systematic review and meta-analysis. *Blood. Cells. Mol. Dis.*, **42**: 267-278.
- Ntonga PA., Tonga C., Mbida JAM., Ndo C., Ambene PA., Lehman LG., Ngaha R., Hondt OEN., Nsangou MFP., Lopedji NT., 2017.** Malaria transmission and the sensitivity of aggressive mosquitoes to insecticides in a poorly urbanized area of the Deido health district in Douala (Cameroon) *Med. Sant. rop.*, : 82-89.
- O M S.** Déclaration d'Abuja sur le projet faire reculer le paludisme en Afrique. TDR/OMS, Nov 2000, Av2001 et Juin 2002. P 231.
- O'Donnell RA., & Blackman MJ., 2005.** The role of malaria merozoite proteases in red blood cell invasion. *Curr. Opin. Microbiol.*, **8**: 422-427.
- Offianan AT., Assi SB., Tiacoh LN., Gbessi EA., Ako AB., Brou MJ., Ehouman MF., Gnamien LA., Coulibaly MAA., Coulibaly B., Beourou S., Bassinka I., Soumahoro A., Kadjo F., & Mea A Tano MA., 2014.** Open label, randomized, non-inferiority clinical trial of artesunate-amodiaquine versus artemetherlumefantrine fixed-dose combinations in children and adults with uncomplicated *falciparum* malaria in Cote d'Ivoire. *Malar. J.*, **13**: 439.
- Oliver M., Simon F., de Monbrison F., Beavogui AH., Pradines B., Ragot C., Moalic JL., Rapp C., & Picot S., 2008.** New use of primaquine for malaria. *Med. Mal. Infect.*, **38**: 169-179.
- O'Meara WP., Mwangi TW., Williams TN., McKenzie FE., Snow RW., & Marsh K., 2008.** Relationship between exposure, clinical malaria, and age in an area of changing transmission intensity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **79**: 185-191.
- Osier FH., Fegan G., Polley SD., Murungi L., Verra F., Tetteh KK., Lowe B., Mwangi T., Bull PC., Thomas AW., Cavanagh DR, McBride JS., Lanar DE., Mackinnon**

- MJ., Conway DJ., & Marsh K., 2008.** Breadth and magnitude of antibody responses to multiple *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with protection from clinical malaria. *Infect. Immun.*, **76**: 2240–2248
- Ouattara I., Ehui E., Tanon A., Eholié SP., & Bissagnéné E., 2008.** Hyperactive malarious splenomegaly: diagnosis and therapeutic problems in adults]. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, **101**: 295-297.
- Oumar AA., Poudiougou B., Sylla M., Sall A., Konate S., Togo B., Diakite M., & Keita MM., 2007.** Blackwater fever in children during cerebral malaria: 3 cases reports in Bamako. *Arch. Pediatr.*, **14**: 993-995.
- Pages F., Orlandi-Pradines E., & Corbel V., 2007.** Vecteurs du paludisme: biologie, diversité, contrôle et protection individuelle. *Méd. Mal. Infect.*, **37**:153-161.
- Pamela W., Klein BA., Judith D., Easterbrook L., Erin N., Lalime BS., & Klein SA., 2008** Estrogen and Progesterone Affect Responses to Malaria Infection in Female C57BL/6 Mice *Gend. Med.*, **5**: 423-433.
- Pascual M., Dobson AP., & Bouma MJ., 2009.** Underestimating malaria risk under variable temperatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **106**: 13645-13646.
- Pasquetto V., Fidock DA., Gras H., Badell E., Eling W., Ballou WR., Belghiti J., Tartar A., & 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**: 2502-2513.
- Perlaza BL., Zapata C., Valencia AZ., Hurtado S., Quintero G., Sauzet JP., Brahim K., Blanc C., Herrera MA., Druilhe P., & Herrera S., 2003.** Immunogenicity and protective efficacy of *Plasmodium falciparum* liver-stage Ag-3 in *Aotus lemurinus griseimembra* monkeys. *Eur. J. Immunol.*, **33**: 1321-1327.
- Perraut R., Marrama L., Diouf B., Fontenille D., Tall A., Sokhna C., Trape JF., Garraud O., & Mercereau-Puijalon O., 2003.** Distinct surrogate markers for protection against *Plasmodium falciparum* infection and clinical malaria identified in a Senegalese community after radical drug cure. *J. Infect. Dis.*, **188**: 1940-1950

- Peters AL., & Van Noorden CJF., 2009.** Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Deficiency and Malaria: Cytochemical Detection of Heterozygous G6PD Deficiency in Women. *J. Histochem. Cytochem.*, **57**: 1003-1011.
- Picot S., Bienvenu AL., Konate S., Sissoko S., Barry A., Diarra E., Bamba K., Djimdé A., & Doumbo OK., 2009.** Safety of epoietin beta-quinine drug combination in children with cerebral malaria in Mali. *Malar. J.*, **8**: 169.
- Pinder M., Sutherland CJ., Sisay-Joof F., Ismaili J., McCall MBB., Ord R., Hallett R., Holder AA., & Milligan P., 2006.** Immunoglobulin G antibodies to merozoite surface antigens are associated with recovery from chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in Gambian children. *Infect. Immun.*, **74**: 2887-2893.
- Piper KP., Hayward RE, Cox MJ., & Day K.P., 1999.** "Malaria transmission and Naturally acquired immunity to PfEMP-1." *Infect. Immun.*, **67**: 6369-6374.
- Pizarro JC., Vulliez-Le Normand B., Chesne-Seck ML., Collins CR., Withers-Martinez C., Hackett F., Blackman MJ., Faber BW., Remarque EJ., Kocken CH., Thomas AW., & Bentley GA., 2005.** Crystal structure of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. *Science.*, **308**: 408-411.
- Plebanski M., Aidoo M., Whittle H. C., & Hill AV., 1997.** "Precursor frequency analysis of cytotoxic T lymphocytes to pre-erythrocytic antigens of *Plasmodium falciparum* in West Africa." *J. Immunol.*, **158**: 2849-2855.
- Plowe CV., 2009.** The evolution of drug-resistant malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **103**: 11-14.
- 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 Antigen1 (AMA1) and their associations with protection from malaria. *Vaccine.*, **23**: 718-728.
- Pongtavornpinyo W., Hastings IM., Dondorp A., White LJ., Maude RJ., Saralamba S., Day NP., White NJ., & Boni MF., 2009.** Probability of emergence of antimalarial resistance in different stages of the parasite life cycle. *J. compil. Black.*, **2**: 52-61.

- Potocnjak P., Yoshida N., Nussenzweig R. S. & Nussenzweig V., 1980.** "Monovalent fragments (Fab) of monoclonal antibodies to a sporozoite surface antigen (Pb44) protect mice against malarial infection." *J. Exp. Med.*, **151**: 1504-1513.
- Pradines B., Vial H., & Olliaro P., 2003.** Malaria prophylaxis and treatment: problems, recent developments and perspectives. *Med. Trop.*, **63**: 79-98.
- Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) Février 2008, Côte d'Ivoire :** Directives Nationales de prise en charge du paludisme. Livre. P145.
- Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP). Ministère de la santé et de la lutte contre le SIDA, Côte d'Ivoire Mai 2013.** Directives nationales de prise en charge du paludisme en Côte d'Ivoire version révisée. P200.
- Prudêncio M., Rodriguez A., & Mota MM., 2006.** The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nat. Rev. Microbiol.*, **4**: 849-856.
- Raso G., Luginbuhl A., Acka CA., Tian-Bi NT., Silué KD., Matthys B., Vounatsou P., Wang Y., Dumas ME., Holmes E., Singer BH., Tanner M., N'Goran EK., & Utzinger J., 2004.** Multiple parasite infections and their relationship to self-reported morbidity in a community of rural Côte d'Ivoire. *Int. J. Epidemiol.*, **33**: 1092-1102.
- Raso G., Matthys B., N'Goran EK., Tanner M., Vounatsou P., & Utzinger J., 2005.** Spatial risk prediction and mapping of *Schistosoma mansoni* infections among schoolchildren living in western Côte d'Ivoire. *Parasitology.*, **131**: 97-108.
- Rayner JC., 2009.** The merozoite has landed: reticulocyte-binding-like ligands and the specificity of erythrocyte recognition. *Trends. Parasitol.*, **25**: 104-106.
- Remarque EJ., Faber BW., Kocken CH., & Thomas AW., 2008.** Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. *Trends. Parasitol.*, **24**: 74-84.
- Renner J., Graves PM., Carter R., Williams JL., & Burkot TR., 1983.** "Target antigens of transmission-blocking immunity on gametes of *plasmodium falciparum*." *J. Exp. Med.*, **158** (3): 976-981.

- Reyburn H., Mbatia R., Drakeley C., Bruce J., Carneiro I., Olomi R., Cox J., Nkya WMMM., Lemnge M., Greenwood BM., & Riley EM., 2005.** Association of transmission intensity and age with clinical manifestations and case fatality of severe *Plasmodium falciparum* malaria. *JAMA.*, **293**: 1461-1470.
- Roberts CW., Walker W., & Alexander J., 2001.** Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clin. Microbiol. Rev.*, **14**:476–488.
- Robert V., Le Goff G., Ariey F., & Duchemin JB., 2002.** A possible alternative method for collecting mosquito larvae in rice fields. *Malar. J.*, **1**: 4.
- Rocco F., 2006.** L'écorce miraculeuse : le remède qui changea le monde. Lausanne (Suisse) : Noir sur blanc. *ISBN.*, **1**: 183-188.
- Roe JK., & Pasvol G., 2009.** New developments in the management of malaria in adults. *QJM.*, **102**: 685-693.
- Roeffen W., Lensen T., Mulder B., Teelen K., Sauerwein R., Eling W., Meuwissen J. H. & Beckers P., 1994.** "Transmission blocking immunity as observed in a feeder system and serological reactivity to Pfs 48/45 and Pfs230 in field sera." *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.*, **2**: 13-15.
- Roeffen W., Mulder B., Teelen K., Bolmer M., Eling W., Targett G. A., Beckers PJ., & Sauerwein R., 1996.** "Association between anti-Pfs48/45 reactivity and *P. falciparum* transmission-blocking activity in sera from Cameroon." *Paras. Immunol.*, **18** : 103-109.
- Rogers WO., Sem R., Tero T., Chim P., Lim P., Muth S., Socheat D., Ariey F., & Wongsrichanalai C., 2009.** Failure of artesunate-mefloquine combination therapy for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in southern Cambodia. *Malar. J.*, **8**: 10.
- Rogerson SJ., Wijesinghe RS., & Meshnick SR., 2010.** Host immunity as a determinant of treatment outcome in *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet. Infect. Dis.*, **10**: 51-59.

- Rogier C., Imbert P., Tall A., Sokhna C., Spiegel A., & Trape JF., 2003.** Epidemiological and clinical aspects of blackwater fever among African children suffering frequent malaria attacks. *Trans R Soc Trop. Med. Hyg.*, **97**: 193-197.
- Rono J., Farnert A., Murungi L., Ojal J., Kamuyu G., Guleid F., Nyangweso G., Wambua J., Kitsao B., Olotu A., Marsh K., & Osier FH., 2015.** Multiple clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria in a low transmission intensity setting: exposure versus immunity. *B.M.C. Med.*, **13**: 114.
- Rowe JA., Claessens A., Corrigan RA., & Arman M., 2009.** Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert. Rev. Mol. Med.*, **11**: 6.
- 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. U S A.*, **104**: 17471-17476.
- Rowe JA., Opi DH., & Williams TN., 2009.** Blood groups and malaria: fresh insights into pathogenesis and identification of targets for intervention. *Curr. Opin. Hematol.*, **16**: 480-487.
- RTS,S Clinical Trials Partnership 2015.** Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *Lancet.*, **386**: 31-45.
- Sagara I., Diallo A., Kone M., Coulibaly M., Diawara SI., Guindo O., Maiga H., Niambele MB., Sissoko M., Dicko A., Djimde A., & Doumbo OK., 2008.** A randomized trial of artesunate-mefloquine versus artemether-lumefantrine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Mali. *Am .J. Trop. Med. Hyg.*, **79**: 655-661.
- Sarr JB., Orlandi-Pradines E., Fortin S., Sow C., Cornelie S., Rogerie F., et Guindo S., Konate L., Fusaï T., Riveau G., Rogier C., & Remoue F., 2011.** Assessment of exposure to *Plasmodium falciparum* transmission in a low endemicity area by using

multiplex fluorescent microsphere-based serological assays. *Parasit. Vectors.*, **4**: 212.

Saye R., 2006. Communication journée africaine de lutte contre le paludisme; MRTC/DEAP-FMPOS; 23p

Schlitzer M., 2008. Antimalarial drugs - what is in use and what is in the pipeline? *Arch Pharm.*, **341**: 149-163.

Shear HL., Grinberg L., Gilman J., Fabry ME., Stamatoyannopoulos G., Goldberg DE., & Nagel RL., 1998. Transgenic mice expressing human fetal globin are protected from malaria by a novel mechanism. *Blood.*, **92**: 2520-2526.

Siau A., Silvie O., Franetich JF., Yalaoui S., Marinach C., Hannoun L., van Gemert GJ., Luty AJ, Bischoff E., David PH., Snounou G., Vaquero C., Froissard P., & Mazier D., 2008. Temperature shift and host cell contact up-regulate sporozoite expression of *Plasmodium falciparum* genes involved in hepatocyte infection. *PLoS Pathog.*, **4**: 8.

Silvie O., Franetich JF., Charrin S, Mueller MS., Siau A., Bodescot M., Rubinstein E., Hannoun L., Charoenvit Y., Kocken CH., Thomas AW., Vangemert GJ., Sauerwein RW., Blackman MJ., Anders RF., Pluschke G., & Mazier D., 2004. A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J. Biol. Chem.*, **279**: 9490-9496.

Silvie O., Franetich JF., Rénia L., & Mazier D., 2004b. Malaria sporozoite: migrating for a living. *Trends. Mol. Med., Mar.*, **10**: 97-100.

Silvie O., Mota MM., Matuschewski K., & Prudêncio M., 2008. Interactions of the malaria parasite and its mammalian host. *Curr Opin Microbiol.* **11**: 352-359.

Singer LM., Mirel LB., Ter Kuile FO., Branch OH., Vulule JM., Kolczak MS., Hawley WA., Kariuki SK., Kaslow DC., Lanar DE., & Lal AA., 2003. "The Effects of Varying Exposure to Malaria Transmission on Development of Antimalarial Antibody Responses in Preschool Children. XVI. Asembo Bay Cohort Project." *J. Infect. Dis.*, **187**: 1756-1764.

- Spillings BL., Brooke BD., Koekemoer LL., Chiphwanya J., Coetzee M., & Hunt RH., 2009.** A new species concealed by *Anopheles funestus* Giles, the major malaria vector in Africa. *Am. J. Trop. Med Hyg.*, **81**: 510-515.
- Snounou G., & White NJ., 2004.** The co-existence of *Plasmodium*: sidelights from *Falciparum* and *vivax* malaria in Thailand. *Trends. Parasitol.*, **20**: 333-339.
- Snow RW., Guerra CA., Noor AM., Myint HY., & Hay SI., 2005.** The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature.*, **434**: 214-217.
- Soe, S., Theisen M., Roussilhon C., Aye KS., & Druilhe P., 2004.** "Association between protection against clinical malaria and antibodies to merozoite surface antigens in an area of hyperendemicity in Myanmar: complementarity between responses to merozoite surface protein 3 and the 220-kilodalton glutamate-rich protein." *Infect. Immun.*, **72**: 247-252.
- Solomon JB., Forbes MG., & Solomon GR., 1985.** "A possible role for natural killer cells in providing protection against *Plasmodium berghei* in early stages of infection." *Immunol. Lett.*, **9**: 349-352.
- Soulama I., Nébié I., Ouédraogo A., Gansane A., Diarra A., Tiono AB., Bougouma EC., Konaté AT., Kabré GB., Taylor WR., & Sirima SB., 2009.** *Plasmodium falciparum* genotypes diversity in symptomatic malaria of children living in an urban and a rural setting in Burkina Faso. *Malar. J.*, **8**: 135.
- Staedke SG., Sendagire H., Lamola S., Kanya MR., Dorsey G., Rosenthal PJ., 2004.** Relationship between age, molecular markers, and response to sulphadoxine-pyrimethamine treatment in Kampala, Uganda. *Trop. Med. Int. Health.*, **9**: 624-329.
- Stepniewska K., Ashley I., Lee SJ., Anstey N., Barnes KI., Tran Quang B., D'Alessandro U., Day PJN., de Vries JP., Dorsey G., Guthmann JP., Mayxay M., Newton NP., Olliaro P., Osorio L., Price NR., Rowland M., Smithuis F., Taylor JRW., Nosten F., & White JN., 2010.** In Vivo Parasitological Measures of Artemisinin Susceptibility *J. Infect. Dis.*, **201**: 570-579

- Talisuna AO., Okello PE., Erhart A., Coosemans M., & D'Alessandro U., 2007.** Intensity of malaria transmission and the spread of *Plasmodium falciparum* resistant malaria: a review of epidemiologic field evidence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **77**: 170-180.
- Tamez PA., Liu H., Fernandez-Pol S., Haldar K., Wickrema A., 2009.** Stage-specific susceptibility of human erythroblasts to *Plasmodium falciparum* malaria infection. *Blood.*, **114**: 3652-3655.
- Tardieux I., & Ménard R., 2008.** Migration of Apicomplexa across biological barriers: the Toxoplasma and Plasmodium rides. *Traffic.*, **9**: 627-635.
- Teka H., Petros B., Yamuah L., Tesfaye G., Elhassan I., Muchohi S., Kokwaro G., Aseffa A., & Engers H., 2008.** Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* malaria in Debre Zeit, Ethiopia. *Malar. J.*, **7**: 220.
- Templeton TJ., Kaslow DC., & Fidock D. A., 2000.** "Developmental arrest of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* within the mosquito midgut via CTRP gene disruption." *Mol. Microbiol.*, **36**: 1-9.
- Theisen M., Roeffen W., Singh SK., Andersen G., Amoah L., van de Vegte-Bolmer M., Arens T., Tiendrebeogo RW., Jones S., Bousema T., Adu B., Dziegiel MH., Christiansen M, & Sauerwein R., 2014.** A multi-stage malaria vaccine candidate targeting both transmission and asexual parasite life-cycle stages. *Vaccine.*, **32**: 2623-2630.
- Thera MA., Doumbo OK., Coulibaly D., Laurens MB., Ouattara A., Kone AK., Guindo AB., Traore K., Traore I., Kouriba B., Diallo DA., Diarra I., Daou M., Dolo A., Tolo Y., Sissoko MS., Niangaly A., Sissoko M., Takala-Harrison S., Lyke KE., Wu Y., Blackwelder WC., Godeaux O., Vekemans J., Dubois MC., Ballou WR., Cohen J., Thompson D., Dube T., Soisson L., Diggs CL., House B., Lanar DE., Dutta S., Heppner DG., Jr. & Plowe CV., 2011.** A field trial to assess a blood-stage malaria vaccine. *N. Engl. J. Med.*, **365**: 1004-1013.
- Trends Mol Med 10 (10), 487-492. 10 2004 Mshana RN., Boulandi J., Mayombo J., & Mendome G., 1993.** "In vitro lymphoproliferative responses to malaria antigens: a

prospective study of residents of a holoendemic area with perennial malaria transmission." *Paras. Immunol.*, **15**: 35-45.

Tsuji M., Miyahira Y., Nussenzweig RS., Aguet M., Reichel M., & Zavala F., 1995.

"Development of antimalaria immunity in mice lacking IFN-gamma receptor." *JB. Immunol.*, **154**: 5338-5344.

Van der Kolk M., Tebo AE., Nimpaye H., Ndongbol DN., Sauerwein RW., & Eling WM.,

2003. Transmission of *Plasmodium falciparum* in urban Yaounde, Cameroon, is seasonal and age dependent. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **97**: 375-379.

Vangapandu S., Jain M., Kaur K., Patil P., Patel SR., Jain R., 2007. Recent advances in

antimalarial drug development. *Med. Res. Rev.*, **27**: 65-107.

Vermeulen, AN., Roeffen WF., Henderik JB., Ponnudurai T., Beckers PJ., & Meuwissen

JH., 1985. "*Plasmodium falciparum* transmission blocking monoclonal antibodies recognize monovalently expressed epitopes." *Dev. Biol. Stand.*, **62**: 91-97.

Verra F., Bancone G., Avellino P., Blot I., Simporé J., & Modiano D., 2007. Haemoglobin

C and S in natural selection against *Plasmodium falciparum* malaria: a plethora or a single shared adaptive mechanism? *Parassitologia.*, **49**: 209-213.

Vlachou D., Schlegelmilch T., Runn E., Mendes A., & Kafatos FC., 2006. The

developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **16**: 384-391.

Wahlin B., Wahlgren M., Perlmann H., Berzins K., Bjorkman A., Patarroyo ME., &

Perlmann P., 1984. "Human antibodies to a Mr 155,000 *Plasmodium falciparum* antigen efficiently inhibit merozoite invasion." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **81** : 7912-7916.

Wang R., Charoenvit Y., Corradin G., De La Vega P., Franke ED., & Hoffman SL.,


1996. "Protection against malaria by *Plasmodium yoelii* sporozoite surface protein 2linear peptide induction of CD4+ T cell- and IFN-gamma-dependent elimination of infected hepatocytes." *J. Immunol.*, **157**: 4061-4067.

- Weiss WR., Sedegah M., Beaudoin RL., Miller LH., & Good MF., 1988.** "CD8+ T cells (cytotoxic/suppressors) are required for protection in mice immunized with malaria sporozoites." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **85**: 573-576.
- White NJ., 2008.** *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. *Clin. Infect. Dis.*, **46**: 172-173.
- White NJ., 2011.** The parasite clearance curve. *Malar. J.*, **10**: 278.
- WHO., 2000.** Le Sommet Africain sur le projet Faire Reculer le paludisme. Déclaration d'Abuja et le plan d'action Abuja, 25 avril 2000 (WHO/CDS/RBM/2000.17).p 298
- WHO., 2006.** Guidelines for treatment of malaria (WHO/HTM/MAL/2006.1108) (<http://www.who.int/malaria/treatmentguidelines>). Geneva, World Health Organization, 2006. Consulté le 25 Avril 2017
- WHO., 2008.** Global malaria control and elimination: report of a meeting on containment of artemisinin tolerance, 19 January 2008, Geneva, Switzerland. ISBN. 978 92 4 159681 7.
- WHO., 2009.** Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy. ISBN 978 92 4 159753 1 (NLM classification: QV 256).
- WHO., 2011.** Global plan for artemisinin resistance containment (GPARC). Geneva, World Health Organization. P198.
- WHO., 2013.** World Malaria Report-World Health Organization http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/en/. Consulté le 13 Janvier 2016
- WHO., 2014.** World Malaria Report-World Health Organization. P152.
- WHO., 2015.** WHO Malaria [WWW Document]. P 203
- WHO., 2016.** World Malaria Report-World Health Organization. P 154.
- WHO., 2017.** Rapport mondiale sur le paludisme (<http://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2017/fr/>). Consulté le 15 Fevrier 2017.

- Wilson PT., Malhotra I., Mungai P., King CL., & Dent AE., 2013.** Transplacentally transferred functional antibodies against *Plasmodium falciparum* decrease with age. *Acta. Trop.*, **128**: 149-153.
- Yamauchi LM., Coppi A., Snounou G., & Sinnis P., 2007.** *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. *Cell Microbiol.* **9**(5):1215-1222. *Microbiol.*, **9**: 2093-2096.
- Yapi RB., Hürlimann E., Hounbedji CA., Ndri PB., Silué KD., Soro G., Kouamé FN., Vounatsou P., Fürst T., N’goran EK., Utzinger J., & Raso G., 2014.** Infection and Co-infection with Helminths and Plasmodium among School Children in Côte d’Ivoire: Results from a National Cross-Sectional Survey. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **8**: 6
- Yeka A., Nankabirwa J., Mpimbaza A., Kigozi R., Arinaitwe E., Drakeley C., Greenhouse B., Kanya MR., Dorsey G., & Staedke SG., 2015.** Factors associated with malaria parasitemia, anemia and serological responses in a spectrum of epidemiological settings in Uganda. *PloS One*, **10**.
- Zeituni AE., Miura K., Diakite M., Doumbia S., Moretz SE., Diouf A., Tullo G., Lopera-Mesa TM., Bess CD., Mita-Mendoza NK., Anderson JM., Fairhurst RM., & Long CA., 2013.** Effects of Age, Hemoglobin Type and Parasite Strain on IgG Recognition of *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes in Malian Children. *PLoS ONE*, **8** : 10.
- Zhang Q., Xue X., Xu X., Wang C., Chang W., & Pan W., 2009.** Influence of HLA-DRB1 alleles on antibody responses to PfCP-2.9-immunized and naturally infected individuals. *J. Clin. Immunol.*, **29**: 454-460.
- Zoh DD., Alou LPA., Toure M., Penetier C., Camara S., Traore DF., Koffi AA., Adja AM., Yapi A., & Chandre F., 2018.** The current insecticide resistance status of *Anopheles gambiae* (s.l.) (Culicidae) in rural and urban areas of Bouaké, Côte d’Ivoire. *Parasit. Vectors*, **11**:118.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Protocole

 Institut Pasteur de Dakar	Unité d'Immunologie	Codification : MO ELI_RP_1
	MODE OPERATOIRE	Version : 2013_01 Page 130 sur 1
MO pour le dosage des Ac en ELISA – Protocole Standard IP		

REDIGE PAR

Fonctions	Service	Noms	Visas et date
Scientifique	Unité Immunologie	Dr Perraut Ronald	

VERIFICATEUR

Vérification Technique et qualité			

APPROBATEUR

--	--	--	--

Objet

L'objet de ce MO est de décrire les étapes à suivre afin de doser par méthode ELISA des réponses anticorps (Ac) contre des Antigènes (Ag=protéines) immobilisés sur des plaques 96 puits.

Ce protocole a 2 aspects 1) concernant des Ag de structure connue (protéines recombinantes) et des Ag somatiques (extraits parasitaires).

Matériel et réactifs

Plaques ELISA (Maxisorp NUNC, ref 439454) pour extraits totaux

Plaques IMULON IV pour Ag recombinant

PBS GIBCO 1X (ref 14190-094, Invitrogen)

BSA Fraction V pure

5% non fat milk Regilait in PBS GIBCO

PBS + 0,1 % Tween 20

PBS BSA 1% /tween (saturation & dilution des échantillons et du conjugué anti-Ig)

Peroxidase–conjugated goat F(AB)² fragment to human IgG Fc at 1/7500e in PBS (ref 55246 Cappel)

TMB Microwell Peroxidase Substrate system (ref: 50-76-00, KPL)

H₃PO₄ (acide orthophosphorique) 1 molaire (1M) {66ml dans 1 l H₂O} **important** verser l'**acide dans l'eau (jamais l'inverse)**

Biorad Multiscan plate reader

Protocole


1) Sensibilisation des plaques avec les protéines :

Possibilité de préparer du carbonate Buffer (meilleur coating)

NaHCO₃ 2,9g

Na₂CO₃ 5,9g

d'H₂O qsp 1 litre

	Unité d'Immunologie	Codification : MO ELI_RP_1
	MODE OPERATOIRE	Version : 2013_01 Page 132 sur 1
MO pour le dosage des Ac en ELISA – Protocole Standard IP		

Diluer l'Ag protéique dans le carbonate buffer ou du PBS 1x propre à une concentration de 0,5-1 microg/ml

Distribuer 100 µL de solution d'Ag par puit

Incuber une nuit à 4 °C

2) Laver 3X avec du PBS Tween 0,1 %

3) Saturer avec 110 µL par puit avec du PBS Tween 0,1 % 1% BSA – Incuber **1 heure** à 37°C

4) Laver 3X avec du PBS Tween 0,1 %

5) Distribuer 100 µL par puit des sérums à tester en duplicatas et dilués dans du PBS Tween 0,1 %, 1% BSA – Incuber **1 heure** à 37°C

6) Laver 4X avec du PBS Tween 0,1 %

7) Incuber avec l'Ac secondaire: 100 µl d'anti-human/mouse - IgG HRP au 1/5000-7000^{ème} dans du PBS + 0,1% tween 1% BSA – Incuber **30 minutes** à 37°C

*Pour la Coloration TMB : Sortir les solutions de TMB/H₂O₂ à température ambiante (environ 1h avant la révélation)

8) Laver 4X avec du PBS Tween 0,1 %

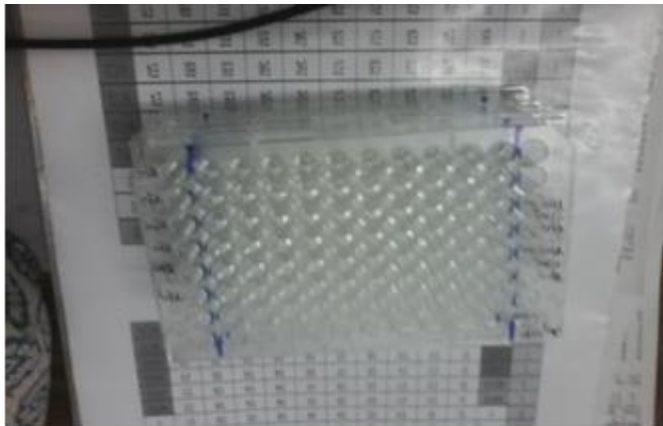
9) Les 2 solutions (TMB Peroxidase Substrate & Peroxidase Substrate= Solution B) sont mélangées en volume égal. 100 µL sont ajoutés dans chaque puit pour environ 10 minutes à température ambiante (20-22°C) (5 minutes pour les extraits bruts)

10) La coloration (bleue) est stoppée avec 100 µl de H₃PO₄ 1M par puit (virage au jaune) en général au bout de 5 minutes

11) La lecture se fait à 490 nm avec 655 nm comme référence

Commentaires Destinataires Techniciens, Scientifiques, Archives techniques

ANNEXE 2 : Dispositif de la chaîne classique d'ELISA (Photographie YAO, 2016)



A) Plaque Elisa Maxisorp® 96 puits

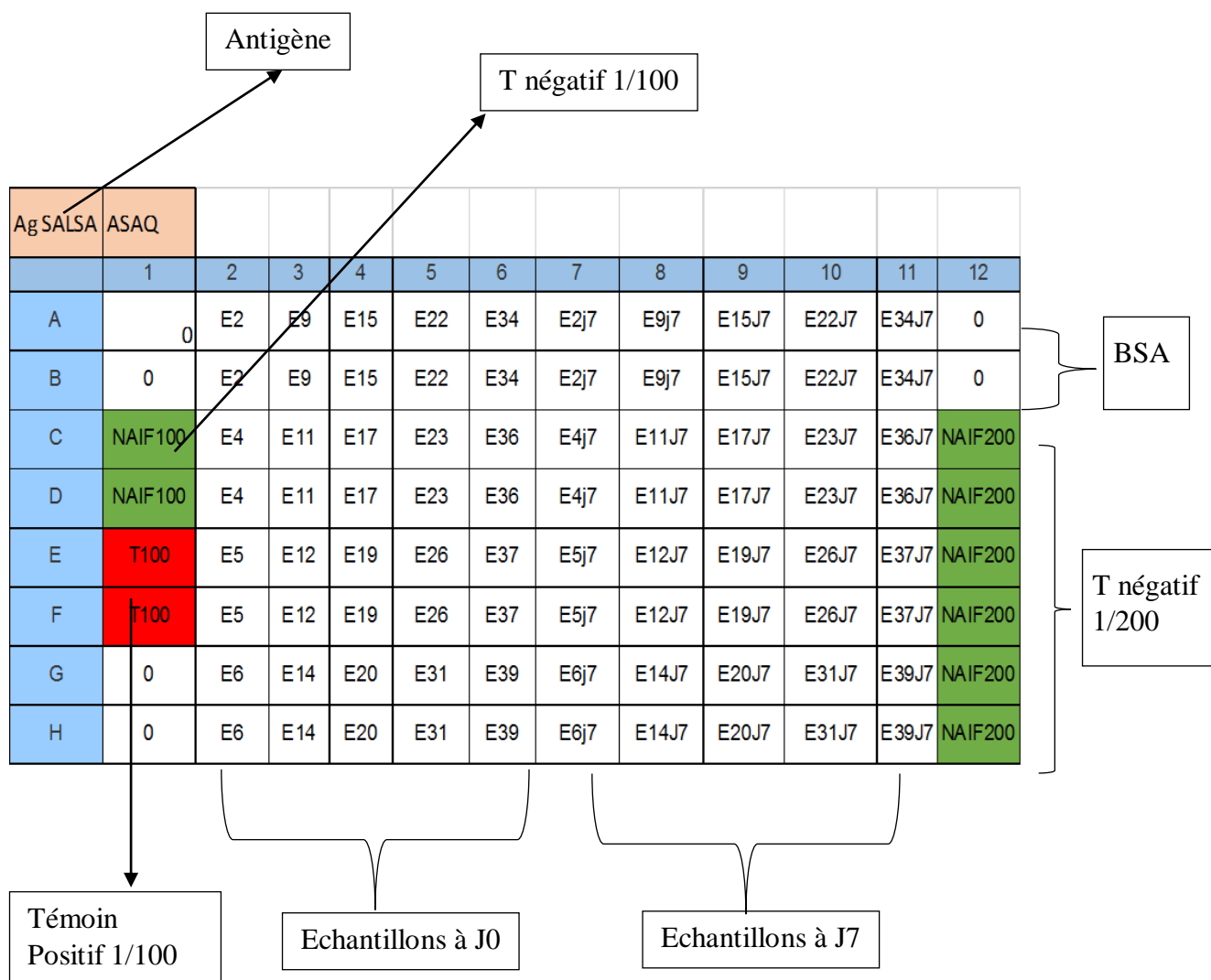


B) Incubateur de plaque



C) Lecteur de plaque

ANNEXE 3 : Plan de la plaque montrant la disposition des échantillons et les témoins



E2 : Echantillon 56 – E2 j7 : Echantillon 2 jour 7 ; NAIF : Témoin négatif, T : Témoin positif

**PUBLICATION
SCIENTIFIQUE**

Full Length Research Paper

Associations between IgG antibody responses to multiple *Plasmodium falciparum* antigens and treatment outcomes with ACTs in Man, Cote d'Ivoire

Yao SS¹, Offianan AT¹, Tiacoh NL¹, Ako AAB¹, Koffi D¹, Kouame E¹, Tuo K¹, Beourou S¹, Djaman J²

¹Malaria Department, Institut Pasteur Côte d'Ivoire.

²Biochemistry Department Institut Pasteur/UFR Biosciences Félix Houphouët Boigny University.

Accepted 18 September, 2017

Successful antimalarial drugs treatment might be due to intrinsic susceptibility of *P. falciparum* and host's factors. In this study we assessed relationship between host IgG antibody responses and treatment outcome with Artesunate+Amodiaquine (AS+AQ) and Artemether+Lumefantrine (AL) in high transmission setting of Cote d'Ivoire. The study was done as part of a clinical drug-efficacy trial of AS+AQ and AL conducted at Man in western Côte d'Ivoire. Serum samples from the time of malaria diagnosis and 7 days later were analyzed for total IgG against schizonte extract (07/03) and 5 specific-*P. falciparum* Ags using a quantitative indirect ELISA. IgG antibody responses were related to treatment outcome. A total of 56 and 55 serum samples in AL and AS + AQ group respectively were available for antibody analysis, on day 0 and day 7. The levels IgG to CSP, GLURP and SALSA increased significantly with age ($p < 0.05$). Antibody responses against all antigens decreased significantly, except SALSA and sch07/03 in day 7 after treatment, with the greatest decreasing seen in IgG response to GLURP ($p = 0.0013$). Adequate Clinical and Parasitological Response PCR corrected (ACPR) was of 98.3% (AS +AQ) and 100% (AL). Prevalence and levels of anti-Glutamate-rich Protein (GLURP) and anti-circumsporozoite (CSP)-specific IgG antibodies were significantly higher ($P < 0.001$) in Patients with ACPR in AS+AQ and AL group respectively. GLURP and CSP IgG antibody responses in Man region may contribute to malaria treatment success and support hypothesis that acquired immunity enhances clinical efficacy of antimalarial drugs.

Keywords: IgG Antibody responses, treatment outcome, ACT, Man, Côte d'Ivoire

INTRODUCTION

Naturally acquired immunity to malaria has been shown to protect these individuals against malaria (Crompton et al., 2010; Gupta et al., 1999; Schofield and Mueller, 2006). Passive transfer of sera from chronically exposed individuals eliminated blood parasites in *P. falciparum*-infected patients (Bouharoun-Tayoun et al., 1995; Cohen

et al., 1961).

Currently, artemether-lumefantrine (AL) and artesunate-amodiaquine (AS-AQ) are the only widely available drugs, which are recommended by most malaria endemic countries in the treatment of uncomplicated falciparum malaria (WHO; 2010). In Côte d'Ivoire, AS-AQ and AL have been recommended respectively in first- and second line treatment since 2005.

There is a considerable inter-individual variability in parasite clearance mechanism. Efficacy of antimalarials is influenced by factors such as parasite life stage, pharm-

acokinetic profile and patient immune response levels (Nébié et al., 2008; White, 2011).

This immunity is slowly established after repeated exposure of the infection (Bouharoun-Tayoun et al., 1990). In addition, parasite clearance is slower in low transmission and relatively quick in high-transmission areas, suggesting that acquired immunity contributes to parasite elimination (Stepniewska et al., 2010). However, the association between the levels of immunoglobulins (IgG) specific to *P. falciparum* and the reduction of the risk of infection of malaria is debated (Biswas et al., 2014; Bejon et al., 2011; Wilson et al., 2013). Antibodies against *P. falciparum* antigens can target the sporozoite stage leading to a subsequent reduction in transmission and infection: the multiplication of parasites is reduced, as are the clinical signs of malaria (Fowkes et al., 2010; Chan et al. 2014). Treatment efficacy improves with age and intensity of transmission, suggesting that acquisition of immunity may play a role in determining the efficacy of antimalarial treatment (Staedke et al., 2004; Francis et al., 2006; Greenhouse et al., 2009). In this regard, previous work in Africa, mainly in high-transmission areas, has noted various associations between immunity and failure of treatment with sulfadoxine pyrimethamine, chloroquine and ACTs (Van Geertruyden et al., 2009; Borrmann et al., 2011; Diarra et al., 2012). The aim of this study was to assess contribution of immunity to treatment outcomes in patients treated with two ACTs by comparing total IgG responses of patients with failure, or adequate clinical and parasitological response.

MATERIALS AND METHODS

Study population and samples

The study was done as part of a clinical drug-efficacy trial in collaboration with the National Malaria Control Programme in Côte d'Ivoire. The trial was conducted from January to May 2016 in Man. Man is located in western Côte d'Ivoire. *Plasmodium falciparum* transmission is intense and perennial, with recrudescence during the rainy, season. The main vectors are *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus*. *Plasmodium falciparum* is the predominant malaria parasite, accounting for more than 95% of infections in children under five years of age (Offianan et al., 2014). The number of bites per person per night (Entomological Inoculation Rate, EIR) due to An. Gambiae is 4,21 b/p/n. Malaria control strategies mainly based on insecticide-treated nets and treatment of clinical cases. The use of insecticide-treated nets in this area remains low.

The efficacy study was designed to enroll 120 patients aged at least six months to presenting with uncomplicated malaria if they met the criteria as defined in the standard efficacy testing protocol by WHO (WHO; 2003) body weight ≥ 5 kg; a history of fever in the

previous 24 hours or measured fever (axillary temperature $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$ or rectal $\geq 38^{\circ}\text{C}$); mono-infection with *P. falciparum*, with parasite density between 2,000–200,000 asexual parasites per microlitre of blood; no other cause of fever than suspected malaria; and no general danger signs or signs of severe and complicated falciparum malaria as per WHO guidelines (WHO; 2000); able to take study drugs by the oral route; able to attend clinic on stipulated days for follow-up; and signed informed consent (by patient or responsible caregiver).

Exclusion criteria consisted of: presence of severe and complicated malaria as defined by WHO; a mixed plasmodial infection, or concomitant disease masking assessment of the response to anti-malarial treatment; full course of AS-AQ or AL in the past 7 days; and known hypersensitivity to any of the study drugs.

Patients were randomly assigned to receive either AS-AQ or AL. Both treatments were three-days oral regimens dosed by weight according to the manufacturer's instructions: AS-AQ 5 to <9 kg: one tablet/day of artesunate (AS) 25 mg/amodiaquine (AQ) 67.5 mg; 9 to <18 kg: one tablet/day of AS 50 mg/AQ 135 mg; 18 to <36 kg: 1 tablet/ day of AS 100 mg/AQ 270 mg; ≥ 36 kg: 2 tablets/day of AS 100 mg/AQ 270 mg.

AL tablet strength was 20 mg artemether/120 mg lumefantrine: 5 to <15 kg: 1 tablet/dose; 15 to <25 kg: 2 tablets/dose; 25 to <35 kg: 3 tablets/dose; ≥ 35 kg 4 tablets/dose. AL was administered twice a day.

Treatment outcomes were classified according to the WHO guidelines for areas of intense transmission as adequate clinical and parasitological response (ACPR), early treatment failure (ETF), late clinical failure (LCF) and late parasitological failure (LPF) (Who, 2003). Failure was defined as the sum of ETF, LCF and LPF. For the purpose of this study, patients with ETF, LCF and LPF were grouped as treatment failures (TF). In order to distinguish recrudescence from reinfection, blood samples collected on filter paper were assessed with nested PCR technique as described previously (Offianan et al., 2014).

Five ml of venous blood was withdrawn on Day 0 and day 7 into an EDTA tube from each participant and the plasma obtained was aliquoted and stored at -20°C until further analysis

Antigens and peptides

Peptides derived from liver (CSP, LSA3, SALSA) and blood stage antigens (GLURP, AMA1) of *Plasmodium falciparum* were used to measure antibody responses. The antigen description is summarized in Table 1.

IgG Antibody Testing by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

IgG responses were quantified by ELISA in duplicate sera samples diluted 1:100 as previously described using

Table 1. Antigens et peptides.

Antigen	Protein or peptides	Sequence and/or Reference	Stage of expression	Antigenfrom
CSP	Peptide	ANPNANPNANPNANPNVDPNVDPC	sporozoite/hepatic stage	<i>P. falciparum</i>
LSA3	Peptide	VLEESQVNDIFNSLVKSVQQEQQHNV	hepatic stage	<i>P. falciparum</i>
SALSA	Peptide	SAEKKDEKEASEQGEESHKKENSQESAC	sporozoite/hepaticstage	<i>P. falciparum</i>
GLURP	Peptide	EDKNEKGQHEIVEVEEILC	merozoite/schizont	<i>P.falciparum</i>
AMA1	Peptide	YKDEIKKEIERESKRIKLNNDNDEGNKKIIPRIFISDDKDSLKC	merozoite/schizont	<i>P.falciparum</i>

specific Ags (peptides) and whole parasite extract sch 07/03 (Dielmo strain adapted to culture) (Niang et al., 2017; Diop et al., 2014; Osier et al., 2008; Bonnet et al., 2006; Aribot et al., 1996). In each plate, pool of sera from adults living in the village of Dielmo, immune IgG (kind gift from Prof M Hommel) and pools of European and African non-immune was used as positive and negative controls respectively. Results were expressed as OD ratio = OD sample/OD naive serum pool (Aribot et al., 1996; Perraut et al., 2003). Sera showing an OD ratio >.2 corresponding to the signal of naive controls + 2 SD were considered sero-positive for prevalence calculations.

Statistical Analysis

Antibody levels and prevalence of responders in different groups were compared using respectively the Mann–Whitney, the Spearman rank correlation test for non normally distributed paired data and the Fisher exact test. Statistical analyses were performed using Prism (graph pad....). For all the tests, *p value* < 0.05 was considered significant.

Ethical Statement

Written informed consent for participation in the study was obtained from adult's patients or children's parents or guardians, in accordance with the Declaration of Helsinki. Approval was granted by National Research Ethic Committee of Côte d'Ivoire. As sentiment was required from young children (10-17 years) in addition to their parent's or guardian consent.

RESULTS

Study profile

Over the course of the study, 843 total patients were screened and 120 (60 in each group) patients were randomized in the clinical trial. Patients were followed up to 42 days. Samples from 56 and 55 participants in AL

and AS + AQ group respectively, meeting inclusion criteria were available for antibody analysis, on day 0 and day 7 (Figure 1).

Characteristics of Patients

The mean age was 6.8 and 12.14 years in AS +AQ and AL group respectively ($p=0.001$).

Body temperature (°C) mean was 38.42 ± 0.4710 and 38.31 ± 0.4446 in AS+AQ and AL group respectively. The mean parasitaemia was high in AS+AQ group (37 935 asexual parasites/ μ l) than in AL (16031 asexual parasites/ μ l) group with a range between 2100 and 177866 asexual parasites/ μ l. A total of 12 patients with Sick cell trait (HbAS) were included in the study (Table 2).

Drug efficacy in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria

The overall failure rate for both drugs was 6.8% (4 patients) and 6.9% (4 patients) for AS+AQ and AL group with an Adequate Clinical and Parasitological Response PCR corrected (ACPR) of 98.3% (AS +AQ) and 100% (AL).

Relationship between age, parasitaemia and antibody levels at D0

In this study, the relationship between antibody levels and age were assessed. The levels of IgG to CSP, GLURP and SALSA increased significantly with age ($p<0.05$) (Table 3).

Levels of IgG to AMA1 decreased with age

There was no correlation between parasitaemia observed at recruitment with antibody responses against all antigens except a significant negative correlation with IgG responses to AMA1 ($p<0.05$) $\rho=-0.194$ and GLURP ($p<0.05$), $\rho=-0.265$.

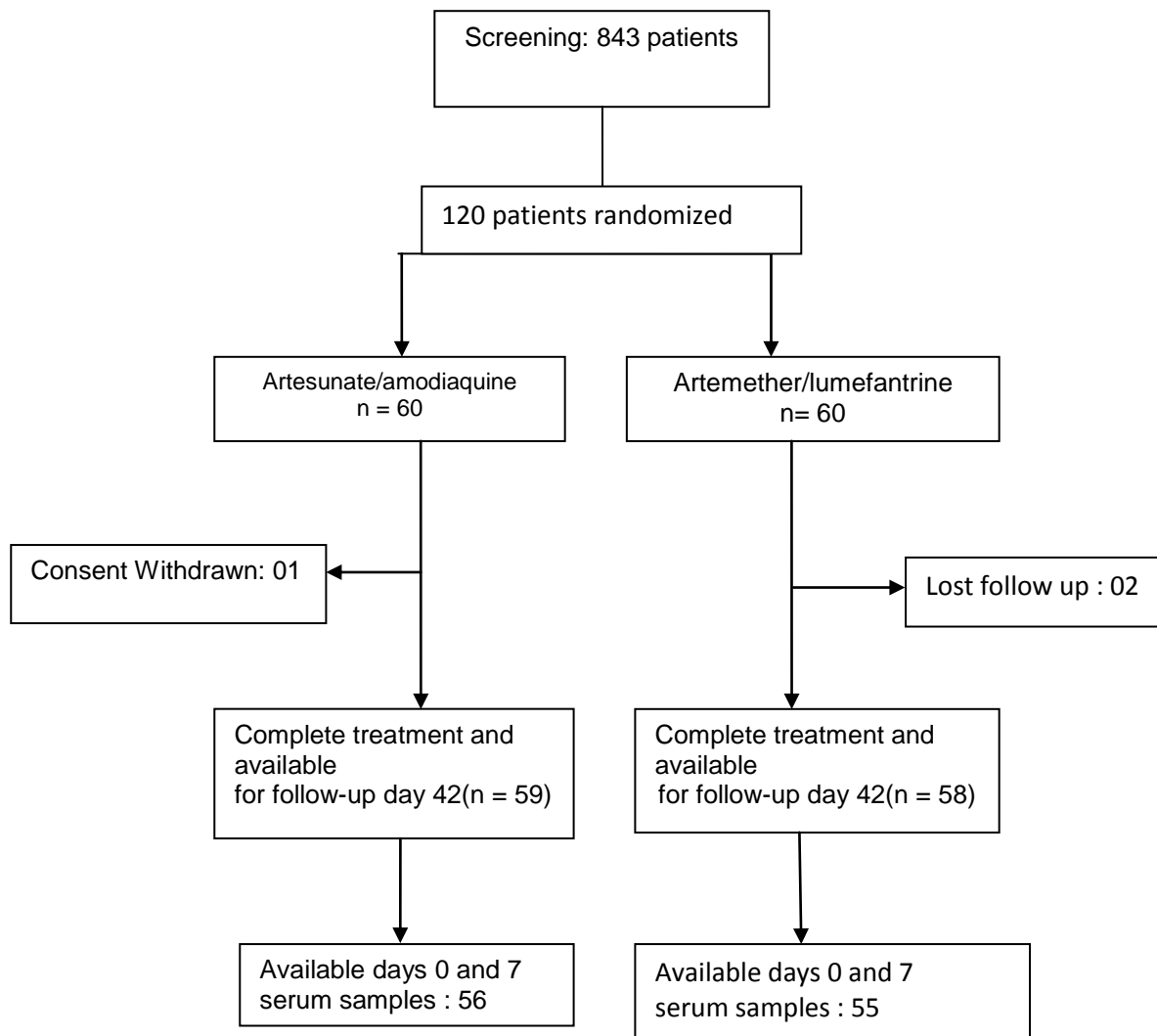


Figure 1. Trial Profile.

Antibody Responses at the Time of Malaria Diagnosis and 7 Days Later

Level and prevalence of antibody responses against the 6 peptides are summarized in Table 2. Prevalence levels were highly variable, ranging from 53.1 % (IgG to SALSA) to 74.7 % (IgG to AMA1).

Levels of antibody responses at days 0 and 7 are stated as Mean values and range [minimum–maximum] ODratio. The level of Ab responses against all antigens decreased significantly, except SALSA and sch07/03 in day 7 after treatment, with the greatest decreasing seen in IgG response to GLURP ($p = 0.0013$) (Table 4).

Association of antibody levels and efficacy of each drug in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria

To investigate whether the treatment efficacy for each of the drugs was associated with a background of immunity, antibody responses against all *falciparum* antigens (CSP,

AMA-1, LSA 3, GLURP, SALSA, and sch07/03) were compared according to each drug's efficacy.

The relationship between immune responses and treatment efficacy was analyzed by stratifying outcome as RCPA and Failure. Table 5 and 6 are shown level of Ab responses according treatment outcome with each drug.

Prevalence and levels of anti-Glutamate-rich Protein (GLURP) and anti-circumsporozoite (CSP)-specific IgG antibodies were significantly higher ($P < 0.001$) in Patients with ACPR in AS+AQ and AL group respectively. Level of Glurp IgG antibodies at day 0 was 4.35 [3.3.-5.73] and 1.92 [0.48-7.77] in Patients with ACPR and failure in AS+AQ group (Table 6). In AL group level of CSP IgG antibodies was also higher in patients with RCPA (2.76; 2.24-3.40) than those with treatment failure (1.17; 1.03-1.33).

DISCUSSION

The study was designed to assess, using standardized

Table 2. Baseline characteristics of study participants.

PARAMETERS	ASAQ	AL	p-value
	(n=60)	(n=60)	
Meanage (Years)	6,8	12,14	0,001
6 months—<5 years	34	20	0,14
5-<15 yrs	21	22	1
≥15 yrs	5	18	0,004
Gender (M/F)	32/28	29/31	0,58
Male [n (%)]	32 (53.33)	29 (48.33)	0.6988
Female [n (%)]	28 (46.67)	31 (51.67)	0.7037
Meanweight	23.76	32.47	0.29
Body temperature [°C, mean (SD)]	38.42± 0.4710	38.31± 0.4446	0.60
Range	(38.20-38.43)	(38.30-38.55)	
Parasite density [parasite/μL, mean (SD)]	37 935±6271	16031± 3058	0,0092
Range	(2100-177866)	(2013–156230)	
Sicklecell trait (HbAS)[n (%)]	7 (11.66)	5 (8.33)	

Table 3. Relationship between age and antibody.

Antigen	Age groups (year)	N	RtDO (D0) Geo.means (95% IC)
AMA1	[0 - 5[56	3.50 (2.92 – 4.19)
	[6 - 15[33	2.96 (2.18 – 4.02)
	≥ 15	22	2.61 (1.80-3.77)
	p		0.1716
CSP	[0 - 5[56	2.37 (1.94 – 2.90)
	[6 - 15[33	2.83 (2.20 – 3.65)
	≥ 15	22	3.93 (2.77 – 5.58)
	p		0.0241
GLURP	[0 - 5[56	3.43 (2.54 – 4.62)
	[6 - 15[33	7.11 (4.66 – 10.86)
	≥ 15	22	9.64 (15.49 – 16.92)
	p		0.0009
LSA3	[0 - 5[56	2.35 (1.92 – 2.86)
	[6 - 15[33	2.34 (1.88 – 2.90)
	≥ 15	22	2.45 (1.59 – 3.79)
	p		0.9115
SALSA	[0 - 5[56	1.91 (1.67 – 2.18)
	[6 - 15[33	2.74 (2.13 – 3.52)
	≥ 15	22	2.92 (2.19 – 3.91)
	p		0.0025
sch07/03	[0 - 5[56	2.20 (1.97 – 2.45)
	[6 - 15[33	2.55 (2.26 – 2.88)
	≥ 15	22	2.40 (1.80 – 3.18)
	p		0.3096

Geo.means: geometric means The Kruskal-Wallis test was used.

methods, association of antibody levels to six malaria antigens (CSP, AMA-1, LSA 3, GLURP, SALSA, and EXTRAIT) with response to antimalarial drugs therapy.

The impact of immunity on treatment outcome have however resulted in conflicting findings (Robert et al., 2000; Mayxay et al., 2001; Mawili-Mboumba et al., 2003; Pinder et al.,

Table 4. Antibody prevalence and level at day 0 and day 7.

Antigen	Antibody Prevalence % (95% CI)			Antibody level Geometric mean (range)		
	D0	D7	P	D0	D7	p
CSP	60.3 (50,3 - 69.5)	56.7 (47.0 - 66.1)	0.2926	2.7 (2.4 - 3.2)	2.5 (2.2- 2.9)	0.1235
AMA1	74.7 (65.6 -82.5)	65.7 (56.1 -74.5)	0.0921	3.1 (2.7 - 3.6)	2.7 (2.3 - 3.0)	0.0002
LSA3	54.9 (45.2- 64.4)	44.1 (34.7 - 53.8)	0.0699	2.3 (2.0 - 2.7)	1.8 (1.6 - 2.1)	< 0.0001
GLURP	72.0 (62.7 - 80.1)	55.8 (46.1 -65.2)	0.004	5.2 (4.1 - 6.6)	2.8 (2.2 - 3.6)	0.0013
SALSA	53.1 (43.4 - 62.6)	61.2 (51.5 - 70.3)	0.111	2.3 (2.0 - 2.6)	2.5 (2.2 - 2.9)	0.0152
sch07/03	66.6 (57.0 -75.3)	76.5 (67.5 - 84.0)	0.0692	2.3 (2.1 - 2.6)	2.7 (2.5 - 3.0)	< 0.0001

Table 5. Association between antibody response and treatment outcome in AL group.

Antigen	AL group		
	Treatmentfailure Geo. means (95% IC) N =4	ACPR Geo. means (95% IC) N=52	p
Ac-AMA1 D0	3.81 (1.15-12.60)	2.82 (2.21-3.60)	0.2571
Ac-AMA1 D7	2.80 (0.93-8,41)	2.79 (2.25-3.45)	0.4494
Ac-CSP D0	1.17 (1.03-1.33)	2.76 (2.24-3.40)	0.0097
Ac-CSP D7	1.75 (0.74-4.07)	3.10 (2.46-3.86)	0.0807
Ac-LSA3 D0	2.42 (0.54-10.69)	2.11 (1.72-2.60)	0.4431
Ac-LSA3 D7	2.08 (0.47-9.15)	1.74 (1.37-2.21)	0.3572
Ac-GLURP D0	3.93 (0.30-52.18)	6.92(4.68-10.22)	0.1865
Ac-GLURP D7	1.39 (0.70-2.74)	2.09 (1.40-3.13)	0.2728
Ac-sch07/03D0	2.33 (1.37-3.96)	2.58 (2.24-2.96)	0.3995
Ac-sch07/03D7	3.17 (1.21-8.26)	3.00 (2.62-3.44)	0.3632
Ac-SALSA D0	2.42 (1.17-5.01)	2.48 (2.08-2.96)	0.4620
Ac-SALSA D7	2.08 (1.20-3.63)	2.40 (1.97-2.94)	0.3513
Age (years)	3.40±1.40	13.76±1.86	0.1250
Parasite density D0 (asexual parasites/µl)	22296±10367	15677±3423	0.4375

2006; Aubouy et al., 2007). We examined in an area of intense transmission of *P. falciparum* in Côte d'Ivoire during a drug trial with Artesunate + amodiaquine (AS+AQ) or Artemether + lumefantrine (AL) the hypothesis that there is a

synergy between drug treatment and acquired malaria immunity.

The study showed that antibody levels to IgG to CSP, GLURP and SALSA increased with age as demonstrated by

Table 6. Association between antibody response and treatment outcome in AS + AQ group.

Antigen	ASAQ group		
	Treatment failure Geo. means (95%IC) N=4	ACPR Geo. means (95%) N=51	p
Ac-AMA1 D0	3.46 (1.23-9.74)	3.44 (2.9-4.13)	0.4871
Ac-AMA1 D7	2.21 (1.01 4.81)	2.62 (2.15-3.18)	0.3020
Ac-CSP D0	2.40 (0.7-8.28)	3.00 (2.40-4.82)	0.5595
Ac-CSP D7	2.82 (0.55-14.57)	2.1 (1.67-2.63)	0.5380
Ac-LSA3 D0	5.6 (4.67-6.71)	2.49 (2.01-3.07)	0.0079
Ac-LSA3 D7	2.13 (0.80-0.71)	1.90 (1.58-2.29)	0.3075
Ac-GLURP D0	1.92(0.48-7.77)	4.35 (3.30-5.73)	0.0659
Ac-GLURP D7	1.25 (0.85-1.84)	4.33 (3.14-5.97)	0.0259
Ac-sch07/03 D0	2.67(2.06-3.47)	2.11 (1.88-2.356)	0.0561
Ac-sch07/03 D7	2.82 (2.12-3.74)	2.51 (2.49-2.80)	0.1424
Ac-SALSA D0	1.73 (1.13-2.65)	2.21 (1.85-2.64)	0.2743
Ac-SALSA D7	1.88 (0.46-7.43)	2.78 (2.22-3.47)	0.1574
Age (years)	4 ± 0.91	6.40 ± 0.98	0.3125
Parasite density D0 (asexual parasites/μl)	20791 ± 12893	37958 ± 6849	0.1250

others results (Tongren et al., 2006; Dodoo et al., 2008; Segeia et al., 2010).

Our results confirmed the hypothesis that malaria immunity is largely effected through antibody-mediated mechanisms and that protective antibody levels to relevant antigens increase with age related exposure to the parasites.

During this study, eight (8) patients failed treatment with four (4) per treatment arm. To investigate whether the level of antibody induced by each antigen tested in our study was associated with treatment failure (ASAQ orAL), we compared the antibody levels produced by each antigen on day 0 and day 7 of patients whose treatment failed to those whose treatment succeeded. The results showed that with AL, only the level of antibody produced by the CSP antigen on day 0 was high in the patients with ACPR compared to that induced by those with treatment failure. In the ASAQ arm, it was on D7 that there was a remarkable difference. Same observation has been made with anti-GLURP antibodies in AS+AQ group.

These results suggested that anti-CSP and GLURP antibodies would have a synergistic effect and would be associated with a low recrudescence (re-infestation) during the treatment of malaria with these two ACTs.

Several studies in malaria endemic areas in Africa have reached the same conclusion. The work of the Enevold and Diarra teams respectively in 2007 and 2012 showed that the anti-GLURP antibody would be associated with a low recrudescence (re-infestation) during the treatment of malaria, from which it would play a protective role (Enevold et al., 2007; Diarra et al., 2012). Adu and collaborators have shown during their study that anti-GLURP-R2 antibody is associated with protection against malaria (Adu et al., 2016). However, our results differ from those of Keh et al.(2012) who have shown that only the anti-AMA1 antibody would protect against treatment failures among eight antigens tested during malaria treatment with either Amodiaquine or Sulfadoxine-pyrimethamine. Other studies are demonstrated the role of anti-MSP1-19 antibody in treatment outcome with chloroquine (Aubouy et al., 2006; Pinder et al., 2006). Differences in result between studies could be due to varying efficacy and pharmacokinetics; differences in the epidemiological setting and patient characteristics, different means of assessing treatment outcome and the use of different methods.

Genetic factors such as sickle cell trait (HbAS), haemoglobin E (Hutagalung et al., 2000, Adjei et al., 2014) and thalass-

aemia (Terlouw et al., 2002; Mockenhaupt et al., 2001) could also affect antimalarial treatment outcome. In this study only sickle cell trait test has been done in all the patients. The twelve patients in our study with sickle cell trait had ACPR. Sickle cell genotype did not influence the treatment efficacy of artemisinin-based combination Therapy as demonstrate by studies conducted in Ghana and DRC (Adjei et al., 2014; N'Dounga et al., 2015) In a study conducted in Kenya, efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine in children with HbAS was increased compared with children with normal haemoglobin (Terlouw et al., 2002). Moreover for intermittent preventive treatment of malaria in children, studies have shown that sulfadoxine-pyrimethamine (SP) is more effective than CQ in paediatric carriers of HbAS (Nakibuuka et al., 2009).

Our study have some limitations. Firstly HIV test was not done. Studies on effect of infection with HIV on the outcome of treatment with antimalarial drugs showed sometimes that HIV infection decreased response to treatment with antimalarial drugs (Brentlinger et al., 2007).

Secondly Measuring IgG1-subclass or IgG3-subclass responses to recombinant antigens might provide more information than total IgG responses (Rogerson et al., 2010).

CONCLUSION

Ac-anti GLURP and CSP may be associated with AL and ASAQ treatment outcome respectively in Man region of Côte d'Ivoire.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to participants who agreed to participate in this study. The assistance of the following personnel is gratefully acknowledged for their assistance during the trial: Drs. Silué, N Guessan, Lawson K, Amany B, Coulibaly, MrsMeité M, Djité F, Kouame A, Kouadio C, Adou K. We thank MmeAkran for work support in the laboratories. We are grateful to PrMireilleDosso for constant support of the project.

REFERENCES

Adjei GO, Goka BQ, Enweronu-Laryea CC, Rodrigues OP, Renner L, Sulley AM, Alifrangis M, Khalil I, Kurtzhals JA (2014). A randomized trial of artesunate-amodiaquine versus artemether-lumefantrine in Ghanaian paediatric sickle cell and non-sickle cell disease patients with acute uncomplicated malaria. *Malar J*, 13:369.

Adu B, Cherif MK, Bosomprah S, Diarra A, Arthur FKN, Dickson EK, Corradin G, Cavanagh DR, Theisen M, Sirima SB, Nebie I, Daniel Doodoo D (2016). Antibody levels against GLURP R2, SP1 block 2 hybrid and AS202.11 and the risk of malaria in children living in

hyperendemic (Burkina Faso) and hypo-endemic (Ghana) areas *Bright Malar J* 15:123 DOI 10.1186/s12936-016-1146-4.

Aribot G, Rogier C, Sarthou JL, Trape JF, Balde AT, Druilhe P, Roussilhon C (1996). Pattern of immunoglobulin isotype response to *Plasmodium falciparum* bloodstage antigens in individuals living in a holoendemic area of Senegal (Dielmo, West Africa). *Am J Trop Med Hyg*. 54:449–57.

Aubouy A, Migot-Nabias F, Deloron P (2007). Correlations between treatment outcome and both anti-MSP119 antibody response and erythrocyte-related genetic factors in *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Genet Evol* 7: 147– 154. doi:10.1016/j.meegid.2006.07.001.

Bejon P, Cook J, Bergmann-Leitner E, Olotu A, Lusingu J, Mwacharo J, Vekemans J, Njuguna P, Leach A, Lievens M, Dutta S, von Seidlein L, Savarese B, Villafana T, Lemnge MM., Cohen J, Marsh K, Corran PH, Angov E, Riley EM, Drakeley CJ, (2011). Effect of the pre-erythrocytic candidate malaria vaccine RTS,S/AS01E on blood stage immunity in young children. *J. Infect. Dis.* 204, 9–18.

Biswas S, Choudhary P, Elias SC, Miura K, Milne K.H, de Cassan SC, Collins KA, Halstead FD, Bliss CM., Ewer KJ, Osier FH, Hodgson SH, Duncan CJA, OHara GA, Long CA, Hill AVS, Draper SJ (2014). Assessment of humoral immune responses to blood-stage malaria antigens following ChAd63-MVA immunization controlled human malaria infection and natural exposure. *PLoS One* 9, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0107903>.

Bonnet S, Petres S, Holm I, Fontaine T, Rosario S, Roth C, Longacre S (2006). Soluble and glyco-lipid modified baculovirus *Plasmodium falciparum* C-terminal merozoite surface protein 1, two forms of a leading malaria vaccine candidate. *Vaccine*. 24:5997–6008.

Borrmann S, Sasi P, Mwai L, Bashraheil M, Abdallah A, Muriithi S, Fruhauf H, Schaub B, Pfeil J, Peshu J, Hanpithakpong W, Rippert A, Juma E, Tsofa B, Mosobo M, Lowe B, Osier F, Fegan G, Lindegardh N, Nzila A, Peshu N, Mackinnon M, Marsh K (2011). Declining responsiveness of *Plasmodium falciparum* infections to artemisinin-based combination treatments on the Kenyan coast. *PLoS One* 6(11):e26005.

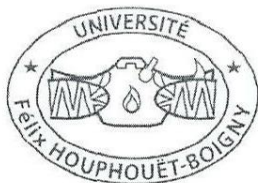
Bouharoun-Tayoun H, Attanath P, Sabchareon A, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P (1990). "Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes." *J Exp Med*. 172(6): 1633-41.

Bouharoun-Tayoun H, Oeuvray C, Lunel F, Druilhe P (1995). Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *J Exp Med*. 182: 409–418. Epub 1995/08/01. PMID: 7629503.

Brentlinger PE, Behrens CB, Kublin JG (2007). Challenges in the prevention, diagnosis, and treatment

- of malaria in human immunodeficiency virus infected adults in sub-Saharan Africa. *Arch Intern Med.* 167: 1827–36.
- Chan JA, Fowkes FJI, Beeson JG (2014). Surface antigens of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes as immune targets and malaria vaccine candidates. *Cell Mol Life Sci* 71(19):3633–3657.
- Cohen S, McGregor IA, Carrington S (1961). Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature* 192:733–737.
- Crompton PD, Miura K, Traore B, Kayentao K, Ongoiba A, Weiss G, Doumbo S, Doumtabe D, Kone Y, Yu Huang C, Doumbo OK, Miller LH, Long CA, Pierce SK (2010). In vitro growth-inhibitory activity and malaria risk in a cohort study in Mali. *Infect Immun.* 78: 737–745. Epub 2009/11/18. doi: 10.1128/IAI.00960-09 PMID: 19917712.
- Diarra A, Nebie I, Tiono A, Soulama I, Ouedraogo A, Konate A, Theisen M, Doodoo D, Traore A Sirima SB (2012). Antibodies to malaria vaccine candidates are associated with chloroquine or sulphadoxine/pyrimethamine treatment efficacy in children in an endemic area of Burkina Faso *Malar J.* 11:79 <http://www.malariajournal.com/content/11/1/79>.
- Diop F, Richard V, Diouf B, Sokhna C., Diagne N, Trape JF, Faye MM, Tall A, Diop G, Balde AT (2014). Dramatic declines in seropositivity as determined with crude extracts of *Plasmodium falciparum* schizonts between 2000 and 2010 in Dielmo and Ndiop, Senegal *Malar J.* Mar 6;13:83. doi: 10.1186/1475-2875-13-83.
- Doodoo D, Aikins A, Kusi KA, Lamptey H, Remarque E, Milligan P, Bosomprah S, Chilengi R, Osei YD, Akanmori BD, Theisen M (2008). Cohort study of the association of antibody levels to AMA1, MSP119, MSP3 and GLURP with protection from clinical malaria in Ghanaian children. *Malar J.* 7:142
- Enevold A, Alifrangis M, Sanchez JJ, Carneiro I, Roper C, Børsting C, Lusingu J, Vestergaard LS, Lemnge MM, Morling N, Riley E, & Drakeley CJ (2007). Associations between alpha+-thalassemia and *Plasmodium falciparum* malarial infection in northeastern Tanzania. *J Infect Dis.* Aug 1; 196(3):451–9.
- Fowkes FJ, Richards JS, Simpson JA, Beeson JG (2010). The relationship between antimerozoite antibodies and incidence of *Plasmodium falciparum* malaria: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* 7(1):e1000218.
- Francis D, Nsobya SL, Talisuna A, Yeka A, Kanya MR, Machezano R, Dokomajilar C, Rosenthal JP Dorsey G (2006). Geographic differences in antimalarial drug efficacy in Uganda are explained by differences in endemicity and not by known molecular markers of drug resistance. *J Infect Dis.* 193:978–86.
- Greenhouse B, Slater M, Njama-Meya D, Nzarubara B, Maiteki-Sebuguzi C, Clark TD, Staedke SG, Kanya MR, Hubbard A, Rosenthal PJ, Dorsey G (2009). Decreasing efficacy of antimalarial combination therapy in Uganda is explained by decreasing host immunity rather than increasing drug resistance. *J Infect Dis.* 199:758–65.
- Gupta S, Snow RW, Donnelly C, Newbold C (1999). Acquired immunity and postnatal clinical protection in childhood cerebral malaria. *Proc Biol Sci.* 266: 33–38. Epub 1999/03/19. PMID: 10081156.
- Hutagalung R, Wilairatana P, Loareesuwan S, Brittenham GM, Gordeuk VR (2000). Influence of hemoglobin E trait on the antimalarial effect of artemisinin derivatives. *J Infect Dis;* 181: 1513–16.
- Keh CE, Jha AR, Nzarubara B, Lanar DE, Dutta S, Theisen M, Rosenthal PJ, Dorsey G, Nixon DF, Greenhouse B (2012). Associations between Antibodies to a Panel of *Plasmodium falciparum* Specific Antigens and Response to Sub-Optimal Antimalarial Therapy in Kampala, Uganda *PLoS ONE* 7(12):. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052571>.
- Mawili-Mboumba DP, Borrmann S, Cavanagh DR, McBride JS, Matsiegui PB, Missinou MA, Kremsner PG, Ntoumi F (2003). Antibody responses to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 and efficacy of amodiaquine in gabonese children with *P.falciparum* malaria. *J Infect Dis.* 187: 1137–1141.
- Mayxay M, Chotivanich K, Pukrittayakamee S, Newton P, Loareesuwan S, White NJ (2001). Contribution of humoral immunity to the therapeutic response in falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 65: 918–923.
- Mockenhaupt FP, May J, Bergqvist Y, Meyer CG, Falusi AG, Bienzle U (2001). Evidence for a reduced effect of chloroquine against *Plasmodium falciparum* in alpha-thalassaemic children. *Trop Med Int Health.* 6: 102–07
- Nakibuuka V, Ndeezi G, Nakiboneka D, Ndugwa CM, Tumwine JK (2009). Presumptive treatment with sulphadoxine-pyrimethamine versus weekly chloroquine for malaria prophylaxis in children with sickle cell anaemia in Uganda: a randomized controlled trial. *Malar J.* 8:237.
- Ndounga M, Mayengue PI, Casimiro PN, Koukouikila-Koussounda F, Bitemo M, Matondo BD, Diakou LAN, Basco LK, Ntoumi F (2015). Artesunate-amodiaquine versus artemether-lumefantrine for the treatment of acute uncomplicated malaria in Congolese children under 10 years old living in a suburban area: a randomized study. *Malar J.* 14:423
- Nebie I, Diarra A, Ouedraogo A, Soulama I, Bougouma EC, Tiono AB, Konate AT, Chilengi R, Theisen M, Doodoo D, Remarque E, Bosomprah S, Milligan P, Sirima SB (2008). Humoral responses to *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens and association with incidence of clinical malaria in children living in an area of seasonal malaria transmission in Burkina Faso, West Africa. *Infect Immun.* 76:759–766.
- Niang M, Niass O, Diagne N, Sarr FD, Michel Matar Faye MM, Diop F, Diouf B, Faye J, Badiane A, Perraut R, Sokhna C, Trape JF, Tall A, Toure-Balde A (2017).

- Temporal analysis of IgG antibody responses to *Plasmodium falciparum* antigens in relation to changing malaria epidemiology in a West African setting. 16:283 DOI 10.1186/s12936-017-1928-3.
- Offianan AT, Assi SB, Tiacoh LN, Gbessi EA, Ako AB, Brou MJ, Ehouman MF, Gnamien LA, Coulibaly MAA, Coulibaly B, Beourou S, Bassinka I, Soumahoro A, Kadjo F, Mea A Tano MA. 2014. Open label, randomized, non-inferiority clinical trial of artesunate-amodiaquine versus artemether lumefantrine fixed-dose combinations in children and adults with uncomplicated falciparum malaria in Cote d'Ivoire. *Malar J*. 13:439
- Osier FH, Fegan G, Polley SD, Murungi L, Verra F, Tetteh KK, Lowe B, Mwangi T, Bull PC, Thomas AW, Cavanagh DR, McBride JS, Lanar DE, Mackinnon MJ, Conway DJ, Marsh K, (2008). Breadth and magnitude of antibody responses to multiple *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with protection from clinical malaria. *Infect Immun* 76, 2240–2248.
- Perraut R, Marrama L, Diouf B, Fontenille D, Tall A, Sokhna C, Trape JF, Garraud O, Mercereau-Puijalon O (2003). Distinct surrogate markers for protection against *Plasmodium falciparum* infection and clinical malaria identified in a Senegalese community after radical drug cure. *J Infect Dis*. 188:1940–50.
- Pinder M, Sutherland CJ, Sisay-Joof F, Ismaili J, McCall MBB, Ord R, Hallett R, Holder AA, Milligan P (2006). Immunoglobulin G antibodies to merozoite surface antigens are associated with recovery from chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in gambian children. *Infect Immun*. 74: 2887-2893.
- Robert V, Roeffen W, Brasseur P, Aribot G, Verhave JP, Roussilhon C (2000). Anti-NANP antibody and treatment efficacy in patients with acute uncomplicated falciparum malaria attacks. *Parasite Immunol*. 22: 589-593.
- Rogerson SJ, Wijesinghe RS, Meshnick SR (2010). Host immunity as a determinant of treatment outcome in *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet Infect Dis* 10: 51–59. doi:10.1016/S1473–3099(09)70322–6.
- Schofield L, Mueller I (2006). Clinical immunity to malaria. *CurrMol Med*. 2006; 6: 205–221. Epub 2006/03/07. PMID: 16515511.
- Segeja MD, Mmbando BP, Seth MD, Lusingu JP, Lemnge MM (2010). Acquisition of antibodies to merozoite surface protein 3 among residents of Korogwe, north eastern Tanzania. *BMC Infectious Diseases*, 10:55.
- Staedke SG, Sendagire H, Lamola S, Kanya MR, Dorsey G, Rosenthal PJ (2004). Relationship between age, molecular markers, and response to sulphadoxine-pyrimethamine treatment in Kampala, Uganda. *Trop Med Int Health*.; 9:624–9.
- Stepniewska K, Ashley I, Lee SJ, Anstey N, Barnes KI, Tran Quang B, D'Alessandro U, Day PJN, de Vries JP, Dorsey G, Guthmann JP, Mayxay M, Newton NP, Olliaro P, Osorio L, Price NR, Rowland M, Smithuis F, Taylor JRW, Nosten F, White JN, (2010). In Vivo Parasitological Measures of Artemisinin Susceptibility *J Infect Dis*; 201:570–579.
- Terlouw DJ, Aidoo MA, Udhayakumar V, Kolczak MS, Oloo AJ, Kager PA, Lal AA, Nahlen BL, Kuile FO (2002). Increased efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine in the treatment of uncomplicated falciparum malaria among children with sickle cell trait in western Kenya. *J Infect Dis*. 186: 1661–68.
- Tongren JE, Drakeley CJ, McDonald SL, Reyburn HG, Manjurano A, Nkya WM, Lemnge MM, Gowda CD, Todd JE, Corran PH, Riley EM (2006). Target antigen, age, and duration of antigen exposure independently regulate immunoglobulin G subclass switching in malaria. *Infect Immun*. 74:257-264.
- Van Geertruyden JP, Van Eijk E, Yosaatmadja F, Kasongo W, Mulenga M, D'Alessandro U, Rogerson S (2009). The relationship of *Plasmodium falciparum* humeral immunity with HIV-1 immunosuppression and treatment efficacy in Zambia. *Malar J* 8:258.
- White NJ (2011). The parasite clearance curve. *Malar J*. 10(1):278.
- WHO (2010). World Health Organization: Guidelines for the treatment of malaria. 2nd edition. Geneva: WHO Press.
- WHO (2000). Communicable diseases cluster. Severe falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 94:S1–90.
- WHO (2003). <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/whocdms120031093>
- Wilson PT, Malhotra I, Mungai P, King CL, Dent AE (2013). Transplacentally transferred functional antibodies against *Plasmodium falciparum* decrease with age. *Acta Trop*. 128, 149–153, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.07.018>.



22 BP : 582 Abidjan 22

PERMIS D'IMPRIMER LA VERSION CORRIGEE DE LA THESE DE

Doctorat de l'Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY

Présenté par Monsieur YAO Serge Stéphane

THEME : «Réponses des anticorps anti-plasmodiaux dirigées contre un panel d'antigènes et leur effet à l'issue du traitement contre le paludisme simple en Côte d'Ivoire ».

Vu et approuvé

Abidjan, le 29 octobre 2018

Le Directeur



KOUAMELAN Essetchi Paul
Professeur Titulaire

Vu et Permis d'Imprimer

Abidjan, le 29 octobre 2018

Le Vice-Président de l'Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY

AFFIAN Kouadio
Professeur Titulaire



RESUME

L'émergence et l'extension de la résistance aux dérivés de l'artémisinine observée en Asie du Sud-Est constituent un problème de santé publique. L'efficacité des antipaludiques est influencée par plusieurs facteurs en outre l'état immunitaire du patient. Ce travail a consisté d'une part à déterminer l'apport de la réponse immune dans l'issue du traitement avec les associations Artesunate + Amodiaquine (AS + AQ) et Artémether + Lumefantrine (AL) à Man et d'autre part l'effet du faciès épidémiologique (Man et Bouaké) sur la réponse immune en Côte d'Ivoire.

L'étude a été réalisée dans le cadre de deux essais cliniques évaluant l'efficacité des deux antipaludiques que sont : AS + AQ et AL. Ces essais cliniques se sont déroulés l'un à Man (Ouest) et l'autre à Bouaké (Centre) de la Côte d'Ivoire. Des échantillons de sérum prélevés au moment du diagnostic du paludisme et jour 7 après le traitement ont été utilisés pour quantifier le niveau de réponse spécifique à 5 antigènes de *Plasmodium falciparum* et l'extrait total de Sch 07/03. La méthode ELISA a été utilisée. Au total 55 et 56 échantillons de sérum respectivement dans le bras de traitement AL et AS+AQ disponibles à J0 et J7 ont été utilisés pour le dosage du niveau de réponse spécifique à chaque antigène. Quant à la comparaison du niveau moyen d'anticorps spécifique à chaque antigène dans deux faciès épidémiologiques différents (Man et Bouaké), respectivement 111 et 40 échantillons de sérum à J0 et J7 ont été utilisés.

A l'issue de cette étude, il ressort que les niveaux moyens de réponse dirigée contre les antigènes CSP, GLURP et SALSA augmentent significativement avec l'âge ($p < 0,05$). Les niveaux de réponses anticorps spécifiques à tous les antigènes diminuent significativement à J7 à l'exception des niveaux de réponses spécifiques aux antigènes SALSA et l'extrait total de sch 07/03. Le niveau de réponse spécifique à l'antigène GLURP a été le plus grand déclin à J7 ($p = 0,0013$). La réponse clinique parasitologique adéquate après correction PCR était de 98,3% (AS +AQ) and 100% (AL). Les niveaux de réponses spécifiques aux antigènes GLURP et CSP ont été significativement ($p < 0,001$) plus élevés chez les patients ayant une RCPA respectivement dans le bras AS+AQ et dans le bras AL.

La comparaison des réponses spécifiques dirigées contre les antigènes de *Plasmodium* entre les patients de Man et de Bouaké souffrant du paludisme a montré que la proportion des répondeurs et les niveaux moyens d'anticorps spécifiques aux antigènes GLURP et l'Extrait total de sch 07/03 ont été significativement ($p < 0,05$) plus élevés à Bouaké qu'à Man. Les résultats indiquent qu'à Man le niveau d'anticorps spécifique à l'antigène SALSA a été plus élevé chez les femmes que chez les hommes. Les femmes de Bouaké ont plus répondu aux antigènes GLURP et Extrait total que celles de Man ($p < 0,05$). L'étude a noté que l'acquisition de la réponse immune humorale pourrait être différente chez les personnes de mêmes âges vivants dans des zones différentes particulièrement chez les plus jeunes enfants et selon le sexe.

Mots clés : Réponses anticorps, échecs aux traitements, CTA, Man, Bouaké, Côte d'Ivoire.

ABSTRACT

The emergence and extension of artemisinin derivative resistance observed in Southeast Asia is a public health problem. The efficacy of antimalarial drugs is influenced by several factors besides the patient's immune status. This study consisted on the one hand to determine the contribution of the immune response in the outcome of treatment with the associations Artesunate + Amodiaquine (AS + AQ) and Artemether + Lumefantrine (AL) to man and on the other hand the effect of the epidemiological facies (man and Bouaké) On the immune response in Cote d'Ivoire.

The study was conducted in two clinical trials evaluating the efficacy of the two antimalarial drugs AS + AQ and AL. These clinical trials were conducted in Man (West) and the other in Bouaké (Center) of Côte d'Ivoire. Serum samples collected at the time of malaria diagnosis and on day 7 after treatment were used to quantify the level of specific response to 5 *Plasmodium falciparum* antigens and the total extract of Sch 07/03. The ELISA method was used. In total 55 and 56 serum samples respectively in AL and AS + AQ treatment arm available at D0 and D7 were used for the determination of the specific response level of each antigen. The comparison of the mean level of antibodies specific to each antigen in two different epidemiological facies (Man and Bouaké), respectively 111 and 40 serum samples at D0 and D7 were used. On completion of this study, it appears that the mean levels of response directed against the antigens CSP, GLURP and SALSA increase significantly with age ($p < 0.05$). The levels of antibody responses specific to all the antigens decreased significantly at day 7 with the exception of levels of specific responses to SALSA antigens and the total extract of Sch 07/03. The level of response specific to GLURP antigen was the largest decline at D7 ($P = 0.0013$). The appropriate parasitological clinical response after PCR correction was 98.3% (AS + AQ) and 100% (AL). GLURP and CSP antigen-specific response levels were significantly ($p < 0.001$) high in patients with APCR respectively in the AS + AQ arm and AL arm.

The comparison of specific responses against Plasmodium antigens between the patients of Man and Bouaké suffering from malaria showed that the proportion of responders and the mean levels of antibodies specific to GLURP antigens and The total extract of Sch 07/03 was significantly ($P < 0.05$) higher in Bouaké than in Man. The results indicate that in Man the level of antibodies specific to SALSA antigen was higher in women than in men. The women of Bouaké responded more to the GLURP antigens and total extract than those of Man ($P < 0.05$). The study showed that the acquisition of the humoral immune response may be different in people of the same age living in different areas especially in younger children and by gender.

Key words: Antibody responses, treatment failures, CTA, Man, Bouaké, Cote d'Ivoire.