



HAL
open science

Analyse immuno-épidémiologique des anticorps antiparasitaires et rôle du répertoire anticorps auto-réactifs dans la protection contre le Paludisme en Côte d'Ivoire

David Koffi

► **To cite this version:**

David Koffi. Analyse immuno-épidémiologique des anticorps antiparasitaires et rôle du répertoire anticorps auto-réactifs dans la protection contre le Paludisme en Côte d'Ivoire. Immunologie. Université Félix Houphouët-Boigny (Abidjan, Côte d'Ivoire), 2017. Français. NNT: . tel-02396382

HAL Id: tel-02396382

<https://theses.hal.science/tel-02396382>

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
2015-2016

THESE

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

Spécialité : Biologie fonctionnelle et moléculaire

Numéro d'ordre
1081/2017

M. KOFFI DAVID

Analyse immuno-épidémiologique des anticorps antiparasitaires et rôle du répertoire anticorps auto-réactifs dans la protection contre le Paludisme en Côte d'Ivoire

Soutenue publiquement
le 14 Janvier 2017

Commission du jury

M. KOUASSI Kouassi Philippe	Professeur Titulaire	UFHB	Président
M. DJAMAN Allico. Joseph	Professeur Titulaire	UFHB	Directeur
M ^{me} PIED Sylviane	Directrice de Recherches	IP Lille/CNRS	coDirectrice
M. ADJA Akéré Maurice	Maître de Conférences	UFHB	Rapporteur
M. TOURE Offianan André	Maître de Recherches	IPCI	Examinateur



DÉDICACE

A

Toi la gloire Seigneur Jésus-Christ

« Avant moi, de nombreux observateurs avaient cherché sans succès à découvrir l'agent du paludisme; j'aurais échoué également si je m'étais contenté d'examiner l'air, l'eau ou le sol des localités palustres comme on l'avait fait jusqu'alors; j'ai pris comme base de mes recherches l'anatomie pathologique et l'étude in vivo du sang palustre ».

Alphonse LAVERAN

Extrait de son discours devant l'Académie des Sciences

de Stockholm lors de la remise du Prix Nobel en 1907

AVANT-PROPOS

Thèse en Co-Direction

Ce travail de thèse a été réalisé grâce à un co-financement de thèse de 15 mois obtenu auprès du programme AMRUGE-CI (Appui à la Modernisation et à la Réforme des Universités et Grande école) élaboré dans le cadre du Contrat de désendettement et développement (C2D) Côte d'Ivoire, d'un financement de 2 semaines provenant du projet Action Concertée Interpasteurienne 2012-2014 (ACIP), ensuite d'un financement de 6 Mois de la bourse CABRI 2016 de l'Université de Lille 2.

Ces financements m'ont permis d'effectuer pendant ces quatre années, un stage doctoral (2 semaines) à l'Institut Pasteur de Dakar (IPD), des alternances (5 mois) entre les équipes de l'Institut Pasteur de Cote d'Ivoire (IPCI) et l'équipe « Basic and Clinical Immunology of Parasitic Diseases » (BCIP) logé au sein du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL) à l'Institut Pasteur de Lille.

Cette thèse a été réalisée en co-direction entre l'Université Félix Houphouët Boigny (Côte Ivoire) et Le Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (Institut Pasteur de Lille, France). L'ensemble de ce travail a été réalisé sous l'encadrement scientifique du Professeur Djaman Allico Joseph (UFHB) et du Dr Sylviane Pied (CIIL) avec des apports critiques du Dr Ronald Perraut (IPD).

Je souhaitais préciser, avant d'exposer mon travail, les conditions un peu particulières dans lesquelles il a été réalisé. L'immunologie n'est pas ma spécialité première, je suis biochimiste de formation. Après plusieurs stages et workshop inter-africain, j'ai souhaité m'orienter vers l'immunologie parasitaire. Les débuts n'ont pas été très simples je l'avoue malgré les quelques brèves notions d'immunologie dispensées au cours des années universitaires précédentes. Les termes qui m'étaient familier enzyme, réaction de michaelis, métabolisme se trouvent peu à peu remplacer par répertoires immunologiques, polyclonalité, panamablot, etc. J'ai également voulu connaître les réalités inhérentes à une autre culture, un autre pays, un autre continent, ce qui m'a motivé à postuler et obtenir la bourse AMRUGE2014-2016 pour la France. Cette thèse a débuté avec la mise en place du projet ACIP-A25 2012-2014 (Action Concertée Inter-pasteurien) qui réunissait trois Instituts (Institut Pasteur de Dakar, Institut Pasteur de Madagascar et Institut Pasteur de Côte d'Ivoire) du Réseau international des Instituts Pasteur (RIIP). Le projet avait pour objectif de mettre en place à Madagascar, au Sénégal et en Côte d'Ivoire (puis au sein du réseau) un essai standardisé permettant d'analyser, de façon qualitative et quantitative, les réponses immunes humorales contre un panel d'antigènes parasitaires en utilisant la dernière génération de système de multiplexage: le MAGPIX (Luminex Corp.). Des personnes formidables ont cru en moi et m'ont aidé à poursuivre ce projet intéressant, à le mettre en place et à le mener à bien.

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma gratitude aux différents Centres de Recherche local (UFR Biosciences, Institut Pasteur de Côte d'Ivoire) et extérieurs (Institut Pasteur de Dakar et Institut Pasteur de Lille), dont les implications ont été déterminantes dans la réalisation de ce projet de recherche, à travers la mise à disposition des infrastructures, des plateformes sérologiques et protéomique pour la mise en œuvre des travaux et toute l'assistance technique et administrative de leur personnel.

Je remercie solennellement

*Monsieur **KOUMELAN Essetchi Paul**, Professeur Titulaire et Directeur de l'UFR Biosciences de l'Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY (UFHB) d'avoir accepté mon inscription en thèse unique dans votre département.*

*Madame **BRETIN-DOSSO Mireille**, Professeur Titulaire de Microbiologie à l'UFR des Sciences médicales de l'Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY (UFHB) et Directrice de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI) pour m'avoir accueilli dans cette institution dans le cadre de cette thèse.*

*Monsieur **KOUASSI Kouassi Philippe**, Professeur Titulaire au Laboratoire de Biologie Animale de l'UFR Biosciences à l'Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY (UFHB). Votre rigueur dans le travail et votre grande culture scientifique font 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 reconnaissance.*

*Monsieur **JAMBOU Ronan**, Directeur de Recherche de l'Institut Pasteur de Paris (IPP) d'avoir accepté de juger cette thèse en tant rapporteur externe. Je suis très heureux d'avoir bénéficié de vos critiques, remarques, suggestions et recommandations qui ont contribué à l'amélioration de cette thèse proposée.*

*Monsieur **ADJA Akré Maurice**, Maître de Conférence au Laboratoire de Biologie Animale, et rapporteur interne de cette thèse. Vous avez, malgré vos occupations, bien voulu juger cette thèse. Docteur Je vous remercie pour ce temps que vous avez bien voulu consacrer pour juger cette thèse.*

*Mes travaux ont été réalisés sous la codirection du Professeur **DJAMAN Allico Joseph**, Directeur du Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique de l'UFR Biosciences, Université Félix Houphouët Boigny d'Abidjan (UFHB) et chef de Département de Biochimie, Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, et Docteur **PIED Sylviane**, Directrice de Recherche CNRS/Institut Pasteur de Lille (IPL). Je leur exprime ma profonde reconnaissance pour la confiance qu'ils m'ont accordée. Leurs conseils, encouragements et disponibilités à chaque sollicitation, m'ont été d'une grande aide tout au long de la réalisation de ce travail.*

*Je remercie le Coordonnateur du projet ACIP-A25 2012-2014, Docteur **PERRAUT Ronald** de l'Institut Pasteur de Dakar (IPD), pour l'opportunité qu'il m'a donnée d'intégrer ce projet multicentrique et de bénéficier de l'ensemble des renforcements de capacités proposés. Sa patience, son ouverture d'esprit et sa rigueur dans le travail ont été pour moi des qualités qui m'ont été personnellement d'un grand appui.*

*Un remerciement particulier s'adresse aux membres de son équipe de Dakar principalement au Docteur **VARELA Marie-Louise**, pour sa disponibilité lors des « training » réalisés dans un cadre convivial et maternel.*

*Mes remerciements vont également à l'endroit de tous les autres participants au projet ACIP, en particulier Docteur **VIGAN-WOMAS Inès**, de l'Institut Pasteur de Madagascar, un grand merci pour l'assistance et les conseils avisés dont j'ai indirectement bénéficié.*

*Je remercie Docteur **PENALI Louis Koné**, Chargé de Recherches, ex Chef de l'Unité de Paludologie (UPAL) de l'IPCI, ex-Directeur du WWARN/Afrique de l'Ouest et actuel Président du Comité Nationale d'Ethique et de la Recherche en Côte d'Ivoire (CNER-CI). Merci de m'avoir accueilli à l'UPAL pour m'apprendre les fondamentaux de la Paludologie. Lors de mon passage au Sénégal, vous m'avez accueilli comme votre fils. Merci pour cette marque de sympathie.*

*Je remercie Docteur **TOURE André Offianan**, Maître de Recherches, actuel chef de l'Unité de Paludologie et Directeur intérimaire du Département de Parasitologie Mycologie de l'IPCI. Sous la responsabilité de Docteur PENALI, vous avez été l'acteur principal de mon initiation à la Paludologie, et sous vos auspices a grandi une passion pour la recherche dans ce domaine. Merci pour vos encouragements et vos conseils quand je désespérais par manque de financement pour la thèse. Merci d'avoir accepté d'être un Examineur de cette thèse. Un grand merci à toute votre équipe de chercheurs (Dr **BEOUROU Sylvain**, Dr **AKO Ako Berenger**, Dr **BONOUMIN Ira**, Dr **VANGA**, et Dr **TUO Karim**) Etudiants (**ADJI S**, **COULIBALY Baba**, **YAO Serges...**) d'Ingénieurs (**ISSIAKA Bassika**, **Madame SYLLA**, **Monsieur SOUMAHORO**), pour leur précieux soutien, les suggestions et critiques durant mon séjour à Abidjan.*

*Je remercie le Docteur **Franck REMOUE** de l'Institut Pierre Richet (IPR) de Bouaké qui m'a fourni gracieusement le peptide salivaire gSG6-P1.*

*Je remercie chaleureusement l'équipe 4 « Basic and Clinical Immunological of Parasitic Diseases » avec à sa tête le Docteur **PIED Sylviane**. Merci Dr. **PIED** de m'avoir accueilli dans votre laboratoire de référence internationale en me poussant à toujours donner le meilleur de moi-même, et aussi d'avoir fait de mon Doctorat une expérience inoubliable, riche scientifiquement et humainement. Je vous en serai toujours reconnaissant. Votre*

attention envers ma formation et celle de tout élève Africain en général est une marque de volonté répondant à un besoin essentiel pour mieux «faire reculer le Paludisme» : la formation des ressources humaines »

Je remercie votre personnel d'ingénieurs Fabien et Delphine sans lesquels cette deuxième partie de mon travail aurait été impossible. Merci à tous les stagiaires qui ont également participé d'une manière ou d'une autre à ce travail. Mes amitiés pour avoir su me supporté.

*Je remercie le Docteur **Jamal KHALIFE** du centre d'infection et d'immunité de Lille (CIIL) qui nous a fourni l'extrait de parasite de Plasmodium 3D7.*

*J'exprime ma gratitude au Pr. **Pierre-André CAZENAVE**, Professeur Emérite à l'Université Pierre et Marie Curie, Professeur Honoraire de l'Institut Pasteur de Paris pour la richesse de son savoir et sa participation infaillible à l'ensemble de mes travaux.*

Je remercie également tout le personnel administratif du CIIL pour leur contribution indiscutable et à tous les niveaux.

Cette étude n'aurait pu être effectuée sans la collaboration des structures et institutions impliquées dans le domaine de la Santé et la lutte contre le Paludisme ainsi que les populations rencontrées au sein des localités d'étude en Côte d'Ivoire. Il s'agit du Programme National de lutte contre le Paludisme (PNLP), du personnel des centres de santé Anoukoua-kouté, Centre de santé petit Paris, et centre de santé urbain de "Libreville" respectivement d'Abobo, Korhogo et Man, des autorités traditionnelles et communautés de Anoukoua-kouté Abobo.

Je ne saurais terminer sans remercier infiniment ma grande famille en Christ, ma famille biologique, ma femme chérie et mes proches pour leur soutien et assistance sans faille depuis le début de ce travail jusqu'à maintenant.

Ce travail vous est dédié. Que Dieu vous bénisse !!!!

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE	<i>I</i>
AVANT-PROPOS	<i>IV</i>
REMERCIEMENTS	<i>VII</i>
TABLE DES MATIÈRES	<i>XI</i>
Liste des abréviations	<i>XVI</i>
Liste des figures	<i>XXI</i>
Liste des tableaux	<i>XXV</i>
INTRODUCTION	<i>1</i>
<i>I. PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DE LA THESE</i>	<i>5</i>
I.1. PROBLÉMATIQUE.....	<i>5</i>
I.2. OBJECTIF GENERAL	<i>7</i>
I.3. OBJECTIFS SPECIFIQUES.....	<i>7</i>
GENERALITES	<i>8</i>
<i>I. EPIDEMIOLOGIE ET PATHOLOGIE DU PALUDISME</i>	<i>9</i>
I.1. DEFINITION ET HISTORIQUE DU PALUDISME.....	<i>9</i>
<i>I.1.1. Définition</i>	<i>9</i>
<i>I.1.2. Historique</i>	<i>9</i>
<i>I.1.3. Paludisme dans le monde</i>	<i>10</i>
<i>I.1.4. Paludisme en Côte d'Ivoire</i>	<i>12</i>
<i>I.1.5. Coût socio-économique du paludisme</i>	<i>14</i>
I.2. HOTES ET BIOLOGIE DES PLASMODIES	<i>14</i>
I.2.1. Agents pathogènes.....	<i>14</i>
I.2.2 Vecteurs : <i>Anopheles spp (Figure 3)</i>	<i>15</i>
I.2.3. Cycle évolutif du parasite.....	<i>17</i>
I.2.3.1. Phase sexuée ou sporogonie chez l'anophèle	<i>17</i>
I.2.3.2. Phase asexuée ou schizogonie chez l'homme	<i>17</i>
I.2.3.3. Antigènes de surface de <i>Plasmodium falciparum</i>	<i>20</i>
I.3. MANIFESTATIONS CLINIQUES ET PATHOLOGIE DE L'INFECTION PALUSTRE	<i>27</i>
I.3.1 diagnostic biologique	<i>27</i>
I.3.2. Le portage asymptomatique	<i>28</i>

1.3.3. Accès palustre simple	28
1.3.4. Formes graves du Paludisme	29
1.3.4.1. Définition et critères du paludisme grave	29
II. IMMUNITE ET PALUDISME.....	32
II.1. NOTION DE PREMUNITION	32
II.2. IMMUNITE INNEE.....	32
II.3. IMMUNITE ADAPTATIVE	33
II.3.1. Immunité à médiation cellulaire	33
II.3.2. Immunité à médiation humorale	34
II.3.3. Les anticorps marqueurs de l'immunité dans l'infection palustre	34
II.4. AUTO-IMMUNITE ET REPERTOIRE AUTO-ANTICORPS	37
II.4.1. Rôle des auto-anticorps	37
II.4.2. Auto-immunité et Paludisme	38
III. MOYENS DE LUTTE ET DE CONTROLE DU PALUDISME.....	39
III.1. LUTTE CONTRE LE PARASITE.....	39
III.1.1. Chimio-prévention	39
III.1.3. Traitement curatif ou Chimiothérapie	40
III.2. LUTTE CONTRE LES VECTEURS.....	41
III.3. LES STRATEGIES VACCINALES POTENTIELLES	41
III.4. SERO-SURVEILLANCE DANS LES PROGRAMMES DE LUTTE CONTRE LE PALUDISME.....	44
III.4.1. Antigènes potentiels pour la surveillance de <i>P. falciparum</i>	45
III.4.2. Plateformes de sérologie pour le contrôle du paludisme	46
MATERIEL ET METHODES	50
I- SITE D'ETUDE.....	51
I.1. CONTEXTE GEOGRAPHIQUE, SITES D'ETUDE ET DE RECRUTEMENT.....	51
I.1.1 Abobo.....	51
I.1.2 Korhogo.....	51
I.1.3 Man.....	53
II. MATERIEL.....	54
II.1. MATERIEL BIOLOGIQUE	54
II.2. MATERIEL TECHNIQUE	54
III- METHODES.....	56

III.1. DESCRIPTION DES COHORTES ET PROCEDURE DE RECRUTEMENT	56
<i>III.1.1. Patients avec un paludisme simple</i>	56
<i>III.1.2. Patients souffrant de Paludisme grave</i>	Erreur ! Signet non défini.
<i>III.1.3. Porteurs asymptomatiques et contrôles endémiques</i>	56
III.2. PRELEVEMENTS SANGUIN ET EVALUATION DE LA PARASITEMIE	57
III.3. CONSIDERATION ETHIQUE	57
III.4. DOSAGES IMMUNOLOGIQUES	57
<i>III.4.1. Dosages immunologiques sur la plateforme de Dakar</i>	58
<i>III.4.1.1 Culture parasitaire et préparation des extraits parasitaires de la souche de</i> <i>référence africaine 07/03</i>	58
<i>III.4.1.2. Test immuno-enzymatique ELISA</i>	59
<i>III.4.1.3. Dosage sérologique multi-antigéniques par “multiplexage”</i>	62
<i>III.4.2. Dosages immunologiques sur la plateforme du CIIL</i>	65
<i>III.4.2.1. Technique ELISA avec système biotinylé</i>	66
<i>III.4.2.2. Quantification et standardisation des immuno-réactivités contre les antigènes</i> <i>cérébraux : la méthode « Panama-Blot »</i>	67
III.5. ANALYSES STATISTIQUES	70
<i>III.5.1. Données sur le multiplex-magpix</i>	70
<i>III.5.2. Données sur l’immunoblot semi-quantitatif « panama blot »</i>	70
RÉSULTATS	71
I. SEROLOGIE MULTIPLEX ET SUIVI DE L’INFECTION PALUSTRE EN COTE D’IVOIRE	72
I.1. ANALYSE DU PROFIL D’ANTICORPS AU COURS DU PALUDISME SYMPTOMATIQUE SUR TROIS SITES SENTINELLES DE SURVEILLANCE DU PALUDISME EN COTE D’IVOIRE	72
<i>I.1.1. Caractéristiques de l’échantillon d’étude</i>	72
<i>I.1.2. Comparaison de la Prévalence des réponses anticorps spécifiques anti-Plasmodium</i> <i>(IgG) entre les différents sites étudiés</i>	74
<i>I.1.3. Détermination des taux d’Ac spécifiques anti-Plasmodium dans les trois sites</i>	74
<i>I.1.4. Corrélation entre les réponses anticorps contre les diverses cibles et relation avec</i> <i>l’âge</i>	77
<i>I.1.5. Relation entre les niveaux de réponses IgG antiparasitaires et les critères clinico-</i> <i>biologiques des patients</i>	79

I.2. UTILISATION DU SYSTEME MULTIPLEX MAGPIX POUR ANALYSER LE SUIVI LONGITUDINAL DE L'IMPACT DES CHANGEMENTS EPIDEMIOLOGIQUES A ABOBO SUR LES REPONSES AC ANTIPARASITAIRES.	82
I.2.1. <i>Analyses des données cliniques sur le Paludisme dans le district d'Abobo de 2010 à 2013</i>	82
I.2.2. <i>Effectifs et caractéristiques des patients analysés de 2010 à 2013</i>	82
I.2.3. <i>Caractéristiques des réponses Anticorps (Ac) antiparasitaires de 2010 à 2013</i>	86
II. AUTO-REACTIVITE DES IMMUNOGLOBULINES G DANS LE PALUDISME.....	89
II.1. AUTO-REACTIVITE ET PROTECTION CONTRE LE PALUDISME	89
II.1.1. <i>Caractéristiques de la cohorte d'étude</i>	89
II.1.5. <i>Analyse du répertoire Anticorps auto-réactifs chez les malades et les asymptomatiques</i>	95
II.1.6. <i>Profil électrophorétique des autoréactivités IgG chez les asymptomatiques</i>	99
II.1.7. <i>Analyse qualitative nanoLC orbitrap ms/ms et identification de protéines majoritaires de la section 11</i>	103
II.1.8. <i>Relation entre anticorps spécifiques du parasite et les auto-anticorps chez les asymptomatiques et les malades</i>	107
II.1.9. <i>Analyse des réponses IgG contre le répertoire antigénique de Plasmodium selon les différents groupes étudiés</i>	110
II.2. ANTICORPS AUTO-REACTIFS IGG DANS DIFFERENTS FOYER DE TRANSMISSION DU PALUDISME EN COTE D'IVOIRE.....	113
II.2.1. <i>Profil de réactivité du répertoire auto-anticorps IgG dirigé contre les protéines d'extrait de cerveau au niveau des trois sites sentinelles</i>	113
II.2.2. <i>Intensité des réponses du répertoire auto-anticorps entre les sites</i>	116
II.2.3. <i>Relation entre réponse IgG auto-réactives et réponses spécifiques antiparasitaires chez les malades en fonction des trois sites sentinelles</i>	118
II.2.4. <i>Spécificité de réponses auto-anticorps qui différencient les trois sites</i>	118
DISCUSSION.....	122
CONCLUSION & PERSPECTIVES.....	131
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	134
ANNEXES.....	

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABJ+ :	contrôle positif (pool de sérums d'individus vivant à Abidjan)
ABJ- :	contrôle négatif (pool de sérums d'individus vivant à Abidjan)
ABTS :	2,2'-azino-bis 3 d'acide éthylbenzothiazoline 6-sulfonique
Ac :	anticorps
ACIP :	action concerté interpasteurienne
ADCI:	antibody-dependent cellular inhibition
ADRB:	antibody-dependent respiratory burst
ADN:	acide désoxyribonucléique
Ag :	antigène
AgT :	extrait totale de schizonte
AMA1 :	apical membrane antigen 1
AMRUGE-CI :	appui à la modernisation et à la réforme des universités et grande école de Côte d'Ivoire
ANA:	anticorps anti-nucléaires
Anti-C:	anti-cardiolipides
Anti-PL :	anti-phospholipides
AQ :	amodiaquine
ASYMPTO:	asymptomatic
BCIP:	basic and clinical immunology of parasitic diseases
BSA:	bovine serum albumin
CABRI :	commission d'attribution des bourses relation internationale université Lille 2
CI :	complexe immun
CIIL :	centre d'infection et d'immunité de Lille
CM :	cerebral malaria
CNER :	comité nationale d'éthique et de recherche
CO2 :	dioxyde de carbone
CRP :	protéine C-réactive
CSP :	Protéine circumsporozoite
CV :	coefficient de variation
DHA :	dihydroartémisinine
DO :	densité optique
EDS CI :	enquête démographique de santé en Côte d'Ivoire
EC :	endemic control

EIR ou TIE :	taux d'inoculation entomologique
ELISA :	enzyme-linked immunosorbent assay
EPP :	école primaire public
EUIC :	naifs européens
Fab :	fragment antigen binding
FS :	frottis sanguin
FSU-COM :	formation de santé urbaine à base communautaire
GE:	Goutte Epaisse
GLURP:	glutamate-rich protein
GM-CSF:	granulocyte colony stimulating factor
gSG6:	salivary protein of <i>Anopheles gambiae</i>
GPARC:	global plan for artemisinin résistance containment
GR :	globule rouge
GRp :	globule rouge parasité
Hb :	hémoglobine
Ht :	hématocrite
IFN- γ :	inteferon gamma
IgG :	immunoglobuline G
IgM :	immunoglobuline M
IL :	interleukine
IPCI :	institut pasteur de Côte d'Ivoire
IPD :	institut pasteur de Dakar
IPP :	institut pasteur de Paris
Jo :	jour zéro
J-C :	Jésus Christ
kDa:	kilo dalton
Km:	kilomètre
LSA-1:	liver stage antigen-1
Ly B:	lymphocyte B
MII :	moustiquaire imprégnée d'insecticide
MILDA :	moustiquaire imprégnée d'insecticide à longue durée d'action
MM :	mild malaria
MSP :	merozoite surface protein
nanoLC :	nanoscale liquid chromatography
ms/ms :	tandem mass spectrometry.

NaCl:	chlorure de sodium
NBT/BCIP:	nitrobleu tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
NK :	natural killer
O+ :	groupe sanguin O positif
OMS :	organisation mondiale de la santé
P3M :	plateforme technologique protéomique et peptides modifiés
PAGE :	électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PBS :	phosphate buffer saline
PBST :	tampon phosphate buffer saline et Tween 20
ACP :	analyse en composante principale
PCR :	réaction en chaîne de polymérisation
PCT :	parasite clearance
PEV :	programme élargi vaccination
PfEMP-1 :	<i>Plasmodium. falciparum</i> erythrocyte membrane protein-1
PfGPI :	<i>Plasmodium falciparum</i> glycosyl phosphatidyl Inositol
pH :	potentiel d'hydrogène
plq:	plaquettes
PmCSP :	protéine circumsporozoite de <i>Plasmodium malariae</i>
PNLP:	programme nationale de lutte contre le paludisme
PPQ :	pipéraquline
PRR :	pattern recognition receptors
PVE :	paludisme viscéral évolutif
rDO :	ratio de densité optique
rho :	coefficient de corrélation
SDS:	sodium dodecyl sulfate
SHI:	sérum hyper immun
SNCM:	severe not cerebral malaria
SP:	sulfadoxine-pyriméthamine
SALSA:	sporozoïtes and liver stage antigen
SUB1 :	protéase de la subtilisine
TDR :	test de diagnostic rapide
Th1:	lymphocyte T helper
TLR:	toll like receptor
TMB:	tétraméthylbenzylidine
TNF α :	tumor necrosis factor alpha

TPI :	traitement Préventif intermittent
TRAP :	thrombospondine protéine adhésive
T $\gamma\delta$:	lymphocyte T gamma delta
UPAL :	unité de paludologie
VIH :	virus de l'immunodéficience acquise
VPE :	vaccin pré-érythrocytaire
VSA :	variant surface antigen

LISTE DES FIGURES

	Pages
Figure 1: Répartition du paludisme dans le monde	11
Figure 2: Faciès éco-climatiques et réseau hydrographique de la Côte d'Ivoire.....	13
Figure 3: Distribution globale des vecteurs (Anophèles) responsables du paludisme.....	16
Figure 4: Cycle de développement de <i>P. falciparum</i>	18
Figure 5: Représentation schématique de CSP et du vaccin RTS, S. Adapté de Crompton et al, 2010	21
Figure 6: Représentation schématique du gène des différents fragments de MSP1 de <i>P.</i> <i>falciparum</i>	23
Figure 7: Formation des différents fragments de MSP1 au cours du cycle sanguin de <i>P.</i> <i>falciparum</i>	23
Figure 8: Représentation schématique d'AMA1	26
Figure 9: Rôle des cellules effectrices et des cytokines dans l'immunité contre les stades sanguins de <i>P. falciparum</i>	36
Figure 10: Représentation schématique des antigènes candidats vaccins.....	43
Figure 11: Différences entre les techniques sérologiques	47
Figure 12: Localisation des sites d'étude	52
Figure 13: Dispositif Magpix : a) petit matériel utilisé pour effectuer des test MBA (Multiple- Bead Assay), b) billes au fond du puits, c) appareil magpix et écran ordinateur, d) Sortie de l'écran de Magpix® avec le logiciel x-ponent 4.1.....	55
Figure 14: Principales étapes du dosage d'anticorps sériques par ELISA	60
Figure 15: Stratégie "panamablot" avec dispositif cassette miniblott, membrane de nitrocellulose, pics électrophorétiques après analyse par le logiciel IGOR (Wavemetrics, lake Oswego, OR).....	69
Figure 16: Analyse des réponses humorales (multiplex magpix et Ag total de la souche 07/03) et parasitémie à l'inclusion chez 94 patients consultant dans 3 sites sentinelles de la Côte d'Ivoire	76
Figure 17: Analyse des niveaux de réponse immune humorale en fonction des temps de clairance parasitaire; rapide (< 24 h) et lente (> 24 h) chez l'ensemble des malades traités par Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine (CTA).....	80
Figure 18: La répartition des densités parasitaires entre les individus de clairance rapide (< 24 h) et lente (> 24 h) au niveau des sites étudiés représenté par des barre à moustache a savoir korhogo (gris foncé) Man et Abobo (gris clair) et l'ensemble des sites (noir)	81
Figure 19: Profil de l'incidence du paludisme et des mesures de lutte enregistrées sur Abobo de 2010- 2013.....	83

Figure 20: a) Répartition des âges et b) des densités parasitaires des patients par année	85
Figure 21: Profils de réponse anticorps dirigées respectivement contre a) extrait de schizonte, b) MSP4, c) MSP1, d) PF13 de <i>P. falciparum</i> de 2010 à 2013, en fonction des tranches d'âge.....	88
Figure 22: Concentration totale des immunoglobulines IgM et IgG en fonction des groupes étudiés (asymptomatique; paludisme simple et endémique contrôle).....	92
Figure 23: Profil de réponse IgG et sous-classes (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4) dirigé contre l'extrait parasitaire 3D7	93
Figure 24: Profil de réponse IgG et sous-classes (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4) dirigé contre l'extrait de cerveau humain (Novus®)	94
Figure 25: a) Immunoblot de 2 à 3 individus pris au hasard dans les groupes respectifs de malade, asymptomatique et contrôle	96
Figure 26: a) Pourcentage des variances des différents facteurs de l'analyse en composante principale (ACP) b) Distribution des groupes étudiés sur l'axe-1 et -2 de l'analyse en composante principale (ACP)	97
Figure 27: Intensité de réponse du répertoire auto-anticorps traduite par le facteur 1 de l'analyse en composante principale (ACP) au niveau des groupes étudiés	98
Figure 28: Profil électrophorétique des réactivités IgG sériques de porteurs asymptomatiques et du standard, dirigées contre les protéines du cerveau.	100
Figure 29: Mise en évidence de la bande de haute réactivité chez les porteurs asymptomatiques.....	101
Figure 30: Comparaison de l'intensité de réactivité IgG anti-protéines de l'extrait de cerveau au niveau de la section 11 entre les groupes étudiés.....	102
Figure 31: Localisation de la bande d'intérêt (section 11).	104
Figure 32: Mise en évidence par le logiciel STRING de réseaux protéiques entre les différentes protéines majoritaires sélectionnées de la bande 11	106
Figure 33: Répartition des individus asymptomatiques et malades par rapport aux réponses IgG auto-réactive et réponse IgG antiparasitaire 3D7.....	108
Figure 34: a) Prévalence d'individu répondeurs aux Ag de Plasmodium chez l'ensemble des participants b) Nombre d'antigènes parasitaires reconnus par individu chez les porteurs asymptomatiques et les malades	111
Figure 35: Profil de réponses anticorps IgG dirigés contre les Ag de Plasmodium testé au multiplex magpix entre les porteurs asymptomatiques et les malades	112
Figure 36: a) Immunoblot -1D comportant le répertoire de réponse auto-anticorps de 2 individus par site. b) Représentation du nombre de bandes reconnues par les IgG	

sériques des patients vivant à Abobo, Korhogo, Man et Naifs (non immun) obtenu par immunblot. c) Proportion de patients sur chaque site en fonction du nombre de bandes reconnus par les IgG plasmatiques. Le nombre de bandes reconnues a été catégorisé dans les intervalles suivants : 0-4, 5-9 et > 10 115

Figure 37: a) Représentation dans l'espace des patients sur les axes-1 et -2 de l'analyse en composante principale (ACP). b) Distribution de l'intensité de réactivité représentée par la (ACP-1) selon les sites sentinelles 117

Figure 38: Répartition des individus des sites sentinelles en fonction de leurs réponses auto-réactive IgG et réponse IgG anti-Plasmodium 3D7 119

Figure 39: Différence des réponses anticorps anti-gSG6-P1 au niveau des groupes sélectionnés "beta" et "μ" 120

Figure 40: Différence de réponses IgG auto-réactives entre les sites sentinelles 121

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Critères cliniques de paludisme grave de l’OMS en 2000	30
Tableau II: Critères biologiques de paludisme grave de l’OMS en 2000.....	31
Tableau III: Applications potentielles de la séro-surveillance.....	Erreur ! Signet non défini.
Tableau IV: Avantages et inconvénients des différentes plateformes pour la séro-surveillance.....	48
Tableau V: Séquences des 8 peptides utilisés dans l’analyse multiplex.....	63
Tableau VI: Protéines recombinantes utilisées dans l’analyse multiplex	64
Tableau VII: Données générales du sous-groupe d’étude	73
Tableau VIII: Prévalence des réponses IgG des patients sur les sites étudiés	75
Tableau IX: Corrélation entre les réponses Ac spécifiques des Ag parasitaires et l’âge chez les patients symptomatiques.....	78
Tableau X : Caractéristiques des patients recrutés à Abobo (2010 à 2013)	84
Tableau XI: Comparaisons diverses des niveaux d’Anticorps chez les patients à Abobo année par année.....	87
Tableau XII: Caractéristiques de la cohorte étudiée	90
Tableau XIII: Candidats antigéniques de l’extrait de cerveau obtenu du spectre ms/ms de la bande (section) 11 analysé à l’Orbitrap Q Exactive.....	105
Tableau XIV: Comparaison des proportions des individus asymptomatiques et malades dans les groupes α , β , γ et μ	109
Tableau XV: Sérologie IgG et IgM des patients au niveau de chaque site sentinelle	114
Tableau XVI: Distribution des individus par sites en fonction des sous-groupes définis	120

INTRODUCTION

Le paludisme reste la maladie parasitaire la plus importante au niveau mondial, c'est une menace majeure responsable d'environ 429.000 décès en 2015 (OMS, 2015). L'Afrique est le continent le plus touché avec près de 90% de sa population à risque. Au cours des dix dernières années, de grands changements ont été liés à des avancées majeures réalisées dans le domaine de la prévention, du diagnostic et du traitement du paludisme, fruit d'une augmentation massive des investissements dans la lutte contre le paludisme (OMS, 2015). Toutefois, étant donné la complexité de l'éco-biologie du paludisme tels que le climat, la végétation, l'hydrographie, l'anthropisation, et les comportements humains, ainsi que la chimiorésistance du parasite, tous ces éléments modifient considérablement les facteurs de risque jouant un rôle supplémentaire dans le changement de situation dans certaines régions. (Ariey, 2014; Raeisi *et al.*, 2014). Dans de nombreux pays (Maroc, Turkménistan, Argentine, Turquie...), les actions de lutte initiées par les Programmes Nationaux de Lutte contre le Paludisme (PNLP) ont permis de réduire la transmission du paludisme jusqu'à des niveaux proches de l'élimination (Shamuradova *et al.*, 2012; Dhimal *et al.*, 2014; Chihanga *et al.*, 2016). Par conséquent, les niveaux des taux de morbidité et de mortalité ainsi que l'évaluation de l'intensité de l'exposition aux vecteurs deviennent de plus en plus difficiles à mesurer et vont manquer de précision dans beaucoup de régions anciennement endémiques, comme critères de surveillance de la transmission et du risque de la maladie. En effet, ces paramètres entomologiques classiques (Taux d'Inoculation Entomologique, TIE) et parasitologiques (détection des infections par la microscopie ou par les Tests de Diagnostic Rapide, TDR) exigeront de très larges cohortes pour évaluer le niveau de transmission avec les conséquences nécessaires en termes de moyens financiers et de temps. Il est nécessaire de développer des marqueurs sensibles d'exposition au *Plasmodium sp.*, outils indispensables pour suivre les progrès de la lutte, les changements dans le niveau de transmission ou d'exposition et déterminer le risque individuel d'accès clinique dans les populations vivant ces changements épidémiologiques. Le suivi des changements dans l'intensité de la transmission du paludisme et de la prévalence de la maladie grâce à la surveillance permettra aux autorités de santé de planifier et d'évaluer les divers programmes de lutte et de contrôle de la maladie.

L'agent responsable du paludisme, un parasite protozoaire du genre *Plasmodium*, a un cycle complexe caractérisé par une forte multiplication asexuée chez l'Homme au niveau érythrocytaire responsable des symptômes observés comme la fièvre, l'anémie, qui peuvent aboutir à une insuffisance fonctionnelle d'organes, souvent grave et mortelle dans le cas de *Plasmodium falciparum*. Les enfants souffrent le plus de la morbidité et de la mortalité palustre puisque l'immunité clinique au paludisme prend des années à se développer, augmentant avec l'âge et la durée d'exposition (Beadle *et al.*, 1995; Doolan *et al.*, 2009). La réponse immune peut être considérée à la fois comme une signature de l'infection et peut contribuer à la protection contre la

maladie. Les anticorps (Ac) antipalustres qui apparaissent chez le malade ne reflètent souvent pas l'importance de la charge parasitaire puisqu'ils persistent longtemps après la guérison. Les réponses Ac ne sont que des témoins de l'infection pouvant être utilisés comme marqueurs de surveillance de la transmission du paludisme **(Drakeley & Cook, 2009)**.

La séro-surveillance est basée sur l'utilisation d'anticorps spécifiques au genre *Plasmodium* comme indicateurs pour l'exposition, la transmission et l'immunité antipalustre. Cet outil a un important potentiel pour contribuer à l'efficacité de la lutte contre le paludisme et le suivi de son programme d'élimination. En effet les anticorps sont des marqueurs très sensibles de l'exposition du paludisme au niveau de la population dans des contextes de faible transmission et reflètent l'exposition cumulée sur une période de temps, ce qui est utile dans les zones avec une transmission très saisonnière **(Cook et al., 2011)**. Plusieurs études ont analysé les réponses anticorps aux protéines recombinantes de *Plasmodium sp.* ou aux peptides salivaires de l'anophèle (gSG6-P1), associées à l'exposition au parasite, par la technique ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) **(Orlandi-Pradines et al., 2007; Fowkes et al., 2010; Badu et al., 2012)**. Cependant, l'ELISA est une technique sérologique limitée à la détection d'un seul antigène (Ag) par série de test et qui devient coûteuse et fastidieuse dans le cadre de la quantification de marqueurs multi-antigéniques de plus en plus nécessaires aux analyses immuno-épidémiologiques avancées **(Corran et al., 2007; Baum et al., 2013; Bretscher et al., 2013)**. Un certain nombre de plateformes ou méthodes sérologiques multiplex sont actuellement mis en place pour des applications opérationnelles des politiques de séro-surveillance du paludisme **(Fouda et al., 2006; Ambrosino et al., 2010; Kerkhof et al., 2015)**. L'immunité acquise contre le paludisme peut contrôler les stades de multiplication sanguins du parasite, ce qui entraîne des densités parasitaires plus faibles et l'atténuation de symptômes fébriles **(Marsh & Kinyanjui, 2006; Langhorne et al., 2008; King et al., 2015)**. Cette immunité se met en place avec l'âge et constitue l'immunité "anti-maladie" qui caractérise en partie la forme dite asymptomatique. Le portage asymptomatique des parasites correspond ainsi à un contrôle de la prolifération des parasites et à celui des signes cliniques induits par la schizogonie sanguine. Outre les macrophages, les monocytes, les lymphocytes (NK) « Natural Killer » ... etc, les anticorps se sont révélés être des médiateurs importants de cette immunité au stade sanguin **(Akpogheneta et al., 2008; Bejon et al., 2009; White et al. 2014)**. Cependant, les mécanismes immunologiques et l'ensemble des effecteurs humoraux associés à la protection contre le paludisme ne sont pas entièrement élucidés. Comprendre les mécanismes de passage de l'état asymptomatique à celui de malade est un enjeu capital pour le développement d'un vaccin, mais aussi pour la santé publique. Il a été montré qu'une infection plasmodiale induit une hypergammaglobulinémie, mais seule une très faible partie des immunoglobulines reconnaissent spécifiquement des antigènes du parasite alors qu'une fraction plus importante est dirigée contre les antigènes de l'hôte. Il y a, par exemple,

les anticorps anti-phospholipides (PL), anti-cardiolipides (CL), anti-nucléaires, anti-érythrocyte, anti-muscle lisse, etc., qui sont fortement associés à l'infection plasmodiale (**Facer & Agiostratidou, 1994; Consigny et al., 2002**). A l'inverse, les auto-anticorps produits par des individus infectés par *Plasmodium* peuvent exercer des effets protecteurs contre certaines maladies auto-immunes tel que le Lupus érythémateux (**Daniel-Ribeiro, 2000a; Daniel-Ribeiro & Zanini, 2000b; Sotgiu et al. 2008**).

Au côté de la réponse spécifique antiparasitaire, plusieurs mécanismes nécessaires au maintien et à l'homéostasie fonctionnelle du système immunitaire, peuvent contribuer à la production d'auto-anticorps dans le paludisme. Ceux-ci incluent des anticorps résultant de l'activation polyclonale des lymphocytes B par les mitogènes du parasite, (**Montes et al., 2007**) la stimulation des cellules B par mimétisme moléculaire des antigènes du parasite (**Adib-Conquy et al., 1993; Semblat et al., 2006**), une dérégulation des fonctions des cellules immunitaires B (**Weiss et al., 2009**). Cependant, l'implication de l'auto-immunité, dans la pathogenèse du paludisme ou dans la protection des formes asymptomatiques est actuellement méconnue. Néanmoins l'existence de deux types de réponse, parasitaire et auto-immune, semble être un acteur important de l'interaction hôte-parasite déterminante dans le devenir de la pathologie. Il est donc d'une importance cruciale d'explorer l'ensemble du répertoire de réactivité des anticorps pour comprendre la complexité de la réponse immunitaire humorale associée à l'infection plasmodiale.

Cette Thèse vise d'une part, à analyser l'application épidémiologique des mesures de niveau d'anticorps anti-*Plasmodium* dans les variations de l'intensité de la transmission, et d'autre part à analyser la contribution du répertoire anticorps auto-réactifs dans la protection clinique du paludisme, mais aussi comme potentiel candidat pour la séro-surveillance en Côte d' Ivoire.

I. Problématique et Objectifs de la Thèse

I.1. Problématique

Deux constats majeurs nous ont poussé à réaliser ce travail :

a) Le déploiement coordonné de mesures de lutte contre le paludisme, l'augmentation des moyens et les efforts pour en augmenter la couverture ont entraîné des changements importants de l'épidémiologie du paludisme dans de nombreux pays (Murray *et al.*, 2012; OMS, 2015). Cependant, un effet rebond est observé depuis 2011 dans plusieurs pays (OMS, 2011). Les études menées dans les villages pilotes de Dielmo et de Ndiop au Sénégal ont montré que l'effet rebond touche deux classes d'âge précédemment protégées: les adultes et les enfants âgés de plus de 10 ans (Trape *et al.*, 2011). Ceci suggère fortement que la baisse d'exposition aux parasites a induit une baisse de l'immunité clinique protectrice acquise. A l'heure actuelle, il n'y a pas de marqueur sérologique associé à cette protection. On sait peu de chose des conséquences des changements épidémiologiques sur l'immunité et l'infection. Il est nécessaire de développer des outils indispensables pour suivre les progrès de la lutte, les changements dans le niveau de transmission ou d'exposition et déterminer le risque individuel d'accès clinique dans les populations soumises aux changements épidémiologiques. La réponse immune, en particulier celle humorale (réponse anticorps) peut être considérée à la fois comme une signature de l'infection et peut contribuer à la protection contre la maladie. Dans cette optique il est nécessaire d'intégrer une analyse des réponses immunitaires anticorps contre *P. falciparum*, mais aussi contre *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae* qui sont présents dans de nombreuses régions du monde et interagissent avec *P. falciparum*. Il est, par ailleurs, reconnu qu'aucune réponse anticorps contre un antigène plasmodial unique ne permet de rendre compte de l'exposition au parasite ou de l'acquisition d'une immunité protectrice. Les "marqueurs" envisagés doivent donc être multi-antigéniques. Pour ce faire, de nouvelles stratégies telles que des analyses multiplex à base de billes fluorescentes développées par Luminex Corporation[®] seront utilisées. Ces instruments permettent de tester simultanément plusieurs marqueurs sérologiques, fournissant une capacité accrue pour une surveillance précise de l'immunité contre le paludisme.

b) Lors d'une infection à *P. falciparum*, une faible fraction des anticorps induits reconnaît les antigènes du parasite, les autres anticorps étant dirigés contre les composants du soi ou des antigènes de spécificités inconnues, présents dans les tissus et organes de l'hôte. Cependant, on ne sait pas si les auto-anticorps jouent un rôle dans l'immunité protectrice ou contribuent au développement de complications associées aux formes sévères du paludisme (anémie, ou neuropaludisme). Contrairement aux anticorps spécifiques du parasite, il existe également peu de

données de l'impact des changements épidémiologiques du paludisme sur ces réponses auto-réactives bien qu'elles soient aussi tributaires de la génétique de l'hôte.

Il a été montré que les patients atteints de neuropaludisme peuvent développer une forte réponse d'anticorps à deux auto-antigènes du cerveau, respectivement l'alpha-2-spectrine décrite au Gabon, en Afrique (**Guiyedi et al., 2007**) et la bêta-tubuline-3 observée dans le Gondia, état de Maharashtra, en Inde (**Bansal et al., 2009**). Dans ces deux études, les auto-anticorps ont été corrélés positivement avec l'augmentation des concentrations de certaines cytokines qui avaient été montrées associées au neuropaludisme.

Plus récemment, l'analyse comparative du répertoire des auto-anticorps chez des porteurs asymptomatiques et des patients développant un accès palustre simple vivant en zone d'endémie a clairement montré une association entre auto-réactivité et protection contre la maladie sans pourtant caractériser les antigènes cibles de ces auto-anticorps (**Guiyedi et al., 2015**). Ainsi, ce travail a pour but de contribuer à mieux comprendre la relation entre les réponses anti-Plasmodium et auto-réactive, notamment la part attribuable de l'auto-réactivité des immunoglobulines G dans la protection du paludisme.

Par conséquent, la deuxième partie de ce travail de thèse porte sur une analyse globale du répertoire des auto-anticorps dirigés contre des auto-antigènes provenant d'un extrait de cerveau humain par la méthode de Panama-blot utilisée pour mieux caractériser la réponse auto-réactive protectrice. Il s'agit d'une méthode d'Immunoblot quantitative, permettant d'avoir la réactivité globale des anticorps sériques avec un grand nombre d'antigènes issus d'extrait d'organes (**Nobrega et al., 1993; Haury et al., 1994**). L'un des avantages de cette méthode est qu'elle permet d'individualiser et d'identifier des bandes protéiques (protéines du cerveau) qui présentent le plus de réactivité avec les immunoglobulines plasmatiques quand on l'associe à une procédure appropriée d'analyse statistique.

La technique Immunoblot décrite dans ce travail ne vise, cependant, pas à distinguer les répertoires d'anticorps auto-réactifs sur la base de spécificité d'épitopes, mais est utilisée pour comparer la nature des répertoires d'anticorps entre les groupes d'individus. Ainsi, le choix de l'extrait de cerveau (source auto-antigènes) marque le reflet de l'auto-réactivité entre les groupes étudiés.

I.2. Objectif général

Analyser le répertoire antigénique des réponses anticorps (Ac) contre un ensemble d'Ag de *Plasmodium* et rechercher d'éventuelles corrélations avec les changements épidémiologiques. En parallèle on étudiera le rôle des anticorps auto-réactifs dans la protection clinique du paludisme en Côte d'Ivoire.

I.3. Objectifs spécifiques

- ❖ La première partie de l'étude vise à valoriser l'outil sérologie-multiplex dans le suivi du paludisme en Côte d'Ivoire. Les objectifs ont été :
 1. Comparer les profils de réponses anticorps spécifiques contre *Plasmodium* entre foyers de transmission différents (Man, Korhogo, Abobo) au cours d'étude concernant le paludisme symptomatique
 2. Evaluer la relation entre la réponse IgG et les paramètres épidémio-cliniques disponibles des patients
 3. Déterminer les réponses anticorps spécifiques de suivi sur 3 ans à Abobo

- ❖ La seconde partie du travail permet une analyse de l'implication de l'auto-réactivité dans la protection contre le paludisme. Les objectifs spécifiques sont de:
 1. Caractériser la réponse auto-réactive protectrice au cours de l'infection par *P. falciparum* grâce à une analyse comparative du répertoire antigénique des IgG auto-réactifs de patients symptomatiques par rapport à celui d'individus asymptomatiques
 2. Déterminer la relation entre réponse anti-Plasmodium et réponse auto-réactive dans la protection clinique des formes asymptomatiques
 3. Déterminer l'influence du niveau de la transmission sur ces réponses anticorps auto-réactives

GENERALITES

I. Epidémiologie et pathologie du paludisme

I.1. Définition et historique du paludisme

I.1.1. Définition

Le Paludisme ou Malaria est une érythrocytopathie fébrile hémolysante causée par le développement et la multiplication dans le foie puis dans les globules rouges d'un hématozoaire du genre *Plasmodium*, transmis surtout à l'Homme par la piqûre d'un moustique femelle du genre *Anopheles* (OMS, 2016).

I.1.2. Historique

C'est une maladie très ancienne dont l'Homme préhistorique a dû en souffrir (Desowitz, 1991). On rapporte l'existence de fièvres mortelles, que l'on pense causées par le paludisme, vers 6000 ou 5500 av. J-C. En Inde, des textes datant de 1600 av. J-C., et ceux d'Hippocrate, du Vème siècle av. J-C., en font mention. Dans le Nouveau Monde, le quinquina ou *Cinchona calisaya* Wedd, un arbre d'Amérique du Sud, était utilisé sous forme de décoction d'écorce pour traiter le paludisme. L'histoire scientifique du paludisme commence au XIXème siècle avec les découvertes de Laveran.

En 1880, Charles Louis Alphonse Laveran, médecin officier de l'armée française, mobilisé dans la région de Constantine en Algérie, remarque la présence systématique d'un parasite dans le sang de 148 individus atteints de fièvre palustre ou fièvre des marais, et son absence dans le sang de 52 patients souffrant d'autres maladies. Ce parasite disparaît suite à l'administration de la quinine, l'alcaloïde extrait du quinquina jaune. Il identifie et décrit le parasite responsable du paludisme qu'il nomme le 6 novembre 1880 *Laverania falcipara*, qui deviendra ensuite *Plasmodium falciparum* (Cox, 2010).

En Décembre 1880, Laveran n'arrive pas à convaincre les membres de l'Académie Française des Sciences Médicales de sa découverte. En 1885, des sommités italiennes de la malariologie telles que Bignami, Golgi et Marchiafava malgré leurs premières réticences confirment les travaux de Laveran après qu'ils aient observé et décrit (grâce à la coloration à base d'éosine et à un objectif à immersion d'huile développé par la Société Carl Zeiss de 1882 à 1884) des mouvements amiboïdes de l'organisme responsable de la fièvre des marais. Ils le nomment *Plasmodium*. Ils acceptent alors seulement l'idée de Laveran selon laquelle le paludisme est causé par un protozoaire et non par une bactérie.

Golgi, en 1886 puis Marchiafava et Celli en 1889 décrivent 3 des 5 espèces de *Plasmodium* endémiques pour l'homme.

John Stephens, en Afrique de l'Ouest, découvre en 1918, puis décrit en 1922, *Plasmodium ovale* (Stephens, 1922).

A la fin du XIX^{ème} siècle, le vecteur du paludisme, le moustique anophèle, est identifié par Sir Ronald Ross, un médecin, officier britannique en poste en Inde. En 1897, celui-ci dissèque des moustiques nourris avec le sang infecté de patients atteints de paludisme (**Ross, 1897**). Il observe clairement différentes formes de développement du parasite chez le moustique : les oocystes sur la paroi de l'estomac, relarguant ensuite les sporozoïtes, ainsi que la présence de sporozoïtes au niveau des glandes salivaires. Les zoologistes italiens Grassi, Bastianelli et Bignami découvrent ensuite le rôle exact du moustique femelle anophèle suite à l'infection d'individus volontaires sains avec des moustiques prélevés dans des zones impaludées. Ils décrivent le cycle complet de développement de *Plasmodium* chez l'anophèle en 1899 (**Fantini, 1999**). Les découvertes de Ronald Ross lui valent le prix Nobel de médecine en 1902. Laveran reçoit le prix Nobel de médecine en 1907 pour l'ensemble de ses travaux sur les protozoaires.

1.1.3. Paludisme dans le monde

Selon les dernières estimations de l'OMS, publiées en décembre 2016, on a compté en 2015, 212 millions de cas de paludisme et 429 000 décès. Entre 2010 et 2015, l'incidence du paludisme a reculé chez les populations exposées de 21% au niveau mondial tandis que le taux de mortalité a baissé de 29%. On estime que 6,8 millions de décès dus au paludisme ont été évités dans le monde depuis 2001. L'Afrique subsaharienne supporte une part disproportionnée de la charge mondiale du paludisme. En 2015, 90% des cas de paludisme et 92% des décès dus à cette maladie sont survenus dans cette région. 76% des cas de paludisme et 75% des décès dus à cette maladie surviennent dans 13 pays – principalement en Afrique subsaharienne. Dans les régions où la transmission du paludisme est intense, les enfants de moins de 5 ans risquent tout particulièrement de contracter l'infection, de tomber malades et de mourir; plus des deux tiers (70%) des décès dus au paludisme surviennent dans cette tranche d'âge. Entre 2010 et 2015, le taux de mortalité chez les enfants de moins de 5 ans a baissé de 29% au niveau mondial. Toutefois, le paludisme demeure toujours un facteur majeur de mortalité chez les enfants de moins de cinq ans et un enfant en meurt toutes les deux minutes.

Avec les moyens de lutte comme l'utilisation du DDT depuis les années 1950, le paludisme a été éradiqué des zones anciennement impaludées d'Europe et d'Amérique du Nord (**Figure 1**). Actuellement, les cas diagnostiqués dans ces régions non endémiques sont des cas d'importation. En Allemagne, l'incidence du paludisme d'importation a été estimée à 4600 cas, en 2010. Il s'agissait principalement de voyageurs en provenance d'Afrique subsaharienne (91%) et infectés dans 86% des cas par *P. falciparum*. Parmi ces cas, 7,4% étaient des accès palustres sévères avec une létalité de 4,42% (**Berg et al., 2011**).

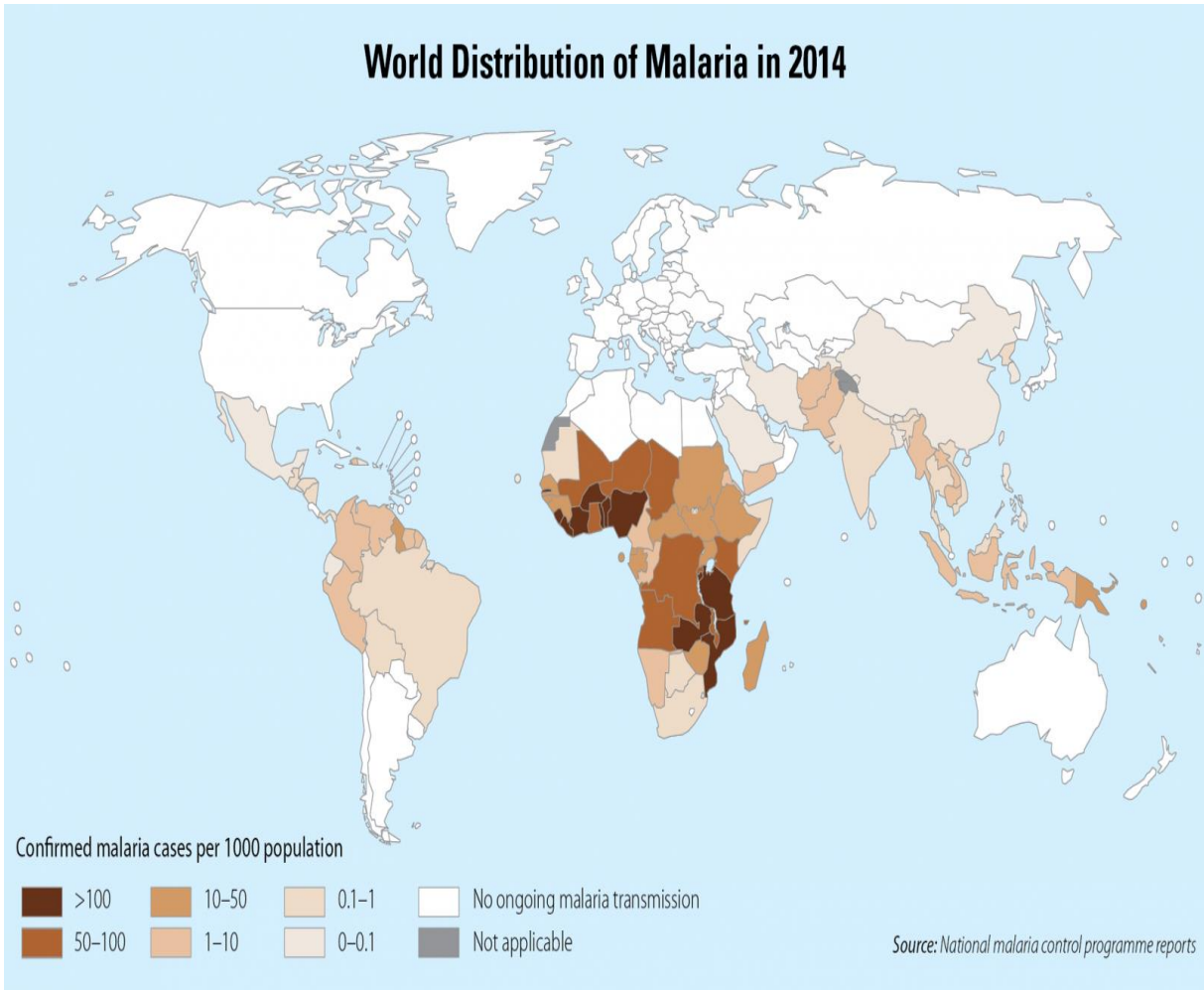


Figure 1: Répartition du paludisme dans le monde (RBM, 2016)

1.1.4. Paludisme en Côte d'Ivoire

En Côte d'Ivoire, comme dans le reste de l'Afrique sub-saharienne, le paludisme reste une des pathologies les plus importantes. En effet, elle représente la première cause de consultation dans les formations sanitaires du pays. Toute la population est exposée, mais la majorité des victimes est constituée par les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes. De façon globale, le paludisme représente environ 32,53 % de toutes les causes de mortalité avec une incidence annuelle s'élevant à 73,58 ‰ (PNLP, 2014). Le poids des répercussions socio-économiques est estimé à 50 % pour les pertes de produits agricoles et près de 40 % concernant l'absentéisme scolaire et professionnel.

La dynamique de la transmission varie suivant les zones climatiques majeures (**Figure 2**) qui correspondent aux trois faciès écologiques ci-dessus mentionnés (**Koffi et al., 2009**) :

- La zone du Sud : région forestière avec une pluviométrie abondante (jusqu'à 1800 mm), où la transmission du paludisme est permanente. Toutefois, avec la déforestation largement avancée, les zones de transmission sont de plus en plus importantes, et elle dure quasiment toute l'année.
- La zone du Nord : zone de savanes boisées ou secteurs Sub-soudanais et soudanais. La transmission dure de 6 à 8 mois, principalement pendant la période pluvieuse. Toutefois, dans cette zone, la transmission peut être également quasi-permanente dans les zones de riziculture et le long des cours d'eau.
- La zone de transition au centre, correspondant à la zone pré-forestière. La durée de la transmission est comparable à celle de la zone forestière. On observe également des variations évolutives en fonction du faciès écologique rizicole ou non rizicole.

Parallèlement à ces trois grands faciès, d'autres aspects épidémiologiques sont décrits dans le pays (paludisme urbain, paludisme lagunaire...etc.).

En Côte d'Ivoire, la mise en place d'un Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) en 1996 a permis une meilleure élaboration des politiques et stratégies de lutte contre la maladie ainsi qu'une coordination des activités sur l'étendue du territoire. Le taux de morbidité est passé de 33,57 % en 2006 à 3,1 % la fin de l'année 2009. Aussi, le taux de mortalité a considérablement diminué passant de 18,17% à 4,4%. En Côte d'Ivoire comme au niveau international, la lutte contre le paludisme repose surtout sur des mesures de prévention individuelles et collectives, telle que la lutte anti-vectorielle avec utilisation des insecticides par pulvérisation intra-domiciliaire, la mise en place des moustiquaires imprégnées d'insecticides, d'une chimio-prophylaxie ou TPI (traitement préventif intermittent) et traitement curatif (avec les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine).



Figure 2: Faciès éco-climatiques et réseau hydrographique de la Côte d'Ivoire
 Source (PR/NSP Bouaké 2001)

Une récente analyse descriptive de la mise en œuvre de ces interventions entre 2008 et 2012 a montré le bilan suivant :

- ✓ 110 238 990 Moustiquaires imprégnées d’Insecticide à longue durée d’action (MILDA) ont été distribuées aux populations de Côte d’Ivoire
- ✓ 6 millions de Combinaisons Thérapeutiques à base de dérivés d’Artémisinine (CTA) dispensées pour le traitement des cas de paludisme simple
- ✓ plus de 4 millions de tests de diagnostic rapide (TDR) utilisés pour le diagnostic biologique du paludisme de 2010 à 2012
- ✓ 67% des ménages possèdent au moins une moustiquaire imprégnée. Cette proportion est plus élevée en milieu rural qu’en milieu urbain (73% contre 60%)
- ✓ 43% des ménage possèdent au moins deux moustiquaires imprégnées et 42% une MILDA (EDS-MICS, 2012)

1.1.5. Coût socio-économique du paludisme

Actuellement, on estime à 3 milliards le nombre de personnes vivant dans des zones à risque de paludisme et ce chiffre est malheureusement en constante augmentation ces dernières années. 90% des cas de paludisme recensés dans le monde le sont en Afrique (**Ruxin et al., 2005**) Cela engendre des conséquences désastreuses, aussi bien sociales qu’économiques, pour ce continent. Il est important de noter qu’un accès palustre simple, sans complication aucune, immobilise le malade pendant au moins une semaine expliquant le frein qu’apporte cette maladie au développement. On observe aujourd’hui pour le paludisme une distribution géographique mondiale superposable au planisphère des pays pauvres. Mais, il est important de souligner que cette maladie est un élément contribuant à la pauvreté des pays qui en souffrent à grande échelle.

En 2001, une étude a estimé que le produit intérieur brut moyen des pays impaludés est 5 fois plus faible que celui des pays non impaludés (**Gallup & Sachs, 2001; Chima et al., 2003**). Le poids du paludisme dans l’économie africaine est estimé, pour ses effets directs, à plus de 1,3% de déficit de croissance annuel, soit une perte de productivité équivalente à 12 milliards de dollars. Cette maladie a également de nombreux effets collatéraux notables tels que des difficultés de scolarisation des enfants dues à l’absentéisme prolongé sans compter les conséquences neurologiques d’un accès grave.

1.2. Hôtes et biologie des Plasmodies

1.2.1. Agents pathogènes

Les agents pathogènes du paludisme constituent un groupe de parasites intracellulaires obligatoires capables d’infecter divers hôtes. Ils appartiennent au phylum des *Apicomplexa*, à la classe des *Sporozoa*, à l’ordre des *Haemosporida*, à la famille des *Plasmodiidae* et au genre

Plasmodium. Sur plus d'une centaine d'espèces pathogènes, seules cinq sont capables d'infecter l'homme et sont responsables des cas cliniques de formes plus ou moins graves. Il s'agit de *P. falciparum* (Welch, 1897), *P. vivax* (Grassi & Fletti, 1890), *P. ovale* (Stephens, 1922), *P. malariae* (Laveran, 1881) et *P. knowlesi* (Sinton & Mulligan, 1933). Cette dernière est un parasite zoonotique de singe largement distribué en Asie du Sud Est. *P. knowlesi* est connu récemment pour être à l'origine d'un nombre important d'infections humaines en Asie du Sud-Est (Cox-Singh *et al.*, 2008). Seule espèce capable d'entraîner le paludisme sévère, *P. falciparum* est le plus mortelle. Du fait de sa forte prédominance en Afrique subsaharienne, il est responsable de plus de 80 à 90% des cas de paludisme enregistrés. Il provoque la fièvre tierce maligne. Très répandu dans le monde, *P. vivax* infecte plus de personnes mais il est cependant rarement létal. Les trois autres espèces (*P. malariae*, *P. ovale* et *P. knowlesi*) sont moins répandues et n'entraînent pas d'accès palustres graves (OMS, 2011). Tous ces agents pathogènes sont présents en Afrique à l'exception de *P. knowlesi*. Il a été récemment montré grâce aux outils de la biologie moléculaire qu'en réalité *P. ovale* comprend deux sous espèces sympatriques que sont *P. ovale wallikeri* et *P. ovale curtisi* (Sutherland *et al.*, 2010).

1.2.2 Vecteurs : *Anopheles spp* (Figure 3)

Au niveau taxonomique, les vecteurs des *plasmodi* sont des insectes diptères appartenant à la famille des *Culicidae* et à la sous-famille des *Anophelinae*. On dénombre environ 500 espèces d'anophèles dans le monde, parmi lesquelles une cinquantaine est capable de transmettre le paludisme à l'homme (Baruch *et al.*, 1996). En Afrique, une douzaine d'espèces est impliquée dans la transmission. Ces vecteurs du paludisme en Afrique tropicale sont répartis en complexe et divers grands groupes :

- le complexe *gambiae* avec sept espèces dont deux seulement sont vectrices : *An. gambiae s.s.* et *An. Arabiensis* ;
- le groupe *funestus* qui renferme neuf espèces dont deux vectrices : *An. funestus s.s.* et *An. rivulorum* assurent la transmission du paludisme ;
- le groupe *nili* contenant quatre espèces dont trois vectrices : *An. nili s.s.*, *An. carnevalei* et *An. ovengensis* (Fontenille *et al.*, 2003; Coetzee & Fontenille, 2004).

Ces trois grands groupes de vecteurs sont impliqués dans la transmission palustre en Afrique. Chacune de ces espèces a des préférences pour des biotopes particuliers. Ces espèces présentent une grande capacité vectorielle, expliquant la forte endémicité palustre en Afrique (Mouchet *et al.*, 2004).

Seule l'anophèle femelle est hématophage. Elle a une activité nocturne, son vol est silencieux et sa piqûre est décrite comme indolore par opposition aux piqûres plus prurigineuses des autres genres de moustiques (Pages *et al.*, 2007).



Figure 3: Distribution globale des vecteurs (Anophèles) responsables du paludisme

Source : Centers for Disease Control and Prevention, division du Département de la Santé et des Services Sociaux des États-Unis. US_CDC2008

1.2.3. Cycle évolutif du parasite

Le cycle des *Plasmodium* comporte une phase sexuée ou sporogonie chez l'anophèle femelle et une phase asexuée ou schizogonie retrouvée chez l'homme. Chez l'homme, le parasite est constamment haploïde, avec une étape de multiplication dans les hépatocytes (phase pré ou exo-érythrocytaire) et une multiplication intra-érythrocytaire (schizogonie érythrocytaire). Certaines caractéristiques du cycle biologique sont typiques de l'espèce plasmodiale en cause, nous avons défini ci-dessous, le cycle de *P. falciparum* qui demeure la seule espèce étudiée dans ce travail (**Figure 4**).

1.2.3.1. Phase sexuée ou sporogonie chez l'anophèle

Lors d'un repas sanguin chez un individu infecté, l'anophèle femelle ingère des gamétocytes, qui constituent des formes parasitaires sexuées mâles ou femelles. Dans l'estomac du moustique, ces gamétocytes subissent une maturation qui les transforme en gamètes mâles et femelles haploïdes. La fécondation entre un gamète femelle et un gamète mâle donne un œuf mobile appelé zygote ou ookinète diploïde qui s'implante en dessous de la paroi stomacale du moustique pour former un oocyste. Cette phase diploïde s'achève par des mitoses permettant la formation des sporozoïtes qui gagnent préférentiellement les glandes salivaires de l'anophèle d'où ils pourront être injectés avec la salive lors d'un repas sanguin chez l'hôte. Cette phase du cycle chez le moustique dure 10 à 40 jours, suivant la température extérieure et les espèces d'anophèles en cause (**Beier, 1998**).

1.2.3.2. Phase asexuée ou schizogonie chez l'homme

1.2.3.2.1. Schizogonie pré ou exo-érythrocytaire

L'infection de l'homme par le *Plasmodium* est initiée par la piqûre de l'anophèle femelle infecté qui inocule des dizaines de sporozoïtes dans les capillaires cutanés. Ces sporozoïtes restent dans le sang circulant pendant une courte durée (30 mn). Certains y seront détruits par les monocytes tandis que d'autres pénétreront activement différents types cellulaires au sein desquels leur développement avortera. Seuls ceux ayant franchi la barrière des cellules de Küpffer du foie et ayant pénétré dans les hépatocytes pourront continuer leur cycle (**Liehl & Mota, 2012**).

Dans l'hépatocyte s'effectue la première prolifération intracellulaire du parasite. Cette multiplication conduit à la formation de plusieurs trophozoïtes qui se transforment par la suite en schizontes intra-hépatiques renfermant de nombreux mérozoïtes. L'éclatement de l'hépatocyte infecté libère les mérozoïtes qui vont passer dans le sang pour infecter les hématies. Cette phase de réplication intra-hépatique est asymptomatique. Elle dure 7 à 15 jours. A la différence des phases hépatiques de *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*, la schizogonie hépatique de *P. falciparum* se caractérise par l'absence de forme de persistance hépatique ou hypnozoïte.

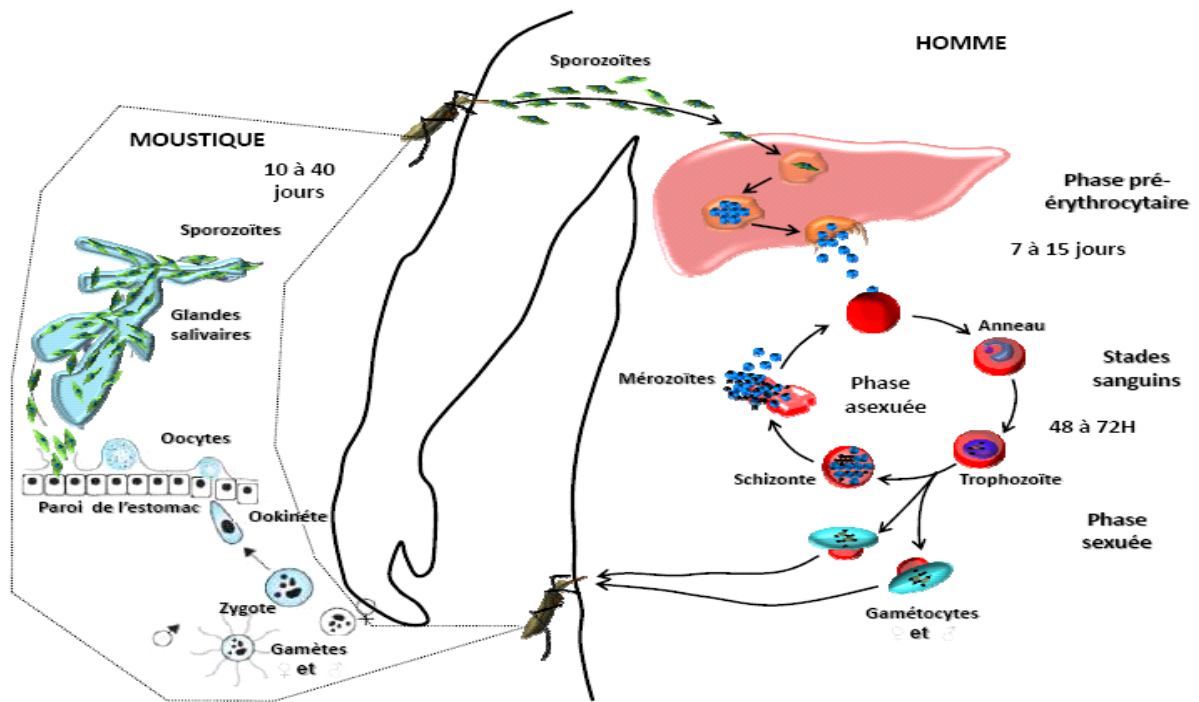


Figure 4: Cycle de développement de *P. falciparum* (White *et al.*, 2013)

En effet, pour les trois premières espèces, leurs hypnozoïtes peuvent rester à l'état quiescent pendant plusieurs mois, voire années dans le foie (**White et al., 2013**).

1.2.3.2.2. Schizogonie érythrocytaire

Les mérozoïtes libérés dans le sang infectent spécifiquement les érythrocytes. Ils montrent une très forte prédilection pour les hématies âgées. Cette invasion des globules rouges initie la phase sanguine asexuée du développement parasitaire. En effet, peu après l'invasion, le mérozoïte se différencie en trophozoïte jeune. C'est une forme en anneau caractérisée par un cytoplasme très fin et qui va par la suite devenir un trophozoïte dit âgé. Ce dernier entreprend des divisions nucléaires pour se transformer en un schizonte plurinucléé. Après une condensation cytoplasmique, le schizonte intra-érythrocytaire éclate en rompant la membrane du GRp. Il libère dans la circulation sanguine 8 à 32 mérozoïtes, ainsi que des débris érythrocytaires et parasitaires. De nouvelles hématies sont rapidement infectées par des mérozoïtes qui initient d'autres cycles sanguins. Certains mérozoïtes se différencient ensuite en éléments à potentiel sexuel appelés gamétocytes mâles et femelles qui ne pourront poursuivre leur développement que chez l'anophèle femelle.

L'ensemble du cycle sanguin asexué dure 48 à 72h. Contrairement aux autres espèces plasmodiales, les formes tardives de développement dans l'hématie infectée par *P. falciparum*, trophozoïtes âgés et schizontes, sont le plus souvent séquestrées au niveau de certains capillaires périphériques et dans certains organes comme la rate, le poumon et le cerveau ou le placenta chez la femme enceinte (**White et al., 2013**).

L'apparition de gamétocytes a lieu généralement dans la deuxième semaine qui suit l'infection; ces formes peuvent persister plusieurs semaines après la guérison. A l'occasion d'une nouvelle piqûre par un moustique, ces gamétocytes mâles et femelles, ingérés avec le repas sanguin, sont à l'origine du cycle sporogonique qui aboutit à la différenciation de sporozoïtes infectieux dans les glandes salivaires de l'anophèle.

Le cycle de *P. falciparum* chez l'homme, représenté sur la figure 3, illustre les divers stades successifs de développement, résidant dans des compartiments biologiquement différents, ayant une constitution moléculaire et des besoins métaboliques propres.

La pathologie observée est essentiellement associée à la phase érythrocytaire de l'infection et il n'a pas été attribué de pathologie significative aux sporozoïtes, aux formes hépatiques et aux gamétocytes (**Menard, 2007**).

En raison de la complexité de son cycle, *P. falciparum* exprime au cours de son développement chez l'homme, un très large panel d'antigènes à la surface de sa membrane et/ou à celle des hématies parasités. Il sera développé le cas des antigènes qui ont été utilisés dans les analyses immunologiques rapporté dans ce travail.

1.2.3.3. Antigènes de surface de Plasmodium falciparum

1.2.3.3.1 Antigènes du stade pré-érythrocytaire

Protéine Circumsporozoite (CSP)

La protéine circumsporozoite est l'antigène qui prédomine à la surface des sporozoïtes. La protéine est composée d'une région N-terminal qui se lie aux protéoglycanes de sulfate d'héparine (RI), une région centrale contenant une répétition de quatre acides aminés (Asn-Ala-Asn-Pro), et une région C-terminal contenant un domaine thrombospondine (RII) ancrée à une GPI (**Figure 5**). La région centrale répétée contient l'épitope immunodominant des cellules B. Cette région centrale induit la production d'anticorps qui inhibent l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes *in vitro* (**Gysin et al., 1984; Plassmeyer et al., 2009**). Les anticorps dirigés contre la région centrale répétée sont associés à la protection contre l'infection par *P. falciparum* (**Aponte et al., 2007; Guinovart et al., 2009**) mais ne protègent pas contre la maladie (**Alonso et al., 2004; Bejon et al., 2008**). Les anticorps monoclonaux dirigés contre la thrombospondine bloquent également l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes, mais à un degré moindre que les anticorps de la région centrale répétée (**Plassmeyer et al., 2009**). La CSP induit aussi une réponse immune cellulaire T. En effet, elle comporte trois épitopes de lymphocytes T connus : un épitope des cellules T CD4+ très variable en amont du domaine de la thrombospondine (**Klinman et al., 1997**), un épitope de cellules T CD8+ très variable à l'intérieur du domaine de la thrombospondine et un épitope « universel » conservé des cellules T CD4+ à l'extrémité C-terminal de la protéine (**Alving et al., 1995**).

Liver Stage Antigen-1 (LSA1)

LSA-1 est un antigène du stade pré-érythrocytaire de *Plasmodium falciparum*. C'est une protéine de 230 kDa, caractérisée par une région répétitive centrale contenant 86 répétitions d'une séquence de 17 amino-acides EQQSDLEQERLAKEKLQ avec souvent des variations mineures de ceux-ci (**Hollingdale et al., 1990**). De part et d'autre de ces répétitions sont logées une séquence de 154 résidus non répétitive N terminale et une région C-terminale de 280 résidus (**Zhu & Hollingdale, 1991; Yang et al., 1995**). La séquence de LSA-1 régions répétées et non répétées est hautement conservée dans des souches de *P. falciparum* (**Hollingdale et al., 1990**) suggérant un rôle crucial durant la schizogonie hépatique.

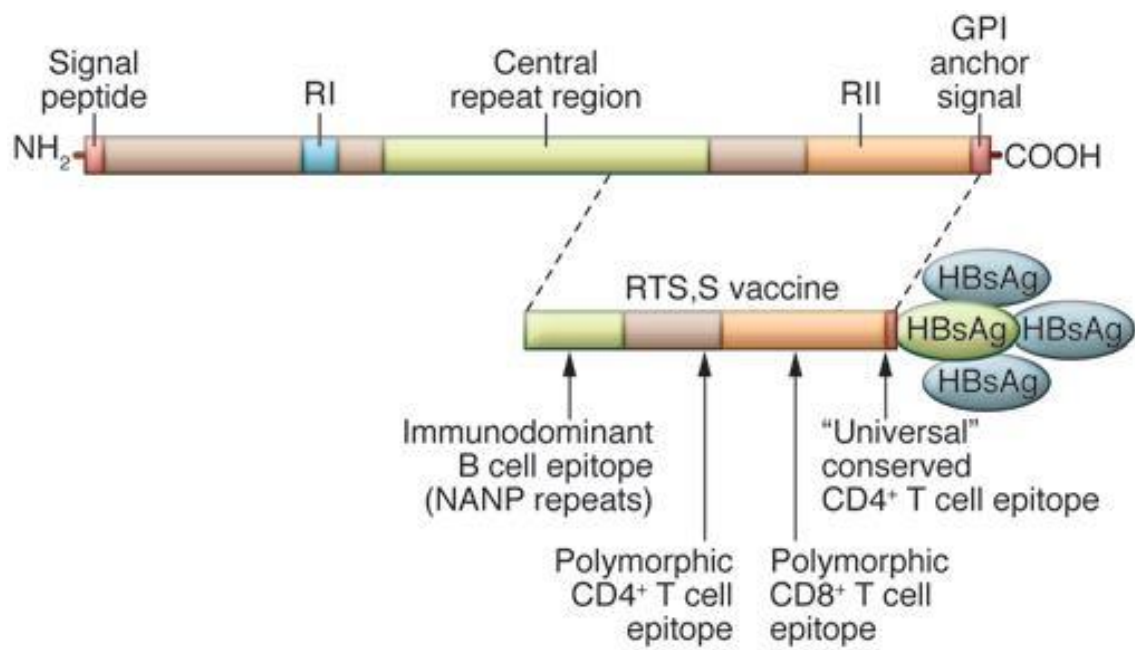


Figure 5: Représentation schématique de CSP et du vaccin RTS, S. Adapté de Crompton et al, 2010 (Crompton *et al.*, 2010)

LSA-1 est l'un des rares antigènes du stade hépatique connus pour être spécifiquement exprimé au cours de la phase pré-érythrocytaire hépatique de *Plasmodium falciparum*. Les études de l'immunité chez l'homme montre qu'après une exposition à des rayonnements de sporozoïtes atténués, ainsi que l'exposition à des parasites transmis naturellement, la réponse immunitaire spécifique contre LSA-1 est toujours associée à la protection, ce qui fait de LSA-1, un candidat vaccin attrayant (Hill *et al.*, 1992; Krzych *et al.*, 1995; Hill *et al.*, 2013). LSA-1 a fait l'objet de plusieurs essais cliniques.

1.2.3.3.2. Antigènes du stade érythrocytaire

Les schizontes expriment à la surface des érythrocytes parasités, un antigène très variable, PfEMP-1 (*P. falciparum Erythrocyte Membrane Protein*) codé par la famille des gènes var. Cette protéine est impliquée dans la pathogénicité palustre grâce à son rôle dans la cytoadhérence des érythrocytes infectés et la formation de rosettes entre les érythrocytes infectés et sains. Elle représente aussi un candidat vaccin potentiel comme les protéines de type MSP dont MSP1 (Merozoite Surface Protein-1), MSP3, MSP4, mais également l'antigène AMA1 (Apical Membrane Antigen-1) et GLURP (Glutamate-Rich protein) qui sont des candidats vaccins en cours d'évaluation.

Merozoïte Surface Protein-1 (MSP1)

C'est une protéine complexe de *P. falciparum* qui est un élément essentiel dans le processus d'invasion des érythrocytes (Cowman & Crabb, 2006). Elle est synthétisée au cours de la schizogonie sous forme d'un polypeptide précurseur de 200 kDa avant d'être exprimée à la surface du mérozoïte intra-érythrocytaire. L'analyse des séquences des gènes de plusieurs clones de *P. falciparum*, a permis de déterminer sa structure primaire divisée en blocs numérotés de 1 à 17 (Figure 6). Ces blocs sont répartis en trois types : conservés, semi-conservés et variables. Les blocs 1, 3, 5, 12 et 17 sont très conservés, les blocs 4, 6, 8, 10, 14 et 16 sont variables. Le bloc4 est l'un des plus variables et les blocs 7, 9, 11, 13 et 15 sont semi-conservés (Tanabe *et al.*, 1987; Miller *et al.*, 1993). Après sa synthèse, MSP1 est ancrée à la membrane plasmique du mérozoïte par un glycolipide transmembranaire : le Glycosyl phosphatidyl Inositol (PfGPI). Elle y est associée à d'autres protéines comme MSP6 et MSP7. En présence d'une protéase, la subtilisine (SUB1), MSP1 subit une première protéolyse juste avant la rupture des schizontes ; pour donner quatre fragments : MSP1-83, MSP1-30, MSP1-38 et MSP1-42 qui restent assemblés en un complexe à la surface du mérozoïte (Figure 7) (Koussis *et al.*, 2009). A la suite d'un deuxième clivage, le fragment de 42kDa dévient un fragment final de 19kDa appelée MSP1-19 ou MSP1p19 qui reste fixée à la surface du mérozoïte par un ancrage PfGPI (Gilson *et al.*, 2006). MSP1p19 accompagne le mérozoïte pendant la réinvasion et persiste jusqu'au stade trophozoïte chez l'hématie nouvellement infectée (Cowman & Crabb, 2006).

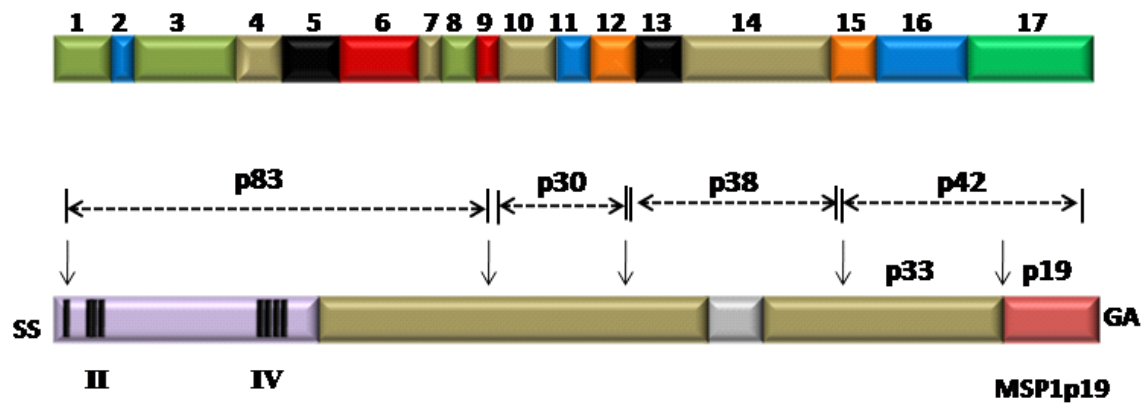


Figure 6: Représentation schématique du gène des différents fragments de MSP1 de *P. falciparum* (Tanabe *et al.*, 1987; Miller *et al.*, 1993).

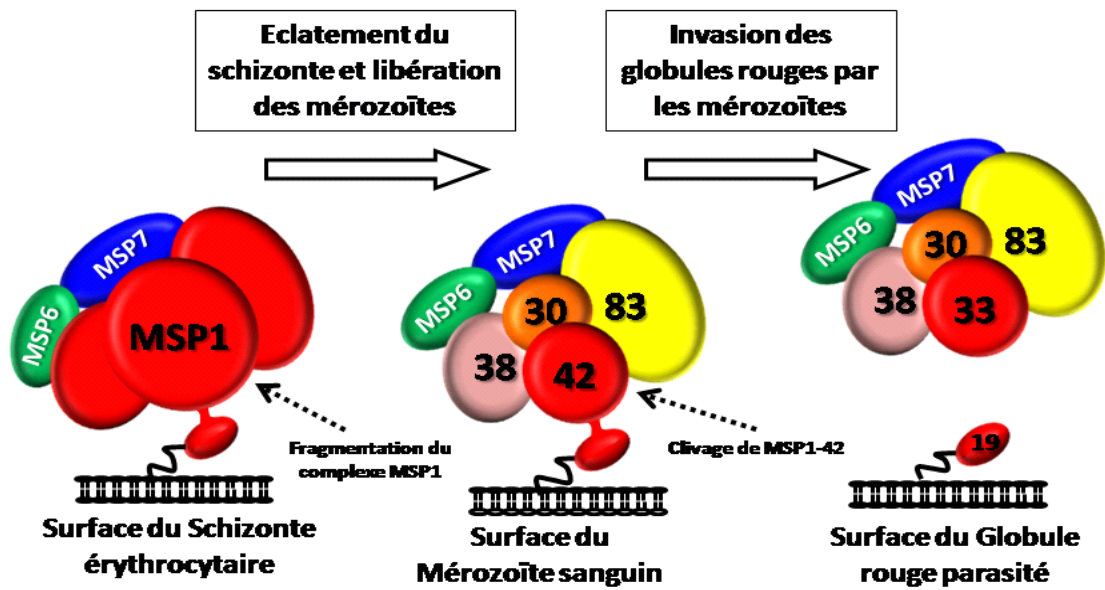


Figure 7: Formation des différents fragments de MSP1 au cours du cycle sanguin de *P. falciparum* (Holder, 2009)

MSP4p20

MSP4 est une molécule de surface du mérozoïte découverte beaucoup plus récemment (1997) et les premières études ELISA analysant sa réponse Ac lors d'infection naturelle chez l'homme ne sont publiées que depuis 2001 (**Wang et al., 2001**). Elles montrent que MSP4 est une cible de l'immunité naturelle chez l'homme, reconnue avec une forte prévalence chez les personnes vivant en zone d'endémie (Vietnam).

MSP4 est une protéine de surface du mérozoïte très importante pour l'invasion des GR car le knock-out du gène codant pour MSP4 empêche la réinvasion. Mais il se peut également que MSP4 ait d'autres fonctions à d'autres stades du développement du parasite (**Polson et al., 2005**). Des études ont montré que cet Ag était présent à presque tous les stades de développement du parasite, y compris sur des formes non sanguines. Cette hypothèse a été réfutée par l'équipe de Wang qui l'a effectivement trouvée exprimée sur les différentes formes sanguines du parasite, mais pas sur les sporozoïtes et gamétocytes. Les Ac anti-MSP4 reconnaîtraient en réalité des épitopes d'Ag de ces deux formes parasitaires selon un phénomène de réaction croisée des Ac (**Wang et al., 1999**). Celui-ci peut s'expliquer par des homologies importantes, telles que celle observée avec la protéine Sporozoïtes And Liver Stage Antigen (SALSA). Une homologie de 92% a, en effet, été déterminée entre les résidus 53 à 135 de MSP4 et le fragment antigénique SALSA. Ce dernier est connu pour se lier spécifiquement aux hépatocytes et permettre l'invasion de ces derniers par les sporozoïtes (**Puentes et al., 2004**). MSP4 est une molécule composée de 272 résidus, d'un domaine EGF et est accrochée au mérozoïte par une ancre GPI. Son poids moléculaire est de 40 kDa. Sa particularité est de présenter un faible polymorphisme. Aucun polymorphisme n'a pu être observé au niveau de l'ancre GPI et de la séquence hydrophobe, un seul nucléotide polymorphe a été identifié dans le domaine EGF (**Benet et al., 2004**). Ce polymorphisme très faible explique que MSP4 est étudié généralement dans sa construction entière. Au laboratoire de Vaccinologie-Parasitaire de l'Institut Pasteur de Paris, deux types de construction ont été exprimés dans le système d'expression Baculovirus/cellules d'insectes : MSP4p40 qui correspond à l'Ag entier et MSP4p30, appelé MSP4modII, dans lequel la seule séquence réellement polymorphe, de 30 acides aminés, a été supprimée. En synthétisant ces deux protéines, il est apparu qu'elles se dégradent toutes les deux afin d'aboutir à un même produit, MSP4p20. Il correspond au fragment C terminal de 20 kDa contenant le domaine EGF (**Polson et al., 2005**).

Apical Membrane Antigen 1 (AMA-1)

C'est une protéine membranaire localisée dans les micronèmes des régions apicales du mérozoïte qui contiennent des ligands pouvant s'associer à des récepteurs érythrocytaires. AMA₁ pour l'espèce *P. falciparum* est produite par les schizontes érythrocytaires matures (**Crewther et**

al., 1990). Elle comporte une région ectoplasmique de 546 acides aminés, un segment transmembranaire composé de 21 acides aminés et un domaine cytoplasmique d'environ 55 acides aminés (Nair *et al.*, 2002). Lors de l'invasion de l'érythrocyte par le parasite, elle se répartit de façon homogène sur toute la surface externe du mérozoïte et elle subit une série de coupures protéolytiques. Initialement exprimée sous la forme d'un précurseur de 83 kDa (*PfAMA*₁₋₈₃), elle est dégradée en un polypeptide de 66 kDa *PfAMA*₁₋₆₆ (Narum, 1994) qui restera exposée à la surface du mérozoïte jusqu'à l'étape de la rupture des schizontes et durant toute la phase d'invasion du globule rouge (Pages *et al.*, 2007). La protéine se subdivise en trois domaines (Figure 8) : DI, DII et DIII (Hodder *et al.*, 1996) et de sa structure cristalline (Pizarro *et al.*, 2005). Elle jouerait un rôle lors de la ré-orientation du mérozoïte au cours de laquelle, les organites apicaux sont alignés sur la membrane des érythrocytes (Mitchell *et al.*, 2004). Cette intervention dans le processus d'invasion érythrocytaire serait liée à la présence du domaine DIII (Kato *et al.*, 2005). *PfAMA*₁ serait également impliqué dans l'invasion des hépatocytes (Silvie *et al.*, 2004).

Glutamate-Rich Protein de *Plasmodium falciparum* (GLURP)

Le Glutamate-Rich Protein de *Plasmodium falciparum* (GLURP) est un antigène considéré comme l'un des principaux candidats vaccins contre le paludisme. GLURP est exprimé à tous les stades du cycle de vie du parasite chez l'homme, y compris sur la surface des mérozoïtes nouvellement libérés (Borre *et al.*, 1991). Il est hautement antigénique et le gène codant la protéine GLURP montre peu de polymorphisme chez les isolats de *P. falciparum* de régions géographiques différentes (Theisen *et al.*, 1995; Stricker *et al.*, 2000). En outre, des études immuno-épidémiologiques dans les zones de forte transmission ont montré une prévalence élevée d'anticorps contre GLURP chez les adultes ainsi qu'une association significative entre des taux élevés d'anticorps spécifiques anti-GLURP avec de faibles densités parasitaires (Hogh *et al.*, 1992; Hogh *et al.*, 1993) et avec la protection contre le paludisme clinique (Dziegiel *et al.*, 1993; Dodoo *et al.*, 2000). En plus, il a été prouvé que les réponses des anticorps cytophiles (IgG1 et IgG3) contre GLURP jouent un rôle primordial par des mécanismes effecteurs tels que l'inhibition cellulaire dépendante d'anticorps (ADCI), une coopération de monocytes et des anticorps qui portent atteinte à la multiplication des parasites (Theisen *et al.*, 1998).

Des études antérieures effectuées dans les zones de forte endémie du paludisme ont montré une prévalence élevée d'anticorps contre deux régions bien définies au sein de la protéine GLURP de *P. falciparum*: la région N-terminal non répétitive (R0) relativement conservée et la région répétitive immuno-dominant (R2) (Theisen *et al.*, 1998).

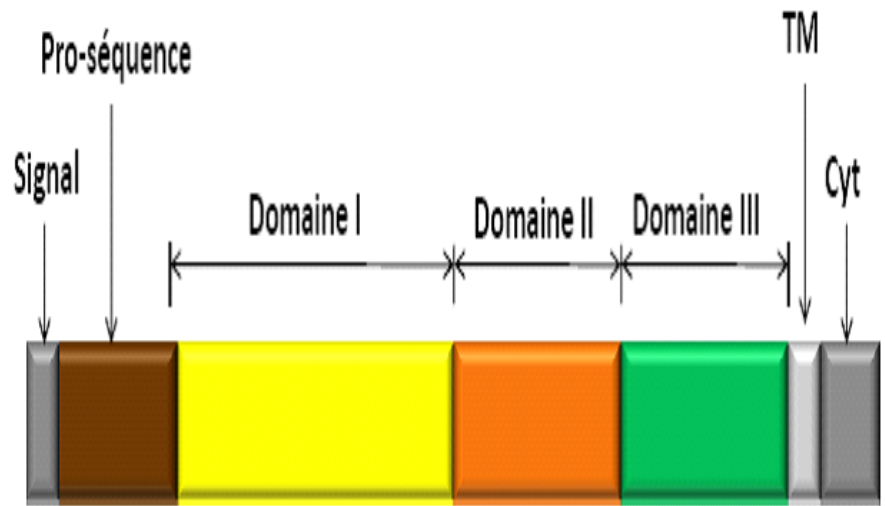


Figure 8: Représentation schématique d'AMA1 (Kato *et al.*, 2005)

NTS-DBL1 α ₁ PfEMP1/PF13

La protéine 1 de membrane de l'érythrocyte de *Plasmodium falciparum* (PfEMP1) est un important facteur de virulence, codé par une famille de cinquante-neuf (59) gènes var, qui comprend cinquante-six (56) gènes var et trois (3) petits gènes var3. Le parasite possède un système de variation antigénique des protéines PfEMP-1 qui lui permet ainsi d'échapper au contrôle immunitaire de l'hôte et de maintenir une infection chronique en dépit de la pression immunitaire. La famille des gènes var est hypervariable, responsable du polymorphisme d'expression des protéines PfEMP-1 et l'existence d'un véritable répertoire antigénique. Différentes études ont montré que par un mécanisme de restriction allélique, un seul gène var est exprimé au stade trophozoïte âgé et une seule protéine PfEMP-1 est exprimée à la surface de l'hématie parasitée. Les molécules de surface les mieux connues sont les membres de la famille PfEMP-1. Les vaccins en cours de développement à partir de PfEMP-1 sont de deux types. Le premier vise à obtenir une prémunition générale contre l'infection palustre et/ou ses complications (à partir de régions conservées comme DBL-1alpha et CIDR-1alpha), le second est orienté vers un vaccin spécifique pour prévenir le paludisme gestationnel (à partir de DBL-gamma) (Gangnard *et al.*, 2015).

I.3. Manifestations cliniques et pathologie de l'infection palustre

Les manifestations cliniques du paludisme sont liées directement ou indirectement au cycle parasitaire, notamment à la phase de schizogonie érythrocytaire. La gravité des symptômes dépend de l'espèce plasmodiale en cause, de la densité parasitaire et du degré de prémunition de l'hôte infecté. Deux principales formes cliniques sont observées dans l'infection par *P. falciparum*: l'accès palustre simple et les accès sévères ou graves. Ces formes cliniques sont souvent précédées d'une forme dite asymptomatique.

I.3.1 diagnostic biologique

La fièvre est le symptôme majeur du paludisme. Toute fièvre chez un individu vivant en zone d'endémie palustre ou ayant séjourné même pendant une période brève doit faire évoquer un paludisme jusqu'à preuve du contraire. Que la fièvre soit isolée ou associée aux autres signes (généraux, physiques ou fonctionnels) mentionnés dans la description des manifestations cliniques de la maladie, le diagnostic de certitude de paludisme est posé si et seulement si une mise en évidence d'hématozoaire de *Plasmodium* est faite sur frottis sanguin ou à l'aide de goutte épaisse. Le frottis sanguin permet aussi de préciser le ou les espèces plasmodiales en cause et donc le diagnostic étiologique (diagnostic d'espèce). Ces deux examens permettent également de déterminer la charge parasitaire (ou parasitémie). La parasitémie est exprimée en pourcentage de globules rouges parasités (frottis sanguin) ou en nombre de trophozoïtes par microlitre de sang (Goutte Epaisse).

En cas de paludisme viscéral évolutif (PVE), ces examens sont le plus souvent négatifs et les praticiens ont recours à la sérologie par immunofluorescence ou ELISA. Il est important de savoir que les examens sérologiques n'ont qu'un argument rétrospectif, en cas de crise de paludisme chez un touriste ayant séjourné en zone d'endémie.

D'autres pathologies également rencontrées en zone tropicale présentent des signes cliniques identiques, sources d'erreurs de diagnostic. De ce fait, le diagnostic différentiel du paludisme doit se faire, entre autres, devant un syndrome pseudo-grippal (avec une pneumopathie infectieuse), un tableau d'altération de l'état général associé à une splénomégalie fébrile et une pancytopénie (leishmaniose viscérale), un ictère fébrile (faisant évoquer une hépatite virale, une arbovirose ou une angiocholite), une encéphalopathie fébrile (pouvant évoquer une méningite bactérienne, une méningo-encéphalite virale, une fièvre typhoïde, une trypanosomiase ou un abcès du cerveau).

1.3.2. Le portage asymptomatique

Le portage asymptomatique du parasite se définit comme la présence continue d'une infection au paludisme (présence du parasite) sans aucun signe clinique de la maladie. Fréquemment observé chez les individus vivant en zone d'endémie, il serait dû à l'acquisition d'une immunité progressive, éphémère et incomplète dite de « prémunition » (**Sergent, 1950**). Cette immunité protège d'abord les patients contre la mortalité et les formes graves de paludisme grâce à une « immunité antitoxique », puis contre les accès simples en diminuant leur incidence, la durée et le niveau des infections grâce à une « immunité antiparasitaire » (**Mouchet et al., 2004**). L'immunité de prémunition demande plusieurs années pour s'installer et doit être entretenue par les stimulations antigéniques dues à une exposition répétée aux parasites (**Struik & Riley, 2004**). Elle s'acquiert d'autant plus rapidement que la transmission est importante et permanente. Si le sujet immun quitte la zone d'endémie, il perd sa prémunition au bout de 12 à 24 mois (La durée de survie d'une infection au stade sanguin peut atteindre 3 ans). Les sujets porteurs asymptomatiques représentent des « réservoirs » parasitaires et cette situation est rencontrée dans la plus grande partie de l'Afrique Sub-saharienne.

1.3.3. Accès palustre simple

La primo invasion apparaît chez un sujet non immun et le temps d'incubation est de 7 à 21 jours et parfois plusieurs mois. Elle est cliniquement muette.

Lors de la phase d'état, la fièvre est la manifestation classique. Elle est observée au cours de l'étape sanguine du cycle parasitaire. Avec l'éclatement des schizontes intra-érythrocytaires, il y a une libération des mérozoïtes, d'un pigment plasmodial appelé hémozoïne et de différentes toxines aux propriétés pyrogènes comme la PfGPI (Glycosyl Phosphatidyl Inositol). Ces substances sont à l'origine d'une inflammation et d'une fièvre (**Malvy et al., 2000**). La crise débute brutalement par

des frissons intenses et des tremblements. La fièvre atteint 40 à 41°C dans le paludisme à *P. falciparum* et persiste généralement pendant 2 à 4 heures. Elle est suivie d'une hypersudation. Ces accès de frissons et de fièvre intermittents sont observés et ils peuvent devenir périodiques survenant toutes les 48 heures pour les infections dues à *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale* (fièvre tierce), tandis que pour celles causées par *P. malariae* l'intervalle entre les crises de 72h (fièvre quarte). En dehors de la fièvre, on peut observer des céphalées, des douleurs articulaires, des myalgies, une anémie et même un ictère, accompagné souvent de nausées et de vomissements. Un accès dû à *P. falciparum* peut se transformer en une forme grave surtout chez les enfants et les personnes non immunes (**Juliano, 2006**).

1.3.4. Formes graves du Paludisme

1.3.4.1. Définition et critères du paludisme grave

L'accès pernicieux palustre a été initialement défini par Alphonse Laveran comme une «forme suraiguë de paludisme à *P. falciparum* susceptible de tuer rapidement le malade en 36 à 72h lorsqu'un traitement spécifique n'est pas rapidement et correctement institué» (**Saissy, 2001**). Il touche essentiellement les sujets non immuns. Seule l'instauration rapide d'une prise en charge adaptée en réanimation peut alors permettre une survie du patient (**Bruneel et al., 2003**). Le décès, quand il survient, est secondaire à la défaillance aiguë d'une ou plusieurs grandes fonctions, et ce parfois même si la mise en place d'un traitement étiologique s'avère efficace (**WHO, 2015**).

En 1990, l'OMS a défini le paludisme grave comme la présence de formes asexuées de *P. falciparum* dans le sang associée à un ou plusieurs critères dits majeurs. Dans cette définition, des critères mineurs ne permettant pas à eux seuls de parler de paludisme sévère mais devant inciter à la vigilance, étaient également définis. En 2000, de nouveaux critères ont été édités par l'OMS Ces critères à la fois cliniques et/ou biologiques, ont fait ainsi disparaître la notion de critères mineurs (**Tableau I et II**).

Tableau I: Critères cliniques de paludisme grave de l’OMS en 2015 (WHO, 2015)

Critères cliniques	Précisions du texte de l’OMS
Prostration	Extrême faiblesse
Trouble de la conscience	Adulte : score de Glasgow < 11 Enfant : score de Blantyre < 3
Respiration acidotique	Détresse respiratoire chez l’enfant
Convulsions répétées	Au moins 2 par 24heures
Collapsus cardiovasculaire	Pression artérielle systolique < 80 mmHg en présence de signes périphériques d’insuffisance circulatoire
Œdème pulmonaire	Définition radiologique
Saignement anormal	Définition clinique sans autre précision
Ictère	Définition clinique ou bilirubine totale > 50 µmol/L
Hémoglobinurie macroscopique	Urines rouges foncées ou noires, hémoglobinurie ou myoglobinurie à la bandelette, absence d’hématurie microscopique

Tableau II: Critères biologiques de paludisme grave de l’OMS en 2015 (WHO, 2015)

Critères biologiques	Précisions du texte de l’OMS
Anémie sévère	Enfant : hématocrite \leq 15% ou hémoglobine \leq 5g/dL Adulte : hématocrite $<$ 20% ou hémoglobine $<$ 7g/dL
Hypoglycémie	Glycémie $<$ 2,2 mmol/L ($<$ 400 mg/dL)
Acidose	Bicarbonates $<$ 15 mmol/L \pm acidémie avec pH $<$ 7,35
Hyperlactatémie	Lactates plasmatiques $>$ 5 mmol/L
Hyperparasitémie	Parasitémie de <i>P. falciparum</i> $>$ 10%
Insuffisance rénale	Enfant : diurèse $<$ 12 mL/kg/24 h ou Créatininémie $>$ 265 μ mol/L après réhydratation Adulte : Créatininémie $>$ 265 μ mol/l avec diurèse $<$ 400 mL/24h après réhydratation

II. Immunité et paludisme

L'infection par *Plasmodium*, engendre des réponses immunitaires de l'hôte. Ces réponses immunes sont régulées aussi bien par le système immunitaire non spécifique dit innée, par le système immunitaire spécifique ou acquis, que par des facteurs environnementaux. Ces deux types d'immunité sont complémentaires. L'immunité innée se mobilise dès le début de l'infection (dans les premières heures). Elle est indépendante de toute infection en attendant la mise en place de l'immunité «acquise» qui est opérationnelle dans les dix jours suivant l'infection. L'immunité acquise est tout autant spécifique des stades de développement du parasite que des espèces parasitaires. Cette immunité est rarement complètement protectrice, et dans le cas du paludisme, on sait qu'elle est partielle et non stérilisante.

II.1. Notion de prémunition

Une des caractéristiques de la relation «homme/parasite/vecteur» est l'acquisition, par les populations humaines exposées, d'une immunité anti-palustre progressive, éphémère et incomplète, dite «de prémunition». C'est un état d'immunité relative traduisant un équilibre hôte-parasite après plusieurs années d'exposition si la transmission est constante et relativement élevée. Elle protège d'abord contre la mortalité et les formes graves palustres, puis contre les accès palustres simples en diminuant leur incidence plutôt que leur gravité et enfin en réduisant la durée ou le niveau des infections par les stades sanguins. Cet équilibre est labile et disparaît en 12 à 24 mois chez le sujet immun qui quitte la zone d'endémie (**Deloron & Chougnnet, 1992 Struik & Riley, 2004**). Le développement de cette immunité de prémunition est dépendant du contexte épidémiologique, de la saisonnalité et de l'intensité de transmission au niveau de la zone géographique. Elle apparaît d'autant plus rapidement que la transmission est importante et permanente. Mais le développement de la prémunition n'empêche pas le portage de parasites faisant des sujets semi-immuns d'excellents "réservoirs" de parasites.

Dans certaines régions sèches, de paludisme instable, la transmission fluctue considérablement d'une saison et d'une année à l'autre, cela retardant l'acquisition de l'immunité (**Rogier & Trape, 1995**).

II.2. Immunité innée

Elle est activée dès le début de l'infection et repose sur l'intervention de plusieurs cellules parmi lesquelles les granulocytes, les monocytes macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes « Natural killer » (NK) et les lymphocytes T $\gamma\delta$.

Les granulocytes comme les neutrophiles peuvent phagocyter les formes parasitaires avec la participation d'opsonines telles que des protéines du complément, la C-réactive protéine (CRP) et des anticorps (**Kumaratilake et al., 1992**). Ces cellules produisent également des cytokines comme

le TNF- α , IFN- γ , GM-CSF et IL1- β qui amplifient la phagocytose des mérozoïtes (**Osier et al., 2014**). Il a été démontré que les neutrophiles peuvent inhiber la multiplication du parasite en produisant ces cytokines (**Auffray et al., 2009**).

Les cellules NK ont également la capacité de produire certaines cytokines comme celles précédemment décrites en réponse à différents stimulus (**Cooper et al., 2001**). Leur sécrétion d'IL-8 en réponse à une stimulation in vitro par un extrait de globule rouge parasité (GRp) a été rapportée et la présence du parasite permet l'activation de leurs fonctions cytotoxiques et une surexpression de marqueurs d'activation comme CD69 à leur surface (**Artavanis-Tsakonas et al., 2003; Baratin et al., 2005**).

Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes (**Noda et al., 2010**). Elles sont activées via des récepteurs appelés PRR (Pattern Recognition Receptors) comme le TLR9 et produisent de l'IFN- γ en réponse à une stimulation par des lysats de GRp. Comme les cellules dendritiques, les monocytes/macrophages sont des cellules présentatrices d'antigènes, ils sont activés par la présence de *Plasmodium* et produisent aussi des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α . Ce sont des cellules phagocytaires et leur implication dans la clairance parasitaire a été largement rapportée. Leur récepteur CD36 semble important dans la phagocytose des érythrocytes infectés et des mérozoïtes libres (**Schofield & Grau, 2005**). Aussi, le rôle majeur des monocytes/macrophages dans la production d'IFN- γ par les cellules NK a été démontré. Il passe par une production d'IL-18 par ces macrophages (**Cramer et al., 2008**).

Les cellules T $\gamma\delta$ sont capables de reconnaître des molécules produites par *P. falciparum*. Ces cellules sont activées par des phospho-antigènes non peptidiques du parasite. Elles sont capables de produire de l'IFN γ , ce sont des cellules cytotoxiques pour les GRp (**Farouk et al., 2004**).

II.3. Immunité adaptative

Elle repose sur l'intervention des lymphocytes T et B qui sont spécifiquement dirigés contre le parasite. Cette réponse immunitaire adaptative se divise en deux composantes essentielles l'immunité à médiation cellulaire et l'immunité humorale.

II.3.1. Immunité à médiation cellulaire

L'immunité à médiation cellulaire a été mise en évidence à la suite d'un transfert adoptif de ses cellules en absence de réponse humorale détectable. Elle est surtout l'œuvre des cellules TCD4+ et TCD8+ spécifiques au parasite et protégerait l'hôte contre les stades hépatocytaires et érythrocytaires car les parasites y sont intracellulaires et difficilement accessibles par les anticorps. Les lymphocytes TCD4 sont classés en plusieurs sous-groupes qui agissent différemment selon le type de cytokines produites. Les cellules Th1 produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ et l'IL-2 intervenant dans la réponse cytotoxique alors que les Th2 produisent des

cytokines anti-inflammatoires comme IL-4 et IL-13 qui régulent la réponse humorale (**Taylor-Robinson et al., 1993**). Une forte prolifération cellulaire TCD4+ et TCD8+ liée à une réponse cytokinique Th1 (IFN- γ et IL2) a été retrouvée associée à la protection contre le paludisme, indépendamment de la production d'anticorps (**Pombo et al., 2002**).

II.3.2. Immunité à médiation humorale

La réponse humorale repose surtout sur l'intervention des cellules B qui après stimulation antigénique puis différenciation en plasmocytes, produisent les Ac. Le rôle des anticorps dans l'immunité anti palustre, bien étudié, est démontré. Les Ac peuvent bloquer l'invasion des hépatocytes. En effet, les fragments Fab d'Ac monoclonaux spécifiques des séquences répétées de la CSP inhibent l'infectivité des sporozoïtes *in vivo* et *in vitro*. Les Ac protecteurs sont principalement de type IgG1 et IgG3. Ils peuvent activer le complément et induire une lyse des sporozoïtes libres dans le sang. Les IgG1 et IgG3 spécifiques peuvent se fixer sur leurs récepteurs présents à la surface de cellules comme les neutrophiles et monocyte-macrophages pour entraîner la lyse des sporozoïtes par ADCI (antibody-dependent cellular inhibition) ou par phagocytose (**Perlmann & Troye-Blomberg, 2000**). Les IgG2 et IgG4 seraient non protecteurs et des études ont montré qu'il existe une relation entre les taux d'IgG non cytophiles et la gravité de la maladie (**Schreiber et al., 2006**).

II.3.3. Les anticorps marqueurs de l'immunité dans l'infection palustre

Les études séro-épidémiologiques contribuent à fournir des informations sur l'immunité au niveau de la population et indirectement sur le niveau de l'exposition (**Richards et al., 2013**). Lorsque la transmission diminue ainsi que l'immunité décroît, les communautés ou sous-groupes devenus vulnérables aux risques accrus de maladies pourraient être identifiés pour adapter des interventions de protection supplémentaires. À ce jour, les corrélations claires de l'immunité anti-palustre manquent encore (**Cutts et al., 2014**), probablement parce que la recherche sur l'immunité anti-palustre a mis l'accent sur les réponses immunitaires à un nombre limité d'antigènes du paludisme et la plupart des études ont mesuré les niveaux d'anticorps, mais pas de réponses fonctionnelles (**Richards & Beeson, 2009; Fowkes et al., 2010; Chan et al., 2012**). Récemment, des études de répertoires étendues à de nouveaux antigènes ou peu étudiés ont identifié des réponses d'anticorps spécifiques d'antigène associés à la protection (**Crompton et al., 2010; Chan et al., 2014**). Les données ont montré que les anticorps contre les antigènes recombinants du mérozoïte sont des biomarqueurs de l'immunité (**Fowkes et al., 2010; Richards et al., 2013**). Il a également émergé beaucoup de travaux au cours de ces dernières années afin d'identifier les mécanismes fonctionnels de l'immunité et de les relier à la protection (**Crompton et al., 2010; Tran et al., 2014**). Les anticorps avec la fonction de reconnaissance de l'antigène du parasite n'ont pas toujours été prédictive de l'immunité protectrice, tandis que les données récentes suggèrent que la phagocytose

opsonique des mérozoïtes peut être un solide corrélat de l'immunité (**Joos *et al.*, 2010; Hill *et al.*, 2013; Osier *et al.*, 2014**). Cependant, des études prospectives supplémentaires reliant les réponses d'anticorps fonctionnels à des résultats cliniques sont nécessaires.

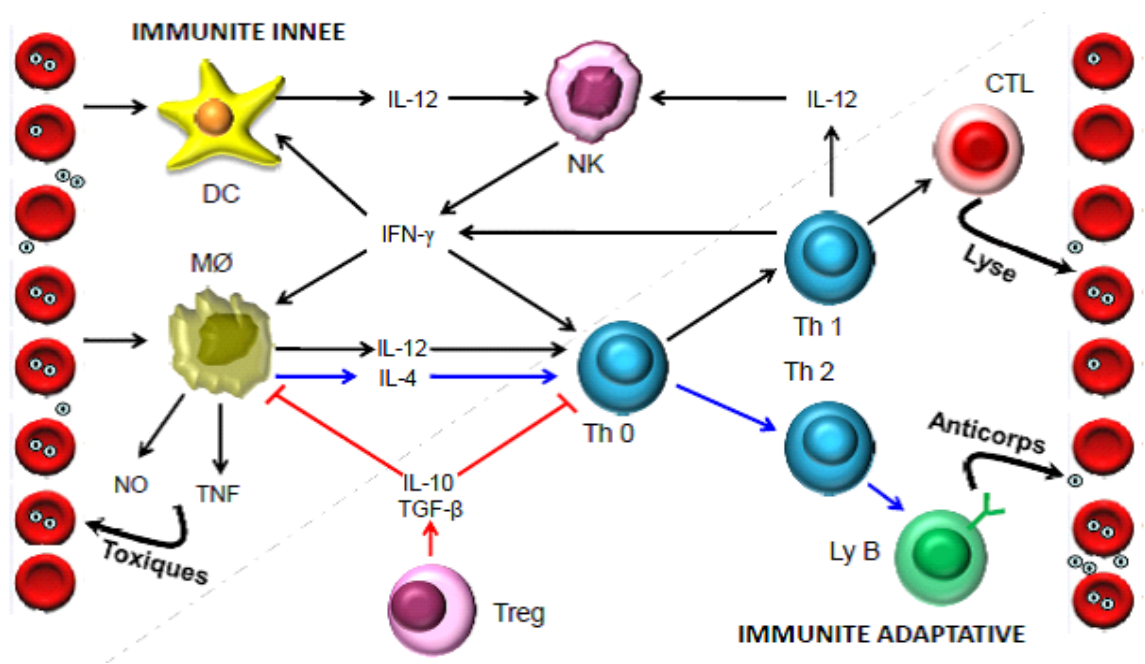


Figure 9: Rôle des cellules effectrices et des cytokines dans l'immunité contre les stades sanguins de *P. falciparum*. (Stevenson & Riley, 2004)

II.4. Auto-immunité et répertoire auto-anticorps

Le système immunitaire comprend un répertoire extrêmement diversifié incluant la reconnaissance de déterminants du soi par les lymphocytes B et T. La mise en place des répertoires B et T est régulée par des mécanismes complexes permettant de distinguer le « soi » du « non-soi » afin d'éviter les inconvénients d'une auto-réactivité. Cependant, il y a un risque d'échappement, et une production importante d'auto-anticorps et de lymphocytes T auto-réactifs a été mise en évidence non seulement chez des individus normaux, mais également dans un certain nombre de maladies.

II.4.1. Rôle des auto-anticorps

En fait, la découverte d'auto-anticorps ne signifie pas forcément maladie auto-immune. Une auto-réactivité "physiologique" est présente chez tous les individus et se traduit par la production d'auto-anticorps "naturels" (**Mouthon *et al.*, 1996**) Ces auto-anticorps "naturels" sont souvent de faible affinité et multi-spécifiques. Ils participent à la régulation du réseau idiotypique et à l'élimination des antigènes endogènes et exogènes. (**Lacroix-Desmazes *et al.*, 1995; Lefranc *et al.*, 2004**). Ils sont produits contre des auto-antigènes cellulaires comme le cytosquelette (vimentine), les phospholipides, les immunoglobulines ou d'autres auto-antigènes communs. Cette auto-réactivité "physiologique" s'oppose à l'auto-immunité "pathologique", appelée aussi "auto-agressivité", qui se caractérise par la présence d'auto-anticorps "pathogènes" observés dans certaines maladies auto-immunes. Ces auto-anticorps sont le plus souvent des IgG de forte affinité, souvent mono-spécifiques.

Comme l'ont observé également les auteurs Naparstek et Plotz (**Naparstek & Plotz, 1993**), les auto-anticorps ont une signification variable selon les cas. D'abord, certains auto-anticorps ne sont pas nocifs. Mais d'autres par contre sont responsables de processus pathologiques. La destruction de cellules par le processus auto-immun libère les auto-antigènes, qui induisent la production d'auto-anticorps ayant une action pathogène. Ils peuvent s'avérer dangereux de trois manières résumées comme suit:

- 1) Certains auto-anticorps vont se lier à des récepteurs : exemple du récepteur de la TSH dans la maladie de Basedow, récepteur de l'acétylcholine dans la myasthénie, l'insuline dans le diabète sucré de type 1. L'occupation du récepteur par l'anticorps empêche l'action normale du ligand ;
- 2) D'autres auto-anticorps sont opsonisants : soit directement, lorsqu'il s'agit d'IgG1 ou d'IgG3 ; soit indirectement, lorsqu'ils fixent le complément. Cela permet la fixation des macrophages qui ont des récepteurs pour le fragment Fc des IgG1, et des IgG3 ou des récepteurs pour la fraction C3 du complément, et par suite la phagocytose des cellules

cibles. Il s'ensuit la destruction des hématies dans les anémies hémolytiques auto-immunes et des plaques dans le purpura thrombopénique idiopathique ;

- 3) D'autres auto-anticorps forment avec les antigènes des complexes immuns (CI). Ces complexes immuns peuvent avoir des effets néfastes, lorsqu'ils sont de grande taille, avec un excès d'antigènes, un anticorps de faible affinité et une aptitude à fixer le complément. Ces CI vont se déposer préférentiellement dans certain site : la synoviale au cours de la polyarthrite rhumatoïde, ou les capillaires des glomérules rénaux au cours du lupus érythémateux disséminé ou de la néphropathie à IgA. Sur les CI viennent se fixer des plaquettes, des polynucléaires neutrophiles, des macrophages avec libération de nombreux médiateurs de l'inflammation.

II.4.2. Auto-immunité et Paludisme

Les résultats de nombreuses études épidémiologiques et cliniques suggèrent que le risque de maladies allergiques et auto-immunes est liée à « **l'hypothèse de l'hygiène** » (**Strachan, 1989; Sotgiu et al., 2008**). Selon cette hypothèse, une exposition insuffisante durant l'enfance à des agents infectieux favoriserait le développement de maladies auto-immunes et allergiques. Ainsi il a été observé que les maladies parasitaires peuvent influencer sur le développement ou l'évolution de la maladie auto-immune comme la sclérose en plaque, les rhinites allergiques et le diabète de type I et à l'inverse certaines composantes auto-immunes pourraient favoriser ou inhiber le développement des maladies infectieuses (**Bach, 2002; Ege et al. 2011**).

Les auto-anticorps ont été trouvés impliqués dans les maladies parasitaires telles que la trypanosomiase, la schistosomiase et le paludisme (**Adu et al., 1982; Ternynck et al., 1990; La Flamme et al., 2003; Nagayama et al., 2004**). Peu de données indiquent que certaines des manifestations cliniques du paludisme peut résulter d'un processus auto-immun (**Wozencraft et al., 1990; van Velthuysen & Florquin, 2000**). Cependant il y a des similitudes entre le type d'auto-anticorps produits au cours du paludisme et ceux observés lors des maladies auto-immunes causées par un dysfonctionnement de la réponse humorale. Nous citerons, par exemple, les anticorps anti-PL, anti-CL, anti-nucléaires, anti-érythrocyte, anti-muscle lisse qui sont fortement associés à l'infection plasmodiale (**Facer & Agiostratidou, 1994; Consigny et al., 2002**). Les premières observations de processus auto-immuns induits au cours du paludisme ont été décrites il y a plus d'une soixantaine d'années et développées par la suite pour mieux caractériser le rôle de l'auto-immunité dans la survenue de l'anémie palustre. Des études avaient mis en évidence une association entre la réponse auto-immune et l'anémie palustre. En effet, l'infection plasmodiale est associée à la phagocytose de globules rouges parasités et non parasités (**Kai & Roberts, 2008**). La sévérité de l'anémie n'est toujours pas corrélée à la parasitémie, elle peut persister après un traitement antipaludique efficace et en absence de parasite dans le sang périphérique (**Nwonwu et**

al., 2009) . Les patients avec anémie sévère présentent un test de coombs positif (**Sharma et al.**, 2012 ; **Sonani et al.**, 2013). De plus, les individus ayant une infection plasmodiale chronique présentent une augmentation des titres d'anticorps dirigés contre des crypto-antigènes érythrocytaires exprimés par les globules rouges infectés (**Zouali et al.**, 1982; **Chan et al.**, 2012). Enfin, l'infection plasmodiale induit la production d'anticorps dirigés contre les globules rouges parasités et non parasités (**Ritter et al.**, 1993). Parallèlement à ces travaux explorant le rôle de la réponse auto-immune dans la physiopathologie de l'anémie palustre, deux courants scientifiques vont apparaître et se développer, argumentant soit l'implication de l'auto-immunité dans la protection contre la maladie, soit un rôle de ce dernier dans la pathogénèse des formes graves du paludisme.

III. Moyens de lutte et de contrôle du paludisme

L'objectif de la lutte est d'éviter la mortalité, de réduire la morbidité et les pertes socio-économiques dues au paludisme. Elle consiste à empêcher la transmission du parasite du vecteur à l'homme en luttant contre le vecteur, d'une part, et d'empêcher le développement du parasite chez l'homme infesté, d'autre part. Nous porterons notre attention sur l'outil de monitoring sérologique et ses applications potentielles dont l'implémentation est recommandée dans les programmes d'élimination du paludisme.

III.1. Lutte contre le parasite

On utilise à cet effet des médicaments actifs sur le *Plasmodium* en chimio-prévention ou en traitement curatif.

III.1.1. Chimio-prévention

La chimio-prévention peut être divisée en deux catégories : la chimio prophylaxie et le traitement préventif intermittent (TPI). Sauf cas particuliers (femmes enceintes), la chimio-prophylaxie n'est plus utilisée pour les populations vivant en zone d'endémie. Par contre, elle doit être envisagée, de manière systématique, pour tout sujet non immun se rendant en zone impaludée. Il n'existe pas de schéma prophylactique idéal. Le choix de la chimio-prophylaxie doit être discuté et son application adaptée à chaque voyageur en fonction de la zone d'endémie visitée (intensité de transmission et niveau de résistance des *Plasmodium* aux antipaludiques), de la saison et du sujet concerné (âge, femme enceinte, mode de vie, antécédents médicaux) (**Greenwood et al.**, 2005). Mais d'une manière générale, l'arsenal thérapeutique de la chimioprophylaxie chez les voyageurs se limite à la chloroquine, au proguanil, à la méfloquine et à la doxycycline (**WHO-Unicef 2003**). Chez les femmes enceintes, le traitement préventif intermittent (TPI) consiste à administrer trois doses de Sulfadoxine-Pyriméthamine (SP) durant les deuxième et troisième trimestres de la

grossesse. Des études ont montré que ce TPI réduit considérablement le risque d'anémie chez la mère ainsi que l'insuffisance pondérale à la naissance (Vallely *et al.*, 2007; Wilson, 2011).

Chez les enfants de moins de 5 ans résidant dans une zone de courte transmission saisonnière, l'administration intermittente et systématique de SP + artésunate en trois prises annuelles a permis de réduire de 86 % le nombre d'accès palustres (Cisse *et al.*, 2006; Greenwood, 2006). Ce TPI est analogue à une chimio-prophylaxie espacée, à dose thérapeutique de courte durée. Du fait du petit nombre de prises d'antipaludiques, son coût est modeste et sa mise en place facilitée. De plus, en combinant deux antipaludiques différents, les souches chimio-résistantes ne devraient pas apparaître trop rapidement.

III.1.3. Traitement curatif ou Chimiothérapie

Une fois le paludisme diagnostiqué, le patient doit être traité rapidement dans les 24 heures qui suivent l'apparition des symptômes pour éviter des complications potentiellement mortelles (OMS, 2010). A cet effet, diverses molécules antipaludiques ont été utilisées. Il s'agit d'antipaludiques usuels (méfloquine, la quinine pour le traitement des cas graves chez jeunes enfants et adultes non immuns, etc.) qui sont des molécules de synthèse. Face à la chimio-résistance grandissante de *P. falciparum* à plusieurs de ces molécules, de nouveaux composés ont vu le jour : les dérivés de l'artémisinine, dont les plus connus sont l'artésunate, l'artéméther et le dihydroartémisinine. Ces composés ont une action thérapeutique très rapide, une courte demi-vie, sont efficaces contre le paludisme à *P. falciparum* poly-chimiorésistant, sont peu toxiques et bien tolérés par les malades, et réduisent le portage de gamétocytes (donc jouent un rôle dans la transmission du paludisme) (Adjuik *et al.*, 2004; Nosten & White, 2007; OMS, 2010). Ils sont utilisés pour le traitement des accès palustres simples et potentiellement pour les cas graves de paludisme (OMS, 2010; Sinclair *et al.*, 2011). Utilisés seuls ou combinés à d'autres médicaments de synthèse (méfloquine, sulfadoxine, pyriméthamine, amodiaquine...etc.), ils permettent une guérison du paludisme à *P. falciparum* en 7 ou 3 jours, respectivement. De plus, l'association médicamenteuse de deux molécules agissant indépendamment l'un de l'autre et dont la cible biochimique au niveau de l'hématozoaire est différente, permet d'empêcher ou de retarder l'émergence d'une résistance. Dès lors, l'OMS recommande la bithérapie (dérivé artémisinine associé à un médicament de longue durée) pour le traitement du paludisme (OMS, 2010). Quatre Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA) sont couramment utilisées : artéméther + luméfantrine (AL), artésunate + amodiaquine (AS + AQ), artésunate + méfloquine (AS + MQ) et artésunate + sulfadoxine pyriméthamine (AS + SP). Récemment, l'accumulation de preuves sur l'innocuité et l'efficacité de l'association dihydroartémisinine + pipéraquline (DHA + PPQ) a conduit l'OMS à ajouter celui-ci à la liste des CTA utilisables en vue de traiter le paludisme simple à *P. falciparum* (Karema *et al.*, 2006; Zongo *et al.*, 2007). Cependant, la bithérapie ne montre pas toujours une efficacité totale

même si elle a été appliquée avec un certain succès en zone endémique. De plus, des phénomènes de résistance de *P. falciparum* à ces composés ont été récemment signalés aux frontières entre le Cambodge et la Thaïlande (**Dondorp et al., 2009; Noedl et al., 2009; Ariey et al., 2014**), en raison probablement d'une forte pression des médicaments utilisés, souvent en monothérapie (**Dondorp et al., 2009**). Il est donc primordial de surveiller de près ces cas de résistance car leur propagation entraînerait des conséquences désastreuses car aucun autre antipaludique de remplacement n'est encore disponible.

III.2. Lutte contre les vecteurs

Elle est essentiellement préventive et a pour objectif de réduire la densité de la population vectrice à un niveau très bas ou de limiter le contact homme-vecteur (**Carnevale et al., 1992; Carnevale et al., 2009**). Elle peut se faire soit au stade aquatique soit au stade de la vie adulte du moustique. Les stratégies et les méthodes employées doivent tenir compte de l'épidémiologie de la maladie, de la biologie des vecteurs, de la qualification du personnel et des moyens logistiques disponibles. La lutte anti-vectorielle fait appel aux méthodes physiques, chimiques, physico-chimiques et biologiques (**Mouchet et al., 2004**). L'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII) reste actuellement le moyen le plus répandu pour prévenir la transmission du paludisme. Des études menées par l'OMS confirment que les MII peuvent réduire la mortalité infantile jusqu'au tiers dans les régions impaludées d'Afrique (**WHO, 2006**). La mise sur le marché de moustiquaires imprégnées de longue durée d'action (MILDA) avec un insecticide efficace pendant 3 à 5 ans a permis de régler les contraintes liées à la ré-imprégnation des MII. Leur faible prix de revient par rapport aux autres moyens de lutte permet leur utilisation à grande échelle. Les contraintes demeurent son acceptation par les populations et le risque de développement de phénomènes de la résistance aux pyréthriinoïdes chez certaines populations d'*An. Gambiae* (**Akogbeto & Yakoubou, 1999; Koffi et al. 2013**).

III.3. Les stratégies vaccinales potentielles

Le développement d'un vaccin efficace contre le paludisme est un objectif difficile à atteindre. *P. falciparum* est l'espèce plasmodiale essentiellement choisie pour les études vaccinales car responsable des formes mortelles de la maladie. Les espèces *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale* sont, relativement moins prioritaires en recherche vaccinale (**Herrera et al., 2007**). En théorie, plusieurs types de vaccins sont réalisables : vaccins contre les stades pré-érythrocytaires, vaccins contre les stades sexués, vaccins bloquant la transmission. Tous ces types de vaccins sont actuellement en développement et tous pourraient apporter une contribution future dans la lutte contre le paludisme. Actuellement, plus d'une centaine de candidats vaccins, dérivés seulement d'une vingtaine d'antigènes (Ag), sont en développement (**Figure 10**). En juillet 2015, l'Agence

européenne du médicament a délivré un avis scientifique positif pour le vaccin antipaludique le plus avancé, RTS S/AS01 dirigé contre le stade pré-érythrocytaire du cycle de vie de *P. falciparum*, de nom commercial Mosquirix®. Nous nous limiterons ici à la présentation de quelques candidats vaccins (stades pré-érythrocytaire et érythrocytaire) parmi les plus connus et les plus avancés.

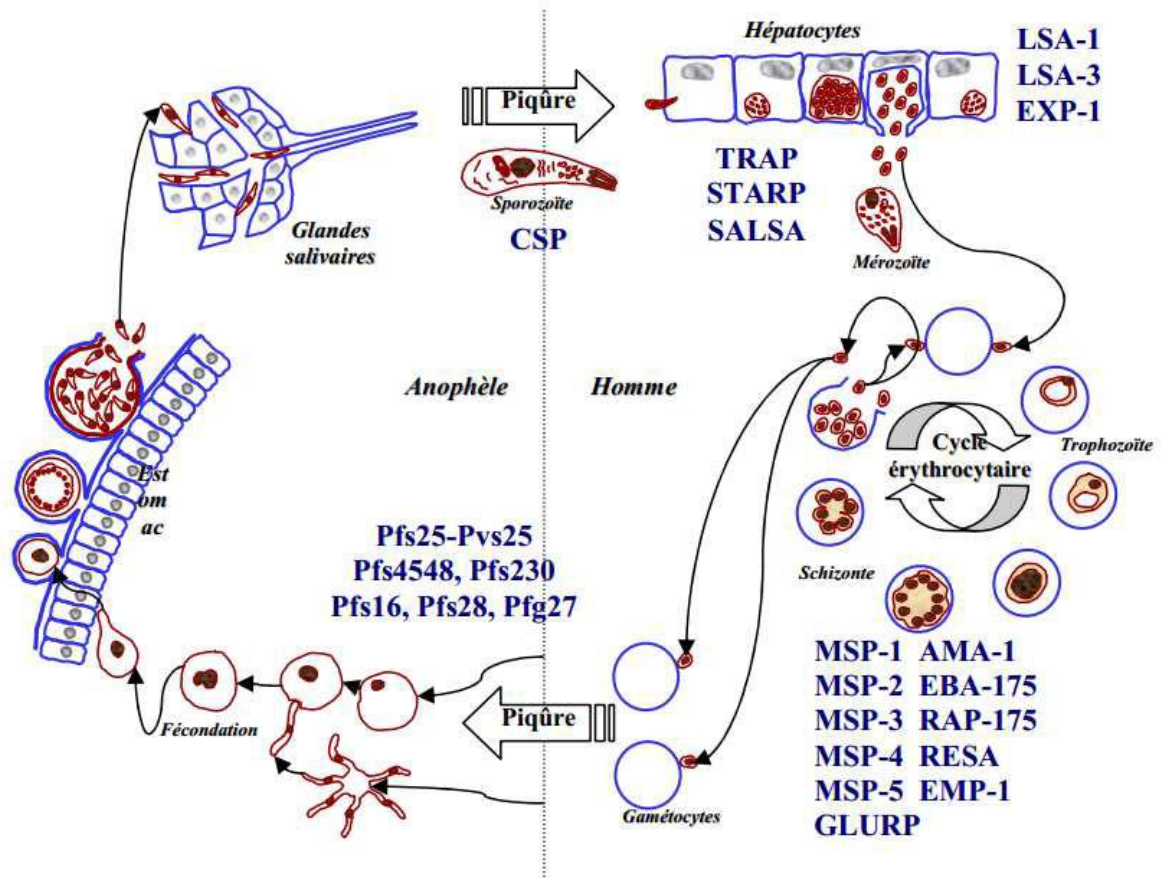


Figure 10: Représentation schématique des antigènes candidats vaccins (Rogier *et al.*, 2006)

Les vaccins pré-érythrocytaires (VPEs) ciblent les sporozoïtes pour les empêcher d'envahir les hépatocytes ou les détruire une fois dans le foie (Alonso *et al.*, 2004). Les VPEs sont alors conçus pour protéger contre l'infection au paludisme, et donc réduire la transmission. Ils doivent donc être efficaces à 100% ; dans le cas contraire, ils ne pourront que retarder la survenue de l'accès palustre. Le vaccin RTS,S/AS01E (GlaxoSmithKline) est à ce jour le candidat le plus avancé et le plus promu (le seul d'ailleurs à terminer la phase 3 d'évaluation) (Ballou, 2009; Casares *et al.*, 2010). En effet, l'étude clinique réalisée en Tanzanie chez 894 enfants de 6 à 17 mois, a démontré une réduction des épisodes cliniques de paludisme de 51% en phase II (Olotu *et al.*, 2011a). Cette protection est associée à une réponse immune protectrice humorale (IgG anti-CSP, *CircumSporozoite Protein*) et cellulaire (TNF α + et CD4+) (Olotu *et al.*, 2011b). La phase 3 qui est terminée a débuté en mai 2009 et a enrôlé 15 460 enfants parmi lesquels plus de 6 000 enfants âgés entre 6 et 14 semaines ont reçu une co-injection RTS,S/AS01E et vaccins du PEV (Programme Elargi de Vaccination). Les résultats définitifs de l'essai ont été publiés en fin 2014. Le vaccin s'est montré efficace dans la prévention du premier ou du seul épisode clinique de paludisme chez 56 % des enfants âgés de 5 à 17 mois et chez 31 % des enfants âgés de 6 à 12 semaines (RTS 2015). Toutefois, quelques questions liées à la durée de protection et son efficacité dans des zones de forte endémicité se posent encore. Malgré tout, l'optimisme perdure car pour l'heure, c'est le seul qui reste le plus prometteur. D'autres vaccins CSP sont en cours de développement, mais aucun n'a dépassé la phase II (essai en zone d'endémie).

NB : *Les candidats vaccins contre les stades pré-érythrocytaires n'ayant pas atteint une protection de 100% contre l'infection, l'intérêt de leur développement repose donc sur leur efficacité éventuelle pour diminuer l'incidence des accès palustres simples et les formes graves de paludisme.*

III.4. Séro-surveillance dans les programmes de lutte contre le paludisme

Plusieurs études ont exploré les réponses anticorps aux protéines recombinantes de *Plasmodium*, comme mesure associée à l'exposition au paludisme par la technique ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), et un certain nombre d'applications potentielles pour la séro-surveillance a été identifié, à savoir :

- estimer le niveau de la transmission dans la population
- surveiller les tendances dans la variation de la transmission sur une longue période (plusieurs années)
- identifier les individus à exposition récente (sur plusieurs mois)
- identifier les sites d'intervention "hot-spots" et les populations "hot-pops" avec transmission continue

- évaluer l'impact des interventions de lutte contre le paludisme
- identifier les porteurs asymptomatiques (réservoirs du paludisme).

La séroprévalence fournit une indication générale du niveau d'endémicité, et des analyses mathématiques des données de la séroprévalence selon l'âge peuvent être appliquées pour estimer les taux de séroconversion (la vitesse à laquelle les individus séronégatifs sont devenus séropositifs) (**Drakeley & Cook, 2009; Stewart et al., 2009; Badu et al., 2012**). Ces analyses ont montré une forte association avec les mesures de l'intensité de transmission, tels que l'incidence du paludisme, l'altitude et le taux d'inoculation entomologique (TIE). La sérologie reste un outil approprié pour mesurer les tendances dans l'évolution de la transmission du paludisme au fil du temps (**Stewart et al., 2009**). Les taux de prévalence d'anticorps spécifiques selon l'âge peuvent être utilisés pour estimer le moment où des changements majeurs dans la transmission ont eu lieu (**Drakeley & Cook, 2009; Cook et al., 2010; Hsiang et al., 2012**). En zone hyperendémique où la séroprévalence est élevée, une variation de l'ampleur des réponses anticorps peut être un marqueur plus sensible des changements dans la transmission (**Drakeley & Cook, 2009; Cook et al., 2011**). La séro-surveillance fournit un outil plus sensible que le dépistage de la parasitémie par microscopie des frottis sanguins ou des tests de diagnostic rapide pour évaluer l'impact des interventions de contrôle sur la transmission, en particulier lorsque l'intensité de la transmission est déjà faible (**Cook et al., 2011**). La séro-surveillance a également prouvé être une méthode utile pour identifier les points chauds (hot-spot) de la transmission et les groupes de population à risque élevé d'infection (**Bousema et al., 2010a; Cook et al., 2011; Hsiang et al., 2012; Sturrock et al., 2013**). Lorsque la transmission diminue, elle devient plus hétérogène, pouvant rester concentrée dans certaines zones géographiques définies « hotspots » entraînant une sous-population à haut risque (« hot-pops ») (**Cotter et al., 2013; Sturrock et al., 2013**). En parallèle, la proportion de personnes atteintes de l'infection augmente sub-microscopiquement, contribuant sensiblement à la transmission en cours (**Okell et al., 2009; Okell et al., 2012**) et posant un défi pour ceux qui cherchent à identifier et éliminer les réservoirs de persistance du paludisme. La séro-surveillance propose un outil simple et sensible qui pourrait être combiné avec d'autres mesures de surveillance et d'analyse géospatiale pour identifier les points chauds et les hot-pops afin de mieux cibler des sites d'interventions appropriées.

III.4.1. Antigènes potentiels pour la surveillance de *P. falciparum*

À ce jour, les réponses anticorps contre les antigènes du mérozoïte MSP1-19 et AMA1 ont été les plus utilisés comme marqueurs dans des modèles d'exposition à *P. falciparum*. Les taux de séroconversion pour les anticorps PfMSP1-19 ont été fortement corrélés avec d'autres indicateurs de l'intensité de la transmission (EIR), le taux de parasites, et l'incidence du paludisme, (**Satoguina et al., 2009; Stewart et al., 2009; Badu et al., 2012**). L'antigène PfAMA1 est hautement

immunogène (Thomas *et al.*, 1994; Chelimo *et al.*, 2005), ce qui peut limiter sa valeur dans la détection des changements dans la transmission modérée et à forte endémicité (Stewart *et al.*, 2009; Cook *et al.*, 2011), mais il pourrait être plus approprié que les anticorps PfMSP1-19 pour la séro-surveillance dans des contextes de très faible transmission et pour une surveillance post-élimination. La séro-surveillance basée sur le taux de séroconversion des antigènes PfMSP1-19 et PfAMA1 a facilité l'identification des points chauds de la transmission (Bousema *et al.*, 2010a; Bousema *et al.*, 2010b) et les changements dans l'intensité de transmission au fil du temps (Stewart *et al.*, 2009), avec une précision conforme ou supérieure à celle des mesures conventionnelles. Des résultats comparables à partir de plusieurs paramètres seraient favorables à l'inclusion de ces antigènes dans une séro-surveillance. Les réponses immunitaires à d'autres antigènes de *P. falciparum* ont également montré un potentiel pour la séro-surveillance, tel que les protéines du stade sanguin Pf MSP2 (Drakeley & Cook, 2009), PfMSP1-42 (le fragment C-terminal de 42 kDa de MSP1) (Hsiang *et al.*, 2012), Pf glutamate protéine riche (GLURP) (Cook *et al.*, 2012) y compris la CSP du sporozoïtes et les protéines du stade hépatique tels que l'antigène-1 (LSA-1), la thrombospondine protéine adhésive (TRAP) (John *et al.*, 2008; Campo *et al.*, 2011).

En ce qui concerne les antigènes du stade sexué ils ne montrent pas une relation significative avec l'intensité de la transmission ou avec la saison. Ces anticorps sont de courte durée en l'absence de gamétocytes circulants (Marrelli *et al.*, 1998; Ouedraogo *et al.*, 2011), ce qui suggère qu'ils peuvent être difficilement appropriés comme marqueurs de l'exposition dans la séro-surveillance.

III.4.2. Plateformes de sérologie pour le contrôle du paludisme

Un certain nombre de plateformes ou méthodes sont actuellement à l'étude pour une application dans la séro-surveillance. Ceux-ci comprennent : (a) ELISA, qui est le procédé le plus largement utilisé et mis en place ; (b) le système luminex de billes magnétiques (les antigènes sont couplés aux billes fluorescentes), qui permettent de tester simultanément de multiples antigènes, et (c) des puces à protéines (protein microarray) (Figure 11).

Les avantages et les inconvénients de ces approches sont résumés dans le **tableau III**. Une autre approche est l'utilisation de tests de point-of-care, qui fournissent des résultats rapides sur le site des services cliniques ou de dépistage afin que les décisions de traitement en temps opportun puissent être faites (Pai *et al.*, 2012), et ils sont souvent sous la forme d'un simple appareil immunochromatographique à flux latéral. Ils se sont avérés précieux pour le diagnostic et la gestion des maladies infectieuses, comme le VIH et le paludisme, et apparaissent utiles dans la surveillance des maladies infectieuses (Heymann & Brilliant, 2011).

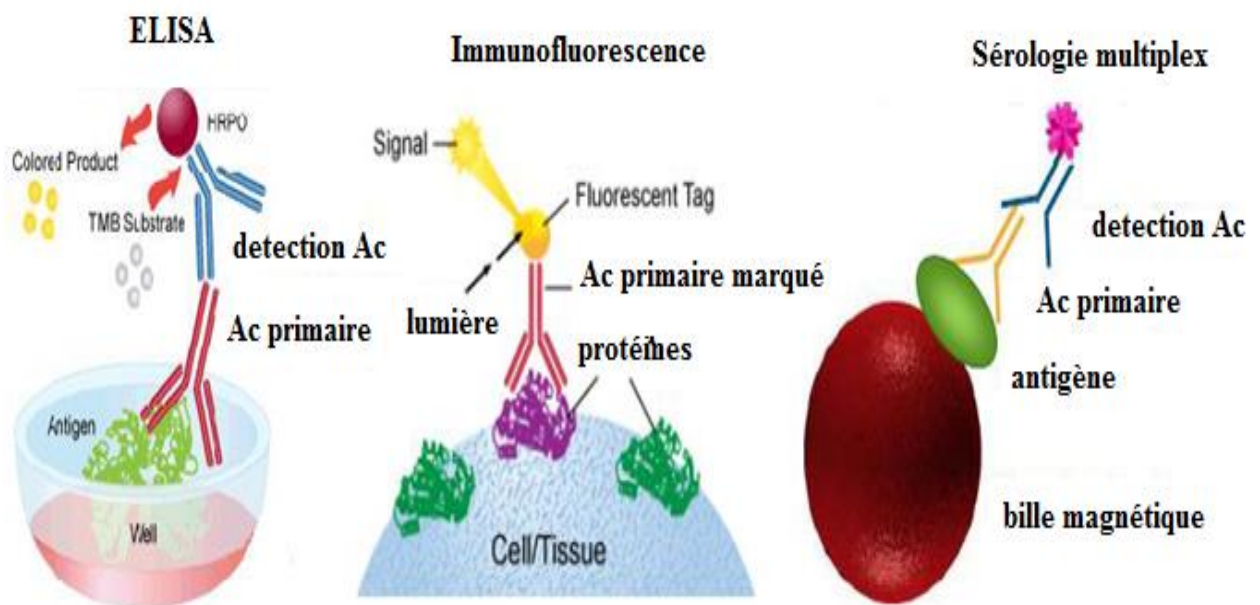


Figure 11: Différences entre les techniques sérologiques (Anonyme, 2012)

Tableau IIIII: Avantages et inconvénients des différentes plateformes pour la séro-surveillance

plateforme	Avantages	inconvénients	commentaires
ELISA	-Technologie établie et largement utilisé	-Teste un seul antigène a la fois	-Convient pour l'application en lab référence
	-Efficace, haut débit	-Nécessite des installations de Laboratoire	-Peut être adapté pour une utilisation avec équipement portatif
	-Coût relativement faible		
	-Technologie,semi-automatisée disponible		
Bille luminex	-Efficace à haut débit	-Relativement couteux	
	-Capable de tester plusieurs réponses spécifiques d'antigènes simultanément	-Exige un haut niveau d'expertise technique	
		-Nécessite des installations de Laboratoire	
		-Optimisation très étendue de billes couplées à l'antigène	
Protein micoarrays	-Evaluer les réponses anticorps à une large gamme d'antigènes	-Très couteux	-Peut être adapté à une application de laboratoire de référence
		-Exige un très haut niveau d'expertise technique	
		-Nécessite des installations de Laboratoire	
		Nécessite la production d'un grand nombre d'antigène	
Point-of-care tests	-Permet de tester dans des collectivités ou des établissements de santé	-Limiter à tester 2 ou 3 antigènes	-Convient pour dépistage à base communautaire et application de laboratoire de référence
	-Faible cout	-Semi-quantitatif seulement	
	-Résultat en quelques minutes, fournit les données en temps réel aux personnels et participants	-Faible sensibilité que les autres méthodes	
	-Aucune expertise de laboratoire ou des installations technique nécessaire		

Les anticorps antipaludéens utilisés pour les tests Point-of-care pourraient réduire les coûts, simplifier les tests, éviter les exigences de la chaîne du froid pour les échantillons prélevés, réduire le temps pour que les résultats atteignent les organismes centraux et fournir une rétroaction immédiate aux individus et aux communautés au sujet de l'exposition en cours, ce qui pourrait encourager les engagements aux interventions de lutte. Ils sont moins sensibles que ELISA ou les suspensions de billes Luminex, mais seraient censés avoir une sensibilité suffisante pour les applications de séro-surveillance.

MATERIEL ET METHODES

I- Sites d'étude

I.1. Contexte géographique, Sites d'étude et de recrutement

La Côte d'Ivoire est un pays d'Afrique occidentale situé dans la zone subéquatoriale, entre le 10ème degré de latitude Nord, le 4ème et le 8ème degré de longitude Ouest, elle couvre une superficie de 322 462 Km². Elle est limitée au Nord par le Burkina Faso et le Mali, à l'Ouest par le Libéria et la Guinée, à l'Est par le Ghana, et au Sud par le Golfe de Guinée. Le paludisme est endémique avec une grande hétérogénéité d'une région à une autre. (**Knoblauch et al., 2014**)

Le recrutement des échantillons biologiques de notre étude s'est déroulé sur trois sites sentinelles du PNLP de la Côte d'Ivoire (Abobo; Korhogo; Man) présentant des caractéristiques éco-climatiques différents (**Figure 12**). Ces sites ont été choisies parce qu'elles enregistrent des données bien repertoriées de prévalence clinique du paludisme et constituent des sites d'excellence d'essai clinique de l'Unité de Paludologie (UPAL) de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Une équipe de l'UPAL est basée sur place, surtout à Abobo depuis bientôt 10 ans pour la conduite de différentes études de recherche.

I.1.1 Abobo

Abobo est une zone périurbaine faisant partie de l'une des dix (10) communes de la ville d'Abidjan, zone la plus élevée de l'agglomération d'Abidjan, la commune d'Abobo est située à une altitude de 125 m au nord de la ville d'Abidjan. Le territoire communal est un vaste plateau bordé par des talwegs qui couvrent près de 2 460 hectares. Le relief laisse apparaître 22 principales cuvettes vers lesquelles sont drainées toutes les eaux pluviales. L'assainissement y est insuffisant. La commune bénéficie du climat subtropical avec deux saisons pluvieuses (une grande saison allant du mi-mars à juillet et une petite saison de fin septembre à fin novembre) et deux saisons sèches (une grande saison qui va de fin novembre à mi-mars et une petite de fin juillet à fin septembre). La pluviométrie annuelle excède 2200 mm et la température oscille entre 27 °C et 33 °C. La transmission du paludisme est quasi-permanente et hyperendémique (**Assoumou et al., 2008**)

I.1.2 Korhogo

La ville de Korhogo est le chef-lieu du district des Savanes de la Région du Poro, frontalière du Mali et du Burkina Faso. Korhogo se situe à 600 km d'Abidjan, la capitale économique et la plus grande ville du pays et à 500 km de Yamoussoukro, la capitale politique. Le climat est du type du climat soudanais : il est très chaud et très sec, avec, en décembre et janvier, l'harmattan, un vent puissant venu du Sahara, qui abaisse considérablement la température. La grande saison sèche

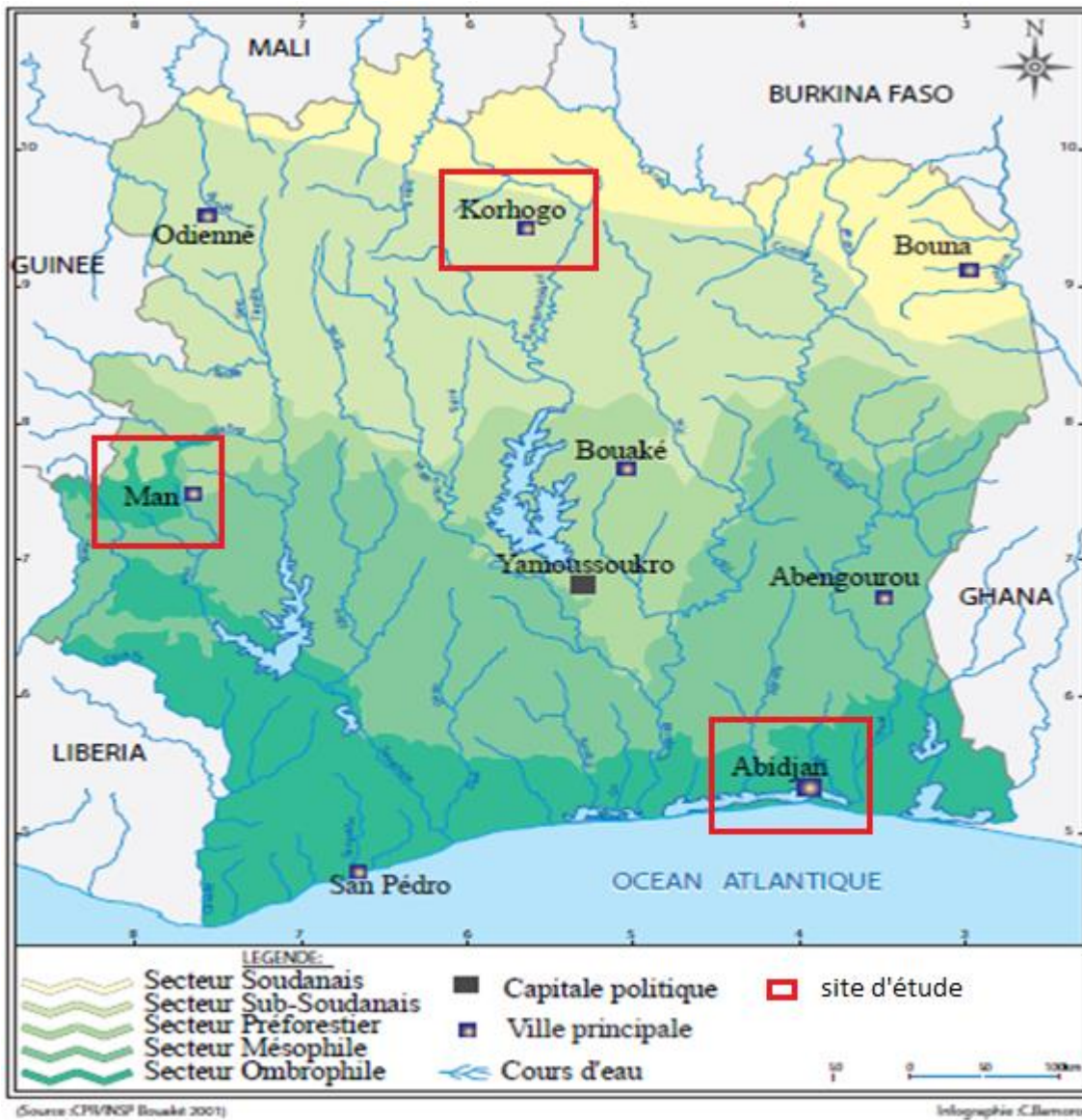


Figure 12: Localisation des sites d'étude

Source (PR/NSP Bouaké 2001)

(octobre - mai) précède la saison des pluies marquée par deux pics pluviométriques, l'un en juin et l'autre en septembre. Dans cette zone la transmission du paludisme est saisonnière et permanente (M'bra *et al.*, 2015).

1.1.3 Man

Man est une grande ville de l'ouest de la Côte d'Ivoire et le chef-lieu de la région du Tonkpi. La ville est surnommée "La ville aux 18 montagnes", et est située dans une cuvette entourée d'une chaîne de montagnes. Non loin de Man, se trouve également le Parc national du Mont Péko (34 000 hectares), qui abrite les dernières forêts primaires d'Afrique de l'Ouest avec une végétation luxuriante et une flore typique des régions montagneuses. La pluviométrie comprend les principales caractéristiques suivantes : 1300 à 2400 mm de pluies par an ; une répartition bimodale dans le Moyen Cavally et monomodale dans les régions des Montagnes et du Bafing. Les températures sont douces, avec une moyenne de 24°C. la transmission du paludisme humain dans cette zone forestière est permanente et hyperendémique (Raso *et al.*, 2009; Mara *et al.*, 2013).

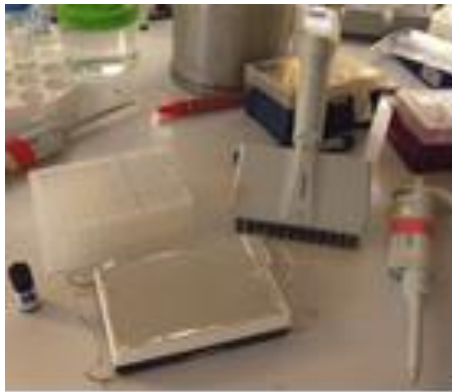
II. Matériel

II.1. Matériel biologique

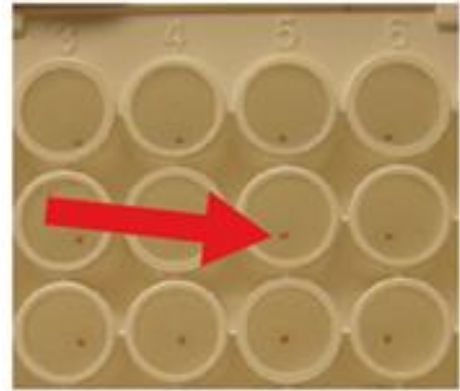
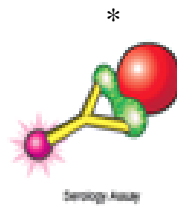
Le matériel biologique est constitué de serum et de sang total, recueillis chez les patients en milieu hospitalier. Aussi des parasites de *Plamodium falciparum* de la souche de reference 3D7 et local africain (Dielmo)07/03 ont été utilisés comme antigènes parasitaires pour la réalisation des tests immuno-enzymatiques (ELISA) . Les extraits de cerveau humain commercial (Novus[®]) ont servi à l'étude du répertoire de réponses auto-réactives.

II.2. Matériel Technique

Le matériel technique regroupe des Consommables de laboraratoire ,des chaines d'ELISA classique et multiplex (Magpix[®]) (**Figure 13**) et un dipositif classique pour réaliser des immunoblots quantitatifs. (papier nitrocellulose, cassette, plaque de verre, dispositif electrotransfert...).



a)



b)



c)



d)

Figure 13: Dispositif Magpix : **a)** petit matériel utilisé pour effectuer des test MBA (Multiple-Bead Assay), **b)** billes au fond du puits, **c)** appareil magpix et écran ordinateur, **d)** Sortie de l'écran de Magpix® avec le logiciel x-ponent 4.1

* *émission de fluorescence après reconnaissance de l'anticorps sur la bille couplée à l'antigène* : Source : Luminex Corp, 2012

III- Méthodes

III.1. Description des cohortes et procédure de recrutement

Sur la base des directives de l’OMS relative à la définition des formes cliniques du paludisme, différents groupes de patients ont été sélectionnés :

III.1.1. Patients avec un paludisme simple

L’étude de l’impact de la transmission sur les réponses immunes a porté sur des patients dont l’âge (varie entre 1 et 79 ans) venus en consultation au niveau d’une des formations sanitaires des villes ci-dessus mentionnées (**figure 12**) et présentant des signes cliniques évocateurs de paludisme simple. Ces patients ont été recrutés, une trentaine (n=30) par site lors d’un essai clinique randomisé conduit par l’Unité de Paludologie de Institut Pasteur de Côte d’Ivoire (IPCI) (**Touré et al., 2014**). Très brièvement, le diagnostic du paludisme a été réalisé par les examens biologiques [frottis sanguin (FS) et goutte épaisse (GE)] . La densité parasitaire a été évaluée au premier jour J0 de la consultation. Tous les consultants ont été hospitalisés, traités et suivis quotidiennement du jour 0 au jour 3 dans les centres de santé suivant le protocole de l’essai clinique. La parasitémie a été enregistrée toutes les 24 heures jusqu’à la confirmation de deux frottis sanguins consécutifs négatifs. Le temps de clairance parasitaire (PCT) défini comme le temps qui s’écoule entre le début du traitement et la fin de la parasitémie, a été déterminé pour chaque patient. Un questionnaire a été administré à l’inclusion à chaque patient comportant les symptômes (classé comme absent, modérée, intense), l’utilisation de moustiquaires imprégnées d’insecticide et la prise précédente d’antipaludique. La procédure comprenait un rappel des patients sur les jours 7-14-21-28-42 pour la confirmation de la guérison complète, en surveillant la tolérance biologique du médicament et la parasitémie. Aucune recrudescence de l’infection palustre n’a été enregistrée chez les patients suivis. Les échantillons de sérum après les examens biologiques au jour 0 ont été recueillis par centrifugation et conservés à -80 °C jusqu’aux analyses immunologiques. Pour ce groupe de patients et particulièrement à Abobo, une sérothèque est constitué depuis 2010 à la formation sanitaire Anoukoua-kouté (FSUCOM Anonkoua-Kouté) en collaboration avec l’Unité de Paludologie/ Institut Pasteur Côte d’Ivoire (IPCI) pour des études longitudinales. Près de 200 sérums ont été collectés entre 2010 et 2013.

III.1.2. Porteurs asymptomatiques et contrôles endémiques

L’une des formes cliniques intéressante pour comprendre les facteurs liés à la protection du paludisme est le portage asymptomatique. Ici, les individus asymptomatiques ont été des écoliers âgés de 6 à 13 ans fréquentant les écoles primaires d’Anonkoua-Kouté (EPP Anonkoua-Kouté I et II), ayant une température axillaire inférieure à 37,5 °C ne présentant aucun signes évocateurs, ni de

symptômes d'aucune forme de paludisme. Ils ont été sélectionnés lors de l'enquête menée par l'UPAL sur 207 écoliers de l'EPP Anonkoua-Kouté I et II avec l'appui de l'autorité villageoise. L'analyse parasitologique a été confirmée par une goutte épaisse positive chez 47 enfants qui ont été retenus comme individus asymptomatiques dans le cadre cette étude. Par ailleurs, 38 enfants avec une goutte épaisse négative ont été tirés au sort et ont servi de contrôles (EC). Aucune prise antérieure d'antipaludique (2 semaines avant) n'a été signalée au cours de l'enquête chez ces écoliers.

III.2. Prélèvements sanguins et évaluation de la parasitémie

Le sang veineux de chaque participant a été recueilli dans un tube EDTA à l'aide d'un vacutainer stérile au jour d'admission (Jo, avant le traitement). La numération formule sanguine (NFS) a été réalisée pour chaque participant de l'étude. Le sérum et plasma ont été obtenus après centrifugation à 3000 trs/min pendant 5 minutes, puis des aliquots constitués et conservés à -80°C jusqu'à l'utilisation pour les dosages immunologiques.

Les patients ont bénéficié d'une goutte épaisse et d'un frottis sanguin à Jo, puis à des intervalles de 24h durant les jours d'hospitalisation. La goutte épaisse et le frottis sanguin ont été préparés au GIEMSA dilué au 1/10^{ème}. La lecture s'est faite au microscope optique à l'objectif X100 avec de l'huile à immersion afin de déterminer la densité parasitaire et l'espèce plasmodiale. La densité parasitaire a été estimée en comptant le nombre de parasites asexués pour 200 champs microscopiques en rapport avec le taux de leucocyte mesuré à l'hémogramme pour chaque patient.

III.3. Considérations éthiques

Le recrutement des patients a été conduit selon les dispositions de la déclaration d'Helsinki et les dispositions légales et règlementaires de la Côte d'Ivoire en la matière. Le protocole d'étude a été approuvé par le Comité National d'Ethique de la Recherche (CNER) à sa session du 14 Août 2013 (N°56/MSLS/CNER-dkn). L'inspection d'enseignement primaire d'Abobo et la chefferie traditionnelle du village ont également donné leur accord pour le déroulement de cette étude dans leur localité. Un consentement éclairé a été requis pour chaque participant et / ou des parents ou tuteurs légaux des enfants. Le formulaire de consentement a été signé par ces derniers avant toute inclusion à l'étude.

III.4. Dosages immunologiques

Les dosages immunologiques se sont déroulés sur deux sites, avec les plateformes de sérologie multiplex et d'immunoblot, respectivement à l'Institut Pasteur de Dakar (IPD) et au Centre d'Immunité et d'Infection de Lille (CIIL). Ces deux structures d'accueil partage un partenariat

scientifique avec l'Unité de Paludologie (IPCI) et le laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique (UFHB).

III.4.1. Dosages immunologiques sur la plateforme de Dakar

Les réponses immunes spécifiques IgG antiparasitaires ont été déterminées à l'aide du système multiplex magpix. Il a été réalisé en parallèle la technique ELISA pour évaluer la réponse anticorps globale sur la souche parasitaire de référence 07/03.

III.4.1.1 Culture parasitaire et préparation des extraits parasitaires de la souche de référence africaine 07/03

a) Culture parasitaire :

Les parasites sont conservés à -180°C dans de l'azote liquide. Ils sont maintenus *in vitro*, en culture continue dans des globules rouges O+ (GR+) lavés 3 fois avec du RPMI 1640. Les étapes suivantes sont réalisées:

- La décongélation qui consiste d'abord à maintenir la souche de parasite à 37°C dans le bain marie pendant 2 minutes, ensuite à ajouter goutte à goutte, 0,1 volume de NaCl 12 % dans le tube contenant la souche tout en l'homogénéisant, et enfin à y rajouter après 5 min d'attente, 10 volumes de NaCl 1,6 % de la même manière que précédemment. La suspension parasitaire est centrifugée à 1500 tours/min pendant 5 min, puis lavée avec du RPMI 1640 avant d'être centrifugée à nouveau à 1500 tours/min pendant 10 min. Après avoir séparé les parasites du surnageant, ces derniers sont mis dans le milieu de culture avec un hématocrite à 5%, puis incubés à 37°C dans une étuve à CO₂, en respectant toutes les proportions de gaz requises (5% de CO₂).
- Le suivi des parasites se fait sur frottis mince fixé au méthanol, puis coloré au Giemsa (dilué à 1/10^e dans du PBS 1X) avant lecture au microscope photonique à l'immersion (objectif 100x). Le milieu de culture est renouvelé tous les jours pendant le suivi. Il est possible d'obtenir en quelques jours, une parasitémie (élevée) jusqu'à 10 %. On peut également synchroniser la culture en utilisant du D-sorbitol (5 g de D-sorbitol dans 100 mL d'eau) ou du Percol afin d'extraire le parasite sous une seule forme comme les mérozoïtes, les schizontes etc.

b) Préparation des extraits de schizontes :

Elle se fait à partir de culture synchrone au stade schizontes. Le culot de culture est lavée avec du PBS 1X, puis centrifugée à 1500 tours/min pendant 5 à 10 min. Les schizontes sont récupérées sous forme de culot au fond des tubes. Une calibration nécessaire est réalisée pour déterminer la concentration optimale des extraits antigéniques pour sensibiliser les plaques

d'ELISA. D'après les résultats de ce calibrage, 1/1200^{ème} est retenu comme la dilution optimale de l'extrait antigénique 07/03.

III.4.1.2. Test immuno-enzymatique ELISA

a) Principe

Le test ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) est une technique de dosage immuno-enzymatique, principalement utilisée pour détecter et/ou doser la présence d'anticorps ou d'antigènes dans un échantillon. Au cours de cette étude, le test d'ELISA indirect a été utilisé. L'antigène est fixé sur une plaque (96 puits), puis les anticorps de l'échantillon d'étude vont se fixer spécifiquement sur l'antigène, pendant la période d'incubation. Ensuite, l'ajout de l'anti-immunoglobuline (anticorps de détection) couplée à une enzyme (peroxydase) permet la transformation du substrat chromogène en produit coloré dont l'intensité, mesurée en densité optique (DO), est proportionnelle à la quantité d'anticorps détectés (**Figure 14**).

Le test est réalisé avec des plaques MAXISORP[®] sur lesquelles sont notés le type d'antigène, l'immunoglobuline recherchée, le numéro de la plaque et la date de la manipulation. Sur chaque plaque, on utilise systématiquement les sérums d'individus naïfs comme témoins négatifs, le sérum hyper immun (SHI) comme témoin positif et le blanc (tampon de dilution seulement) comme contrôle négatif. La réalisation du test passe par plusieurs étapes successives et tous les sérums sont testés en duplicata (*c-à-d* 2 puits par sérum) :

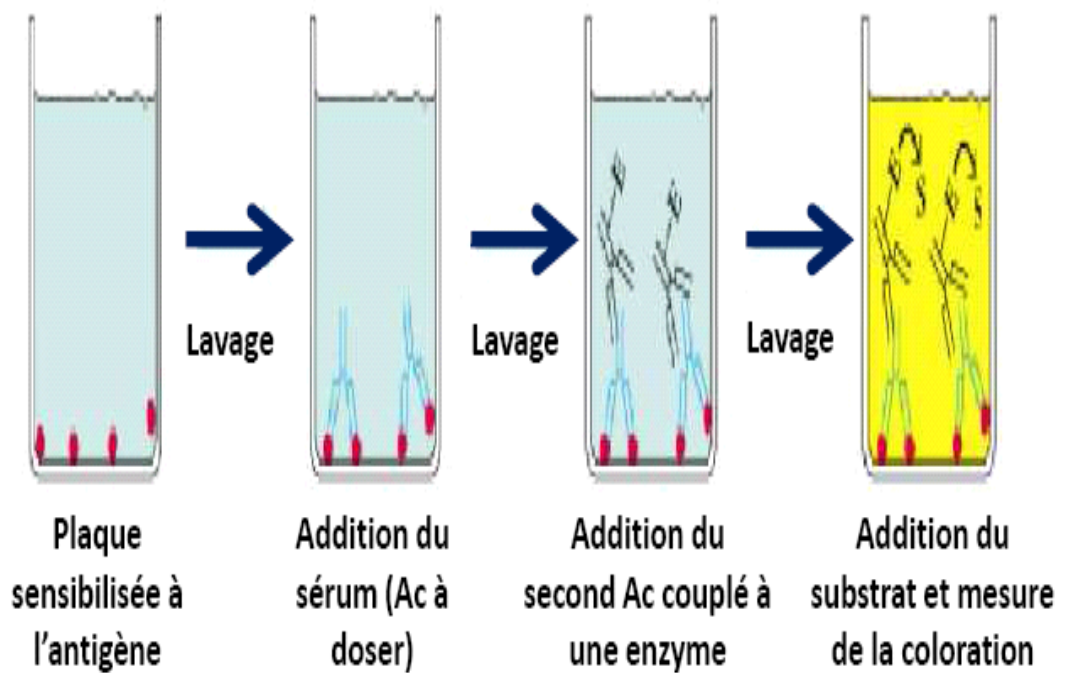


Figure 14: Principales étapes du dosage d'anticorps sériques par ELISA

Source : <http://www.mercier-groupe.com/> principale technique ELISA consulté le 12 Juin 2014

Adsorption ou « Coating » des plaques : les antigènes sont d'abord dilués (5µg/mL) dans le tampon de dilution des antigènes puis, 100 µL sont déposés dans chaque puits. Les plaques sont ensuite couvertes avec des papiers adhésifs transparents et gardées à +4°C pendant une nuit pour permettre aux antigènes de se fixer au fond des puits.

Lavage des plaques : après avoir sorti les plaques du réfrigérateur, elles sont lavées (4 fois) pour éliminer l'excès d'antigènes avec 250µL du tampon de lavage (PBS-Tween 20). Les puits remplis avec du tampon de lavage sont vidés par retournement des plaques, puis séchés en les tapotant sur du papier absorbant.

Saturation des plaques : pendant cette étape, 200 µL de tampon de saturation (PBS BSA 1 %) sont ajoutés dans chaque puits avant d'incuber les plaques à 37°C pendant 1 heure. Les puits sont ensuite vidés avant incubation des sérums.

Incubation des sérums : dans chaque puits, sont versés 100 µL de sérum dilué au 1/100^e dans PBS1X 0,05tween20 BSA 1%, en duplicata.

Incubation du conjugué (anti-immunoglobuline G couplée à la peroxydase) : après 6 lavages, 100 µL de conjugué dilué au 1/7000^e dans le tampon de dilution (PBS1X 0,05tween20 BSA 1%) sont distribués dans chaque puits. Les plaques sont recouvertes à nouveau, et incubées à 37°C pendant 1h.

Révélation : après 6 lavages, 100 µL de substrat ou réactif de révélation TMB, préparé extemporanément par mélange de volume égal des flacons A et B du kit de révélation sont additionnés dans chaque puits. Les plaques sont ensuite laissées 5 min dans l'obscurité, à température ambiante avant que la réaction ne soit stoppée par ajout de 50 µL de H₂SO₄ (4N) dans chaque puits. Il apparaît ainsi une coloration jaune dans les puits, dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'anticorps détectés.

b) Lecture et analyse des résultats

L'absorbance (DO) est mesurée entre 450 et 620 nm grâce à un lecteur de plaque ELISA et les résultats sont exprimés en ratio de DO (**rDO**) selon la formule suivante :

rDO = (Moyenne DO sérum) / (Moyenne DO sérums naïfs).(Perraut *et al.*, 2002).

c) Standardisation

Elles ont été faites selon les protocoles précédemment publiés pour les ELISA IgG et sous classes d'IgG. (Perraut *et al.*, 2002; 2003; Diop *et al.*, 2014). Tous les sérums sont testés en duplicata. Les valeurs sont exprimées en ratio de DO permettant d'homogénéiser les résultats et de limiter les variations intra et inter-analyses. Les individus négatifs correspondent à ceux dont la valeur moyenne de DO est en dessous de la moyenne des DO des contrôles négatifs (2 à 4 par plaques, pool SAB) + 3 SD,. Les duplicata avec un écart de 20% sont invalidés et re-testés.

L'homogénéité des réponses inter plaques est validée par 2 contrôles positifs un pool de sérum hyperimmuns (pool ABJ+) et un pool d'IgG immunes (Pool IgMH, don du Pr Marcel Hommel), la variation ne doit pas dépasser 15% pour validation.. Il est à noter que la procédure de standardisation inclut également une répartition programmée des échantillons afin qu'un même type de prélèvement ne se retrouve pas uniquement sur la même plaque (exemple les échantillons d'un même villages ou ceux à un même moment de suivi longitudinal).

III.4.1.3. Dosage sérologique multi-antigéniques par "multiplexage"

Pour mesurer la dynamique des réponses anticorps contre les divers stades parasitaires, il est nécessaire d'explorer le profil des réponses anticorps contre un panel d'antigènes parasitaires et d'adopter une méthodologie de multiplexage a l'aide du Magpix[®]

a) Les Antigènes spécifiques utilisés au multiplex :

Plusieurs antigènes peuvent être utilisés dans le système multiplex. Onze (11) antigènes sur la base des analyses de **Ambrosino et al., (2010)** ont été sélectionnés et validé par l'équipe de l'Institut Pasteur de Dakar, (IPD). Ce sont 8 peptides et 3 protéines recombinantes spécifiques de *Plasmodium* détaillé dans les **tableaux IV et V**.

Les peptides sont synthétisés et fournis par Genecust, (Allemagne) avec une cystéine N-Terminal couplé de façon covalente à la BSA (Sérum Albumine Bovine, Sigma, Aldrich). Les protéines recombinantes MSP1, MSP4 et PFEM1-13 ont été produites par l'Unité d'Immunologie (IPP). L'ensemble des antigènes inclus ont permis de suivre les variations des réponses contre tous les stades parasitaires de *P. falciparum* (espèce majoritaire en Côte d'Ivoire) et contre l'autre espèce plasmodiale (*P. malariae*) ainsi que le peptide salivaire des anophèles femelles.

Tableau IIV: Séquences des 8 peptides utilisés dans l'analyse multiplex

Peptides	Séquence N-terminal à C-terminal	g /mol	Etape du cycle de vie	Espèce plasmodiale	références
LSA1	LAKEKLQEQSDLEQERLAKEKLQEQSDLEQERLAKEKEKLQC	5297,97	Phase hépatique	<i>P. falciparum</i>	(Tangpukdee et al., 2009),
CSP	ANPNANPNANPNANPNVDPNVDPC	2557,67	sporozoite	<i>P. falciparum</i>	(Greenwood et al., 2005)
LSA3	VLEESQVNDIFNSLVKSVQQEQQHNV	3230,53	Phase hépatique	<i>P. falciparum</i>	
SALSA1	SAEKKDEKEASEQGEESHKKENSQESAC	3123,24	Sporozoite et phase hépatique		
GLURP	EDKNEKGQHEIVEVEEILC	2241,47	trophozoite		
PmCSP	GNAAGNAAGNDAGNAAGNAAGNAAGNAAGNAAC		sporozoite	<i>P. malariae</i>	(Ambrosino et al., 2010)
AMA1	YKDEIKKEIERESKRIKLNNDDEGNKKIIP RIFISDDKDSLKC	1986,9	trophozoite	<i>P. falciparum</i>	
gSG6-P1	EKVWVDRDNVYCGHLDCTRVATFC	2830,22	Protéine salivaire	<i>An. Gambiae</i>	

Tableau V: Protéines recombinantes utilisées dans l'analyse multiplex (Ambrosino *et al.*, 2010)

Protéines recombinantes	Etape du cycle de vie	Espèce plasmodiale
MSP1p19	mérozoïte	<i>P. falciparum</i>
MSP4p20	mérozoïte	<i>P. falciparum</i>
PF13	Merozoite (sequestration endotheliale)	<i>P. falciparum</i>

a) quantification des Immunoglobulines G par la technique sérologique multiplex Magpix

L'ensemble des antigènes ci-dessus cités a été couplé à des billes magnétiques fluorescentes comme décrit par Ambrosino (2010) (**Ambrosino et al., 2010**) et selon les instructions du fabricant du kit (ref 40-50016, Luminex corp, Austin, USA) (**Anonyme, 2011; 2012**). Ce dosage multi-antigénique suit les mêmes étapes que celle de l'ELISA classique. L'opération de dosage a été effectuée dans une pièce faiblement éclairée. Le mélange de billes réalisé après couplage (**annexe 1**) a été conservé dans un flacon opaque, et un aliquot de 2,5 µL contenant 3000 billes par Ag a été distribué dans les puits d'une plaque opaque de microtitrage à fond rond en polystyrène blanc (Ref.103977741, Fisher Scientific, Illkirch, Allemagne). Un volume de 100 µL de plasma dilué au 1/100 dans du PBS Tween 0,01 % de BSA 1 % (PBSB) a été ajouté dans les puits en duplicata, puis mélangé et incubé avec les billes à l'abri de la lumière sur un agitateur de microplaque (IKA®MTS, Wilmington, NC) à 350 tours par minute pendant 45 min. Le plasma est ensuite retiré par deux étapes de lavage avec 100 µL de PBSB. Lors du processus de lavage, les billes sont maintenues en culot au fond de la plaque grâce à un support aimanté. L'anticorps secondaire phycoérythrine-anticorps anti-humain dilué à 1/500 (chaîne gamma spécifique, F (ab')₂ fragment-R-phycoérythrine (Sigma, P-8047 St. Louis, MO) dans PBSB a été ajouté à chaque puits et l'ensemble incubé à l'obscurité sous agitation à 350 tours par minute pendant 45 min. Après deux lavages avec 100 µL de PBSB par puits, les billes ont été ensuite remises en suspension dans 120 µL de PBSB et analysé dans un système Multiplex MAGPIX (Millipore, USA) en utilisant le logiciel XPONENT 4.1 pour la détection des réponses d'anticorps (**Figure 14**). Les résultats ont été exprimés en intensité médiane de fluorescence (MFI).

b) Standardisation

Les mêmes critères utilisés pour l'ELISA ont été appliqués et validés pour la technique multiplex Magpix. Les individus non répondeurs sont ceux dont le signal MFI est < moyenne MFI contrôles négatifs + 3 SD. Les duplicatas non valides sont repris et la comparabilité inter-plaque est validée selon les mêmes critères avec les contrôles positifs.

Il est à noter que dans le cas particulier des analyses multiplex, une baisse progressive des niveaux de mesure peut être observée en fonction du temps selon les lots de billes (baisse général des signaux MFI). Afin d'éviter un tel biais, les analyses sont regroupées sur un intervalle de temps maximum de 15 jours après la fin du couplage des antigènes sur les billes. Chaque plaque permettant de traiter 40 sérums, 4 à 6 plaques peuvent être analysées quotidiennement et de manière continue soit autour de 200-300 sérums par jour. Les lots de billes sont prévus pour une utilisation complète sur une dizaine de jours maximum. Les tests pour les 300 sérums dans ce travail ont été réalisés sur 3 jours, y compris la reprise des duplicatas invalides, ce qui limite très fortement une dérive potentielle des niveaux de mesure.

III.4.2. Dosages immunologiques sur la plateforme du CIIL

Les réponses anticorps IgG et IgM ont été mesurées respectivement en ELISA avec des systèmes biotinylés de détection d'anticorps et en immunoblot semi-quantitatif dénommé « panama blot ».

III.4.2.1. Technique ELISA avec système biotinylé

a) Dosage des Immunoglobulines G et M totales :

Les concentrations des Immunoglobulines G et M (IgG, IgM) totales sont déterminées à partir des sérums des patients par la méthode ELISA. Des plaques de 96 puits à fond plat (Maxisorp) ont été sensibilisées toute la nuit à 4°C avec 100 µL d'anticorps monoclonal anti-IgG ou anti-IgM (Sigma Aldrich, Allemagne), puis saturées avec du PBS contenant 1 % de gélatine et 0,1 % de Tween 20 pendant 1 heure à 37°C. Après lavage en PBS-Tween 0,1 %, 100 µL de sérum de patient ont été déposés en duplicata, puis incubés pendant 1 heure à 37°C. La peroxydase anti-IgM humaine a été ensuite ajoutée pendant 30 minutes après une étape de lavage. Pour la recherche des IgG une étape de biotine (dilué 1/2000) de 1 heure d'incubation a été réalisée, suivie de l'ajout de son conjugué, la streptavidine-péroxydase (dilué au 1/20000). Le développement colorimétrique a été réalisé par ajout d'ABTS (2,2'-azino-bis (3 d'acide éthylbenzthiazoline 6-sulfonique) diammonium ; Sigma, St Louis, MO, USA). L'absorbance (DO) a été mesurée à 405 nm. Les concentrations d'immunoglobulines sériques de chaque individu ont été calculées à partir d'une gamme d'étalon d'IgG et d'IgM (Sigma Aldrich, Allemagne) rajoutée à chaque plaque.

b) Quantification des IgG et sous-classe (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4) anti-parasitaire 3D7 et anti-protéines extrait de cerveau :

• Quantification des IgG antiparasitaire :

L'extrait 3D7 a été fourni par l'équipe du Dr Khalife du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL) avec une concentration protéique de 2,2 mg/mL déterminée par le kit de quantification protéique BC assay (Interchim, France).

Les niveaux d'anticorps sériques (IgG totales et des sous-classes) dirigés contre les antigènes du parasite et l'extrait de cerveau ont été mesurés en utilisant la technique de dosage immuno-enzymatique (ELISA) comme décrit précédemment (**Garraud et al., 2003; Perraut et al., 2002**). Les plaques (Marxisorp) ont été sensibilisées par l'extrait antigénique à 1 µg/mL, puis incubées pendant une nuit à 4 °C. Les plaques ont été saturées pendant deux heures avec de la gélatine 1 % dans du tampon PBS-Tween20 0,1 %. Les échantillons de plasma ont été dilués dans du tampon (PBS + 1% de gélatine), 1 / 100 pour les IgG ; 1/50 pour les sous-classes (IgG1-4). Chaque échantillon a été ajouté en double sur la plaque ELISA, puis incubé pendant une heure à 37 °C. Après lavage, les anticorps IgG ont été détectés avec des anticorps de souris anti-IgG humaine-biotinylé (1/2000) (BD Pharmingen, Europe). Les sous-classes d'IgG ont été analysées avec les

anticorps monoclonaux de souris biotinylés spécifiques conjugués à la sous-classe anti-humain tel que :anti-humain de souris IgG1 à 1 / 4000 (SB 59052-08, Bedfordshire, UK), de l'anti-humain de souris IgG2 à 1/3000 (555874, BD, Allemagne), l'anti-humain de souris IgG3 à 1 / 4000 (59210-08, Sigma, St. Louis, USA) et l'anti-humain de souris IgG4 à 1/3000 (BD 555884, USA). Le substrat streptavidine-péroxydase (GE Healthcare, UK) conjugué de la biotine a été ajouté à la dilution de 1/20000. Le développement colorimétrique est obtenu par l'ABTS (2,2'-azino-bis 3 d'acide éthylbenzthiazoline 6-sulfonique) diammonium ; (Sigma, St Louis, MO, USA). L'absorbance a été lue à 405 nm en utilisant un lecteur de microplaques Vmax™ cinétique (Molecular Devices, Menlo Park, États-Unis).

- ***Quantification des IgG total anti-protéines extrait de cerveau :***

La mesure des anticorps dirigés contre les protéines de l'extrait de cerveau s'est faite de la même manière que celle de la mesure antiparasitaire. Les échantillons de sérum ont été dilués différemment : 1/50 pour la détection IgG et 1/25 pour les sous-classes (IgG1, IgG2, IgG3, et IgG4).

III.4.2.2. Quantification et standardisation des immuno-réactivités contre les antigènes cérébraux : la méthode « Panama-Blot »

a) Electrophorèse et transfert des protéines (antigènes)

Une quantité de 245 µg d'extrait de protéines cérébrales (Novus®) déposée sur gel a été séparé par SDS-PAGE sur gel de polyacrylamide à 10 %. La migration des gels est faite pendant 15 min à 50 volts puis à 100 volts dans le gel de migration pendant 1 heure. Les protéines séparées par électrophorèse ont été transférés sur membranes de nitrocellulose (Schleicher et Schnell, Dassel, Allemagne) par électrotransfert à 25 volts, constant pendant 1 heure. Les membranes ont été bloquées avec du PBS contenant 0,2 % de tween 20 (PBST) pendant toute la nuit.

b) Incubation des plasmas et révélation des réactivités des IgG

Les membranes sont incubées avec les plasmas des patients (en condition ajustée 1mg/mL d'IgG total) pendant 4 heures à la température ambiante à l'aide de système de cassette miniblot (Immunonetics, Cambridge, MA). Le système de cassette miniblot contient 28 canaux d'incubation permettant d'incuber simultanément 20 échantillons et 2 standards (pools de sérums individus infectés). Après lavage dans le PBS-TWEEN 20 (PBST), les membranes ont été incubées pendant 90 minutes à température ambiante avec des anticorps secondaires anti-IgG couplés à la phosphatase alcaline (Sigma-Aldrich). Après lavage, les anticorps fixés (immunoréactifs) ont été révélés avec du NBT/BCIP (nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) dans du tampon Tris contenant du NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, pH 9,5 (Promega, madison, WI). Les poids moléculaires des protéines du cerveau ont été déterminé après électrophorèse sur gel à 8% d'acrylamide par comparaison avec un marqueur de poids moléculaire « précision plus protein

Standards » (Bio-Rad, Richmond, CA). Ce standard contient 10 protéines recombinantes purifiées de poids moléculaires compris entre 10 et 250 kDa.

c) Identification et caractérisation des protéines du cerveau cible des anticorps

Le programme d'analyse statistique associé à l'immunoblot permet de répertorier les sections (bandes correspondant à la réactivité des immunoglobulines G sur les antigènes du cerveau). Les sections sur lesquels l'intensité des réactivités des IgG est significativement importante entre les groupes d'individus a été ciblées et analysées. Ainsi, les lysats de cerveau humain commercial NOVUS® ont été déposés sur gel à 8 % d'acrylamide. Après électrophorèse le gel est découpé en deux parties égales, l'une est colorée au bleu de coomassie et l'autre partie est transférée sur une membrane de nitrocellulose sur laquelle seront incubés les sérums d'individus asymptomatiques et de malades. Ensuite, le gel coloré au bleu de coomassie est superposé à la membrane pour localiser la bande d'intérêt déterminée suite aux analyses statistiques (logiciel IGOR).

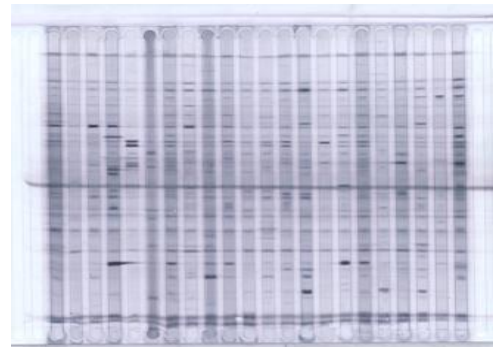
L'identification des protéines contenues dans la bande d'intérêt a été effectuée par analyse nanoLC-Orbitrap ms/ms. Les données spectrales sont ensuite interprétées par le moteur de recherche Mascot (version 2.4.0, Matrix Science, London, UK). L'analyse protéomique a été réalisée sur la plateforme technologique Protéomique et Peptides Modifiés (P3M) du Centre d'infection et d'immunité de Lille (CIIL). Les protéines majoritaires ont été sélectionnées en tenant compte de l'abondance de spectres dans la bande d'intérêt et du poids moléculaire attendu (**Figure 15**).

d) Standardisation

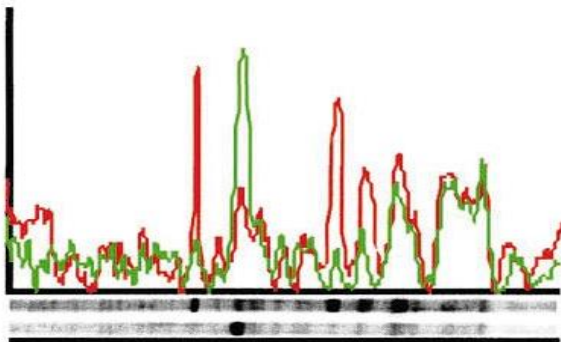
Toutes les membranes de nitrocellulose sont découpées à la même dimension. Sur chaque membrane sont déposés à la même position un standard (pool de serum) en duplicata et un marqueur de poids moléculaire. Une programmation d'analyse est faite de telle sorte que se retrouvent sur chaque membrane, les individus de chaque groupe étudié. Après coloration des membranes au protogold, les sérums du puits dans lequel il n'y a pas eu transfert de protéines (extrait de cerveau) sont ré-testés. Pour la normalisation des membranes entre elles, on choisit une membrane qui servira de membrane de référence, celle qui présente les plus "belles" réactivités (bandes), avec le moins d'artéfacts possible et une bonne coloration des protéines totales. Les autres membranes seront normalisées sur cette membrane de référence par l'application d'un facteur correctif. Par exemple, si une membrane a moins de protéines transférées, alors les réactivités (patients et standard) seront forcément plus faibles. Pour pallier à cette perte d'information, le logiciel appliquera ce fameux facteur correctif pour mettre au même niveau les deux standards des deux membranes et par voie de conséquence rehausser les réactivités du patient concerné. Le facteur correctif est différent pour chaque membrane. Les bande de reactivités sont définies en sections (S0, S1, S2...) en tenant compte des pics électrophorétiques du standard.



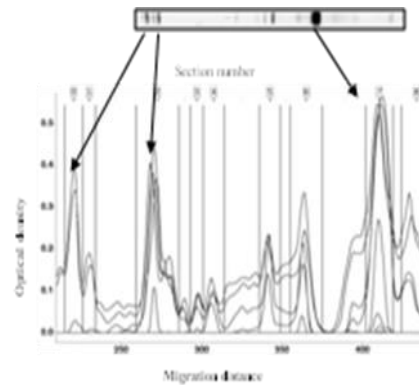
a)



b)



c)



d)

Figure 15: Stratégie "panamablott" avec dispositif cassette miniblot, membrane de nitrocellulose, pics électrophorétiques après analyse par le logiciel IGOR (Wavemetrics, lake Oswego, OR)

- a) système incubation serums
- b) bandes de reactivités immunologiques
- c) électrophoregramme
- d) sections définies à partir des pics de réactivité du standard

III.5. Analyses statistiques

III.5.1. Données sur le multiplex-magpix

Les quantités d'anticorps déterminés avec le multiplex et le pourcentage de répondants dans les différents groupes ont été comparés en utilisant respectivement le test de Mann-Whitney et le test exact de Fisher. La recherche de corrélation a été faite par le test des rangs de Spearman. Pour les comparaisons multiples associées, la correction de Bonferroni a été appliquée. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Statview 5.0 (SAS Institute Inc. 2011. Base SAS ® 9.3 Procédures Guide. Cary, NC : SAS Institute Inc.)

III.5.2. Données sur l'immunoblot semi-quantitatif « panama blot »

La méthode utilisée est celle de l'analyse statistique multivariée utilisant le logiciel IGOR (Wavemetrics, Lake Oswego, OR) qui a permis de développer une procédure spéciale (**annexe 2**) pour l'analyse statistique basée sur l'analyse en composantes principales (ACP) elle-même basée sur le calcul de co-variance multiparamétrique. L'ACP donne une image globale de la réponse immune contre l'extrait antigénique utilisé. La méthode « Panama blot » regroupe les expériences d'immunoblots, le traitement des données et programme d'analyse statistique. Les facteurs d'analyse en composante principale (ACP) sont classés selon la proportion de l'information qu'ils contiennent sur la réactivité totale. Ainsi, le facteur1 (ACP) est la représentation en une dimension du vecteur contenant la proportion la plus élevée de la variance totale, et le facteur 2, le second vecteur en une dimension de proportion inférieure, ainsi de suite. Chaque facteur est une combinaison linéaire de variables initiales (il s'agit ici dans notre cas de bandes de réactivité). Le facteur-1 représente le meilleur choix lorsqu'on veut avoir une idée globale des variables étudiées (ici, les autoréactivités). Pour la comparaison quantitative des facteurs entre groupes de patients, le test de Mann-Whitney a été utilisé, et pour comparer plus de deux groupes, le test de Kruskal-Wallis. Les associations qualitatives ont été analysées par le test de Person's χ^2 . Les corrélations ont été déterminées respectivement par régression linéaire, et le test de rang Spearman. Les tests statistiques ont été considérés significatifs pour une valeur de $p < 0,05$.

RÉSULTATS

Les résultats sont présentés en deux parties successives :

Premièrement les résultats générés par l'utilisation de l'outil sérologique multiplex-magpix dans le suivi de l'infection palustre, puis deuxièmement ceux résultant de l'implication de l'auto-réactivité dans la transmission et la protection du paludisme en Côte d'Ivoire.

I. Sérologie multiplex et suivi de l'infection palustre en Côte d'Ivoire

Dans ce chapitre sont présentés successivement les résultats de l'analyse des réponses Ac anti-*Plasmodium* sur trois sites sentinelles du PNLP avec des caractéristiques épidémiologiques distinctes, suivi de l'étude de l'impact du changement épidémiologique du paludisme sur ces réponses immunes humorales par une approche longitudinale.

I.1. Analyse du profil d'anticorps au cours du paludisme symptomatique sur trois sites sentinelles de surveillance du paludisme en Côte d'Ivoire.

L'objectif est d'évaluer le profil des réponses spécifiques Ac antiparasitaires chez les patients symptomatiques consultant pour un accès clinique confirmé dans les sites où les écosystèmes et les niveaux de transmission sont différents. L'analyse a été réalisée en sérologie multiplex-Magpix sur plus d'une dizaine d'antigènes de *Plasmodium* et le peptide salivaire de l'anophèle (gSG6-P1) avec en parallèle l'antigène total du parasite (AgT) de la souche 07/03 déterminé à l'Elisa.

I.1.1. Caractéristiques de l'échantillon d'étude

Le **tableau VII** résume les données générales des groupes étudiés. Ici, la cohorte est composée de 94 personnes souffrant d'un accès palustre simple et répartie sur les trois sites Abobo, Korhogo et Man. L'âge médian varie entre 9,5 et 10,5 ans sans montrer de différence significative entre les sites. Par contre, l'analyse de la densité parasitaire a montré des variations statistiquement significatives entre les sites étudiés ($p < 0,05$). L'utilisation déclarée de moustiquaire imprégnée (MILDA) est en proportion supérieure à Abobo par rapport aux deux autres sites. La prévalence clinique du paludisme enregistrée en 2013 est au-dessus de la moyenne nationale pour Korhogo et Man respectivement 147 et 185 cas pour 1000 habitants.

Tableau VI: Données générales du sous-groupe d'étude

	Abobo	Korhogo	Man
Situation géographique	Zone Sud	Zone nord	Ouest forestier
Effectif des patients	31	32	31
Nbre patients (<5ans)	3	7	10
Age : médiane ; moy [min ; max]	9,5 ;14 [2-54]	10,5 ;19,6 [1 -70]	10 ;13,9 [1-59]
Moyenne densité parasitaire (Tpz/μL) [min ; max] (trophozoïtes par μL)*	103 706 [3480-174000]	28 474 [2030-92800]	52 336 [2470-120000]
Hémoglobine : moyenne [min ; max] – G/L	10.9 [8,1-12,9]	10.7 [6,3-16,1]	9.2 [6,0-12,5]
Plaquettes : moyenne [min ; max] – 10^3/microL*	141 [32-309]	188 [37-530]	189 [26-536]
Durée de la transmission	Toute l'année	6-8 mois	8-12 mois
Utilisation individuelle de MILDA¹	27 %	10 %	20 %
Prévalence clinique du paludisme	59 ‰	147 ‰	185 ‰
% incidence du paludisme /moyenne nationale²	56,2 %	140 %	176 %
% de patients ayant clairance parasitaire >24h	90 %	13 %	32 %

¹ MILDA : moustiquaire imprégnée d'insecticide à longue durée d'action

² Incidence au plan national en 2013 de la morbidité du paludisme en Côte d'Ivoire a été de 105 ‰

Le test de Kruskal wallis a été appliqué pour la comparaison des moyennes ; l'astérix indique que la différence de moyenne pour ce paramètre est significative entre les sites étudiés ($p < 0,05$)

Prévalence clinique = taux de morbidité (source DIPE-MSHP, 2014)

1.1.2. Comparaison de la Prévalence des réponses anticorps spécifiques anti-Plasmodium (IgG) entre les différents sites étudiés

La proportion de répondeurs sur les dix antigènes de *Plasmodium* et l'antigène salivaire gSG6-P1, est déterminée sur les sites étudiés et présentée dans le **Tableau VIII**. Les niveaux de prévalence des réponses Ac sont très variables, allant de 3 % (IgG contre le peptide salivaire gSG6-P1) à 97 % (IgG contre la protéine recombinante MSP4p20). Pour chaque site sentinelle, le niveau moyen global de répondeurs est croissant entre les sites allant de 37 % à Man, 42 % à Abobo et 66 % à Korhogo.

Comme indiqué dans le **Tableau VIII**, les comparaisons statistiques des prévalences de réponses IgG relatives contre chaque antigène n'ont pas montré de différences significatives entre Man et Abobo, sauf pour l'antigène parasitaire LSA1-41. A Korhogo, la prévalence des réponses d'Ac spécifiques a été significativement plus élevée que celles des deux autres sites pour les marqueurs parasitaires CSP, LSA1-41, SALSA, AMA1, MSP4p20, et *P. malariae* CSP. La réponse contre LSA1-41 a été la seule qui différencie les 3 sites sentinelles en terme de répondeurs. La prévalence de répondeurs mesurée chez les individus contre l'antigène PFEMP-1_13 (PF13) a été significativement inférieure à Abobo (45 %) par rapport aux deux autres zones d'études (71 % et 91 % respectivement à Man et Korhogo).

1.1.3. Détermination des taux d'Ac spécifiques anti-Plasmodium dans les trois sites

Les niveaux de réponses d'Ac sont présentés dans le **tableau VIII**, elles sont traduites en valeurs moyennes de l'Intensité de Fluorescence (MFI) pour les réponses anticorps détectées au multiplex, et en ratio de densité optique (DO) pour la réponse contre l'extrait total parasitaire. La comparaison des niveaux de réponses d'anticorps est illustrée sur la **Figure 16** pour tous les antigènes étudiés et l'extrait total de parasite 07/03 (**Figure 16 a, b, c**).

Comme montré sur la **figure 16**, les niveaux de réponses contre les cibles Ag ont été très significativement supérieurs à Korhogo, où les patients interrogés, témoignent d'une faible utilisation des moustiquaires imprégnées (**tableau VII**) que dans les deux autres sites, notamment à Abobo où la prévalence clinique du paludisme est de 2,5 fois plus élevée. la différence de niveau de réponse calculée est très significative et élevée à Korhogo ($p < 10^{-3}$). La comparaison des réponses spécifiques aux marqueurs antigéniques à Abobo versus Man, n'a pas montré de différence significative, sauf pour l'antigène PF13 ($P = 0,04$). De même, la densité parasitaire (moyenne) calculée a montré une très nette différence significative entre les sites étudiés.

Tableau VII: Prévalence des réponses IgG des patients sur les sites étudiés

Réponse Ac contre	Abobo			Korhogo			Man		
	IgG (rDO/MFI) ^f	%	<i>p</i> ^a	IgG (rDO/MFI)	%	<i>p</i> ^b	IgG (rDO/MFI)	%	<i>p</i> ^c
Scz_Ag^e	4.1 [1-7.3]	84	NS ^d	3.9 [1- 10.4]	81	NS	3.6 [1- 11]	68	NS
CSP	110 [16- 920]	26	< 10 ⁻³	602 [26- 2 834]	75	< 10 ⁻³	133 [21- 2 139]	13	NS
LSA1_41	376 [22- 1 475]	61	0.04	1112 [31-8 171]	84	< 10⁻³	188 [27- 1 774]	32	0.03
LSA3	70 [16- 676]	10	NS	143 [40- 1 035]	31	NS	79 [19- 637]	10	NS
SALSA	112 [18- 886]	19	< 10 ⁻³	785 [26- 7 656]	59	<0.004	74 [22-376]	23	NS
AMA1	145 [21- 814]	39	< 10 ⁻³	713 [47- 3 337]	84	< 10 ⁻³	142 [37- 747]	35	NS
GLURP	403 [20- 2 006]	45	NS	1485 [38- 7 701]	50	NS	344 [29- 1 440]	35	NS
MSP1p19	1031 [34- 2 834]	81	NS	2203 [77-9 058]	88	NS	946 [42-3 305]	68	NS
MSP4p20	817 [22- 4 231]	77	<0.03	3125 [90- 10 674]	97	0.013	831 [49- 2 455]	74	NS
PF13	351 [21- 3 820]	45	< 10 ⁻³	1887 [67-10 036]	91	NS	402 [33- 1 601]	71	NS
CSP <i>P. malariae</i>	60 [24-370]	10	<0.016	232 [33-3 202]	38	<0.005	47 [25-267]	6	NS
gSG6 A <i>gambiae</i>	66 [18- 219]	6	NS	126 [25-452]	16	NS	83 [25- 744]	3	NS

P pvalue de la séroprévalence par le test exact de Fisher

a = Abobo vs Korhogo, b = Korhogo vs Man, c = Man vs Abobo, d = NS non significatif, e = ELISA, mesure des réponses d'anticorps contre l'extrait de schizonte exprimé en ratio de OD, f moyenne [minimum-maximum] des réponses d'anticorps exprimées par le ratio de DO (schizonte extrait) et MFI

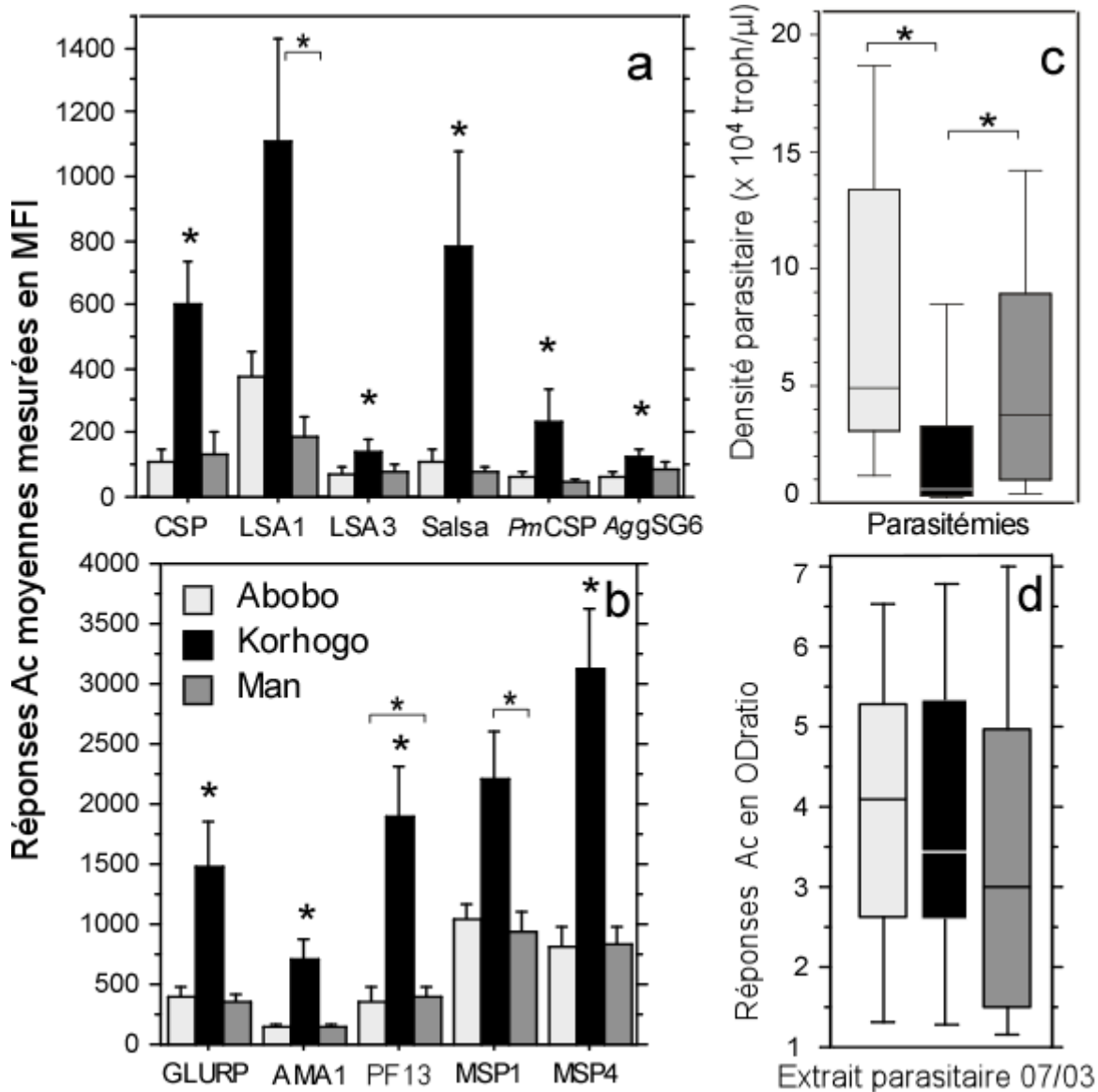


Figure 16: Analyse des réponses humores (multiplex magpix et Ag total de la souche 07/03) et parasitémie à l'inclusion chez 94 patients consultant dans 3 sites sentinelles de la Côte d'Ivoire

Les réponses anticorps mesurées au multiplex sont présentées par des boîtes à moustache avec les medianes exprimées en (MFI) pour les trois sites, à savoir, Abobo (gris clair), Korhogo (noir) et Man (gris foncé). Les réponses d'anticorps aux antigènes *P. falciparum* pré-érythrocytaires, *P. malariae* CSP et peptide salivaire *A. gambiae* sont présentées dans la partie (a) et (b). Dans la partie c, des réponses d'anticorps aux antigènes érythrocytaires sont présentés. Les valeurs moyennes de parasitémie et les niveaux de réponses d'anticorps contre l'antigène de l'extrait de schizonte sont représentés respectivement dans la partie c et d. les Astérix au-dessus des barres indiquent des différences significatives dans les niveaux d'anticorps ($P < 0,05$)

- Au niveau de la boîte à moustache la valeur centrale du graphique est la **médiane** Les bords du rectangle sont les **quartiles** (Pour le bord inférieur, un quart des observations ont des valeurs plus petites et trois quart ont des valeurs plus grandes, le bord supérieur suit le même raisonnement).

Le fait intéressant à noter, c'est que la réponse IgG contre l'extrait total de parasite (de la souche de référence 07/03) n'a pas permis de discriminer de manière significative l'immunité entre les sites malgré son fort taux de réponse anticorps à Korhogo, contrairement à l'ensemble des autres marqueurs parasitaires analysés au multiplex. Il apparaît donc qu'avec un sondage limité sur une trentaine de prélèvements par site, ciblé sur du paludisme symptomatique, l'analyse multiplex a permis de discriminer les niveaux d'immunité et par extrapolation de déterminer le risque relatif de gravité du paludisme (notamment l'hyperparasitémie, **Figure 16c**).

1.1.4. Corrélation entre les réponses anticorps contre les diverses cibles et relation avec l'âge

Les résultats de l'analyse des corrélations entre les réponses d'anticorps contre les différentes cibles et l'âge des individus sont détaillés dans le **Tableau IX**.

Une forte corrélation entre les réponses d'anticorps à presque tous les antigènes cibles a été observée, avec une exception pour l'extrait parasitaire 07/03 et MSP1p19. La relation réciproque entre les réponses d'anticorps n'a pas été significative pour l'ensemble extrait de schizonte 07/03 et l'Ag recombinant MSP1p19.. La corrélation entre l'âge et les réponses d'anticorps est significative pour 7/12 antigènes et cette significativité ne reste que pour antigène GLURP après correction Bonferroni ($\rho = 0,5$, $p < 10^{-3}$).

Tableau VIIIVIII: Corrélation entre les réponses Ac spécifiques des Ag parasites et l'âge chez les patients symptomatiques

Inter-relation entre les réponses Ac et avec l'âge des individus dans le paludisme de recrutement clinique																																				
Antigènes	MSP4			CSP			LSA1			LSA3			GLURP			Salsa			MSP1			PF13			AMA1			Pm CSP			Saliv			schz07/03		
	Rho	P	P _B	Rho	P	P _B *	Rho	P	P _B	Rho	P	P _B	Rho	P	P _B	Rho	P	P _B	Rho	P	P _B	Rho	P	P _B	Rho	P	P _B	Rho	P	P _B	Rho	P	P _B			
CSP	0,46	<10 ⁻³	Ok																																	
LSA1	0,24	0,02	NS	0,49	<10 ⁻³	Ok																														
LSA3	0,34	<10 ⁻²	NS	0,44	<10 ⁻³	Ok	0,16	0,12	NS																											
GLURP	0,34	<10 ⁻²	NS	0,43	<10 ⁻³	Ok	0,32	0,00	NS	0,34	<10 ⁻²	NS																								
Salsa	0,44	<10 ⁻³	Ok	0,64	<10 ⁻³	Ok	0,28	0,01	NS	0,43	<10 ⁻³	Ok	0,48	<10 ⁻³	Ok																					
MSP1	0,37	<10 ⁻³	Ok	0,25	0,02	NS	0,29	0,01	NS	0,21	0,04	NS	0,26	0,01	NS	0,20	0,05	NS																		
PF13	0,44	<10 ⁻³	Ok	0,40	<10 ⁻³	Ok	0,21	0,04	NS	0,39	<10 ⁻³	Ok	0,33	<10 ⁻²	NS	0,54	<10 ⁻³	Ok	0,07	0,51	NS															
AMA1	0,46	<10 ⁻³	Ok	0,52	<10 ⁻³	Ok	0,18	0,08	NS	0,49	<10 ⁻³	Ok	0,33	<10 ⁻²	NS	0,77	<10 ⁻³	Ok	0,22	0,03	NS	0,54	<10 ⁻³	Ok												
Pm CSP	0,40	<10 ⁻³	Ok	0,49	<10 ⁻³	Ok	0,23	0,03	NS	0,55	<10 ⁻³	Ok	0,37	<10 ⁻³	Ok	0,55	<10 ⁻³	Ok	0,00	0,99	NS	0,55	<10 ⁻³	Ok	0,53	<10 ⁻³	Ok									
Saliv	0,26	0,01	NS	0,32	<10 ⁻²	NS	0,05	0,65	NS	0,38	<10 ⁻³	Ok	0,11	0,29	NS	0,40	<10 ⁻³	Ok	0,30	0,00	NS	0,42	<10 ⁻³	Ok	0,46	<10 ⁻³	Ok	0,31	<10 ⁻²	NS	0,15	0,14	NS			
schz07/03	0,20	0,06	NS	0,21	0,04	NS	0,21	0,04	NS	0,07	0,52	NS	0,43	<10 ⁻³	Ok	0,24	0,02	NS	0,25	0,01	NS	0,31	<10 ⁻²	NS	0,25	0,02	NS	0,14	0,17	NS	0,15	0,14	NS			
âge	0,21	0,04	NS	0,37	<10 ⁻²	NS	0,19	0,07	NS	0,15	0,14	NS	0,50	<10 ⁻³	Ok	0,33	<10 ⁻²	NS	0,00	0,99	NS	0,30	<10 ⁻²	NS	0,20	0,05	NS	0,29	0,01	NS	0,04	0,73	NS	0,30	<10 ⁻²	NS

* Probabilité significative ou non de la corrélation après correction de Bonferroni prenant en compte toutes les analyses (n=78, P < 0.0006)

*Probabilité des coefficients de corrélation après correction de Bonferroni pour toutes les combinaisons (n = 78; P <0,0006), OK = différence significative, NS = non significatif

Dans ce tableau à double entrée sont résumés les résultats de l'analyse réciproque de corrélation entre les réponses d'anticorps à tous les antigènes, et entre l'âge et les réponses d'anticorps sur la dernière ligne. La forte relation de corrélation entre les réponses IgG dirigés contre tous les antigènes a été démontré (55 étaient significatifs sur 66, P < 0,05); il ne reste important pour 30 sur 66 après correction de Bonferroni (P < 0,0006). La corrélation entre l'âge et les réponses d'anticorps est significative pour 7/12 antigènes et cette significativité ne reste que pour antigène GLURP après correction Bonferroni.

1.1.5. Relation entre les niveaux de réponses IgG antiparasitaires et les critères clinico-biologiques des patients

Les réponses IgG antiparasitaires ont été analysées en fonction des divers paramètres tels que la densité parasitaire, les plaquettes et la clairance parasitaire.

Il n'y a pas eu de corrélation entre la densité parasitaire (log-transformée) observée au recrutement (J_0) avec les réponses d'anticorps contre tous les antigènes, à l'exception des réponses IgG contre les peptides parasitaires LSA3 et PF13 qui ont présenté des corrélations négatives et respectivement significatives ($p < 10^{-3}$, $\rho = -0.35$) et ($p < 10^{-4}$, $\rho = -0,41$). La distinction des densités parasitaires par groupe de densité parasitaire (DP) inférieure ou supérieure à 50.000 trophozoïtes/ μL , a montré que seules les réponses Ac anti-PF13 sont restées significativement plus faibles ($p = 0,01$) chez les personnes ayant des niveaux élevés de parasites (environ un tiers de la cohorte globale). Une relation significative a été trouvée entre la parasitémie et la thrombopénie ($P < 0,001$), ainsi la thrombopénie diminue lorsque la parasitémie augmente.

Par ailleurs la relation entre les réponses immunitaires et l'efficacité du traitement a été analysée en groupe stratifiée par rapport au temps de disparition de la densité parasitaire au cours du suivi des patients. Deux groupes ont été définis: clairance parasitaire rapide ($t \leq 24$ h) et clairance parasitaire lente ($t = 48-72$ h). Comme montré sur la **Figure 17**, la tendance générale est un niveau d'anticorps plus élevés chez les individus ayant une clairance parasitaire rapide après traitement. Dans ce groupe, des niveaux d'anticorps ont été trouvés significativement plus élevés pour 50 % des marqueurs parasitaires étudiés, à savoir, LSA3, SALSA, AMA1, PF13, MSP4p20 et PmCSP. La contribution potentielle des réponses d'anticorps dans l'élimination du parasite post-traitement semble un résultat intéressant à mentionner ici. Elle semble être associée à la densité parasitaire initiale, sachant que le niveau de la parasitémie au moment de l'inclusion est un indicateur partiel de la vraie biomasse parasitaire. En effet les densités parasitaires faible ont été observées à Korhogo ainsi que des niveaux élevés d'anticorps qui ont conduit à 90 % de la clairance de 24 h sur ce site. Cependant, sur l'ensemble de la population d'étude, 22 personnes sur 50 ont également éliminé les parasites en 24 h, 3 individus pour Abobo et 19 pour Man. Les individus qui ont eu une clairance parasitaire en 24 h avaient des niveaux de densité parasitaire très variable (de 2030 à 174000 trophozoïtes par μL), incluant ceux de Korhogo qui ont montré un niveau moyen de densité parasitaire d'environ 30000 trophozoïtes par μL , ce qui n'est pas significativement plus bas que les deux autres villages (moyenne densité parasitaire d'environ 55000 trophozoïtes par μL). Comme le montre le graphique de la **figure 18**, il y a eu à une clairance parasitaire rapide après traitement, chez les individus avec de faible densité parasitaire à l'inclusion J_0 .

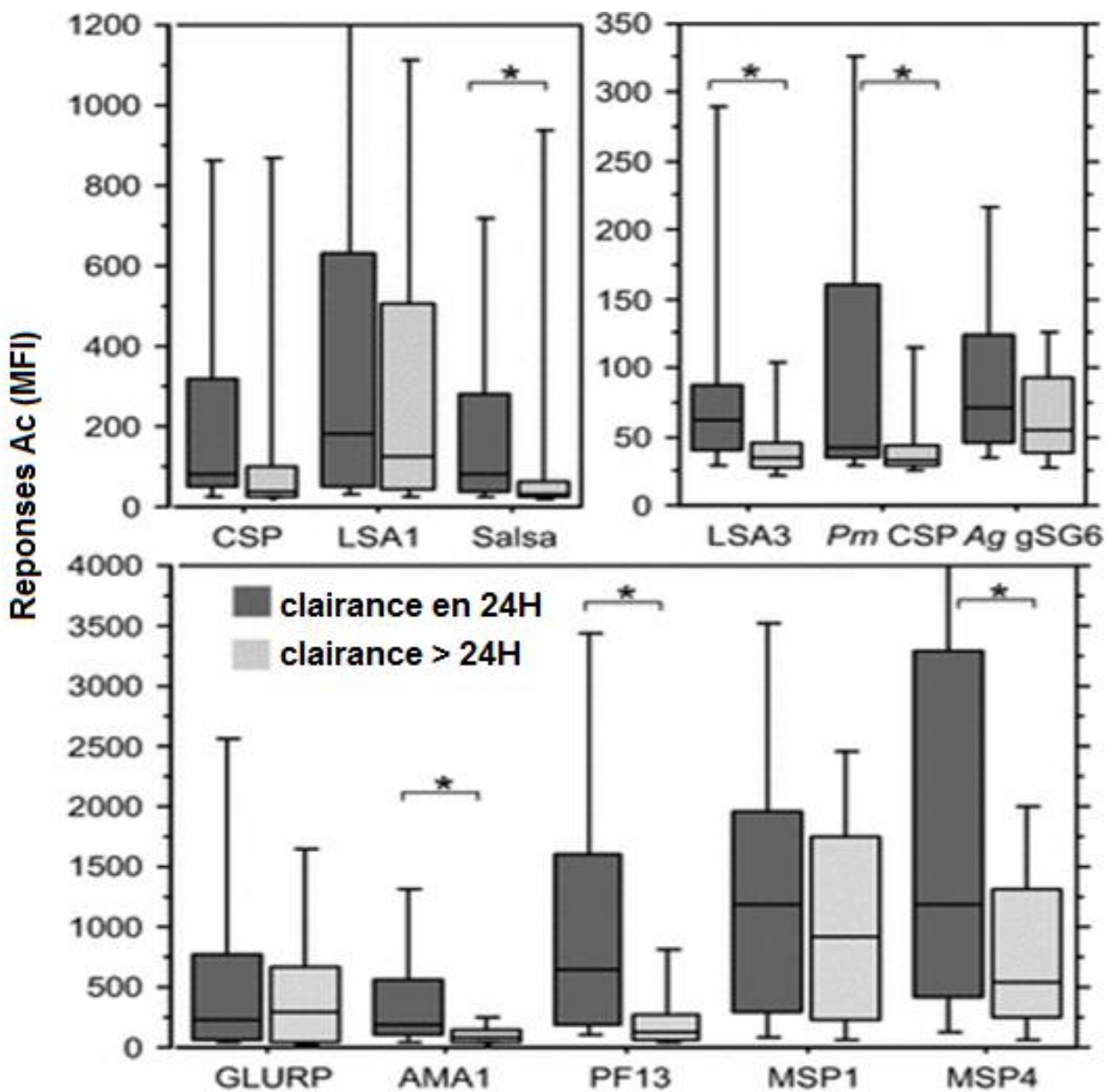


Figure 17: Analyse des niveaux de réponse immune humorale en fonction des temps de clairance parasitaire; rapide (< 24 h) et lente (> 24 h) chez l'ensemble des malades traités par Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine (CTA)

L'astérix sur les barres à moustache indique une différence de réponse anticorps significative ($p < 0,05$)

- La valeur centrale de la boîte à moustache est la **médiane** (il existe autant de valeur supérieures qu'inférieures à cette valeur dans l'échantillon).
- Les bords du rectangle sont les **quartiles** (Pour le bord inférieur, un quart des observations ont des valeurs plus petites et trois quart ont des valeurs plus grandes, le bord supérieur suit le même raisonnement).
- Les extrémités des moustaches sont calculées en utilisant **1.5 fois l'espace interquartile** (la distance entre le 1er et le 3ème quartile)

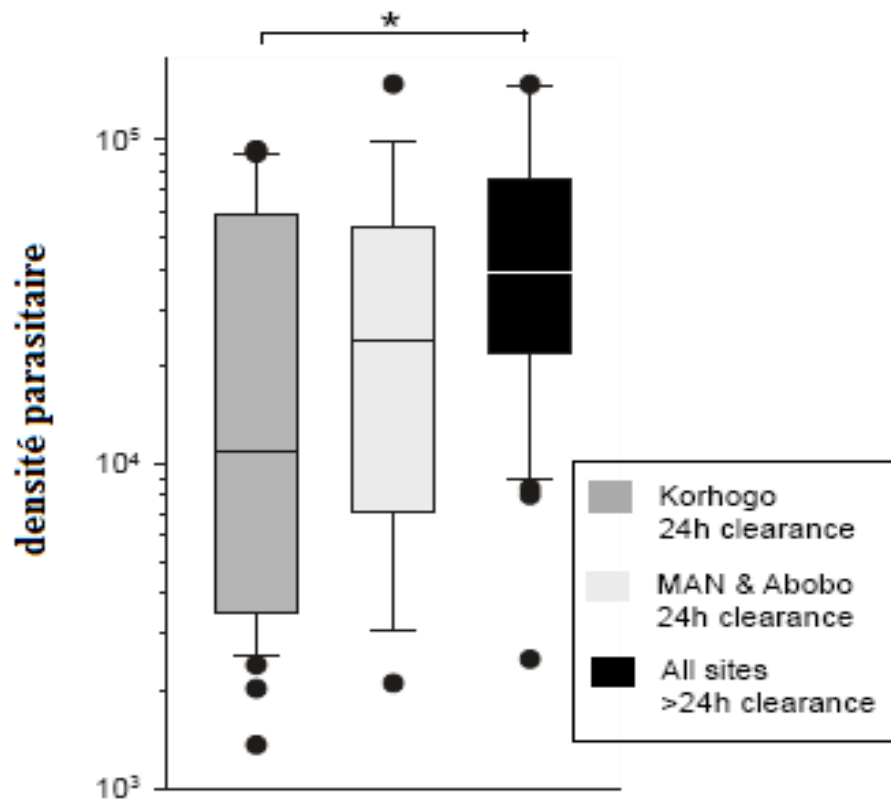


Figure 18: La répartition des densités parasitaires entre les individus de clairance rapide (< 24 h) et lente (> 24 h) au niveau des sites étudiés représenté par des barre à moustache a savoir korhogo (gris foncé) Man et Abobo (gris clair) et l'ensemble des sites (noir)

L

boite noire represente la distribution de densité parasitaire à J0 des individus qui ont une clairance lente (>24H).

- La valeur centrale e la boite à moustache est la **médiane** (il existe autant de valeur supérieures qu'inférieures à cette valeur dans l'échantillon).
- Les bords du rectangle sont les **quartiles** (Pour le bord inférieur, un quart des observations ont des valeurs plus petites et trois quart ont des valeurs plus grandes, le bord supérieur suit le même raisonnement).
- Les extrémités des moustaches sont calculées en utilisant **1.5 fois l'espace interquartile** (la distance entre le 1er et le 3ème quartile)

I.2. Utilisation du système multiplex Magpix pour analyser le suivi longitudinal de l'impact des changements épidémiologiques à Abobo sur les réponses Ac antiparasitaires.

Dans la suite des analyses transversales sur les patients symptomatiques, l'utilisation de sérothèques de patients recrutés lors d'essais cliniques sur les années 2010, 2012 et 2013 a permis un suivi longitudinal dans la commune d'Abobo. Le but a été d'identifier une signature sérologique et/ou une relation éventuelle entre les réponses Ac spécifiques avec les changements épidémiologiques liés à l'implémentation avérée des mesures de lutte intégrées dans la zone d'Abobo.

I.2.1. Analyses des données cliniques sur le Paludisme dans le district sanitaire d'Abobo de 2010 à 2013

Comme montré sur la **figure 19**, il y a eu une baisse très significative de l'incidence clinique du paludisme dans ce district sanitaire entre 2010 et 2013. La quantité de traitements ACT nécessaires a diminué, cependant une forte augmentation du nombre de moustiquaires imprégnées distribuées durant cette même période a été notée. La consommation générale des ACT a diminué de manière concomitante à l'incidence du paludisme. Tous ces indicateurs témoignent des résultats très encourageant, notamment que les ACT sont réellement utilisés pour des cas avérés de paludisme dans cette commune urbaine. Cette politique voulue par l'OMS pour éviter l'émergence de souches résistantes à l'artémisinine (global plan for artemisinin resistance containment, GPARC OMS 2011) a été appliquée et le bilan a montré une progression de l'efficacité de la lutte. L'objectif de l'OMS pour une couverture par des moustiquaires imprégnées d'insecticide de 60 % a été presque atteint (52 % en 2013), et le challenge de maintenir ce taux de couverture semble se réaliser malgré la crise économique qui menace les investissements selon l'OMS. Le récent rapport fait, en effet, état d'une couverture satisfaisante proche de 60 % en 2015.

I.2.2. Effectifs et caractéristiques des patients analysés de 2010 à 2013

Comme il s'agit d'une étude rétrospective, la composition des groupes a été assez hétérogène du point de vue du nombre de patients et de l'âge. L'ensemble des caractéristiques des groupes sont résumées dans le **Tableau IX**.

Sur les **figures 20a et 20b** sont illustrées la répartition de l'âge des individus de chaque cohorte et les densités parasitaires moyennes mesurées au moment du recrutement.

Les recrutements de 2010 ont inclus des individus significativement plus jeunes que les autres années ($P < 10^{-3}$). En ce qui concerne les densités parasitaires observées, il n'y a pas eu de différence significative entre toutes les années en comparant les données brutes (nombre de trophozoïtes par μL). Cependant, leur transformation en log montre des résultats différents reflétant mieux la réalité et illustrés sur la **figure 20b**.

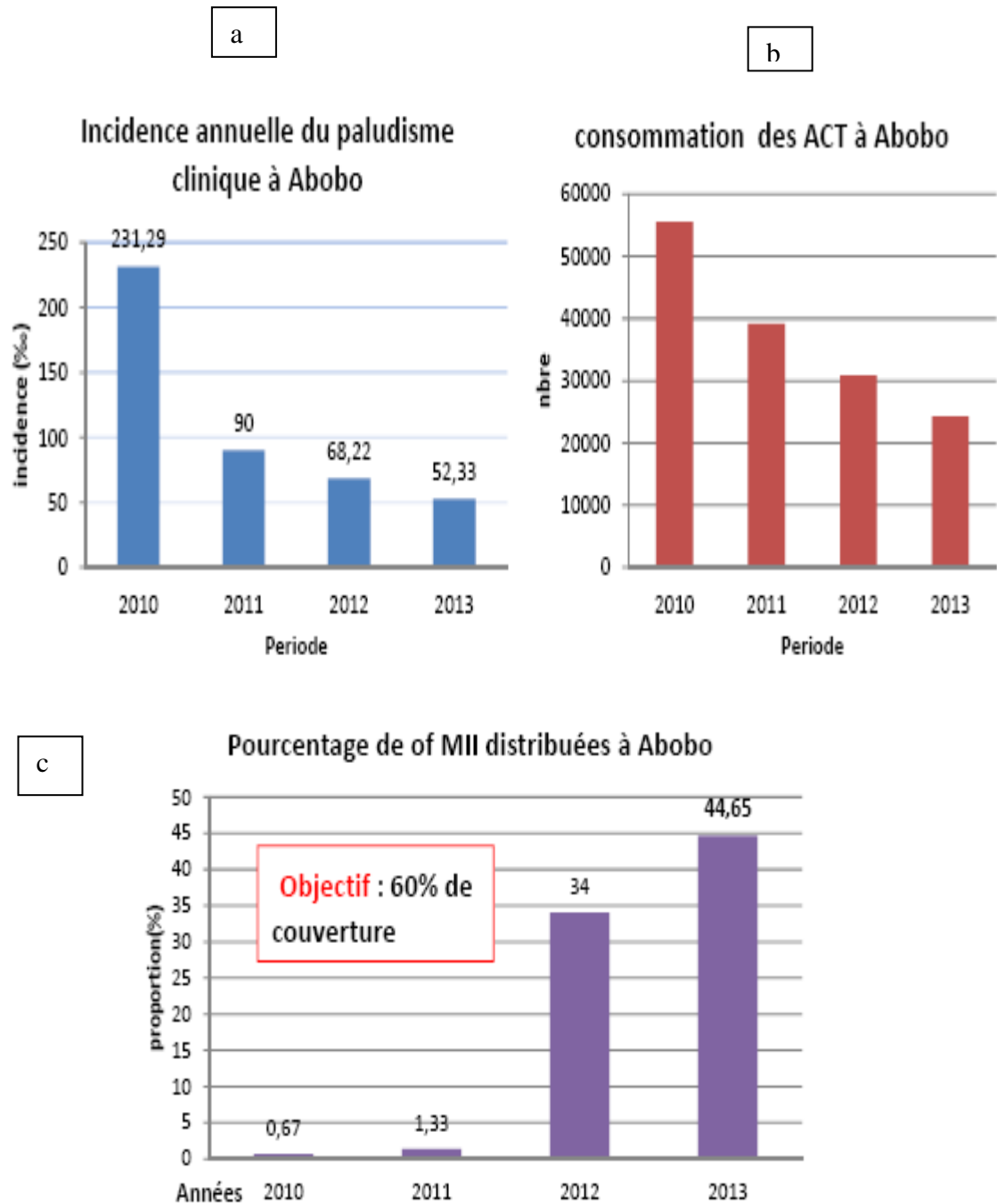


Figure 19: Profil de l'incidence du paludisme et des mesures de lutte enregistrées sur Abobo de 2010- 2013

a) évolution de l'incidence annuelle du paludisme, b) consommation des dérivés à base d'artémisinine (ACT)
 c) proportion de moustiquaire imprégnée à longue durée d'action par habitant à Abobo (source ministère de la santé et de hygiène publique CI 2014)

Tableau IIX : Caractéristiques des patients recrutés à Abobo (2010 à 2013)

Année de recrutement	2010	2012	2013
période	Octobre 2010	Août 2012	Septembre 2013
total	57	56	62
Mediane âge	8	16,4	17,7
< 5ans - paras.	12 - 130991	8-53173	6 - 85556
5-10ans - paras.	32 - 89256	15 - 43813	17 - 74605
10-15ans - paras.	13 - 54926	11 - 41460	16 - 87269
> 15ans - paras.	na	22-21470	23 - 28236
Paras - Med	46093	26360	32205
Paras < 10ans	44486	49280	30640
Paras > 10ans	41566	6666	28906

- *Paras - Med = densité parasitaire mediane du groupe (tpz/μL) ;*
- *densité parasitaire, des individus inférieur à 5ans (< 5ans - paras.), entre 5-10ans (5-10 ans - paras.) ; entre 10-15 ans (10-15 ans - paras.)*
- *na = indéterminé*

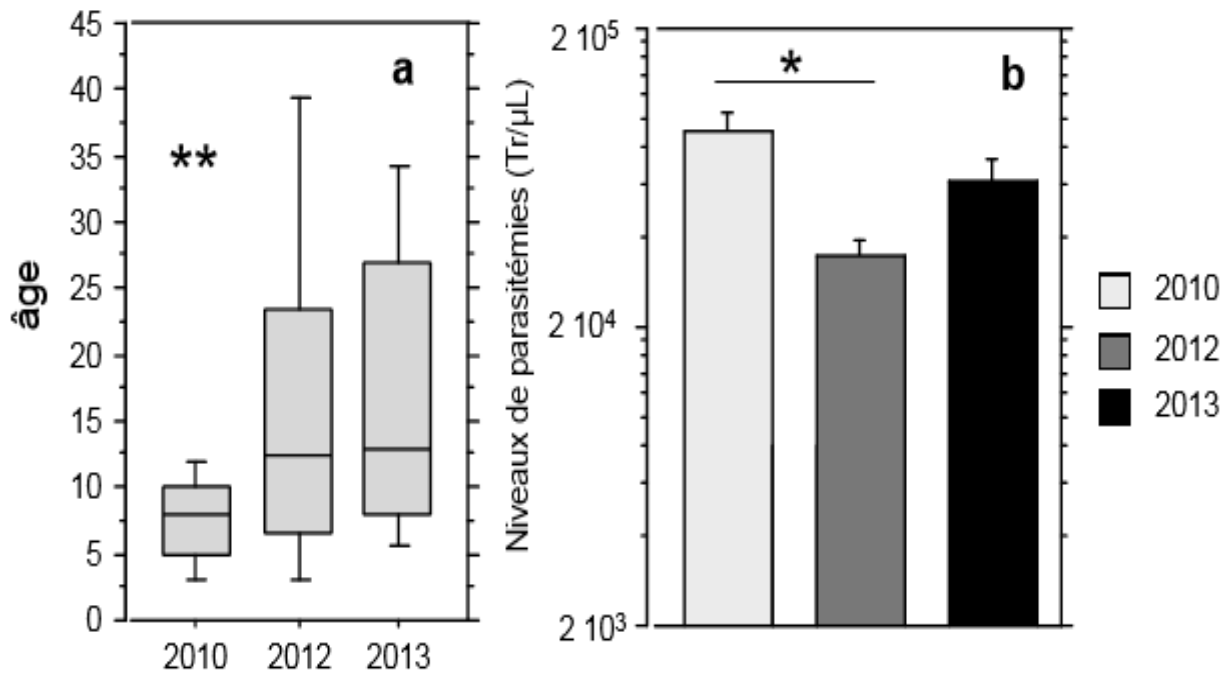


Figure 20: a) Répartition des âges et b) des densités parasitaires des patients par année (2010 à 2013)

L'astérix* indique une différence significative ($p < 0,05$)

1.2.3. Caractéristiques des réponses Anticorps (Ac) antiparasitaires de 2010 à 2013

Les réponses Ac contre l'extrait de schizonte (AgT), MSP4, MSP1 et PF13 sont montrées sur la **figure 21** afin d'illustrer l'essentiel des résultats du **tableau X** sous forme de graphiques stratifiés selon les tranches d'âge, à savoir < 5ans ; 5-10 ans ; 10-15ans et > 15ans.

Dans le **tableau X** sont résumées toutes les combinaisons de comparaisons entre les années pour chaque Ag. Les comparaisons ont été faites 2 à 2 par le test de Mann Whitney, cela a concerné les taux d'anticorps de l'ensemble des individus par année (colonne « All », du **tableau XI**) avec les niveaux d'anticorps des plus jeunes, soit < 5 ans et < 10 ans.

Au regard du suivi longitudinal des réponses Ac contre l'extrait de schizonte (Schiz. Extrc.), il n'y a pas eu de différence significative entre les groupes et même par groupe d'âges séparés. Il y a eu, cependant, une tendance à la baisse pour les plus jeunes (< 5 ans) entre 2010 et 2013, mais cette baisse ne ressort pas statistiquement, probablement en raison des faibles effectifs dans cette catégorie. Cependant, si tous les individus < 10 ans sont regroupés, une baisse significative entre 2010 et 2012 ($P = 0,02$) est observée.

Si on considère les antigènes spécifiques, il est observé peu de différences significatives entre les années si ce n'est pour les réponses anticorps anti- CSP et anti-gSG6 qui ont baissé significativement en 2013. C'est un argument qui peut être éventuellement relié à la baisse effective de la transmission au vu du recul de l'incidence clinique jusqu'en 2013.

Pour ce qui concerne le marqueur antigénique MSP4, globalement il n'y a pas eu de différence entre les groupes. Cependant, des différences significatives signant une baisse en 2013 par rapport à 2012 ou 2010 ($P < 0,05$) pour les plus jeunes (< 5ans) ont été observées.

Le seul antigène qui a donné un résultat analogue sur la durée est PF13 qui a diminué chez les plus jeunes entre 2012 et 2013.

Tableau X: Comparaisons diverses des niveaux d'Anticorps chez les patients à Abobo année par année

	2010 vs 2012				2010 vs 2013				2012 vs 2013				
	T	<6ans	6_10ans	11_15ans	T	<6ans	6_10ans	11_15ans	T	<6ans	6_10ans	11_15ans	>15y
Schiz. Extrc.	ns	ns	0.01	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CSP	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
LSA1 ₄₁	ns	0,03	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
LSA3	ns	0,02	ns	ns	0,03	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
SALSA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
GLURP	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
AMA1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PF13	0,03	0,04	ns	ns	ns	0,01	ns	ns	ns	0,01	ns	ns	ns
MSP1p19	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
MSP4p20	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PmCSP	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
gSG6	0,003	0,01	ns	ns	ns	ns	0,04	ns	ns	ns	0,04	ns	ns

- *ns = non significatif $p < 0,05$*
- *Schiz. Extrc. : extrait total de schizonte*
- *comparaison Mann Whitney année par année, entre tous les individus (T), entre individu âge < 6 ans (colonne < 6ans), entre tout individu âge < 10 ans colonne (< 10ans), entre tous les individus âge compris (11 à 15) colonne (11-15 ans) et tous les individus âge supérieur à 15 ans (> 15ans)*
- *NB : 2011 exclu des analyses pour garder une homogénéité phénotypique*

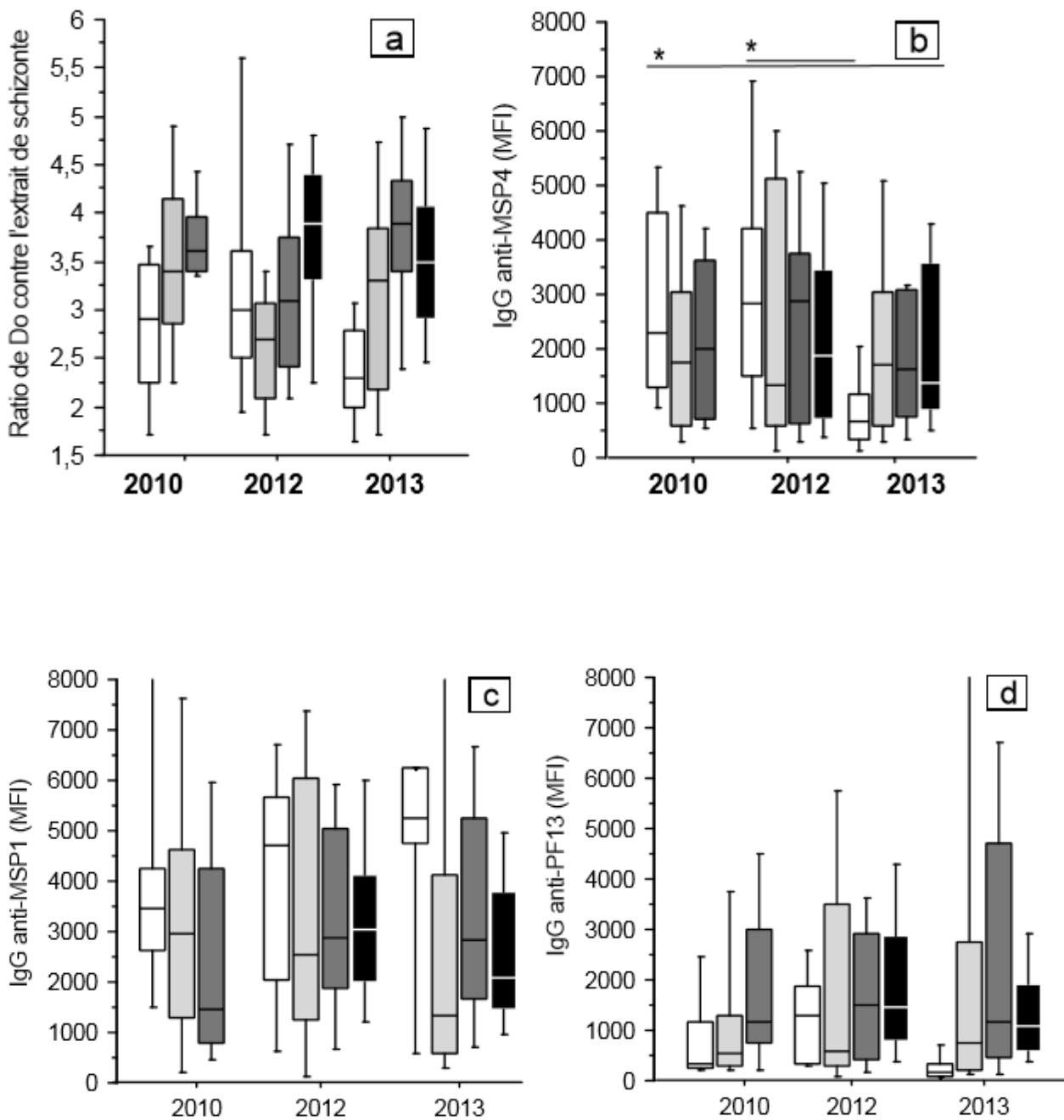


Figure 21: Profils de réponse anticorps dirigées respectivement contre a) extrait de schizonte, b) MSP4, c) MSP1, d) PF13 de *P. falciparum* de 2010 à 2013, en fonction des tranches d'âge

< 5 ans (blanc), 5-10 ans (gris clair), 10-15 ans (gris fonce) et > 15 ans (noir)

- Astéris * au-dessus des boites à moustache marque une différence significative de réponse anticorps ($p < 0,05$);
- Test de Mann Whitney utilisé pour la comparaison de l'intensité de la réponse anticorps année par année
-

II. Auto-réactivité des immunoglobulines G dans le paludisme

Il est présenté dans cette partie un aperçu des études menées en collaboration avec l'équipe « Basic and Clinical Immunology of Parasitic Diseases » (BCIP) de Lille qui a abordé deux des questions relatives à l'auto-réactivité et le paludisme, à savoir:

- a) quelle est la contribution des auto-anticorps dans un modèle de protection du paludisme (forme asymptomatique)?
- b) quel est l'influence des changements épidémiologiques sur ces réponses auto-réactives

II.1. Auto-réactivité et protection contre le paludisme

Afin d'explorer l'association de l'auto-réactivité des IgG dans la protection clinique contre le paludisme, il a été étudié comparativement, par la méthode « panama –blot », le répertoire des auto-anticorps produits au cours de l'infection par *P. falciparum* chez des porteurs asymptomatiques et chez des malades développant un accès palustre simple dans la zone hyperendémique d'Abobo. Il a été effectuée une analyse des corrélations de l'auto-réactivité avec des concentrations sériques des IgG totaux, les taux d'IgG spécifiques des antigènes de *P. falciparum* quantifiés respectivement par Elisa et la technique multiplex magpix.

II.1.1. Caractéristiques de la cohorte d'étude

Les données générales des groupes cliniques retenus pour cette étude sont résumées dans le **Tableau XI**. La cohorte ici est constituée de patients souffrant de paludisme simple (n = 33) de porteurs asymptomatiques (n = 47) et des écoliers apparemment sains (non infectés par *Plasmodium* et pris comme des contrôles, EC = 38) recrutés dans la commune hyperendémique d'Abobo. L'âge médian est identique entre les trois groupes. La densité parasitaire a été plus élevée chez les patients qui présentaient un paludisme simple que chez les porteurs asymptomatiques. L'analyse des données biologiques entre malades et non malades montre des variations statistiquement significatives pour les paramètres tels que l'hémoglobine, l'hématocrite et les plaquettes ($p < 0,001$). Cependant, aucune différence significative n'a été observée pour les paramètres, entre les individus asymptomatiques (AS) et les contrôles (EC). Les résultats suggèrent que la présence de fortes densités parasitaires chez les malades est associée aux diverses perturbations biologiques observées (**Tableau XI**).

Tableau XI: Caractéristiques de la cohorte étudiée

	MM	AS	EC	<i>p</i> value (kruskal wallis)
n	33	47	38	
Age médiane (min;max)	10 (5;15)	10 (6;13)	12 (9; 14)	0,628
Densité parasitaire (médiane)	46200	810,5	00	< 0,001*
Hb médiane (min; max)	11,1 (6,6;12,9)	11,1 (8,2; 13)	11,45 (9,2; 13,2)	< 0,01**
Ht médiane (min; max)	33,9 (18,5; 38,7)	31,6 (23,7; 36,1)	35,4 (28,8; 41)	< 0,001
plq médiane (min;max)	117,5 (18; 309)	248 (153; 411)	246 (150; 328)	< 0,001

Hb : Hémoglobine ; Ht : Hématocrite ; plq: Plaquettes

MM : malades ; AS : Asymptomatique ; EC : Endémique contrôlé

**la densité parasitaire est supérieure chez les malades que les asymptomatiques*

***le taux d'hémoglobine est supérieur chez les contrôles par rapport aux malades et aux asymptomatiques*

II.1.2. Distribution de la réponse totale IgG et IgM entre les différents phénotypes cliniques étudiés : asymptomatique, paludisme simple et contrôle endémique

Les taux d'Ac des réponses totales IgG et IgM dans le sérum des individus des trois groupes étudiés par ELISA ont été évalués. Les titres d'anticorps sont exprimés en gramme par litre (g/L) et représenté sur la (**Figure 22**). L'analyse montre une augmentation de la concentration d'IgM chez les malades par rapport aux porteurs asymptomatiques. Par contre, la concentration totale IgG a été significativement plus élevée chez les asymptomatiques (AS) comparé respectivement aux deux autres groupes malades (MM) et enfants non infectés (EC) ($p < 0,01$).

II.1.3. Réponses antiparasitaires IgG et Isotypes dirigés contre l'extrait total 3D7

Les niveaux de réponses en IgG et ses sous-classes (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4) dirigées contre l'extrait total de la souche parasitaire 3D7 testé ici sont exprimés en rDO et illustrés suivant le phénotype clinique au niveau de la **Figure 23**. Les amplitudes de réponses IgG anti-3D7 ont été élevées autant chez les malades que chez les porteurs asymptomatiques. Le groupe considéré comme contrôle (EC) a présenté une réponse anti-parasitaire élevée par rapport aux malades bien que n'étant pas infecté. ($p < 0,01$). Par contre, l'analyse des sous-classes IgG ne montre aucune différence significative entre les groupes ($p > 0,05$).

II.1.4. Réponses anticorps IgG et Isotypes dirigés contre l'extrait total de cerveau

Le but a été de déterminer les réponses auto-anticorps contre l'extrait de cerveau chez nos différents groupes d'étude. Il n'y a pas eu de différence significative dans la réponse totale auto-anticorps dirigée contre les antigènes de l'extrait total de cerveau entre les malades du paludisme, les asymptomatiques ainsi que les endémiques contrôles (EC). Cependant, l'analyse des sous-classes d'IgG a montré une augmentation significative de la sous-classe IgG3 chez les porteurs asymptomatiques ($p < 0,01$) (**Figure 24**).

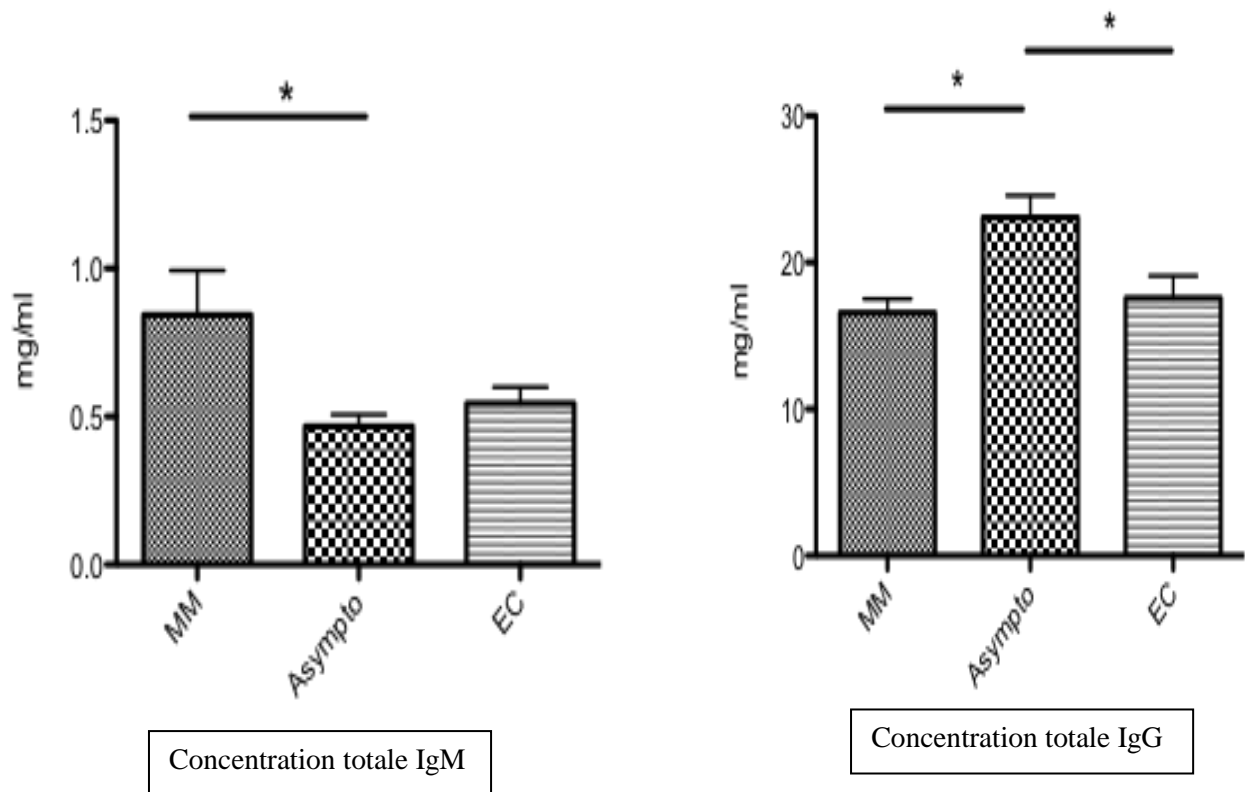


Figure 22: Concentration totale des immunoglobulines IgM et IgG en fonction des groupes étudiés (asymptomatique; paludisme simple et endémique contrôle)

Le test de Mann Whitney utilisé pour comparer les concentrations entre deux groupes. Astérix indique que la différence de concentration est significative ($p < 0,01$).*

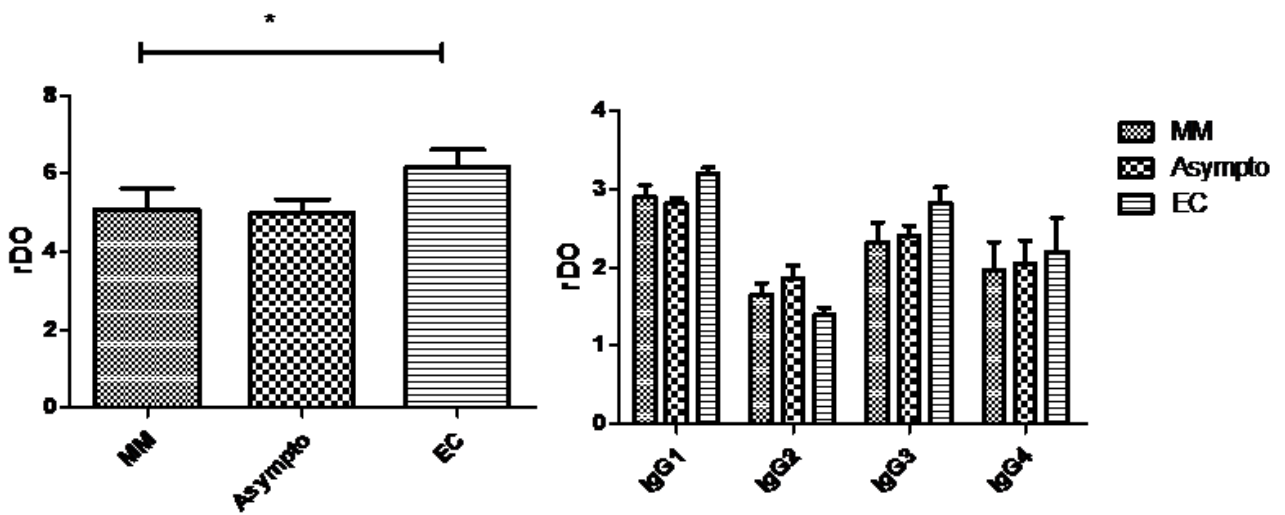


Figure 23: Profil de réponse IgG et sous-classes (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4) dirigé contre l'extrait parasitaire 3D7

Le test utilisé est le Mann Whitney, l'asterix au dessus de barre indique une différence de réponse significative $p < 0,05$*

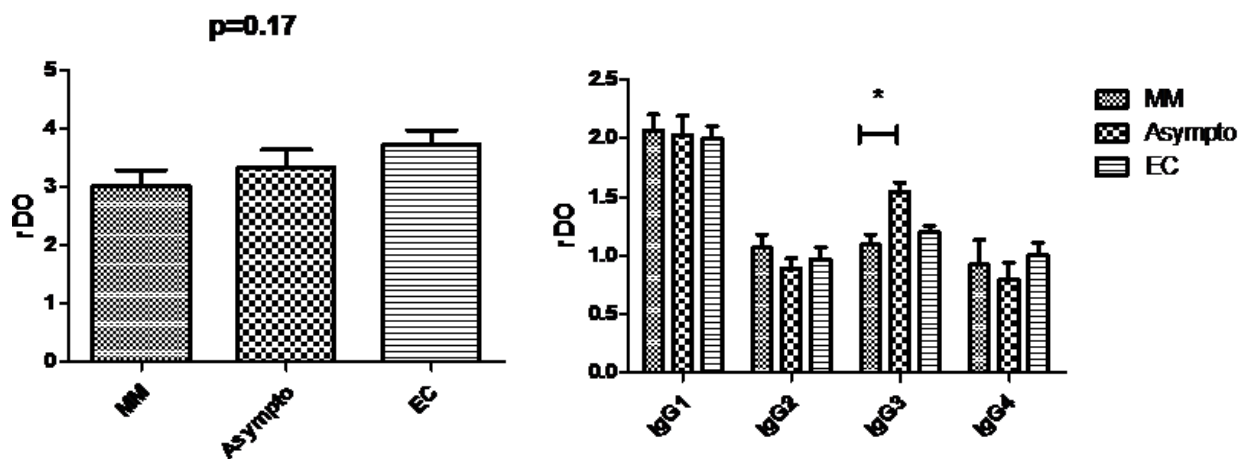


Figure 24: Profil de réponse IgG et sous-classes (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4) dirigé contre l'extrait de cerveau humain (Novus®)

MM = malade ; Asympto = Asymptomatiques ; EC = endémique contrôle. Asterix au dessus de barre indique une différence de réponse anticorps significative $p < 0,05$*

Au total, chez les porteurs asymptomatiques, il a été remarqué une forte concentration totale IgG, associée à une faible réponse IgG antiparasitaire, puis à une réponse auto-réactive légèrement augmentée. Cela laisse suggérer une forte stimulation polyclonale IgG chez les groupes asymptomatiques. Ainsi, cette étude s'est intéressée par la suite à regarder dans le détail le répertoire auto-réactif chez ces groupes.

II.1.5. Analyse du répertoire Anticorps auto-réactifs chez les malades et les asymptomatiques

La réponse auto-réactive induite par l'infection à *P. falciparum* a été ensuite étudiée par la mesure des auto-anticorps dirigés contre les protéines de l'extrait de cerveau avec la technique d'immunoblot quantitative (panama blot).

Les bandes immuno-réactives observées sur la **figure 25a** ont été évaluées chez chaque individu testé, puis incluses dans leur groupe respectif. Ensuite les groupes ont été repartis selon une classification de bandes définie arbitrairement: faible nombre de bande (0 à 4) à fort nombre de bande reconnue (> 10). Une forte proportion d'individus (62 %) chez les porteurs asymptomatiques ont reconnu un plus grand nombre de bandes (> 10) contrairement aux individus malades (27 %) et individus non infectés (26%). A l'inverse, près de 30 % des malades et 23 % d'enfants non infectés ont présenté un plus faible nombre de bandes (0 à 4) contre 7 % chez les asymptomatiques (**Figure 25b**). Les bandes ont été converties en données densitométriques pour des analyses quantitatives réalisées par le logiciel IGOR.

L'intensité de réponse du répertoire a été ensuite appréciée par l'analyse en composantes principales (PCA). La PCA permet la comparaison de la réactivité totale IgG auto-réactif des individus au sein des différents groupes. Ici les variances des différents facteurs de la PCA obtenues sont représentées sur la **figure 26**. La composante facteur 1 ou PCA-1(54,60 % de variance) représente le score le plus significatif de l'activité totale d'IgG anti-cerveau. La distribution dans l'espace montre une meilleure ségrégation des groupes sur l'axe-1 que sur l'axe-2 (**Figure 26**). la PCA-1 a été plus élevée dans le groupe asymptomatique que le groupe de malades (MM), ($p < 0,001$) (**Figure 27**).

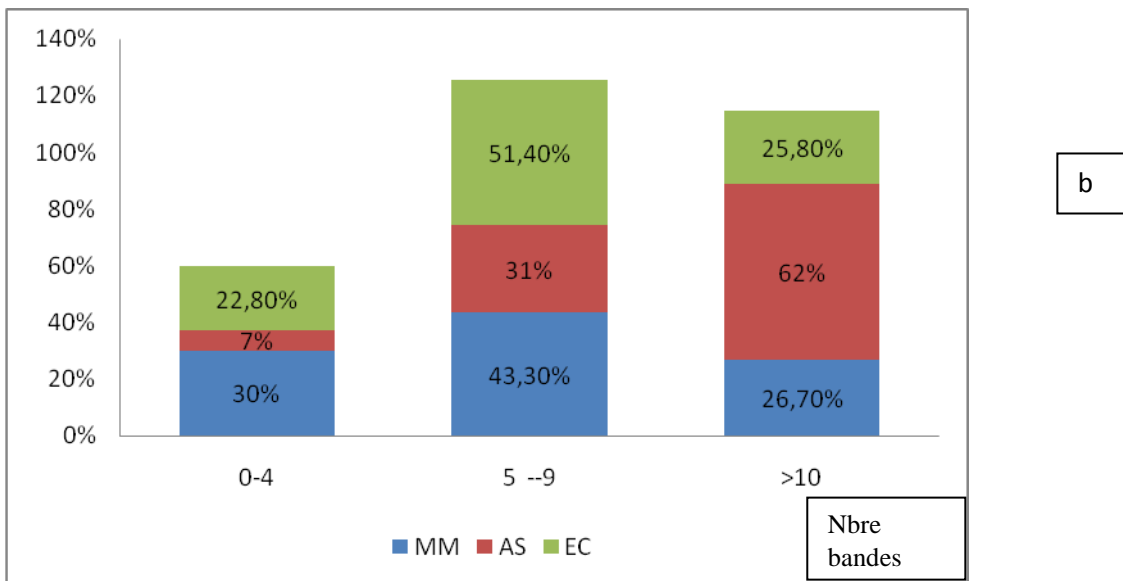
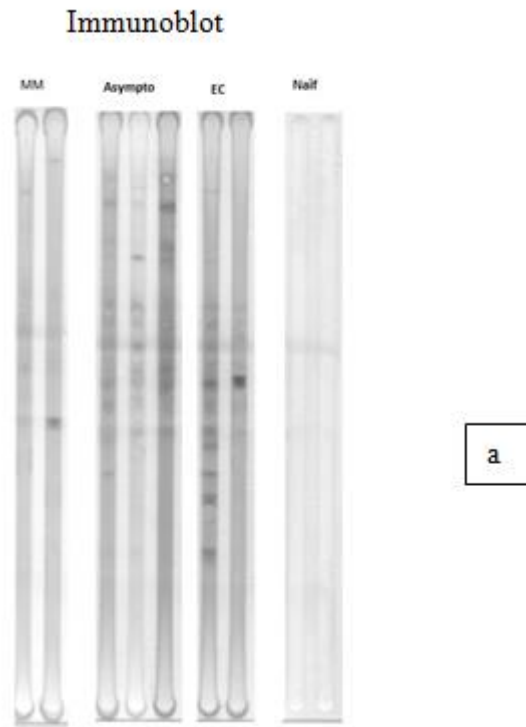
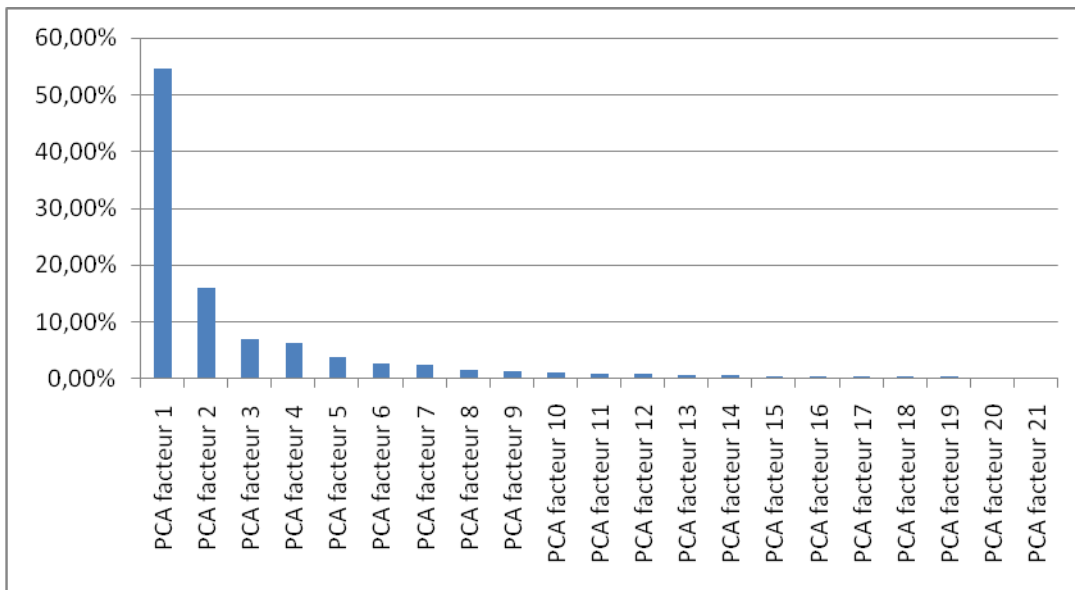


Figure 25: a) Immunoblot de 2 à 3 individus pris au hasard dans les groupes respectifs de malade, asymptomatique et controle

b) Pourcentage d'individus par groupe en fonction du nombre de bandes detectées sur la membrane de nitrocellulose (panama blot)

AS= asymptomatique ; EC= endemique contrôle ; MM= paludisme simple



a

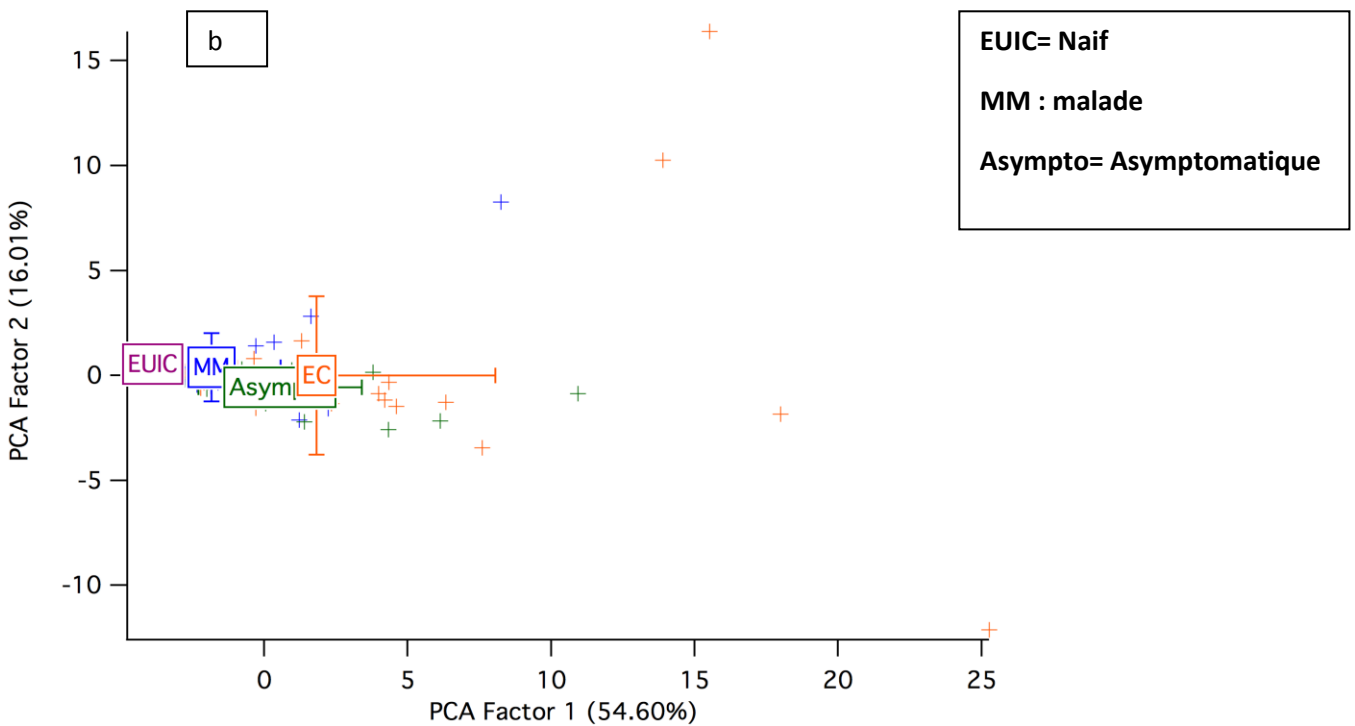


Figure 26: a) Pourcentage des variances des différents facteurs de l'analyse en composantes principales (ACP) b) Distribution des groupes étudiés sur l'axe-1 et -2 de l'analyse en composante principale (ACP)

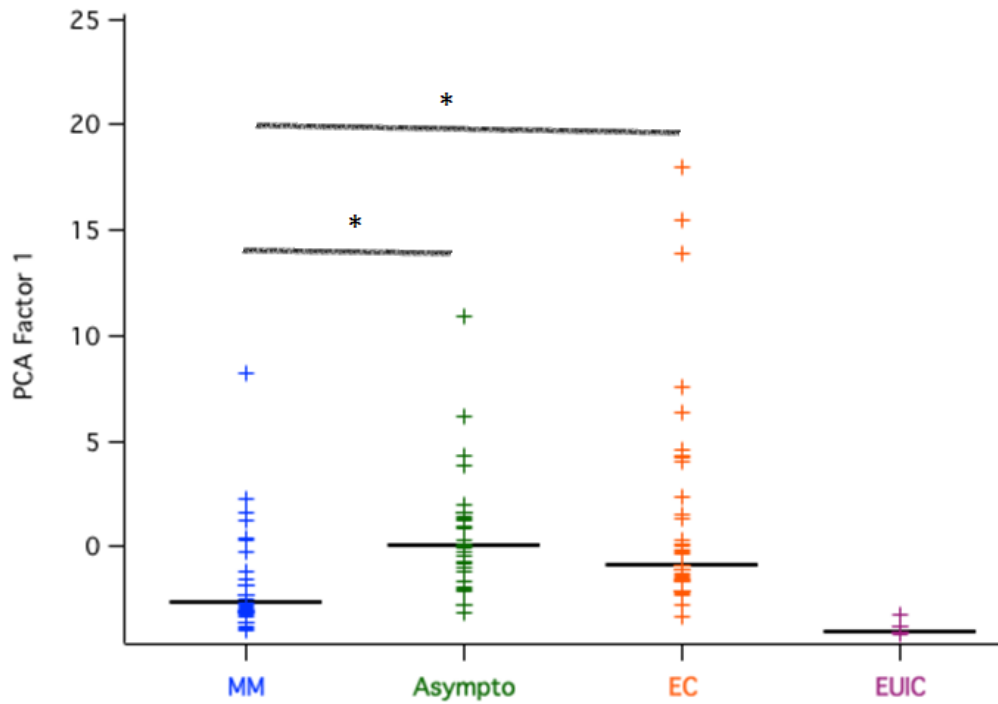


Figure 27: Intensité de réponse du répertoire auto-anticorps traduite par le facteur 1 de l'analyse en composantes principales (ACP) au niveau des groupes étudiés

Le test de mann Whitney a été utilisé pour la comparaison entre deux groupe ($p < 0,05$ différence est significative) ; l'asterix indique que la différence est significative.*

II.1.6. Profil électrophorétique des autoréactivités IgG chez les asymptomatiques

Etant donné la forte augmentation de l'auto-réactivité chez les asymptomatiques par rapport aux malades, l'intérêt a été porté sur le profil du répertoire auto-anticorps uniquement chez les asymptomatiques. L'analyse en composantes principales (ACP) qui est une analyse multivariée, prend en compte le nombre de bandes (définie par section) et l'intensité de la bande dans les comparaisons entre les groupes testés. Dans cette étude, les porteurs asymptomatiques ont présenté un nombre significativement plus élevé en terme de nombre de bandes et d'intensité de la bande. La **figure 28** présente le profil électrophorétique de réactivité chez les asymptomatiques. Chaque section est caractéristique d'une bande de protéines de l'extrait de cerveau ayant le même poids moléculaire et qui reconnaît les auto-anticorps IgG du sérum de l'individu testé. 21 sections (Section0 à Section20) dans l'ordre décroissant de poids moléculaires (250 kDa à 20 kDa) ont été définies. Il a été remarqué un profil similaire d'immuno-réactivité chez les individus du groupe asymptomatique (60 % présentaient un profil de réactivité identique, ce qui traduit une forte homogénéité de réponse chez les asymptomatiques). L'intensité de réactivité IgG anti-bande (protéines cérébrales) de chaque section a été appréciée sur la **Figure 29**. Il ressort à l'analyse que la bande 11 (S11) a été hautement réactive vis-a-vis des sérums de porteurs asymptomatiques et est restée significativement élevée en intensité chez les asymptomatiques par rapport aux malades de paludisme simple (**Figure 30**).

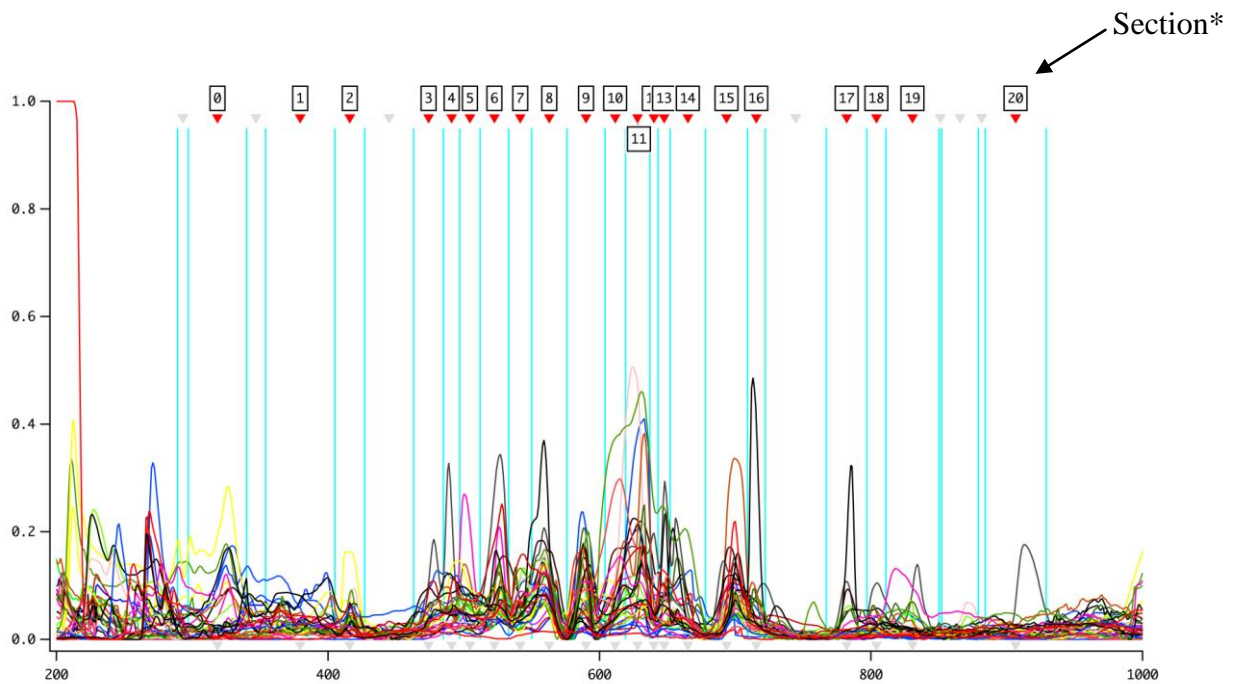


Figure 28: Profil électrophorétique des réactivités IgG sériques de porteurs asymptomatiques et du standard, dirigées contre les protéines du cerveau.

**Les sections sont déterminées à partir des pics de réactivité du standard. Ces pics sont définis dans l'ordre décroissant, partant des protéines de haut poids moléculaire aux bandes de protéines de bas poids moléculaires (250 à 20 kDA).*

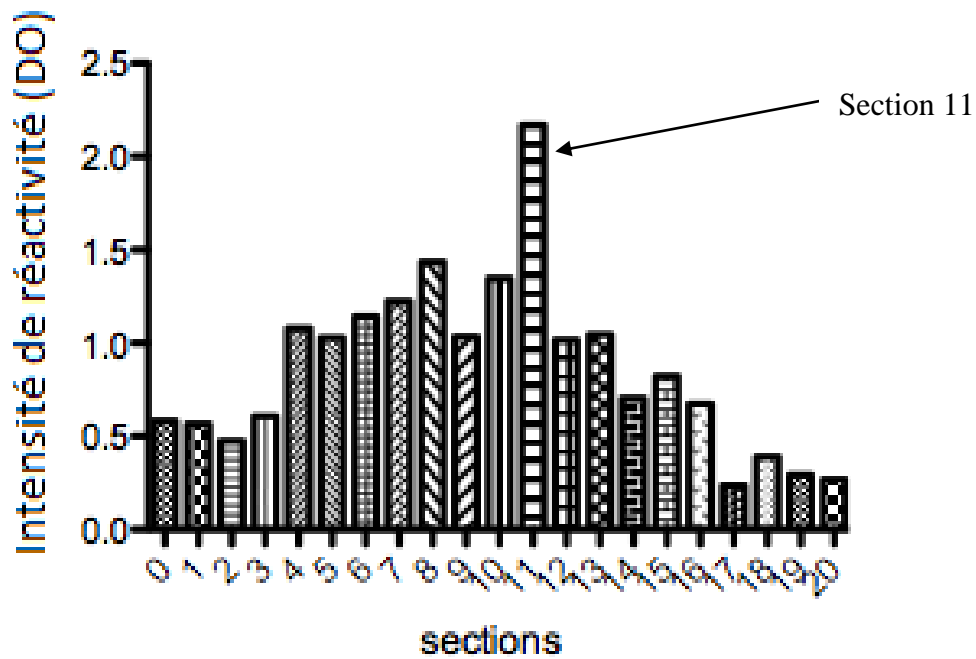


Figure 29: Mise en évidence de la bande de haute réactivité chez les porteurs asymptotiques

Ce graphique représente la distribution de l'intensité de réponse de réactivité (DO) au niveau de chaque section chez l'ensemble des individus du groupe asymptotique

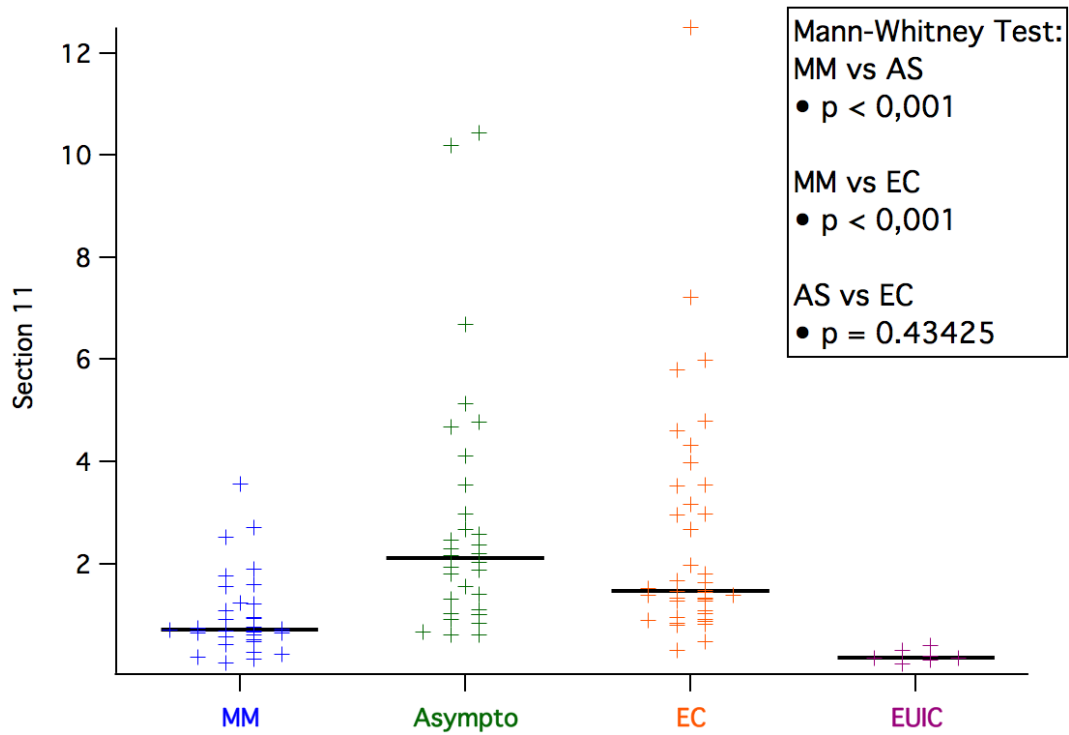


Figure 30: Comparaison de l'intensité de réactivité IgG anti-protéines de l'extrait de cerveau au niveau de la section 11 entre les groupes étudiés

Le test de Mann-Whitney ($p < 0,05$ indique que la différence de réponse auto-réactive est significative) ; Asympto = asymptomatiques ; MM = paludisme simple ; EC = endémique contrôle

II.1.7. Analyse qualitative nanoLC orbitrap ms/ms et identification de protéines majoritaires de la section 11

Les protéines majoritaires de la section 11 chez les asymptomatiques ont été recherchées. Le poids moléculaire de la bande d'intérêt observée sur la membrane de nitrocellulose est d'environ 45 kDa (**Figure 31**). Le résultat de l'analyse a donné 11 candidats résumés dans le **Tableau XII**. Pour identifier d'éventuelles interactions entre ces candidats, il a été réalisé une analyse avec le logiciel STRING qui donne sous un niveau de confiance (70 %) deux types de réseaux protéiques (**Figure 32**) :

- un réseau de protéines du cytosquelette constitué de gamma-1-actine et beta-actine, impliqué dans la motilité cellulaire et présent dans l'organisation membranaire des hématies ;
- un réseau de protéines catalytiques constitué de succinate-CoA ligase, acétyl-CoA acyltransférase 2, acyl-CoA déshydrogénase, glutaryl-CoA déshydrogénase, impliquées dans la voie de biosynthèse des lipides indispensables aussi bien à l'hôte qu'au parasite.

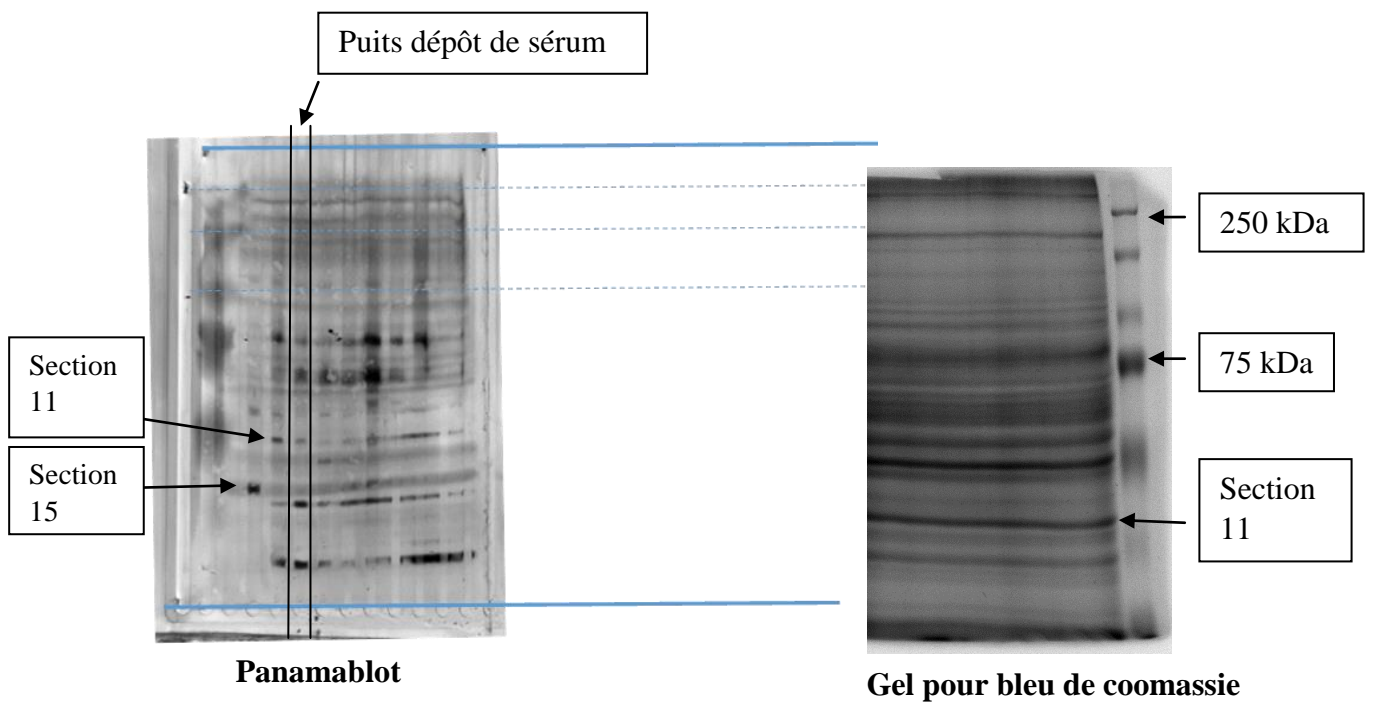


Figure 31: Localisation de la bande d'intérêt (section 11).

La superposition du gel coloré au coomassie avec la membrane de nitrocellulose a permis de localiser la bande d'intérêt (section 11) de poids moléculaire de 45kDa. La bande a été découpé du gel et digérée par la trypsine (15 ng/μL) puis séparé par chromatographie nanoLC puis analysé au spectromètre de masse orbitrap ms/ms. Les spectres collectés ont été interprétés par le moteur de recherche Mascot (version 2.4.0, Matrix Science, London, UK)

Tableau XIII: Candidats antigéniques de l'extrait de cerveau obtenu du spectre ms/ms de la bande (section) 11 analysé à l'Orbitrap Q Exactive

Nom de la protéine	Protein accession numbers	MW(kDa)	Ratio spectrum (%)
3-ketoacyl-CoA thiolase	sp P42765 THIM_HUMAN	41 924	73
Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial	sp Q9P2R7 SUCB1_HUMAN	50 318	70
Actin, cytoplasmic 2	sp P63261 ACTG_HUMAN	41 794	70
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7	sp P68032 ACTC_HUMAN	42 020	68
Beta-actin-like protein 2	sp Q15435 PP1R7_HUMAN	41 566	67
Actin, cytoplasmic 1	sp Q562R1 ACTBL_HUMAN	42 004	67
Glutaryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	sp P60709 ACTB_HUMAN	41 738	67
Actin-related protein 10	sp Q92947 GCDH_HUMAN	48 129	65
Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	sp Q9NZ32 ARP10_HUMAN	46 308	64
Mitochondrial chaperone BCS1	sp P11310 ACADM_HUMAN	46 590	63
Tropomodulin-2	sp Q9NZR1 TMOD2_HUMAN	39 596	62

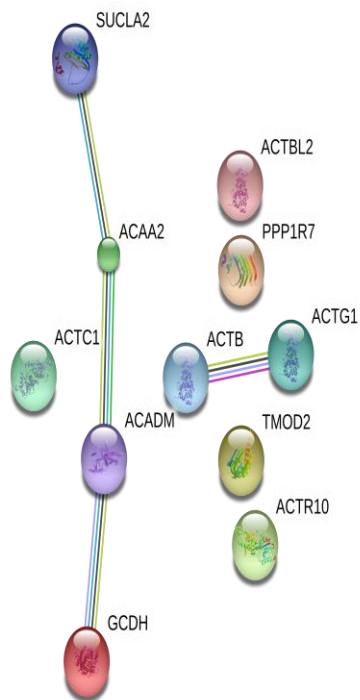


Figure 32: Mise en évidence par le logiciel STRING de réseaux protéiques entre les différentes protéines majoritaires sélectionnées de la bande 11

STRING= functional protein association network, www.string-db.org

SUCLA2= succinate-CoA ligase

ACAA 2=acetyl-CoA acyltransferase 2

ACADM = acyl-CoA dehydrogenase

GCDH= glutaryl-CoA dehydrogenase

ACTBL2 = actin, beta-like 2

PPP1R7 = -protein phosphatase 1

ACTG1 = actin, gamma 1

ACTB= actin, beta

TMOD2= tropomodulin 2

ACTR10= Actin-related protein 10

ACTC1= actin, alpha, cardiac muscle 1

II.1.8. Relation entre anticorps spécifiques du parasite et les auto-anticorps chez les asymptomatiques et les malades

Pour déterminer l'interaction éventuelle entre la réponse spécifique au parasite et l'auto-réactivité au cours de l'infection palustre, les sujets (asymptomatiques AS et malades MM) ont été regroupés autour des seuils arbitraires définis respectivement pour la réponse globale anti-cerveau (PCA-1 = +0,5) et la réponse antiparasitaire 3D7 (rOD = 5). Tous les participants à l'étude ont été répartis en 4 sous-groupes: α) IgG auto-réactive faible (PCA-1 < +0,5) et IgG spécifique de *P. falciparum* faible (rOD < 5); β) IgG auto-réactive faible et IgG spécifique de *P. falciparum* élevé (rOD > 5) et, γ) IgG auto-réactive élevée (PCA < +0,5) IgG spécifiques faible (rOD < 5) et μ) IgG auto-réactive élevée (PCA < +0,5) et IgG spécifique de *P. falciparum* élevée (rOD > 5) (**figure 33**). Les participants ont été répartis en proportion presque égale dans le sous-groupe μ . Les individus AS ont été entièrement représentés dans le sous-groupe γ (65 % AS par rapport à 5 % MM, $p < 0,001$) (**Tableau XIII**). A l'inverse, le sous-groupe β contenait totalement les MM 30 % contre 6 % AS, ($p < 0,001$). Ces données indiquent clairement que les individus asymptomatiques (AS) sont fortement associée à une réponse prédominante d'auto-anticorps contre les antigènes du cerveau avec de faible IgG spécifiques antiparasitaire alors que chez les MM sont associées des réponses anticorps autoréactifs bas, mais une réponse spécifique antiparasitaire élevée. Il semble avoir une association de la réponse auto-réactive avec la forme asymptomatique du paludisme. Cette réponse augmente alors que la réponse IgG antiparasitaire totale est faible chez les asymptomatiques comparés aux malades.

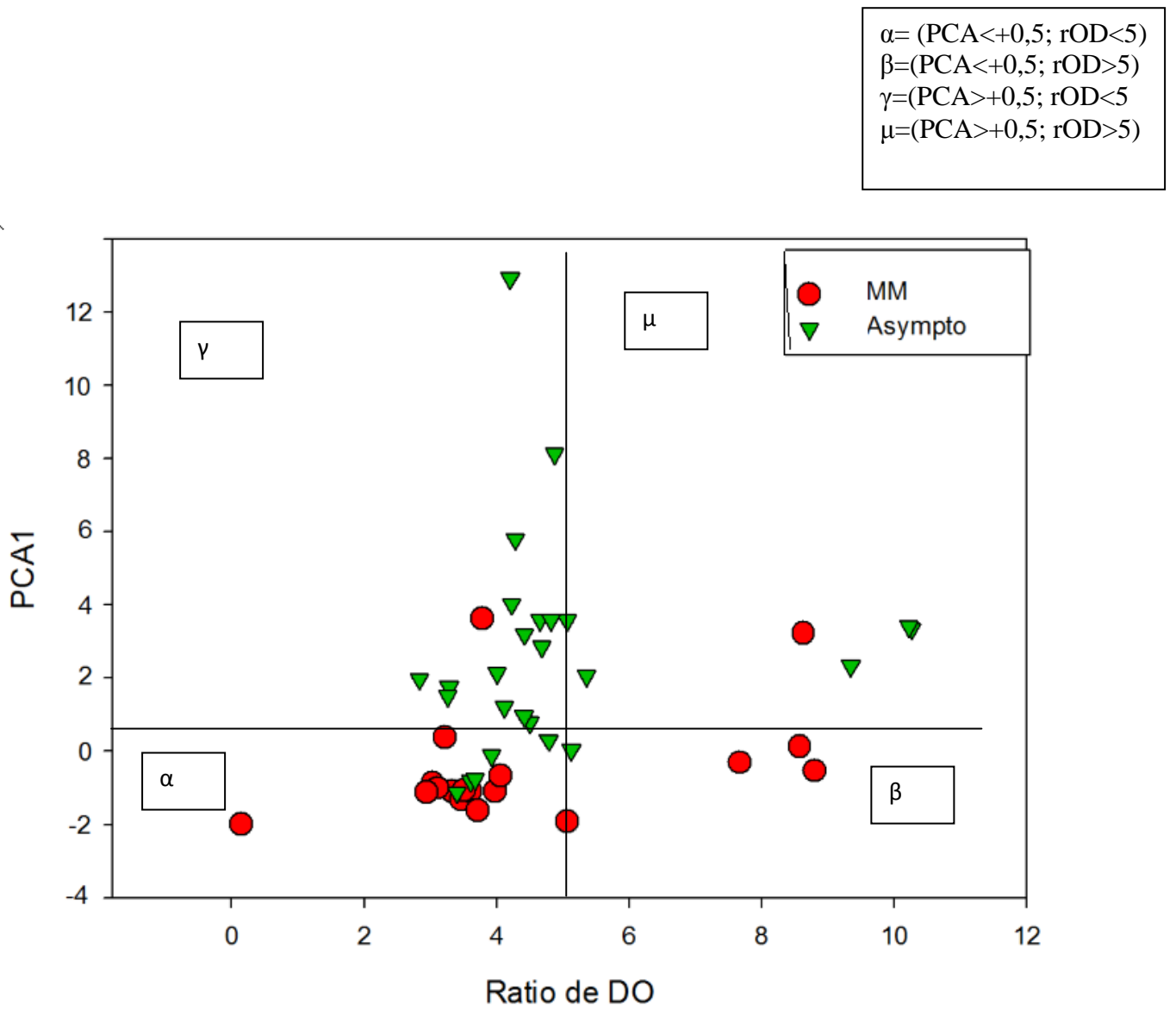


Figure 33: Répartition des individus asymptomatiques et malades par rapport aux réponses IgG auto-réactive et réponse IgG antiparasitaire 3D7

Tableau XIII: Comparaison des proportions des individus asymptomatiques et malades dans les groupes α , β , γ et μ

	α	β	γ	μ
MM (%)	60	30	5	5
Asympto (%)	21	6	65	8
Khi-deux	$p = 0,03$	$p < 0,01$	$p < 0,001$	$p > 0,05$

α) IgG auto-réactive faible ($PCA-1 < +0,5$) et IgG spécifique de *P. falciparum* faible ($rOD < 5$)

β) IgG auto-réactive faible et IgG spécifique de *P. falciparum* élevé ($rOD > 5$)

γ) IgG auto-réactive élevé ($PCA < +0,5$) IgG spécifiques faible ($rOD < 5$)

μ) IgG auto-réactive élevé ($PCA < +0,5$) et IgG spécifique de *P. falciparum* élevé ($rOD > 5$)

Test de Fischer, $p < 0,05$ différence significative

II.1.9. Analyse des réponses IgG contre le répertoire antigénique de Plasmodium selon les différents groupes étudiés

Les réponses contre (11) onze antigènes de *Plasmodium* chez les deux groupes (malades et asymptomatiques) ont été explorées avec le système multiplex Magpix décrit précédemment. Les résultats des niveaux de réponses sont exprimés en MFI. Tous les Ag testés ont donné une prévalence de répondeurs supérieure à 20 %, excepté les Ag CSP, LSA3, PmCSP et SALIVA pour l'ensemble de la cohorte (**Figure 34**). Le nombre d'Ag du répertoire reconnu par chaque individu a été déterminé et a montré une augmentation significative chez les asymptomatiques ($p < 0,01$) (**Figure 35**). Lorsqu'on compare les amplitudes de réponses IgG contre chacun des Ag du répertoire, il ressort une augmentation significative des réponses Ac dirigés respectivement contre MSP4, SALSA, PF13, AMA1 et PmCSP chez les porteurs asymptomatiques par rapport aux groupes de malades. L'augmentation de ces Ac spécifiques pourraient donc être associés à la protection contre le paludisme.

MM= malade
 -Asympto : asymptomatique

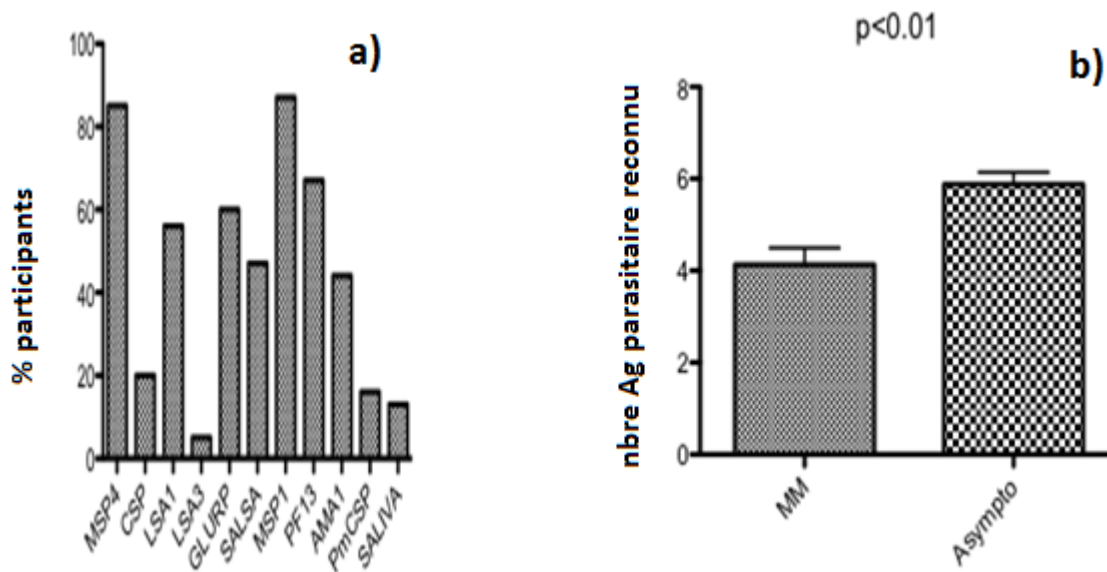


Figure 34: a) Prévalence d'individu répondeurs aux Ag de Plasmodium chez l'ensemble des participants b) Nombre d'antigènes parasitaires reconnus par individu chez les porteurs asymptomatiques et les malades .

-Le Test de Mann Whitney a été utilisé pour comparer les médianes. L'astérix* indique une différence significative $p < 0,01$.

-un individu reconnaît un Ag parasite (est repondeur) lorsque sa réponse en MFI est $> 3MFI_{Naif} + 3SD$

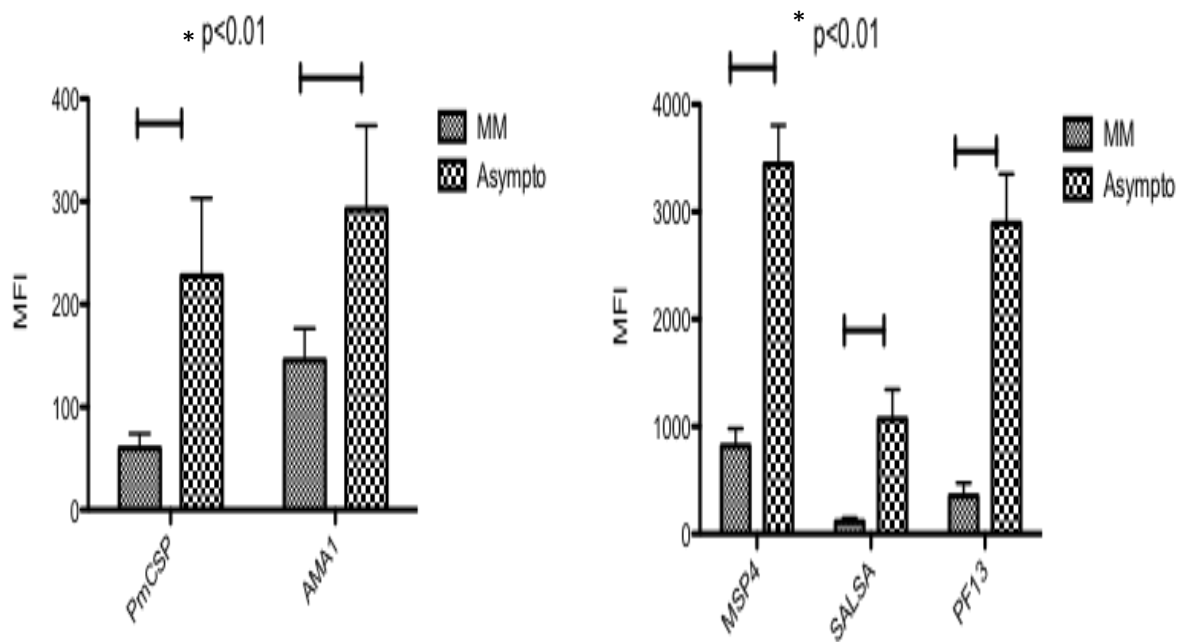


Figure 35: Profil de réponses anticorps IgG dirigés contre les Ag de Plasmodium testé au multiplex magpix entre les porteurs asymptomatiques et les malades

**Le test de Mann Whitney est utilisé pour comparer les réponses anticorps entre les 2 groupes.*

II.2. Anticorps auto-réactifs IgG dans différents foyers de transmission du paludisme en Côte d'Ivoire

L'hypothèse d'une baisse de l'auto-réactivité lorsque la transmission diminue a été émise par la suite dans ce travail. Il a été analysé ici l'influence du degré de transmission du paludisme sur le répertoire auto-réactif IgG de patients symptomatiques à travers les trois sites sentinelles initialement décrits (**Tableau VI**). La technique panamablot précédemment décrite a été utilisée pour évaluer le répertoire auto-anticorps et l'ELISA pour déterminer les réponses globales IgG anti-Plasmodium et IgG anti-extrait de cerveau au niveau des sites sentinelles.

II.2.1. Profil de réactivité du répertoire auto-anticorps IgG dirigé contre les protéines d'extrait de cerveau au niveau des trois sites sentinelles

Sur les mêmes patients des trois sites sentinelles, avec des caractéristiques étudiées dans le chapitre précédent, il est procédé à la quantification des concentrations totales IgG et IgM par la technique ELISA. Les patients de Man, ont eu une concentration moyenne IgG totale plus élevée que ceux des 2 autres sites ($p < 0,001$). Puis en analysant la réponse spécifique IgG contre l'extrait de parasite 3D7 et la réponse IgG contre l'extrait de cerveau, la réponse contre l'extrait de parasite 3D7 bien que très forte, n'a pas permis de discriminer les 3 sites sentinelles du paludisme. Alors que Man et Korhogo ont présenté des niveaux de réponses contre l'extrait de cerveau beaucoup plus élevé que les patients d'Abobo ($p < 0,01$). (**Tableau XIV**)

Des immunoblots ont été réalisés pour analyser le répertoire des auto-anticorps IgG au niveau des sites sentinelles (**Figure 36a**). La réponse auto-réactive IgG est représentée par des bandes de réactivité illustrées sur la **figure 36a**. Malgré les différences inter-individuelles un certain nombre de bande de protéines a été trouvé conservé à l'intérieur de chaque site. Cependant le nombre de bandes de réactivités n'a montré aucune différence significative entre les différents sites (**Figure 36b et c**).

Tableau XIV: Sérologie IgG et IgM des patients au niveau de chaque site sentinelle

	Abobo n = 31	Korhogo n = 32	Man n = 31	P¹	P²	P³
Age (ans)	(2;54)9,5	(1-70)10,5	(1-59)10	NS	NS	NS
Total IgG (g/l) mediane (min;max)	(8,58;26,10)15,54	(7,07;27,63)15,49	(10,84;42,36)23,63	NS ⁴	< 0,001	< 0,001
Total IgM (g/l) median (min;max)	(0,26;4,61)0,6	(0,21;1,63)0,41	(0,19;3,13)0,47	0,04	NS	NS
Extrait 3D7(rOD) mediane (min;max)	(0,34;26,1)11,24	(0,49;26,14)11,24	(1,07;27,21)12,23	NS	NS	NS
Extrait de cerveau (rOD) mediane (min;max)	(0,04;0,4)0,18	(0,11;0,5)0,23	(0,09;1,01)0,243	0,01	NS	0,002

P : *p* value de la comparaison des réponses Ac par le test de Mann Whitney :

1 = Abobo vs Korhogo; 2 = Korhogo vs Man; 3 = Man vs Abobo ; 4 = Non Significant (NS)

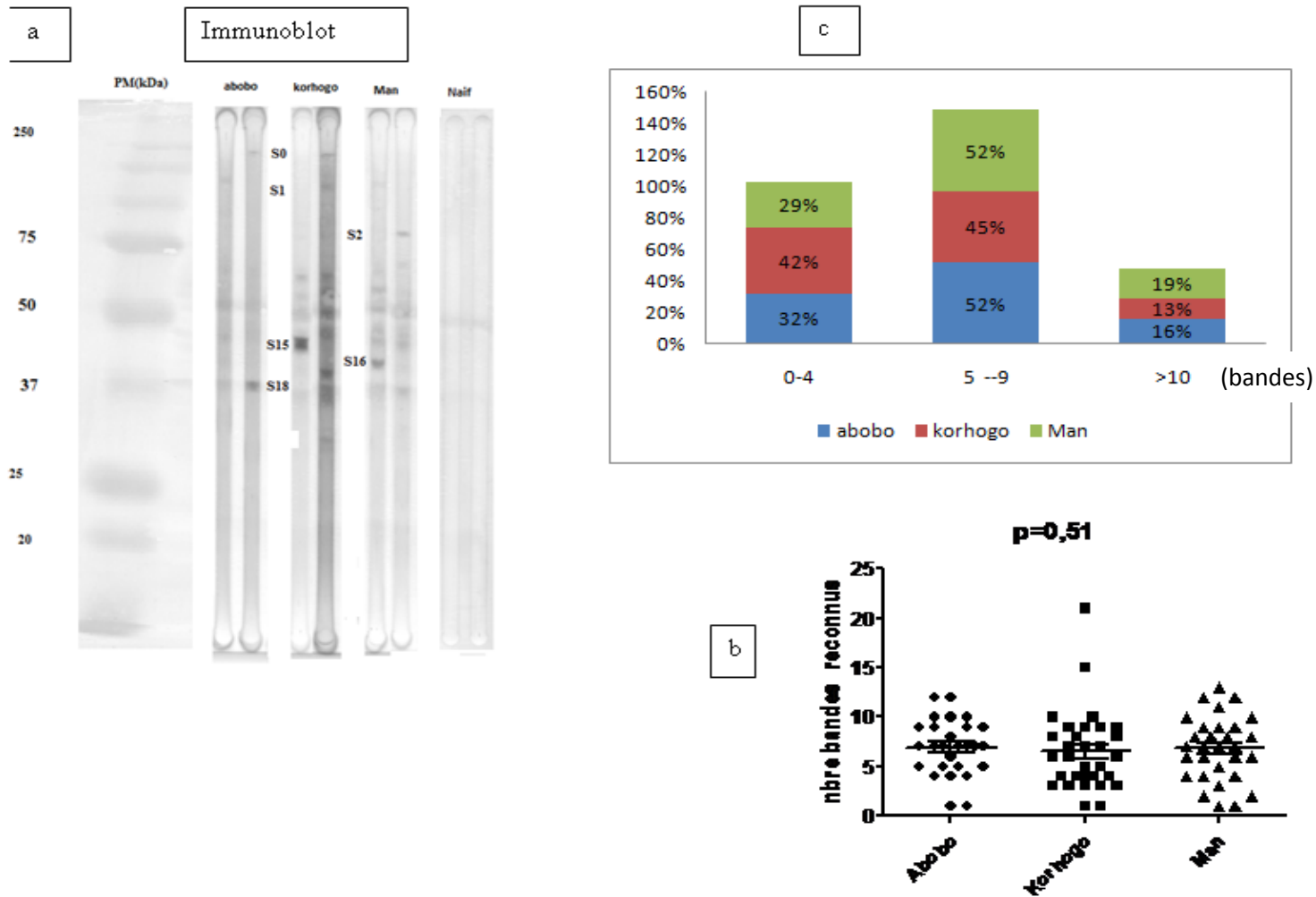


Figure 36: **a)** Immunoblot -1D comportant le répertoire de réponse auto-anticorps de 2 individus par site. **b)** Représentation du nombre de bandes reconnues par les IgG sériques des patients vivant à Abobo, Korhogo, Man et Naifs (non immun) obtenu par immunoblot. **c)** Proportion de patients sur chaque site en fonction du nombre de bandes reconnues par les IgG plasmatiques. Le nombre de bandes reconnues a été catégorisé dans les intervalles suivants : 0-4, 5-9 et > 10

II.2.2. Intensité des réponses du répertoire auto-anticorps entre les sites

Les bandes de réactivité ont été également transformées en données densitométriques pour des analyses quantitatives sur le logiciel IGOR. Ainsi, les sections (ou bande de réactivité) ont été délimitées allant de S0 à S20 grâce au profil électrophorétique du pool de patients pris comme standard. Chaque patient présente donc un répertoire de réponse contre ces bandes de protéines (S0 à S20). L'analyse en composantes principales (ACP) a donné une image globale de la réponse immune dirigée contre le répertoire antigénique (S0 à S20) de l'extrait de cerveau et la projection dans l'espace des réponses auto-réactives des individus sur les axes (facteur-1 et facteur-2) a montré une meilleure ségrégation sur l'axe-1 (ou facteur-1) de l'ensemble des groupes infectés (représenté par les sites sentinelles) par rapport aux individus non-immuns (Naifs) (**Figure 37a**). Cette observation témoigne que la réponse auto-anticorps est associée à l'infection plasmodiale. En outre, l'intensité de réponse auto-réactive (PCA facteur-1) n'a pas montré de corrélation avec les paramètres tels que l'âge, la densité parasitaire et la concentration totale IgG de l'ensemble des patients, mais sur la **Figure 37b** l'intensité du PCA facteur-1 entre les sites, a été significativement plus élevée chez les individus à Korhogo, qui ont eu une utilisation de moustiquaires imprégnées plus faible que les individus des deux autres sites (**Tableau VI**). L'exposition accrue à l'infection et au parasite a donc favorisé une plus grande intensité de réponse auto-réactive à Korhogo.

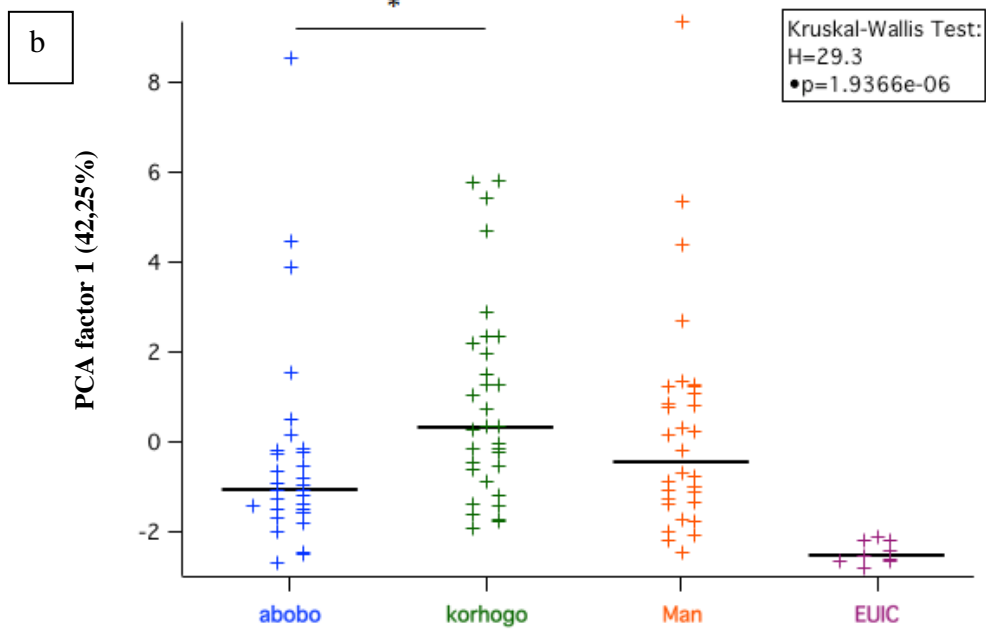
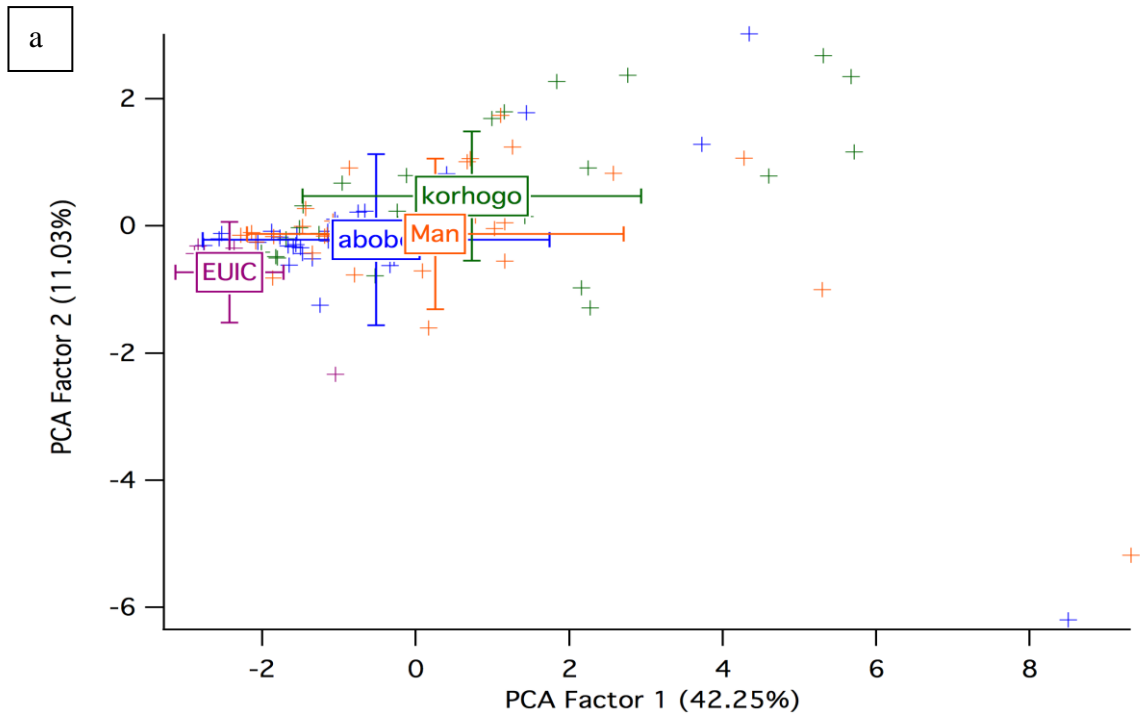


Figure 37: a) Représentation dans l'espace des patients sur les axes-1 et -2 de l'analyse en composantes principales (ACP). b) Distribution de l'intensité de réactivité représentée par la (ACP-1) selon les sites sentinelles

Le Test de Mann Whitney utilisé pour comparer les 2 sites entre eux ; asterix* indique que la différence est significative $p < 0,05$; EUIC = naifs européens

II.2.3. Relation entre réponse IgG auto-réactives et réponses spécifiques antiparasitaires chez les malades en fonction des trois sites sentinelles

Ici, l'objectif était de chercher à voir si la relation entre les répertoires auto-anticorps et anticorps spécifiques pourrait être influencée par le niveau de transmission déterminée par la réponse salivaire du moutique chez les individus malades.

D'abord pris ensemble les résultats ont montré une corrélation positive ($R = +0,27$; $p < 0,01$) entre la réponse auto-réactive et la réponse anticorps dirigée contre le peptide salivaire gSG6-P1 sur la population des trois sites. De même en s'aidant de la démarche précédente pour étudier la relation entre réponse auto-réactive et réponse spécifique antiparasitaire, il a été défini 4 sous-groupes où se trouve réparti l'ensemble des individus (**Figure 38**). Cependant, près de 70 % de l'ensemble des individus malades se partagent les sous-groupes β et μ avec respectivement une dominance des individus d'Abobo et Man pour le groupe β et une dominance des individus de Korhogo pour le groupe μ (**Tableau XV**). Lorsqu'on analyse les réponses anticorps anti-gSG6-P1 (peptide salivaire) au niveau de ses deux sous groupes β et μ , une augmentation significative de réponse IgG anti-salivaire en faveur du sous-groupe μ a été observée (**Figure 39**).

II.2.4. Spécificité de réponses auto-anticorps qui différencient les trois sites

Il s'est agi ici de comparer au sein du répertoire les réponses IgG dirigée contre chaque bande (S0 à S20) entre les différents sites. D'un point de vue général l'analyse des réponses par le test de Kruskal Wallis montre des différences significatives au niveau de l'intensité des bandes de protéines S6, S10, S11, S12 et S13. La réponse IgG contre ces bandes (S6, S10, S11, S12 et S13) discrimine bien l'auto-réactivité entre ces sites. Pris individuellement ces marqueurs sont hautement plus élevés à Korhogo que dans les deux autres sites (Abobo et Man) (**Figure 40**).

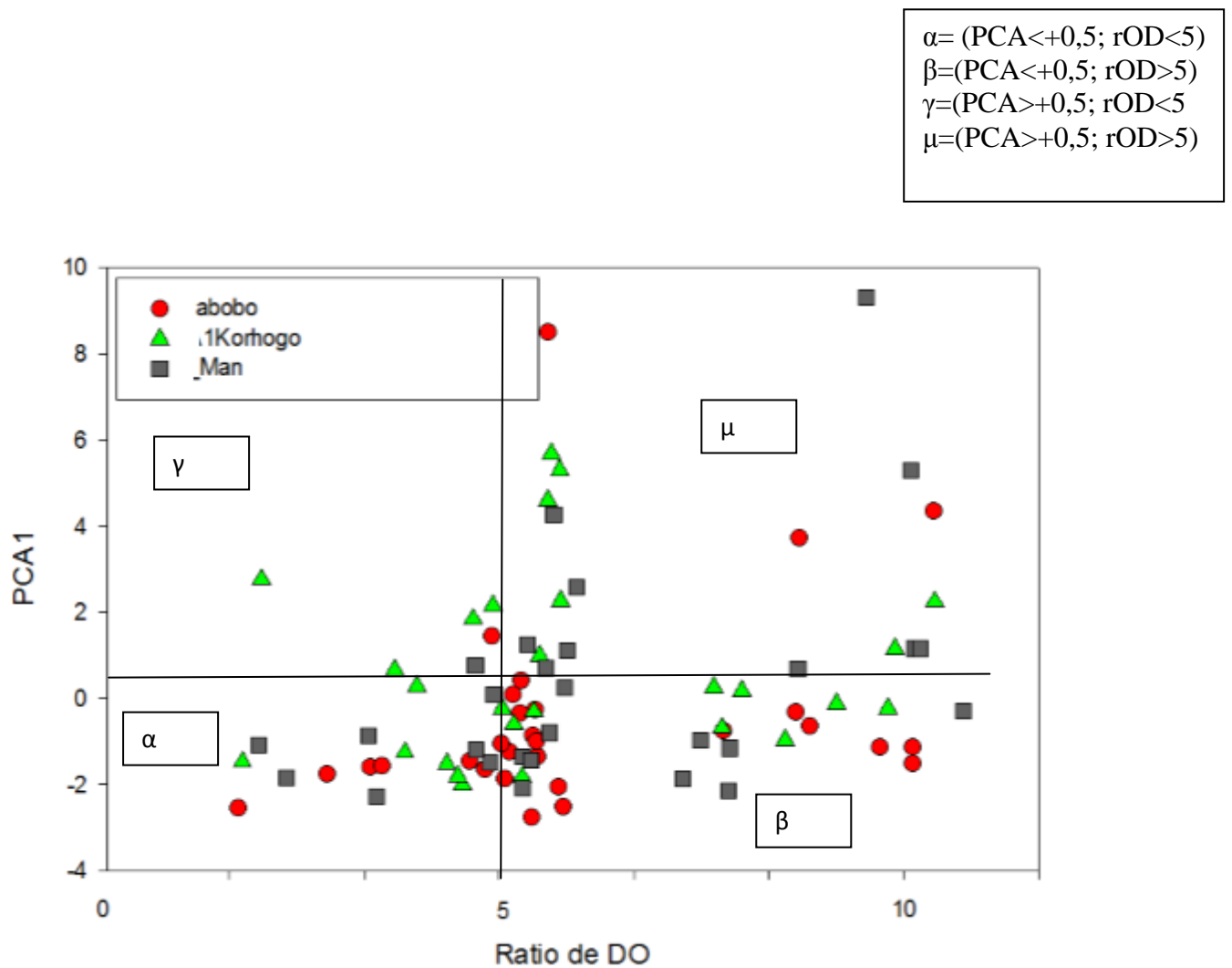


Figure 38: Répartition des individus des sites sentinelles en fonction de leurs réponses auto-réactive IgG et réponse IgG anti-Plasmodium 3D7

Tableau XV: Distribution des individus par sites en fonction des sous-groupes définis

	α	β	γ	μ
Abobo (%)	27	54	4	15
Korhogo (%)	23	35	15	27
Man (%)	26	33	4	37

α) IgG auto-réactive faible ($PCA-1 < +0,5$) et IgG spécifique de *P. falciparum* faible ($rOD < 5$)

β) IgG auto-réactive faible et IgG spécifique de *P. falciparum* élevé ($rOD > 5$)

γ) IgG auto-réactive élevé ($PCA < +0,5$) et IgG spécifique faible ($rOD < 5$)

μ) IgG auto-réactive élevé ($PCA < +0,5$) et IgG spécifique de *P. falciparum* élevé ($rOD > 5$)

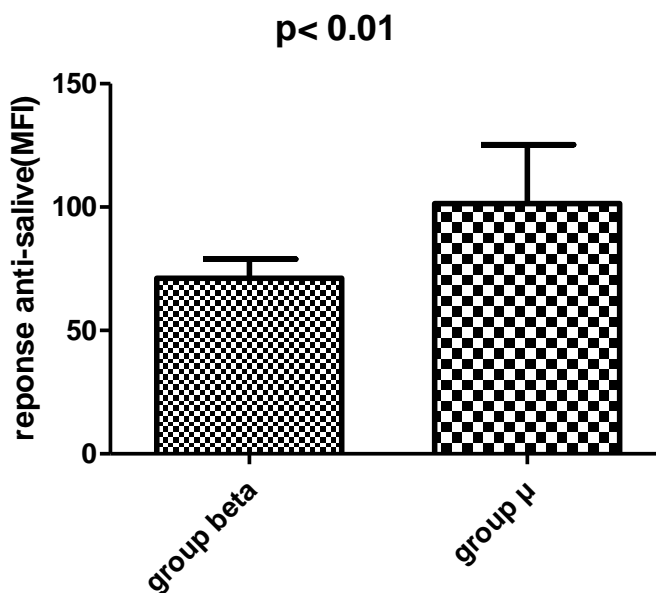


Figure 39: Différence des réponses anticorps anti-gSG6-P1 au niveau des groupes sélectionnés "beta" et " μ "

Le test de Mann Whitney utilise pour comparer les médianes des réponses IgG, ($p < 0,05$), la différence de réponse anti-salive est significative.

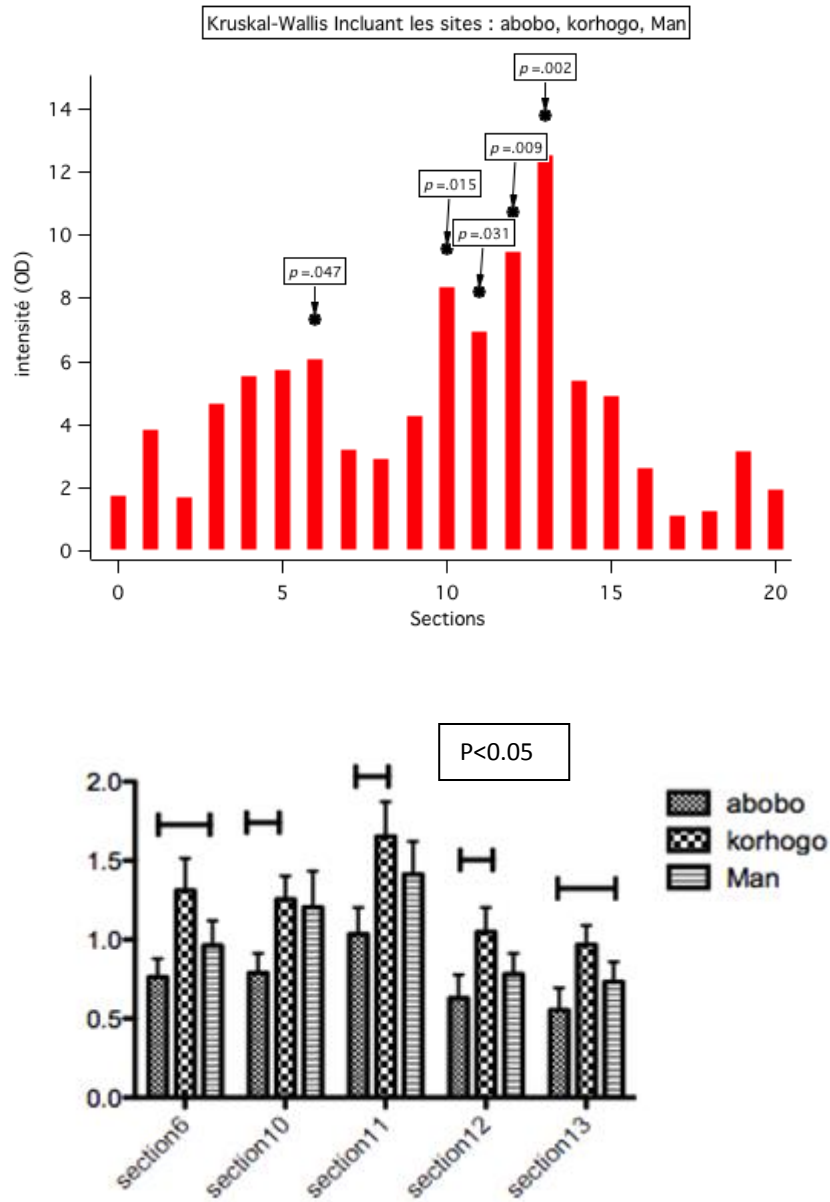


Figure 40: Différence de réponses IgG auto-réactives entre les sites sentinelles

Le test de kruskall Wallis appliqué à l'ensemble des sites, puis Mann whitney appliqué entre deux sites pour les sections différentielles, $p < 0,05$ la différence de réponse est significative.

DISCUSSION

L'objectif de cette thèse était d'une part d'analyser l'application épidémiologique des mesures de niveau d'anticorps anti-Plasmodium pour le suivi des variations de l'intensité de la transmission, et d'autre part de déterminer l'association entre variation du répertoire anticorps auto-réactifs et portage asymptomatiques du paludisme.

Ainsi, dans la première partie, il a été mesuré et analysé le profil des réponses d'anticorps contre un panel d'antigènes du parasite dans trois sites sentinelles du paludisme en Côte-d'Ivoire. Dans le site d'Abobo (hyper-endémique), il a été effectué en parallèle une étude longitudinale entre 2010 et 2013 pour évaluer l'impact des variations de transmission (incluant les mesures de contrôle) sur les réponses humorales.

Dans la seconde partie une approche quantitative du répertoire auto-anticorps a permis d'analyser la réponse auto-réactivité dans les formes asymptomatiques du paludisme et aussi de voir l'évolution de cette réponse auto-réactive dans différents foyers de transmission.

L'une des particularités de cette étude est d'analyser les réponses anticorps (parasitaire et auto-réactifs) à partir d'échantillons sanguins prélevés chez des patients vivant dans des contextes épidémiologiques différents d'un même pays, la Côte d'Ivoire.

La Côte d'Ivoire continue d'être endémique malgré le léger recul de la mortalité et de la morbidité. Le paludisme représente également un véritable frein au développement dans ce pays, avec 40 % d'absentéisme scolaire et professionnel et 50 % de perte agricole (Koudou *et al.*, 2010; PNLP, 2014). La lutte apparaît donc comme un enjeu d'ordre vital pour ce pays, qui sort d'une décennie de crises sociopolitiques successives l'ayant affaibli dans de nombreux domaines. Afin de mener à bien et efficacement les stratégies de la lutte sur l'ensemble du territoire, des sites sentinelles ont été définis en vue de réunir des informations sur l'épidémiologie, l'entomologie, la chimiorésistance aux médicaments usuels et la diversité génétique du parasite (Toure *et al.*, 2014; Koffi *et al.*, 2013; Yavo *et al.*, 2015; 2016). Cette étude-ci propose d'utiliser l'analyse sérologique dans le suivi de l'infection palustre dans diverses localités choisies comme sites sentinelles.

Analyse multiplex et suivi de l'infection palustre en Côte d'Ivoire

Il existe peu d'études analysant précisément les profils immunologiques du paludisme à *P. falciparum* en Côte-d'Ivoire. Dans des enquêtes précédentes menées au centre et au centre-sud de la Côte-d'Ivoire (Koudou *et al.*, 2010; Knoblauch *et al.*, 2014), il a été observé et souligné que le paludisme est fortement endémique et caractérisé par une hétérogénéité considérable. Les situations locales sont complexes selon les contextes socio-écologiques et les flux de population, ce qui pourrait expliquer l'augmentation présumée du nombre global de cas cliniques passant de 2,8 à 4,7 millions en 2012 (OMS, 2014).

Dans ce contexte, des outils sensibles et accessibles pour l'évaluation et le suivi des interventions de lutte contre le paludisme, comme les biomarqueurs immunitaires, pourraient être utiles (**Corran et al., 2007; Kerkhof et al., 2015**). En effet, le risque d'être piqué par l'anophèle infecté dépend essentiellement de l'écologie du vecteur et de l'utilisation des moustiquaires. Dans cette étude, la proportion déclarée d'utilisation de moustiquaire était inférieure à 30 % et légèrement différente entre les sites (Abobo > Man > Korhogo). Ces chiffres sont relativement plus faibles que ceux des autres pays africains (**OMS, 2015**).

La plupart des études de séro-épidémiologie utilisent des cohortes transversales avant ou après des épisodes cliniques pour établir des relations entre la réponse anticorps contre un antigène (**Riley et al., 1993; Branch et al., 1998; Perraut et al., 2005; John et al., 2008; Perraut et al., 2014**) ou plusieurs antigènes avec la protection contre le paludisme clinique (**Osier et al., 2008; Greenhouse et al., 2011**). À l'exception des individus porteurs asymptomatiques du parasite, ces analyses sous-tendent un état relativement stable dans l'interaction hôte-parasite, une approche dans laquelle les analyses sérologiques peuvent représenter des indicateurs potentiels pertinents de la transmission du paludisme (**Corran et al., 2007**). Par exemple, un seul antigène AMA1 a été utilisé pour le suivi de l'efficacité des mesures d'intervention en Guinée Equatoriale (**Cook et al., 2011**). Ailleurs, plusieurs antigènes (AMA1, MSP1, CSP) ont été utilisés comme marqueurs de l'exposition et de risque de paludisme (**Greenhouse et al., 2011**). Au cours de notre étude, nous avons utilisé des prélèvements déjà réalisés, chez des malades en accès palustre. Cette approche est très différente car le couple parasite-système immunitaire est en pleine évolution. La concentration d'anticorps est la résultante d'une stimulation du système immunitaire par le parasite et la consommation de ces anticorps lors du combat engagé. Ainsi, il a été mis en évidence une réponse Ac plus forte chez les patients du district de Korhogo, un site où la transmission est saisonnière et plus faible que dans les deux autres sites. Ces réponses Ac à Korhogo sont associées à une faible densité parasitaire. Cette constatation de niveau élevé Ac peut être liée à plusieurs facteurs (temps du début de la maladie ; degré réel d'exposition individuel, temps d'utilisation des MII) et aussi le fait qu'il y ait une consommation moindre d'Ac du fait que les densités parasitaires sont plus basses.

La réponse contre l'extrait total de parasite de la souche 07/03 (souche de référence adaptée de villageois de Dielmo), a déjà été utilisée comme un marqueur pertinent pour le suivi des niveaux d'immunité (**Aribot et al., 1996; Perraut et al., 2000; Diop et al., 2014**), mais n'a pas montré de corrélation avec la protection clinique dans les études prospectives réalisées au Sénégal (**Perraut et al., 2005**). En Côte d'Ivoire, la prévalence des réponses anticorps contre l'extrait de parasite n'a pas montré de différence entre les trois sites, contrairement aux antigènes spécifiques qui ont clairement souligné une forte réponse à Korhogo. Cette différence pourrait être liée à une différence entre cette souche sénégalaise particulière et les souches en circulation en Côte d'Ivoire. Mais plus

vraisemblablement l'antigène total permet de détecter des réponses si diverses que l'on ne peut discriminer les niveaux de stimulation. Une telle observation soulève des questions et doit pouvoir être confirmée ou infirmée en testant une souche de Côte d'Ivoire adaptée localement à la culture *in vitro* (ou chez une souche *ex vivo* d'un patient fortement parasité).

Un point très intéressant est qu'en dépit de différences considérables des densités parasitaires (médiane) entre les sites, le traitement administré a présenté une efficacité de 100 % en un maximum de 72 h. Les parasites ont été rapidement éliminés en laissant très peu de patients avec une faible parasitémie au jour 3: seulement 1,5 % des patients étaient toujours positifs au jour 3 qui est sous le seuil de 3 % indiquant une réponse retardée (**Stepniewska et al., 2010**). Il est possible qu'un haut niveau de réponse Ac contribue à cette clairance rapide des parasites circulants (24 h). On retrouve cette association pour la moitié des biomarqueurs testés. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études montrant une association significative entre un niveau élevé d'anticorps contre l'antigène GLURP (**Enevold et al., 2007**), AMA1 (**Keh et al., 2012**) et MSP1 (**Mawili-Mboumba et al., 2003**) et un plus faible risque d'échec du traitement. Une autre étude a démontré la contribution des anticorps dirigés contre l'antigène de surface de la forme jeune (anneau) érythrocytaire à la réponse thérapeutique chez les patients traités avec l'artésunate en Thaïlande où la résistance est déjà observée (**Mayxay et al., 2001**). Il est à noter que la résistance vraie aux ACT n'a pas été encore constatée en Côte d'Ivoire.

Ainsi, ces données suggèrent que globalement, l'analyse des réponses immunitaires pourrait non seulement souligner l'hétérogénéité de degré individuel d'exposition à un niveau communautaire, mais aussi renseigner sur l'application effective des mesures de contrôle dans les zones étudiées. Il faudrait pour cela pouvoir suivre la variation temporelle des réponses qui suivrait une mise en place des mesures de prévention. C'est en partie ce que nous avons essayé d'analyser dans le cas d'Abobo en suivi longitudinal sur 3 années.

Une approche multiplex dans les analyses sérologiques longitudinales a été évaluée. La première remarque par rapport à cette approche est que les effectifs analysés sont répartis de manière non homogène par rapport aux différentes tranches d'âge. Ce qui représente un biais très important dans l'analyse. Si on analyse les profils globalement et en terme de tendances, il ressort 2 points :

- d'une part l'hétérogénéité de distribution des réponses en fonction des Ag et des tranches d'âge: sur l'ensemble des individus, on ne met pas en évidence de baisse globale du niveau d'immunité sur une courte période de 2-3 ans après l'implémentation des mesures de lutte. Il est probable que les taux d'anticorps des adultes sont trop élevés pour pouvoir observer une décroissance rapide de prévalence.

- à l'inverse on note une tendance à la baisse du niveau d'immunité chez les plus petits (< 5 ans) ce qui traduit un contact diminué avec le parasite. La réponse anticorps contre MSP4 et PF13, semble

le marqueur le plus intéressant à surveiller dans ce sous-groupe. Ce résultat pourrait compléter celui de **Askjaer et al., (2001)** qui trouve une baisse des anticorps dirigés contre les antigènes de surface du parasite (VSA) après quatre (4) années d'utilisation de moustiquaire imprégnée d'insecticide chez des enfants d'une zone d'endémie (Tanzanie).

La réponse contre l'Ag de salive de moustique est également un marqueur intéressant, cependant les amplitudes de réponses mesurées sont relativement limitées de 100 à 400 unités en MFI. De récentes études ont montré que le marqueur salivaire gSG6-P1 est un bon indicateur de suivi opérationnel de l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide (**Drame et al., 2012; Drame et al., 2013**).

Enfin un point important à noter est justement le profil général des réponses Ac, notamment pour l'Ag extrait de schizonte ou l'antigène du mérozoïte MSP4 : ils montrent bien que les populations vivent en forte zone d'endémie avec des niveaux d'Ac croissants en fonction de l'âge et où les individus les plus âgés gardent un fort bruit de fond d'immunité, même lors d'un recrutement symptomatique. Ce profil âge-dépendant présent en 2010 se retrouve en 2013 avec les plus petits (< 5ans) ayant des réponses qui semblent plus basses et témoigneraient de l'effet des mesures de lutte.

En somme la stratégie multiplex Magpix pourrait même durant le paludisme symptomatique aider au suivi des variations de la transmission et au suivi de la mise en œuvre des stratégies de contrôle local et de la prévention du paludisme.

Répertoire des Ac auto-réactifs et Paludisme asymptomatique

Pour obtenir un aperçu du rôle joué par les auto-anticorps dans la forme asymptomatique du paludisme, la relation entre les réponses d'anticorps spécifiques du parasite et le répertoire auto-réactif a été étudiée chez les asymptomatiques et enfants atteints de paludisme simple avec des contrôles de la zone hyper-endémique Abobo, (Abidjan, Côte d'Ivoire). Contrairement aux études antérieures l'analyse du répertoire d'auto-réactivité dans les trois groupes de participants a été réalisé au moyen d'une approche quantitative qui a permis l'analyse d'un grand nombre d'antigènes. (**Fesel et al., 2005; Guiyedi et al., 2007**). Il a été montré une réponse IgG total et IgG3 auto-réactive significativement plus élevée chez les asymptomatiques. que chez les patients présentant un paludisme simple. La réponse auto-anticorps IgG a été corrélée avec l'âge. Ces résultats corroborent les études précédentes qui ont démontré une forte réponse IgG auto-réactive contre les antigènes du cerveau chez les asymptomatiques à *P. falciparum* et *P. vivax* respectivement au Gabon (**Guiyedi et al., 2015**) et Brésil (**Gomes et al., 2013**). Ceci peut traduire également une consommation des auto-anticorps au cours de l'accès palustre, ou l'induction des anticorps spécifiques diminuant relativement les auto-anticorps (puisque'une quantité fixe d'IgG est déposé sur les membranes

d'immunoblot). Cette réponse auto-réactive pourrait être la conséquence de la réactivité des auto-anticorps naturels. Bien que ce soit encore un sujet de discussion (**Dighiero, 1997**). Nous pouvons considérer que deux types de réponses auto-anticorps existent : un type correspondant aux auto-anticorps qui accompagnent les maladies auto-immunes (appelés auto-anticorps pathogènes souvent de type IgG). Des exemples sont les anti-ADN ou anticorps anti-nucléaires (ANA) associé au lupus érythémateux systémiques, les anti-érythrocytaires des anémies hémolytiques, le facteur rhumatoïde de la polyarthrite rhumatoïde (PR), l'anti-thyroïde et de l'anti-thyroglobuline associée à la thyroïdite auto-immune; pour ne citer que ceux-là (**Gehrs & Friedberg, 2002; Okten et al., 2006**). Le second type comprend les "anticorps naturels" décrit en premier par l'équipe de Avrameas à l'Institut Pasteur de Paris (**Dighiero et al., 1982; Guilbert et al., 1982**). Ces auto-anticorps naturels sont essentiellement des IgM, mais comprennent aussi des IgG et IgA qui constituent une fraction des immunoglobulines circulantes (**Coutinho et al., 1995**). Ils sont physiologiquement présents chez tous les individus, ils augmentent avec l'âge (**Dasse et al., 2011; Mouthon et al., 1996**) et contribuent à l'auto-réactivité naturelle dont la régulation est assurée par des mécanismes cellulaires et humoraux (**Durand et al., 2009**). Les auto-anticorps ont une activité poly-réactive, qui permettent une réaction du système immunitaire innée contre une invasion par n'importe lequel des agents pathogènes. (**Zhou et al., 2007**). Ces mécanismes sont connus comme étant les premières lignes de défenses contre les micro-organismes avant la mise en place de la réponse immunitaire adaptative.

Il est évident que si l'on prétend qu'une réponse auto-réactive peut agir sur les parasites, l'existence de réactions croisées entre auto-antigène et antigène du parasite doit être prouvée. Une relation étroite entre les antigènes du parasite et les auto-antigènes a déjà été démontrée, à l'aide d'Ac monoclonal spécifique du parasite (**Brahimi et al., 2011**). En effet, ces travaux entrepris par l'équipe de Ribeiro montraient que les sérums de patients atteints de maladie auto-immune ainsi que des Ac monoclonaux de souris réagissent avec différents isolats de *P. falciparum* et ceci représente une preuve supplémentaire de l'existence du partage de structure antigénique entre l'hôte et le parasite. Cependant, dans notre étude sur des sujets en cours d'accès palustre, nous n'avons pas retrouvé de corrélation entre les réponses d'anticorps spécifiques du parasite et ceux auto-réactifs. Ceci suggère que la réponse auto-réactive lors d'une infection à *P. falciparum* ne peut pas être exclusivement attribuable à une réaction croisée entre les antigènes du parasite et de l'hôte. L'activation polyclonale des lymphocytes B est cependant bien décrite au cours de l'accès palustre puisque c'est elle qui favorise l'apparition du lymphome de Burkitt chez les enfants vivant en zone d'endémie (**Rafaramino et al., 2001**). Si le rôle des auto-anticorps a été exploré au cours des infections virales et bactériennes (**Baumgarth et al., 2005**), peu d'études ont été menées au cours du Paludisme. Certaines études ont cependant montré la production d'auto-anticorps contre

l'antigène Glycosyl Phosphatidyl Inositol (GPI) du globule rouge au cours de l'infection plasmodiale (**Nebl et al., 2005**). La réactivité contre ces antigènes érythrocytaires pourrait contribuer à la protection contre les stades sanguins de *P. falciparum* (**Cissoko et al., 2006**) ou simplement témoigner de la lyse cellulaire induite par le parasite. Pourtant on a pu observer une protection contre les formes graves du paludisme associé à la réduction de la cytoadhérence des globules rouges parasités aux cellules endothéliales grâce à la production d'anticorps dirigés contre la protéine bande-3 des érythrocytes infectés. (**Hogh et al., 1994; Goel et al., 2003**).

L'implication de mécanisme auto-réactif ayant des cibles antigéniques non-érythrocytaires a également été évoquée dans la protection contre le paludisme (**Menoret et al., 2000; Semblat et al., 2006**). Même si très peu d'études sont actuellement disponibles sur le rôle des auto-anticorps dans la protection contre le paludisme chez l'homme, les modèles expérimentaux ont permis de mettre en évidence une prolifération des lymphocytes B au cours de l'infection par *P. chabaudi chabaudi* responsable de la production importante d'auto-anticorps anti-ADN associé à la résistance contre la maladie et à la survie des souris BALB/cJ (**Yoder & Goodrum, 2001**). La même observation a été faite avec des souris DBA:2 (H-2d) qui présentaient une prolifération des lymphocytes B220 et une sécrétion importante d'auto-anticorps anti-ADN associé à une évolution non létale après une infection par *P. yoelii* (**Bakir et al., 2006**).

Les antigènes utilisés dans ce volet de notre travail proviennent d'extrait de tissus cérébraux humain; une question importante que l'on pourrait se poser est celle de savoir pourquoi la réactivité des IgG chez les porteurs asymptomatiques n'a pas été pathogène vis-à-vis de leurs propres antigènes ? Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que les auto-anticorps n'ont pas nécessairement un rôle immunopathologique. En effet, lorsque **Jarra et al., (1986)** a estimé en premier que, pour être efficace, la réponse immunitaire contre le parasite devrait inclure une réponse auto-réactive, ils ont admis que cela pourrait même être au risque d'induire une immunopathologie. Les études publiées à ce jour, et celui que nous réalisons nous amène à croire que ce n'est pas nécessairement le cas. L'argument le plus important en faveur de l'idée que les auto-anticorps peuvent ne pas être associés à une immunopathologie est basée sur le travail accompli par les équipes de Avrameas et Dighiero (**Dighiero, 1997**). Ces auteurs ont pu étudier un panel de 612 protéines monoclonales obtenues de patients atteints de myélome multiple ou de la maladie de Waldenström, et ceux-ci démontrent que 35 soit 6 % de ces protéines monoclonales ont présenté une activité auto-réactive naturelle sans preuve de toutes manifestations cliniques de maladie auto-immune.

Ce travail met également en évidence un groupe d'antigènes d'extrait de cerveau particulièrement bien reconnu par les immunoglobulines plasmatiques des individus asymptomatiques. Ces molécules interagissent entre elles, formant deux types de réseaux : actine (impliqué dans le

cytosquelette) et réseau enzymatique constitué de succinate-CoA ligase, acétyl-CoA acyltransférase 2, acyl-CoA déshydrogénase, glutaryl-CoA déshydrogénase. Une forte réactivité anticorps contre certaines composantes du cytosquelette a été montrée récemment chez des individus infectés par *Plasmodium* sp. (**Liew et al., 2015**). En outre dans le modèle expérimental d'infection par *Plasmodium chabaudi*, il a été observé que la souris infectée, développe une intense réponse immune contre les composantes telles que l'actine, la myosine, la myoglobine, et la spectrine du cytosquelette (**Ternynck et al., 1991**). Les enzymes identifiées dans cette étude sont connues pour leur implication dans le métabolisme des lipides. Ce métabolisme est souvent régulée par la réponse pro inflammatoire qui intervient aussi dans le paludisme (**Russo-Marie, 1998; Lyke et al., 2004**).

Les protéines identifiées sont en majorité intracellulaire, et leur libération pourrait résulter de la lyse des hématies (**Balde et al., 1995; Toure-Balde et al., 1996**). Cependant, l'implication des anticorps contre ces protéines dans la protection clinique du paludisme devrait être biologiquement prouvée.

L'origine des anticorps auto-réactifs induits lors du paludisme reste incertaine. Les auto-anticorps associés au portage asymptomatique dans le paludisme peuvent être dérivés de cellules B CD27⁺ de la zone marginale qui sont développés dans certaines maladies auto-immunes. (**Thien et al., 2004; Cerutti et al., 2013**).

Si l'on commence à mieux comprendre les nombreux mécanismes par lesquels l'organisme humain peut contrôler les parasites chez les porteurs asymptomatiques, à l'inverse on connaît également les très nombreuses stratégies d'échappement dont ceux-ci sont capables (induction d'apoptose, prolifération polyclonale des lymphocytes B, inhibition par l'oxyde nitrique et les prostaglandines, antigènes à séquences répétées, variation antigénique, mimétisme des antigènes de l'hôte). Cependant l'équilibre entre le portage asymptomatique et l'accès clinique reste largement inexplicé notamment en ce qui concerne ses variations avec l'intensité de la transmission de la maladie.

L'étude réalisée afin de comprendre l'impact du niveau de transmission du paludisme sur les réponses auto-réactives qui semble être utile au portage asymptomatique, a montré une baisse de l'auto-réactivité quand la transmission est faible et ceci en relation avec les mesures de contrôle de la maladie. Il faut signaler, qu'en dépit de l'hétérogénéité individuelle, les réponses auto-anticorps dirigées contre les bandes S6, S10, S11, S12 et S13 d'extrait de cerveau discriminent parfaitement les sites selon l'intensité de la transmission du paludisme. Ainsi les protéines contenues dans ces bandes pourraient être de potentiels marqueurs épidémiologiques. Ces auto-anticorps présentent une stabilité immunologique (en dehors de la génétique de l'hôte) contrairement aux réponses antiparasitaires qui sont sujettes à de grande variation due aux variabilités antigéniques du parasite.

L'infection par *Plasmodium* étant susceptible d'induire une production d'auto-anticorps pouvant contribuer à l'élimination du parasite, les cibles de ces auto-anticorps pourrait être aussi des antigènes exprimés à la surface du parasite. La question du rôle éventuel de cet antigène dans l'induction de réaction croisée avec l'antigène du soi demeure non élucidée. Et nous ne pourrions que renforcer la spéculation sur les liens éventuels entre antigène du parasite et celui du « soi » d'autant plus que nos observations mathématiques mettent en lumière des corrélations positives entre la réactivité de certaines bandes de protéines du cerveau (obtenu sur immunoblot) avec les réponses IgG spécifiques aux peptides du parasite.

Les seuls antigènes parasitaires pour lesquels nous avons observé une différence de réactivité entre les malades et les porteurs asymptomatiques ont été MSP4 ; SALSA ; PF13 ; AMA1 et PmCSP. Ces antigènes pourraient jouer un rôle déterminant dans la mise en place d'une réponse parasitaire protectrice. En effet AMA1 est un Ag du pôle apical du mérozoïte, impliqué dans le phénomène d'invasion des GR. C'est aussi un Ag présent dans les micronèmes des sporozoïtes, qui pourrait donc également jouer un rôle dans l'invasion des hépatocytes. Il est connu que la variation antigénique à la surface du mérozoïte permet au parasite d'échapper au système immunitaire en présentant différentes séquences d'acides aminés de MSP-1, qui est la protéine majeure de surface du mérozoïte. Cette région antigénique a un rôle important dans le processus d'invasion des hématies, comme le montre l'immunisation expérimentale d'animaux par des protéines recombinantes (**Kedzierski et al., 2002; Zhang et al., 2005**). Pour ces raisons, ces peptides sont considérés comme de bons candidats pour l'élaboration d'un vaccin. Cependant, aucun de ces antigènes n'a la capacité d'induire une réponse protectrice totalement efficace et durable.

Par ailleurs, les érythrocytes infectés expriment des antigènes parasitaires à leur surface qui peuvent être la cible de la réponse immunitaire. Le mieux caractérisé de ces antigènes est le *Plasmodium falciparum* erythrocyte membran antigen-1 (PfEMP-1) impliqué dans la séquestration des hématies parasitées. La structure moléculaire de (PfEMP-1) est complexe constituée de domaines différents codant pour l'expression d'antigène PfEMP-1 à la surface des globules rouges parasités. Nos résultats montrent une augmentation significative des anticorps spécifiques dirigés contre cet antigène (domaine 13 PfEMP-1_13) chez le groupe asymptomatique, qui les protégerait de la forme grave du paludisme (**Abdel-Latif et al., 2002; Janes et al., 2011**).

CONCLUSION & PERSPECTIVES

La réponse immune au cours du paludisme, par sa composante d'anticorps joue un rôle aussi bien de reflet épidémiologique que dans le contrôle du devenir de la maladie. Notre étude réalisée sur deux fronts (épidémiologie et protection) suggère :

-d'une part que des mesures de profils de réactivité contre un panel d'antigènes en utilisant le système multiplex peuvent contribuer positivement à un suivi des mesures intégrées de lutte contre le paludisme. Un panel d'antigènes, couvrant les cibles des différents stades parasites sont utilisables, y compris des antigènes provenant d'autres espèces de *Plasmodium*. Cette partie de notre étude montre que d'autres investigations sont nécessaires ; (i) en terme de transversalité par l'élargissement à plusieurs sites sentinelles couvrant les divers aspects épidémiologiques en Côte d'Ivoire ; (ii) en terme de suivi longitudinal, les sites doivent faire l'objet d'investigations annuelles permettant de signer l'évolution du background immunitaire vers une baisse attendue. Un tel profilage dynamique et multicentrique de l'immunité à l'aide de biomarqueurs (sérologiques) permettrait d'établir une cartographie immunologique évolutive des stratégies d'interventions et une aide pour les mesures de prévention vers l'élimination du paludisme. Des évolutions des niveaux de réponses en suivi longitudinal, comme soulevé à Abobo entre 2010 et 2013, semble difficile à mettre en évidence sur une courte période avec un seul point d'analyse chez les patients symptomatiques. Cette approche des cas symptomatiques, qui semble plus discriminante entre les différents sites devrait être accompagnée d'analyses transversales chez des cohortes d'individus asymptomatiques, notamment de jeunes scolarisés qui apportent une excellente photographie complémentaire de la situation du paludisme dans un site donné. Une investigation plus large géographiquement (nombre de sites) plus diversifiée (enquête scolaire dans la même zone) serait nécessaire d'une part pour préciser l'exactitude de cette approche et d'autre part pour sélectionner le nombre de biomarqueurs minimum pour générer cette information au meilleur compte..

-Par ailleurs certains facteurs humoraux associés à l'immunité "anti-maladie" chez les porteurs asymptomatiques ont pu être examinés. Pour être efficace, la réponse immunitaire contre le parasite devrait inclure une réponse auto-réactive. Notre étude montre l'existence d'une composante auto-réactive induite au cours de l'infection par *Plasmodium* associée vraisemblablement au processus impliqué dans la protection contre la maladie chez les porteurs asymptomatiques. L'augmentation de la réponse auto-réactive est associée à une baisse de la réponse IgG totale antiparasitaire 3D7 chez les porteurs asymptomatiques. Cette réponse auto-réactive diminue quand les mesures de lutte et de contrôle du paludisme augmentent. Les réactivités d'immunoglobulines IgG sériques contre les bandes de protéines S6, S10, S11, S12, et S13 d'extrait de cerveau (de poids moléculaire compris entre 50-75 kDa) discriminent les sites de transmission différente ; ces bandes pourraient abriter des protéines de l'hôte qui peuvent être utilisées comme marqueurs épidémiologiques.

Perspectives

Eu égard l'importance de la réponse anticorps dans le suivi des mesures de lutte et dans la protection contre le paludisme, nous envisageons :

- d'inclure dans notre système multiplex d'autres antigènes de pathogènes responsables de syndromes fébriles, notamment les arbovirus (pour déterminer le degré de co-circulation dans la zone) ou tout autre agent infectieux dont la co-infection peut moduler la réponse anticorps.

- de caractériser et valider les marqueurs auto-réactifs identifiés dans la réponse protectrice (β et γ -actine, acétyl CoA...) sur des cohortes longitudinales.

- en plus de ces réponses anticorps, il conviendra, par ailleurs, d'évaluer la réponse cellulaire et les facteurs de régulation (Cytokines et chémokines) pour apprécier toute la complexité de la réponse immunitaire au cours du paludisme.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel-Latif M. S., Khattab A., Lindenthal C., Kreamsner P. G., & Klinkert M. Q., 2002.** - Recognition of variant Rifin antigens by human antibodies induced during natural *Plasmodium falciparum* infections. *Infect. Immun.*, **70** (12): 7013-7021.
- Adib-Conquy M., Avrameas S., & Ternynck T.,1993.** - Monoclonal IgG and IgM autoantibodies obtained after polyclonal activation, show reactivities similar to those of polyclonal natural autoantibodies. *Mol. Immunol.*, **30**: 119–127.
- Adjuik M., Babiker A., Garner P., Olliaro P., Taylor W., & White N., 2004.** Artesunate combinations for treatment of malaria: meta-analysis. *Lancet*, **363** (9402): 9-17.
- Adu D., Williams D. G., Quakyi I. A., Voller A., Anim-Addo Y., Bruce-Tagoe A. A., Johnson G. D.,& Holborow E. J., 1982.** - Anti-ssDNA and antinuclear antibodies in human malaria. *Clin. Exp. Immunol.*, **49** (2), 310-316.
- Akogbeto M., and Yakoubou S., 1999.** - Résistance of malaria vectors to pyrethrins used for impregnating mosquito nets in Benin, West Africa. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, **92** (2), 123-130.
- Akpogheneta O. J., Duah N. O., Tetteh K. K. A., Dunyo S., Lanar D. E., Pinder M., Conway D.J., 2008.** - Duration of naturally acquired antibody responses to blood-stage *Plasmodium falciparum* is age dependent and antigen specific. *Infect. Immun.* , **76**: 1748–1755.
- Alonso P. L., Sacarlal J., Aponte J. J., Leach A., Macete E., Milman J., Mandomando I., Spiessens B., Guinovart C., Espasa M., Bassat Q., Aide P., Ofori-Anyinam O., Navia M. M., Corachan S., Ceuppens M., Dubois M. C., Demoitie M. A., Dubovsky F., Menendez C., Tornieporth N., Ballou W. R., Thompson R., & Cohen J., 2004.** - Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet*, **364**(9443): 1411-1420.
- Alving C. R., Koulchin V., Glenn G. M., & Rao M., 1995.** Liposomes as carriers of peptide antigens: induction of antibodies and cytotoxic T lymphocytes to conjugated and unconjugated peptides. *Immunol. Rev.*, **145**: 5-31.
- Ambrosino E., Dumoulin C., Orlandi-Pradines E., Remoue F., Toure-Balde A., Tall A., Sarr J. B., Poinsignon A., Sokhna C., Puget K., Trape J. F., Pascual A., Druilhe P., Fusai T., & Rogier C., 2010.** - A multiplex assay for the simultaneous detection of antibodies against 15 *Plasmodium falciparum* and *Anopheles gambiae* saliva antigens. *Malar. J.*, **9**: 317.

- Anonyme, 2011.** - xMAP Antibody Coupling Kit User Manual. 2.0. www.luminexcorp.com/eu/research/our-technology/xmap-technology/. consulté le 12 Juin 2015.
- Anonyme, 2012.** - Description and operation of the Luminex technology. 2.0. <https://www.luminexcorp.com/>. consulté le 12 Juin 2015.
- Aponte J. J., Aide P., Renom, M., Mandomando I., Bassat Q., Sacarlal J., Manaca M. N., Lafuente S., Barbosa A., Leach A., Lievens M., Vekemans J., Sigauque B., Dubois M. C., Demoitie M. A., Sillman M., Savarese B., McNeil J. G., Macete E., Ballou W. R., Cohen J., & Alonso P. L., 2007.** - Safety of the RTS,S/AS02D candidate malaria vaccine in infants living in a highly endemic area of Mozambique: a double blind randomised controlled phase I/IIb trial. *Lancet*, **370 (9598)**: 1543-1551.
- Aribot G., Rogier, C., Sarthou J. L., Trape J. F., Balde A. T., Druilhe P., & Roussilhon C., 1996.** - Pattern of immunoglobulin isotype response to *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens in individuals living in a holoendemic area of Senegal (Dielmo, west Africa). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **54 (5)**: 449-457.
- Ariey F., Witkowski B., Amaratunga C., Beghain J., Langlois A. C., Khim N., Kim S., Duru V., Bouchier C., Ma L., Lim P., Leang R., Duong S., Sreng S., Suon S., Chuor C. M., Bout D. M., Menard S., Rogers W. O., Genton B., Fandeur T., Miotto O., Ringwald P., Le Bras J., Berry A., Barale J. C., Fairhurst R. M., Benoit-Vical F., Mercereau-Puijalon O., & Menard D., 2014.** - A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, **505 (7481)**: 50-55.
- Artavanis-Tsakonas K., Eleme K., McQueen K. L., Cheng N. W., Parham P., Davis D. M., & Riley E. M., 2003.** - Activation of a subset of human NK cells upon contact with *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J. Immunol.*, **171 (10)**: 5396-5405.
- Askjaer N., Maxwell C., Chambo W., Staalsoe T., Nielsen M., Hviid L., Curtis C., & Theander T. G., 2001.** - Insecticide-treated bed nets reduce plasma antibody levels and limit the repertoire of antibodies to *Plasmodium falciparum* variant surface antigens. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **8 (6)**: 1289-1291.
- Assoumou A., Adoubryn K. D., Aboum K. S., Kouadio-Yapo C. G., & Ouhon J., 2008.** - Symptomatic and asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection in children from 6 months to 6 years old in the Abobo general hospital (Abidjan, Côte d'Ivoire). *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, **101 (1)**: 50-53.

- Auffray C., Sieweke M. H., & Geissmann F., 2009.** - Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.*, **27**: 669-692.
- Bach J. F., 2002.** - The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N. Engl. J. Med.*, **347 (12)**: 911-920.
- Badu K., Afrane Y. A., Larbi J., Stewart V. A., Waitumbi J., Angov E., Ong'echa J. M., Perkins D. J., Zhou G., Githeko A., & Yan G., 2012.** - Marked variation in MSP-119 antibody responses to malaria in western Kenyan highlands. *BMC Infect. Dis.*, **12**: 50.
- Bakir H. Y., Tomiyama-Miyaji C., Watanabe H., Nagura T., Kawamura T., Sekikawa H., & Abo T., 2006.** - Reasons why DBA/2 mice are resistant to malarial infection: expansion of CD3int B220+ gammadelta T cells with double-negative CD4- CD8- phenotype in the liver. *Immunology*, **117 (1)**: 127-135.
- Balde A. T., Sarthou, J. L., & Roussilhon C., 1995.** Acute *Plasmodium falciparum* infection is associated with increased percentages of apoptotic cells. *Immunol. Lett.*, **46 (1-2)**: 59-62.
- Ballou W. R., 2009.** - The development of the RTS,S malaria vaccine candidate: challenges and lessons. *Parasite Immunol.*, **31 (9)**: 492-500.
- Bansal D., Herbert F., Lim P., Deshpande P., Becavin C., Guiyedi V., de Maria I., Rousselle J. C., Namane A., Jain R., Cazenave P. A., Mishra G. C., Ferlini C., Fesel C., Benecke A., & Pied S., 2009.** - IgG autoantibody to brain beta tubulin III associated with cytokine cluster-II discriminate cerebral malaria in central India. *PLoS One*, **4 (12)**: e8245.
- Baratin M., Roetynck S., Lepolard C., Falk C., Sawadogo S., Uematsu S., Akira S., Ryffel B., Tiraby J. G., Alexopoulou L., Kirschning C. J., Gysin J., Vivier E., & Ugolini S., 2005.** - Natural killer cell and macrophage cooperation in MyD88-dependent innate responses to *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **102 (41)**: 14747-14752.
- Baruch D. I., Gormely J. A., Ma C., Howard R. J., & Pasloske B. L., 1996.** - *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **93**: 3497-3502.
- Baum E., Badu K., Molina D. M., Liang X., Felgner P. L., & Yan G., 2013.** Protein microarray analysis of antibody responses to *Plasmodium falciparum* in western Kenyan highland sites with differing transmission levels. *PLoS One*, **8 (12)**: e82246.

- Baumgarth N., Tung J. W., & Herzenberg L. A. , 2005.** - Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. *Springer Semin. Immunopathol.*, **26** (4), 347-362.
- Beadle C., McElroy P. D., Oster C. N., Beier J. C., Oloo A. J., Onyango F. K., Chumo D. K., Bales J. D., Sherwood J. A., & Hoffman S. L., 1995.** - Impact of transmission intensity and age on *Plasmodium falciparum* density and associated fever: implications for malaria vaccine trial design. *J. Infect. Dis.*, **172** (4): 1047-1054.
- Beier J., 1998.** - Malaria parasite development in mosquitoes *Annu. Rev. Entomol.* **43**: 519-543.
- Bejon P., Lusingu J., Olotu A., Leach A., Lievens M., Vekemans J., Mshamu S., Lang T., Gould J., Dubois M. C., Demoitie M. A., Stallaert J. F., Vansadia P., Carter T., Njuguna P., Awuondo K. O., Malabeja A., Abdul O., Gesase, S., Mturi N., Drakeley C. J., Savarese B., Villafana T., Ballou W. R., Cohen J., Riley, E. M., Lemnge M. M., Marsh K., & von Seidlein L., 2008.** - Efficacy of RTS,S/AS01E vaccine against malaria in children 5 to 17 months of age. *N. Engl. J. Med.*, **359** (24): 2521-2532.
- Bejon P., Warimwe G., Mackintosh C. L., Mackinnon M. J., Kinyanjui S. M., Musyoki J. N., Peter C.B., & Marsh K., 2009.** - Analysis of immunity to febrile malaria in children that distinguishes immunity from lack of exposure. *Infect. Immun.*, **77**: 1917–1923.
- Benet A., Tavul L., Reeder J. C., & Cortes A., 2004.** - Diversity of *Plasmodium falciparum* vaccine candidate merozoite surface protein 4 (MSP4) in a natural population. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **134** (2): 275-280.
- Berg J., Breederveld D., Roukens A. H., Hennink Y., Schouten M., Wendt J. K., & Visser L. G., 2011.** - Knowledge, attitudes, and practices toward malaria risk and prevention among frequent business travelers of a major oil and gas company. *J. Travel. Med.*, **18** (6): 395-401.
- Borre M. B., Dziegiel M., Hogh B., Petersen E., Rieneck K., Riley E., Meis J. F., Aikawa M., Nakamura K., & Harada M., 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**(1): 119-131.
- Bousema T., Drakeley C., Gesase, S., Hashim R., Magesa S., Mosha F., Otieno S., Carneiro I., Cox J., Msuya E., Kleinschmidt I., Maxwell C., Greenwood B., Riley, E., Sauerwein R., Chandramohan D., & Gosling R., 2010a.** - Identification of hot spots of malaria transmission for targeted malaria control. *J. Infect. Dis.*, **201** (11): 1764-1774.

- Bousema T., Youssef R. M., Cook J., Cox J., Alegana V. A., Amran J., Noor A. M., Snow R. W., & Drakeley C., 2010b.** - Serologic markers for detecting malaria in areas of low endemicity, Somalia, 2008. *Emerg. Infect. Dis.*, **16 (3)**: 392-399.
- Brahimi K., Martins Y. C., Zanini G. M., Ferreira-da-Cruz Mde F., & Daniel-Ribeiro C. T., 2011.** - Monoclonal auto-antibodies and sera of autoimmune patients react with *Plasmodium falciparum* and inhibit its in vitro growth. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **106 (Suppl 1)**: 44-51.
- Branch O. H., Udhayakumar V., Hightower A. W., Oloo A. J., Hawley W. A., Nahlen B. L., Bloland P. B., Kaslow D. C., & Lal A. A., 1998.** - A longitudinal investigation of IgG and IgM antibody responses to the merozoite surface protein-1 19-kiloDalton domain of *Plasmodium falciparum* in pregnant women and infants: associations with febrile illness, parasitemia, and anemia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **58 (2)**: 211-219.
- Bretscher M. T., Supargiyono S., Wijayanti M. A., Nugraheni D., Widyastuti A. N., Lobo N. F., Hawley W. A., Cook J., & Drakeley C. J., 2013.** - Measurement of *Plasmodium falciparum* transmission intensity using serological cohort data from Indonesian schoolchildren. *Malar. J.*, **12**: 21.
- Bruneel F., Hocqueloux L., Alberti C., Wolff M., Chevret S., et al, 2003.** - The clinical spectrum of severe imported *falciparum malaria* in the intensive care unit: report of 188 cases in adults. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **167**: 684-689.
- Cabrera G., Cot M., Migot-Nabias F., Kremsner P. G., Deloron P., & Luty A. J., 2005.** - The sickle cell trait is associated with enhanced immunoglobulin G antibody responses to *Plasmodium falciparum* variant surface antigens. *J. Infect. Dis.*, **191 (10)**: 1631-1638.
- Campo J. J., Whitman T. J., Freilich D., Burgess, T. H., Martin G. J., & Doolan D. L., 2011.** - Toward a surrogate marker of malaria exposure: modeling longitudinal antibody measurements under outbreak conditions. *PLoS One*, **6 (7)**: e21826.
- Carnevale P., Bitsindou P., Diomande L., & Robert V., 1992.** - Insecticide impregnation can restore the efficiency of torn bed nets and reduce man-vector contact in malaria endemic areas. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **86 (4)**: 362-364.
- Carnevale P., Robert V., Manguin S., Corbel V., Fontenille D., Garros C., & Rogier C., 2009.** - Les anophèles-biologie, transmission du *Plasmodium* et lutte antivectorielle. *IRD Editions, coll Didactiques. Marseille, 391p.*

- Casares S., Brumeanu T. D., & Richie T. L., 2010.** - The RTS,S malaria vaccine. *Vaccine*, **28** (31): 4880-94.
- Cerutti A., Cols M., & Puga I., 2013.** - Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.*, **13** (2): 118-132.
- Chan J. A., Fowkes F. J., & Beeson J. G., 2014.** - Surface antigens of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes as immune targets and malaria vaccine candidates. *Cell. Mol. Life. Sci.*, **71** (19): 3633-3657.
- Chan J. A., Howell K. B., Reiling L., Ataide R., Mackintosh C. L., Fowkes F. J., Petter M., Chesson J. M., Langer, C., Warimwe G. M., Duffy M. F., Rogerson S. J., Bull P. C., Cowman A. F., Marsh K., & Beeson J. G., 2012.** - Targets of antibodies against *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in malaria immunity. *J. Clin. Invest.*, **122**(9): 3227-38.
- Chelimo K., Ofulla A. V., Narum D. L., Kazura J. W., Lanar D. E., & John C. C., 2005.** Antibodies to *Plasmodium falciparum* antigens vary by age and antigen in children in a malaria-holoendemic area of Kenya. *Pediatr Infect. Dis. J.*, **24** (8): 680-684.
- Chihanga S., Haque U., Chanda E., Mosweunyane T., Moakofhi K., Jibril H. B., Motlaleng M., Zhang W., & Glass G. E., 2016.** - Malaria elimination in Botswana, 2012-2014: achievements and challenges. *Parasit. Vectors*, **9**: 99.
- Chima R. I., Goodman C. A., & Mills A., 2003.** - The economic impact of malaria in Africa: a critical review of the evidence. *Health Policy*, **63**(1): 17-36.
- Cisse B., Sokhna C., Boulanger D., Milet J., Ba el, H., Richardson K., Hallett R., Sutherland C., Simondon K., Simondon F., Alexander N., Gaye O., Targett G., Lines J., Greenwood B., & Trape J. F., 2006.** - Seasonal intermittent preventive treatment with artesunate and sulfadoxine-pyrimethamine for prevention of malaria in Senegalese children: a randomised, placebo-controlled, double-blind trial. *Lancet*, **367** (9511): 659-667.
- Cissoko Y., Daou M., Lyke K. E., Dicko A., Diarra I., Kone A., Guindo A., Traore K., Krishnegowda G., Diallo D. A., Doumbo O. K., Plowe C. V., Gowda D. C., & Sztein M. B., 2006.** Serum antibody levels to glycosylphosphatidylinositols in specimens derived from matched Malian children with severe or uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria and healthy controls. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **75**(2): 199-204.

- Coetzee M., & Fontenille D., 2004.** Advances in the study of *Anopheles funestus*, a major vector of malaria in Africa. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, **34**: 599-605.
- Consigny P. H., Cauquelin B., Agnamey P., Comby E., Brasseur P., Ballet J. J., & Roussilhon C. 2002.** - High prevalence of co-factor independent anticardiolipin antibodies in malaria exposed individuals. *Clin. Exp. Immunol.*, **127** (1): 158-164.
- Cook J., Kleinschmidt I., Schwabe C., Nseng G., Bousema T., Corran P. H., Riley E. M., & Drakeley C. J., 2011.** - Serological markers suggest heterogeneity of effectiveness of malaria control interventions on Bioko Island, equatorial Guinea. *PLoS One*, **6** (9): e25137.
- Cook J., Reid H., Iavro J., Kuwahata M., Taleo G., Clements A., McCarthy J., Vallely A., & Drakeley C., 2010.** Using serological measures to monitor changes in malaria transmission in Vanuatu. *Malar. J.*, **9**: 169.
- Cook J., Speybroeck N., Sochanta T., Somony H., Sokny M., Claes F., Lemmens K., Theisen M., Soares I. S., D'Alessandro U., Coosemans M., & Erhart A., 2012.** - Sero-epidemiological evaluation of changes in *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* transmission patterns over the rainy season in Cambodia. *Malar. J.*, **11**: 86.
- Cooper M. A., Fehniger T. A., & Caligiuri M. A., 2001.** - The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.*, **22** (11): 633-640.
- Corran P., Coleman P., Riley E., & Drakeley C., 2007.** Serology: a robust indicator of malaria transmission intensity? *Trends Parasitol.*, **23** (12): 575-582.
- Cotter C., Sturrock H. J., Hsiang M. S., Liu J., Phillips A. A., Hwang J., Gueye C. S., Fullman N., Gosling R. D., & Feachem R. G., 2013.** - The changing epidemiology of malaria elimination: new strategies for new challenges. *Lancet*, **382** (9895): 900-11.
- Coutinho A., Kazatchkine M. D., & Avrameas S., 1995.** - Natural autoantibodies. *Curr. Opin. Immunol.*, **7** (6): 812-818.
- Cowman A. F., & Crabb B. S., 2006.** Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*, **124**: 755-766.
- Cox E.G.F., 2010.** History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasites Vectors*, **3**:5
- Cox-Singh J., Davis T. M., Lee K. S., Shamsul S. S., Matusop A., Ratnam S., Rahman H. A., Conway D. J., & Singh B., 2008.** - *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin. Infect. Dis.*, **46** (2): 165-171.

- Cramer J. P., Lepenies, B., Kamena, F., Holscher, C., Freudenberg, M. A., Burchard, G. D., Wagner H., Kirschning C. J., Liu X., Seeberger P. H., & Jacobs T., 2008.** - MyD88/IL-18-dependent pathways rather than TLRs control early parasitaemia in non-lethal *Plasmodium yoelii* infection. *Microbes Infect.*, **10(12-13)**: 1259-1265.
- Crewther P. E., Culvenor J. G., Silva A., Cooper J. A., & Anders R. F., 1990.** - *Plasmodium falciparum*: two antigens of similar size are located in different compartments of the rhoptry. *Exp. Parasitol.*, **70**: 193-206.
- Crompton P. D., Miura K., Traore B., Kayentao K., Ongoiba A., Weiss G., Doumbo S., Doumtabe D., Kone Y., Huang C. Y., Doumbo O. K., Miller L. H., Long C. A., & Pierce S. K., 2010.** - *In vitro* growth-inhibitory activity and malaria risk in a cohort study in mali. *Infect. Immun.*, **78 (2)**, 737-745.
- Cutts J. C., Powell R., Agius P. A., Beeson J. G., Simpson J. A., & Fowkes F. J., 2014.** - Immunological markers of *Plasmodium vivax* exposure and immunity: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med.*, **12**: 150.
- Daniel-Ribeiro C. T., 2000a.** Is there a role for autoimmunity in immune protection against malaria? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **95(2)**: 199-207.
- Daniel-Ribeiro C. T., & Zanini G., 2000b.** - Autoimmunity and malaria: what are they doing together? *Acta Trop.*, **76 (3)**: 205-21.
- Dasse R., Lefranc, D., Dubucquoi S., Dussart P., Dutoit-Lefevre V., Sendid B., Sombo Mambo F., Vermersch P., & Prin L., 2011.** - Changes Related to Age in Natural and Acquired Systemic Self-IgG Responses in Malaria. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.*, **2011**: 462767.
- Deloron P., & Chougnat C., 1992.** Is immunity to malaria really short-lived? *Parasitol. Today*, **8 (11)**: 375-378.
- Desowitz R. S., 1991.** - The malaria capers. In *More Tales of Parasites and People, Research and Reality*. ed. W.W.N. Company, New York, 288p.
- Dhimal M., Ahrens B., & Kuch U., 2014.** - Malaria control in Nepal 1963-2012: challenges on the path towards elimination. *Malar. J.*, **13**: 241.
- Diallo T. O., Spiegel A., Diouf A., Lochouarn L., Kaslow D. C., Tall A., Perraut R., & Garraud O. , 2002.** - Short report: differential evolution of immunoglobulin G1/G3 antibody responses to *Plasmodium falciparum* MSP1(19) over time in malaria-immune adult Senegalese patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **66 (2)**: 137-139.

- Dighiero G., 1997.** Natural autoantibodies, tolerance, and autoimmunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **815**: 182-92.
- Dighiero G., Guilbert B., & Avrameas S., 1982.** - Naturally occurring antibodies against nine common antigens in humans sera. II. High incidence of monoclonal Ig exhibiting antibody activity against actin and tubulin and sharing antibody specificities with natural antibodies. *J. Immunol.*, **128 (6)**: 2788-2792.
- Diop F., Richard V., Diouf B., Sokhna C., Diagne N., Trape J. F., Faye M. M., Tall A., Diop G., & Balde A. T., 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.*, **13**: 83.
- Dodoo D., Theisen M., Kurtzhals J. A., Akanmori B. D., Koram K. A., Jepsen S., Nkrumah F. K., Theander T. G., & Hviid L., 2000.** - Naturally acquired antibodies to the glutamate-rich protein are associated with protection against *Plasmodium falciparum* malaria. *J. Infect. Dis.*, **181 (3)**: 1202-1205.
- Dondorp A. M., Nosten F., Yi P., Das D., Phyto A. P., Tarning J., Lwin K. M., Arieu F., Hanpithakpong W., Lee S. J., Ringwald P., Silamut K., Imwong M., Chotivanich, K., Lim P., Herdman T., An S. S., Yeung S., Singhasivanon P., Day N. P., Lindegardh N., Socheat D., & White N. J., 2009.** - Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N. Engl. J. Med.*, **361 (5)**: 455-467.
- Doolan D. L., Dobano C., & Baird J. K., 2009.** - Acquired immunity to malaria. *Clin. Microbiol. Rev.*, **22 (1)**: 13-36.
- Drakeley C., & Cook J., 2009.** Potential contribution of sero-epidemiological analysis for monitoring malaria control and elimination: historical and current perspectives. *Adv. Parasitol.*, **69**: 299-352.
- Drame P. M., Diallo A., Poinsignon A., Boussari O., Dos Santos S., Machault V., Lalou R., Cornélie S., LeHesran J. Y., & Remoue F., 2013.** - Evaluation of the effectiveness of malaria vector control measures in urban settings of Dakar by a specific anopheles salivary biomarker. *PLoS One*, **8 (6)**: e66354.
- Drame P. M., Machault V., Diallo A., Cornélie S., Poinsignon A., Lalou R., Sembene M., Dos Santos S., Rogier C., Pages F., Le Hesran J. Y., & Remoue F., 2012.** - IgG responses to the gSG6-P1 salivary peptide for evaluating human exposure to Anopheles bites in urban areas of Dakar region, Senegal. *Malar. J.*, **11**: 72.

- Durand C. A., Hartvigsen K., Fogelstrand L., Kim S., Iritani S., Vanhaesebroeck B., Witztum J. L., Puri K. D., & Gold M. R., 2009.** - Phosphoinositide 3-kinase p110 delta regulates natural antibody production, marginal zone and B-1 B cell function, and autoantibody responses. *J. Immunol.*, **183 (9)**: 5673-5684.
- Dziegiel M., Rowe P., Bennett S., Allen S. J., 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 (1)**, 103-108.
- EDS-MICS, 2012.** - Côte d'Ivoire: Enquête Démographique et de Santé et à Indicateurs Multiples 2011-2012 *Rapport de synthèse*, 25p.
- Ege M. J., Mayer M., Normand A. C., Genuneit J., Cookson W. O., Braun-Fahrlander C., Heederik D., Piarroux R., and von Mutius E., 2011.** - Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *N. Engl. J. Med.*, **364 (8)**: 701-709.
- Enevold A., Nkya W. M., Theisen M., Vestergaard L. S., Jensen A. T., Staalsoe T., Theander T. G., Bygbjerg I. C., & Alifrangis M., 2007.** - Potential impact of host immunity on malaria treatment outcome in Tanzanian children infected with *Plasmodium falciparum*. *Malar. J.*, **6**: 153.
- Facer C. A., & Agiostratidou G., 1994.** High levels of anti-phospholipid antibodies in uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* and in *Plasmodium vivax* malaria. *Clin. Exp. Immunol.*, **95(2)**: 304-309.
- Fantini B., 1999.** - The concept of specificity and the Italian contribution to the discovery of the malaria transmission cycle. *Parassitologia*, **41 (1-3)**: 39-47.
- Farouk S. E., Mincheva-Nilsson L., Krensky A. M., Dieli F., & Troye-Blomberg M., 2004.** - Gamma delta T cells inhibit *in vitro* growth of the asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* by a granule exocytosis-dependent cytotoxic pathway that requires granulysin. *Eur. J. Immunol.*, **34 (8)**: 2248-2256.
- Fesel C., Goulart L. F., Silva Neto A., Coelho A., Fontes C. J., Braga E. M., & Vaz N. M., 2005.** - Increased polyclonal immunoglobulin reactivity toward human and bacterial proteins is associated with clinical protection in human *Plasmodium* infection. *Malar. J.*, **4**: 5.

- Fontenille D., Cohuet A., Awono-Ambene P. H., Antonio-Nkondjio C., Wondji C., et al., 2003.** - Systematics and biology of *Anopheles* vectors of *Plasmodium* in Africa, recent data. *Med. Trop. (Mars)*, **63**: 247-253.
- Fouda G. G., Leke R. F., Long C., Druilhe P., Zhou A., Taylor D. W., & Johnson A. H., 2006.** - Multiplex assay for simultaneous measurement of antibodies to multiple *Plasmodium falciparum* antigens. *Clin. Vaccine Immunol.*, **13 (12)**: 1307-1313.
- Fowkes F. J., Richards J. S., Simpson J. A., & Beeson J. G., 2010.** - The relationship between anti-merozoite antibodies and incidence of *Plasmodium falciparum* malaria: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.*, **7 (1)**: e1000218.
- Gallup J. L., & Sachs J. D., 2001.** - The economic burden of malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **64(1-2 Suppl)**, 85-96.
- Gangnard S., Lewit-Bentley A., Dechavanne S., Srivastava A., Amirat F., Bentley G. A., & Gamain B., 2015.** - Structure of the DBL3X-DBL4epsilon region of the VAR2CSA placental malaria vaccine candidate: insight into DBL domain interactions. *Sci. Rep.*, **5**: 14868.
- Garraud O., Mahanty S., & Perraut R., 2003.** - Malaria-specific antibody subclasses in immune individuals: a key source of information for vaccine design. *Trends Immunol.*, **24 (1)**, 30-5.
- Gehrs B. C., & Friedberg R. C., 2002.** - Autoimmune hemolytic anemia. *Am. J. Hematol.*, **69 (4)**, 258-271.
- Gilson P. R., Nebl T., Vuckcevic D., Moritz R. L., Sargeant T., Speed T. P., Schofield L., & Crabb B. S., 2006.** - Identification and stoichiometry of GPI-anchored membrane proteins of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Am. Soc. Bioch. Mol. Biol.*, **5**: 1286-1299.
- Goel V. K., Li X., Chen H., Liu S. C., Chishti A. H., & Oh S. S., 2003.** - Band 3 is a host receptor binding merozoite surface protein 1 during the *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **100 (9)**: 5164-5169.
- Gomes L. R., Martins Y. C., Ferreira-da-Cruz M. F., & Daniel-Ribeiro C. T., 2014.** - Autoimmunity, phospholipid-reacting antibodies and malaria immunity. *Lupus*, **23 (12)**: 1295-1298.
- Gomes L. R., Totino P. R., Sanchez M. C., Daniel E. P., Macedo C. S., Fortes F., Coura J. R., Santi S. M., Werneck G. L., Suarez-Mutis M. C., Ferreira-da-Cruz Mde F., & Daniel-**

- Ribeiro C. T., 2013.** - Asymptomatic infection in individuals from the municipality of Barcelos (Brazilian Amazon) is not associated with the anti-*Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositol antibody response. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **108 (6)**: 796-800.
- Greenhouse B., Ho, B., Hubbard A., Njama-Meya D., Narum D. L., Lanar D. E., Dutta S., Rosenthal P. J., Dorsey G., & John C. C., 2011.** - Antibodies to *Plasmodium falciparum* antigens predict a higher risk of malaria but protection from symptoms once parasitemic. *J. Infect. Dis.*, **204 (1)**: 19-26.
- Greenwood B., 2006.** - Review: Intermittent preventive treatment--a new approach to the prevention of malaria in children in areas with seasonal malaria transmission. *Trop. Med. Int. Health*, **11 (7)**: 983-991.
- Greenwood B. M., Bojang K., Whitty C. J., & Targett G. A., 2005.** - Malaria. *Lancet*, **365 (9469)**: 1487-1498.
- Guilbert B., Dighiero G., & Avrameas S., 1982.** - Naturally occurring antibodies against nine common antigens in human sera. I. Detection, isolation and characterization. *J. Immunol.*, **128 (6)**: 2779-2787.
- Guinovart C., Aponte J. J., Sacarlal J., Aide P., Leach, A., Bassat Q., Macete E., Dobano C., Lievens M., Loucq C., Ballou W. R., Cohen J., & Alonso P. L., 2009.** - Insights into long-lasting protection induced by RTS,S/AS02A malaria vaccine: further results from a phase IIb trial in Mozambican children. *PLoS One*, **4 (4)**: e5165.
- Guiyedi V., Becavin C., Herbert F., Gray J., Cazenave P. A., Kombila M., Crisanti A., Fesel C., & Pied S., 2015.** - Asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection in children is associated with increased auto-antibody production, high IL-10 plasma levels and antibodies to merozoite surface protein 3. *Malar. J.*, **14**:162.
- Guiyedi V., Chansaoud Y., Fesel C., Snounou G., Rousselle J. C., Lim P., Koko J., Namane A., Cazenave P. A., Kombila M., & Pied S., 2007.** - Self-reactivities to the non-erythroid alpha spectrin correlate with cerebral malaria in Gabonese children. *PLoS One*, **2 (4)**: e389.
- Gysin J., Barnwell J., Schlesinger D. H., Nussenzweig V., & Nussenzweig R. S., 1984.** - Neutralization of the infectivity of sporozoites of *Plasmodium knowlesi* by antibodies to a synthetic peptide. *J. Exp. Med.*, **160 (3)**: 935-940.

- Haury M., Grandien A., Sundblad A., Coutinho A., & Nobrega A., 1994.** - Global analysis of antibody répertoires. 1. An immunoblot method for the quantitative screening of a large number of reactivities. *Scand. J. Immunol.*, **39** (1): 79-87.
- Herrera S., Corradin G., & Arevalo-Herrera M., 2007.** - An update on the search for a *Plasmodium vivax* vaccine. *Trends Parasitol.*, **23** (3): 122-128.
- Heymann D. L., & Brilliant L., 2011.** - Surveillance in eradication and elimination of infectious diseases: a progression through the years. *Vaccine*, **29** (Suppl 4): D141-4.
- Hill A. V., Elvin J., Willis A. C., Aidoo M., Allsopp C. E., Gotch F. M., Gao X. M., Takiguchi M., Greenwood B. M., Townsend A. R., 1992.** - Molecular analysis of the association of HLA-B53 and résisitance to severe malaria. *Nature*, **360** (6403): 434-439.
- Hill D. L., Eriksson E. M., Li Wai Suen C. S., Chiu C. Y., Ryg-Cornejo V., Robinson L. J., Siba P. M., Mueller I., Hansen D. S., & Schofield L., 2013.** - Opsonising antibodies to *P. falciparum* merozoites associated with immunity to clinical malaria. *PLoS One*, **8** (9): e74627.
- Hodder A. N., Crewther P. E., Matthew M. L., Reid G. E., Moritz R. L., Simpson R. J., & Anders R. F. T., 1996.** - The disulfide bond structure of *Plasmodium* apical membrane antigen-1. *J. Biol. Chem.*, **271**: 29446-29452.
- Hogh B., Petersen E., Crandall I., Gottschau A., & Sherman I. W., 1994.** - Immune responses to band 3 neoantigens on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in subjects living in an area of intense malaria transmission are associated with low parasite density and high hematocrit value. *Infect. Immun.*, **62** (10): 4362-6.
- 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**(3): 307-313.
- Hogh B., Thompson R., Zakiuddin I. S., Boudin C., & Borre M., 1993.** - Glutamate rich *Plasmodium falciparum* antigen (GLURP). *Parassitologia*, **35** (Suppl): 47-50.
- Holder A. A., 2009.** - xy-terminus of merozoite surface protein 1: structure, specific antibodies and immunity to malaria. *Parasitology*, **136**: 1445-1456.

- Hollingdale M. R., Aikawa M., Atkinson C. T., Ballou W. R., Chen G. X., Li J., Meis J. F., Sina B., Wright C., & Zhu J. D., 1990.** - Non-CS pre-erythrocytic protective antigens. *Immunol. Lett.*, **25 (1-3)**: 71-76.
- Hsiang M. S., Hwang J., Kunene S., Drakeley C., Kandula D., Novotny J., Parizo J., Jensen T., Tong M., Kemere J., Dlamini S., Moonen B., Angov E., Dutta S., Ockenhouse C., Dorsey G., & Greenhouse B., 2012.** - Surveillance for malaria elimination in Swaziland: a national cross-sectional study using pooled PCR and serology. *PLoS One*, **7 (1)**: e29550.
- Janes J. H., Wang C. P., Levin-Edens E., Vigan-Womas I., Guillotte M., Melcher M., Mercereau-Puijalon O., & Smith J. D., 2011.** - Investigating the host binding signature on the *Plasmodium falciparum* PfEMP1 protein family. *PLoS Pathog*, **7 (5)**: e1002032.
- Jarra W., Hills L. A., March J. C., & Brown K. N., 1986.** - Protective immunity to malaria. Studies with cloned lines of *Plasmodium chabaudi chabaudi* and *P. berghei* in CBA/Ca mice. II. The effectiveness and inter- or intra-species specificity of the passive transfer of immunity with serum. *Parasite Immunol.*, **8 (3)**: 239-254.
- John C. C., Tande A. J., Moormann A. M., Sumba P. O., Lanar D. E., Min X. M., & Kazura J. W., 2008.** - Antibodies to pre-erythrocytic *Plasmodium falciparum* antigens and risk of clinical malaria in Kenyan children. *J. Infect. Dis.*, **197 (4)**: 519-526.
- Joos C., Marrama L., Polson H. E., Corre S., Diatta A. M., Diouf B., Trape J. F., Tall A., Longacre S., & Perraut R., 2010.** - Clinical protection from *falciparum* malaria correlates with neutrophil respiratory bursts induced by merozoites opsonized with human serum antibodies. *PLoS One*, **5 (3)**: e9871.
- Juliano J.J., 2006.** - Paludisme. In: *Maladies infectieuses, SECTION X j*, pp 824-830.
- Kai K. O., & Roberts D. J., 2008.** - The pathophysiology of malarial anaemia: where have all the red cells gone? *BMC Medicine*, **6**: 24.
- Karema C., Fanello C. I., van Overmeir C., van Geertruyden J. P., van Doren W., Ngamije D., & D'Alessandro U., 2006.** - Safety and efficacy of dihydroartemisinin/piperaquine (Artekin) for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Rwandan children. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **100 (12)**: 1105-1111.
- Kato K., Mayer D. C., Singh S., Reid M., & Miller L. H., 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 (15)**: 5552-5557.

- Kedzierski L., Black C. G., Goschnick M. W., Stowers A. W., & Coppel R. L., 2002.** - Immunization with a combination of merozoite surface proteins 4/5 and 1 enhances protection against lethal challenge with *Plasmodium yoelii*. *Infect. Immun.*, **70** (12): 6606-13.
- Keh C. E., Jha A. R., Nzarubara B., Lanar D. E., Dutta S., Theisen M., Rosenthal P. J., Dorsey G., Nixon D. F., & 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): e52571.
- Kerkhof K., Canier L., Kim S., Heng S., Sochantha T., Sovannaroeth S., Vigan-Womas I., Coosemans M., Sluydts V., Menard D., & Durnez L., 2015.** - Implementation and application of a multiplex assay to detect malaria-specific antibodies: a promising tool for assessing malaria transmission in Southeast Asian pre-elimination areas. *Malar. J.*, **14**: 338.
- King C. L., Davies D. H., Felgner P., Baum E., Jain A., Randall A., Tetteh K., Drakeley C. J., & Greenhouse B., 2015.** - Biosignatures of Exposure/Transmission and Immunity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **93** (3 Suppl): 16-27.
- Klinman D. M., Takeno M., Ichino M., Gu M., Yamshchikov G., Mor G., & Conover J., 1997.** - DNA vaccines: safety and efficacy issues. *Springer Semin. Immunopathol.*, **19** (2): 245-256.
- Knoblauch A. M., Winkler M. S., Archer C., Divall M. J., Owuor M., Yapo R. M., Yao P. A., & Utzinger J., 2014.** - The epidemiology of malaria and anaemia in the Bonikro mining area, central Cote d'Ivoire. *Malar. J.*, **13**: 194.
- Koffi A.A., Ahoua A. P. L., Adja A.M., Konan Y.L., Manga L., Bagayoko M., Bitsindou M., 2009.** Profil entomologique du paludisme en Côte d'Ivoire 1956-2009. *WHO/ANVR/2009*
- Koffi A. A., Ahoua Alou L. P., Adja M. A., Chandre F., & Pennetier C., 2013.** - Insecticide résisistance status of *Anopheles gambiae* s.s population from M'Be: a WHOPES-labelled experimental hut station, 10 years after the political crisis in Côte d'Ivoire. *Malar. J.*, **12**: 151.
- Koudou B. G., Doumbia M., Janmohamed N., Tschannen A. B., Tanner M., Hemingway J., & Utzinger J., 2010.** - Effects of seasonality and irrigation on malaria transmission in two villages in Cote d'Ivoire. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **104** (2): 109-121.

- Koussis K., Withers-Martinez C., Yeoh S., Child M., Hackett F., et al, 2009.** - A multifunctional serine protease primes the malaria parasite for red blood cell invasion. *EMBO J.*, **28**: 725-735.
- Krzych U., Lyon, J. A., Jareed T., Schneider I., Hollingdale M. R., Gordon D. M., & Ballou W. R., 1995.** - T lymphocytes from volunteers immunized with irradiated *Plasmodium falciparum* sporozoites recognize liver and blood stage malaria antigens. *J. Immunol.*, **155** (8): 4072-4077.
- Kumaratilake L. M., Ferrante A., Jaeger T., & Rzepczyk C. M., 1992.** - Effects of cytokines, complement, and antibody on the neutrophil respiratory burst and phagocytic response to *Plasmodium falciparum* merozoites. *Infect. Immun.*, **60** (9): 3731-8.
- La Flamme A. C., Ruddenklau K., & Backstrom B. T., 2003.** - Schistosomiasis decreases central nervous system inflammation and alters the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Infect. Immun.*, **71** (9): 4996-5004.
- Lacroix-Desmazes S., Mouthon L., Coutinho A., & Kazatchkine M. D., 1995.** - Analysis of the natural human IgG antibody repertoire: life-long stability of reactivities towards self antigens contrasts with age-dependent diversification of reactivities against bacterial antigens. *Eur. J. Immunol.*, **25** (9): 2598-2604.
- Langhorne J., Ndungu F. M., Sponaas A. M., & Marsh K., 2008.** - Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat. Immunol.*, **9**(7): 725-732.
- Lefranc D., Almeras L., Dubucquoi S., de Seze J., Vermersch P., & Prin L., 2004.** - Distortion of the self-reactive IgG antibody repertoire in multiple sclerosis as a new diagnostic tool. *J. Immunol.*, **172** (1), 669-678.
- Liehl P., & Mota M. M., 2012.** - Innate recognition of malarial parasites by mammalian hosts. *Int. J. Parasitol.*, **42**: 557-566.
- Liew J., Amir A., Chen Y., Fong M. Y., Razali R., & Lau Y. L., 2015.** - Autoantibody profile of patients infected with *knowlesi* malaria. *Clin. Chim. Acta*, **448**: 33-38.
- Lyke K. E., Burges, R., Cissoko, Y., Sangare, L., Dao, M., Diarra, I., Kone, A., Harley, R., Plowe, C. V., Doumbo, O. K., & Sztein, M. B., 2004.** - Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12(p70) in Malian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. *Infect. Immun.*, **72** (10): 5630-5637.

- Malvy D. D. F., Thiebaut R., & Le Bras M., 2000.** - Plasmodies-Malaria. Formes cliniques et diagnostic. *Encyclopédie médico-chirurgicale Paris Elsevier* 8. 16p
- Mara E.S, Silué K.D., Raso G., N'Guetta P., N'Goran K.E., Tanner M., Utzinger J. and Ding X.C., 2013.** Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* among school-aged children from the Man region, western Côte d'Ivoire. *Malar. J.*, **12**:419
- Marrelli M. T., Branquinho M. S., Hoffmann E. H., Taïpe-Lagos C. B., Natal D., & Kloetzel J. K., 1998.** - Correlation between positive serology for *Plasmodium vivax*-like/*Plasmodium simiovale* malaria parasites in the human and anopheline populations in the State of Acre, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **92** (2): 149-151.
- Marsh K., & Kinyanjui S., 2006.** - Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol.*, **28**(1-2), 51-60.
- Mawili-Mboumba D. P., Borrmann S., Cavanagh D. R., McBride J. S., Matsiegui P. B., Missinou M. A., Kremsner P. G., & 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** (7): 1137-1141.
- Mayxay M., Chotivanich K., Pukrittayakamee S., Newton P., Looareesuwan S., & White N. J., 2001.** - Contribution of humoral immunity to the therapeutic response in *falciparum* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **65** (6): 918-923.
- M'bra K.R., Kone B., Ibrahima S.Y., Dahdi S.A., N'Dione J.A., Soro N., Cisse G., 2015.** Water, Sanitation and Hygiene: Integrated analysis of risk factors for malaria and schistosomiasis in Korhogo (Côte d'Ivoire) and Kaedi (Mauritania). *projet TDR OMS atelier d'évaluation*, 11 Février 2015 Abidjan, Cote d'Ivoire http://vbd-environment.org/assets/documents/Project_E_Resources/Poster_Environmental_Epidemiology.pdf
- Meek B., Back J. W., Klaren V. N., Speijer D., & Peek R., 2002.** - Conserved regions of protein disulfide isomerase are targeted by natural IgA antibodies in humans. *Int. Immunol.*, **14** (11): 1291-1301.
- Menard R., 2007.** - Malaria: parasite imaging unveils the intimacy of infection. *Pathol. Biol. (Paris)*, **55**: 219-221.

- Menoret A., Chandawarkar R. Y., & Srivastava P. K., 2000.** - Natural autoantibodies against heat-shock proteins hsp70 and gp96: implications for immunotherapy using heat-shock proteins. *Immunology*, **101** (3): 364-370.
- Miller L. H., Roberts T., Shahabuddin M., & McCutchan T. F., 1993.** - Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1). *Mol. Biochem. Parasitol.*, **59**: 1-14.
- Mitchell G. H., Thomas A. W., Margos G., Dluzewski A. R., & Bannister L. H., 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** (1): 154-158.
- Montes C. L., Acosta-Rodriguez E. V., Merino M. C., Bermejo D. A., & Gruppi A., 2007.** - Polyclonal B cell activation in infections: infectious agents' devilry or defense mechanism of the host? *J. Leukoc. Biol.*, **82** (5): 1027-1032.
- Mouchet J. C. P., Coosemans M., Julvez J., Manguin S., Richard- Lenoble D., et al, 2004.** - Biodiversité du paludisme dans le monde. *John Libbey Eurotext*. 428p
- Mouthon L., Lacroix-Desmazes S., Nobrega A., Barreau, C., Coutinho A., & Kazatchkine M. D., 1996.** - The self-reactive antibody repertoire of normal human serum IgM is acquired in early childhood and remains conserved throughout life. *Scand. J. Immunol.*, **44** (3): 243-251.
- Murray C. J., Rosenfeld L. C., Lim S. S., Andrews K. G., Foreman K. J., Haring D., Fullman N., Naghavi M., Lozano R., & Lopez A. D. , 2012.** Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet*, **379** (9814): 413-431.
- Nagayama Y., Watanabe K., Niwa M., McLachlan S. M., & Rapoport B., 2004.** - Schistosoma mansoni and alpha-galactosylceramide: prophylactic effect of Th1 Immune suppression in a mouse model of Graves' hyperthyroidism. *J. Immunol.*, **173** (3): 2167-2173.
- Nair M., Hinds M. G., Coley A. M., Hodder A. N., Foley M., Anders R. F., & Norton R. S., 2002.** - Structure of domain III of the blood-stage malaria vaccine candidate, *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (AMA1). *J. Mol. Biol.*, **322** (4): 741-753.
- Nankabirwa J., Brooker S. J., Clarke S. E., Fernando D., Gitonga C. W., Schellenberg D., & Greenwood B., 2014.** - Malaria in school-age children in Africa: an increasingly important challenge. *Trop. Med. Int. Health*, **19** (11): 1294-1309.
- Naparstek Y., & Plotz P. H., 1993:** - The role of autoantibodies in autoimmune disease. *Annu. Rev. Immunol.*, **11**: 79-104.

- Narum D. L. T., 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**: 59668.
- Nebi T., De Veer M. J., & Schofield L., 2005.** - Stimulation of innate immune responses by malarial glycosylphosphatidylinositol via pattern recognition receptors. *Parasitology*, **130** (Suppl): S45-62.
- Nobrega A., Haury M., Grandien A., Malanchere E., Sundblad A., & Coutinho A., 1993.** - Global analysis of antibody répertoires. II. Evidence for specificity, self-selection and the immunological "homunculus" of antibodies in normal serum. *Eur. J. Immunol.*, **23** (11): 2851-2859.
- Noda K., Kodama S., Umemoto S., Abe, N., Hirano T., & Suzuki M., 2010.** - Nasal vaccination with P6 outer membrane protein and alpha-galactosylceramide induces nontypeable *Haemophilus influenzae*-specific protective immunity associated with NKT cell activation and dendritic cell expansion in nasopharynx. *Vaccine*, **28** (31): 5068-5074.
- Noedl H., Socheat D., & Satimai W., 2009.** - Artemisinin-resistant malaria in Asia. *N. Engl. J. Med.*, **361**(5): 540-541.
- Nosten F., & White N. J., 2007.** - Artemisinin-based combination treatment of falciparum malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **77** (6 Suppl): 181-192.
- Nwonwu E. U., Ibekwe P. C., Ugwu J. I., Obarezi H. C., & Nwagbara O. C., 2009.** - Prévalence of malaria parasitaemia and malaria related anaemia among pregnant women in Abakaliki, South East Nigeria. *Niger. J. Clin. Pract.*, **12** (2): 182-186.
- Okech B. A., Corran P. H., Todd J., Joynson-Hicks A., Uthaipibull C., Egwang T. G., Holder A. A., & Riley E. M., 2004.** - Fine specificity of serum antibodies to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein, PfMSP-1(19), predicts protection from malaria infection and high-density parasitemia. *Infect. Immun.*, **72** (3): 1557-1567.
- Okell L. C., Bousema T., Griffin J. T., Ouedraogo A. L., Ghani A. C., & Drakeley C. J., 2012.** - Factors determining the occurrence of submicroscopic malaria infections and their relevance for control. *Nat. Commun.*, **3**: 1237.
- Okell L. C., Ghani A. C., Lyons E., & Drakeley C. J., 2009.** - Submicroscopic infection in *Plasmodium falciparum*-endemic populations: a systematic review and meta-analysis. *J. Infect. Dis.*, **200** (10): 1509-1517.

- Okten A., Akcay, S., Cakir M., Giriskan I., Kosucu P., & Deger O., 2006.** - Iodine status, thyroid function, thyroid volume and thyroid autoimmunity in patients with type 1 diabetes mellitus in an iodine-replete area. *Diabetes Metab.*, **32** (4): 323-9.
- Olotu A., Lusingu J., Leach A., Lievens M., Vekemans J., Msham S., Lang T., Gould J., Dubois M. C., Jongert E., Vansadia P., Carter T., Njuguna P., Awuondo K. O., Malabeja A., Abdul O., Gesase S., Mturi N., Drakeley C. J., Savarese B., Villafana T., Lapierre D., Ballou W. R., Cohen J., Lemnge M. M., Peshu N., Marsh K., Riley E. M., von Seidlein L., & Bejon P., 2011a.** - Efficacy of RTS,S/AS01E malaria vaccine and exploratory analysis on anti-circumsporozoite antibody titres and protection in children aged 5-17 months in Kenya and Tanzania: a randomised controlled trial. *Lancet Infect. Dis.*, **11** (2): 102-109.
- Olotu A., Moris P., Mwacharo J., Vekemans J., Kimani D., Janssens M., Kai O., Jongert E., Lievens M., Leach A., Villafana T., Savarese B., Marsh K., Cohen J., & Bejon P., 2011b.** - Circumsporozoite-specific T cell responses in children vaccinated with RTS,S/AS01E and protection against *P. falciparum* clinical malaria. *PLoS One*, **6** (10): e25786.
- OMS, 2010.** - Guidelines for the Treatment of malaria. 317p
- OMS, 2011.** - World Malaria Report. <http://www.who.int/malaria/publications/en/>. Consulté le 20 Octobre 2014.
- OMS, 2012.** - Malaria report. http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012. Consulté le 20 Octobre 2014.
- OMS, 2014** World Malaria Report 2014. Geneva, World Health Organization; 2014. http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/en/ 2014. Consulté le 12 Juin 2015.
- OMS, 2015.** - World Malaria Report 2015. www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2015/report/en. Consulté le 31 Juillet 2016.
- OMS, 2016** - Paludisme, *Aide-mémoire* N°94 Avril 2016
- Orlandi-Pradines E., Almeras L., Denis de Senneville L., Barbe S., Remoue F., Villard C., Cornélie S., Penhoat K., Pascual A., Bourgouin C., Fontenille D., Bonnet J., Correcatelin N., Reiter P., Pages F., Laffite D., Boulanger D., Simondon F., Pradines B., Fusai T., & Rogier C., 2007.** - Antibody response against saliva antigens of *Anopheles*

gambiae and *Aedes aegypti* in travellers in tropical Africa. *Microbes Infect.*, **9** (12-13): 1454-1462.

Osier F. H., Fegan G., Polley S. D., Murungi L., Verra F., Tetteh K. K., Lowe B., Mwangi T., Bull P. C., Thomas A. W., Cavanagh D. R., McBride J. S., Lanar D. E., Mackinnon M. J., Conway D. J., & 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** (5): 2240-2248.

Osier F. H., Feng G., Boyle M. J., Langer C., Zhou J., Richards J. S., McCallum F. J., Reiling L., Jaworowski A., Anders R. F., Marsh K., & Beeson J. G., 2014. - Opsonic phagocytosis of *Plasmodium falciparum* merozoites: mechanism in human immunity and a correlate of protection against malaria. *BMC Med.*, **12**: 108.

Ouedraogo A. L., Roeffen W., Luty A. J., de Vlas S. J., Nebie I., Ilboudo-Sanogo E., Cuzin-Ouattara N., Teleen K., Tiono A. B., Sirima S. B., Verhave J. P., Bousema T., & Sauerwein R., 2011. - Naturally acquired immune responses to *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens Pfs48/45 and Pfs230 in an area of seasonal transmission. *Infect. Immun.*, **79** (12): 4957-4964.

Pages F., Orlandi-Pradines E., and Corbel V., 2007. - Vectors of malaria: biology, diversity, prevention, and individual protection. *Med. Mal. Infect.*, **37**: 153-161.

Pai N. P., Vadnais C., Denkinger C., Engel N., & Pai M., 2012. - Point-of-care testing for infectious diseases: diversity, complexity, and barriers in low- and middle-income countries. *PLoS Med.*, **9** (9): e1001306.

Perlmann P., and Troye-Blomberg M., 2000. - Malaria blood-stage infection and its control by the immune system. *Folia Biol. (Praha)*, **46** (6): 210-218.

Perraut R., Guillotte M., Drame I., Diouf B., Molez J. F., Tall A., Trape J. F., Mercereau-Puijalon O., Spiegel A., & Garraud O., 2002. - Evaluation of anti-*Plasmodium falciparum* antibodies in Senegalese adults using different types of crude extracts from various strains of parasite. *Microbes Infect.*, **4** (1): 31-35.

Perraut R., Joos C., Sokhna C., Polson H. E., Trape J. F., Tall A., Marrama L., Mercereau-Puijalon O., Richard V., & Longacre S., 2014. - Association of antibody responses to the conserved *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 5 with protection against clinical malaria. *PLoS One*, **9** (7): e101737.

- Perraut R., Marrama L., Diouf B., Fontenille D., Tall A., Sokhna C., Trape J. F., 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 (12)**: 1940-1950.
- Perraut R., Marrama L., Diouf B., Sokhna C., Tall A., Nabeth P., Trape J. F., Longacre S., & Mercereau-Puijalon O., 2005.** - Antibodies to the conserved C-terminal domain of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 and to the merozoite extract and their relationship with in vitro inhibitory antibodies and protection against clinical malaria in a Senegalese village. *J. Infect. Dis.*, **191 (2)**: 264-271.
- Perraut R., Mercereau-Puijalon O., Diouf B., Tall A., Guillotte M., Le Scanf C., Trape, J. F., Spiegel A., & Garraud O., 2000.** - Seasonal fluctuation of antibody levels to *Plasmodium falciparum* parasitized red blood cell-associated antigens in two Senegalese villages with different transmission conditions. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **62 (6)**: 746-751.
- Pizarro J. C., Vulliez-Le Normand B., Chesne-Seck M. L., Collins C. R., Withersmartinez C., Hackett F., Blackman M. J., Faber B. W., Remarque E. J., Kocken C. H., Thomas A. W., & Bentley G. A., 2005.** - Crystal structure of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. *Science*, **308 (5720)**: 408-411.
- Plassmeyer M. L., Reiter K., Shimp R. L., Kotova S., Smith P. D., Hurt D. E., House B., Zou X., Zhang Y., Hickman M., Uchime O., Herrera R., Nguyen V., Glen J., Lebowitz J., Jin A. J., Miller L. H., Macdonald N. J., Wu Y., & Narum D. L., 2009.** Structure of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein, a leading malaria vaccine candidate. *J. Biol. Chem.*, **284**: 26951-26963.
- PNLP, 2014.** - Plan Stratégique National 2011-2015. Côte d'Ivoire, Programme National de Lutte contre le Paludisme. . <http://pnlpcotedivoire.org>. Consulté le 12 Juin 2015
- Polson H. E., Conway D. J., Fandeur T., Mercereau-Puijalon O., & Longacre S., 2005.** - Gene polymorphism of *Plasmodium falciparum* merozoite surface proteins 4 and 5. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **142 (1)**: 110-5.
- Pombo D. J., Lawrence G., Hirunpetcharat C., Rzepczyk C., Bryden M., Cloonan N., Anderson K., Mahakunkijcharoen Y., Martin L. B., Wilson D., Elliott S., Eisen D. P., Weinberg J. B., Saul A., & Good M. F., 2002.** - Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. *Lancet*, **360 (9333)**: 610-617.

- Puentes A., Garcia J., Vera R., Lopez R., Suarez J., Rodriguez L., Curtidor H., Ocampo, M., Tovar D., Forero M., Bermudez A., Cortes J., Urquiza M., & Patarroyo M. E., 2004.** - Sporozoite and liver stage antigen *Plasmodium falciparum* peptides bind specifically to human hepatocytes. *Vaccine*, **22 (9-10)**, 1150-1156.
- Raeisi A., Mirkhani V., Alkaran F. N., Jalali B. P., Faraji L., Keykhah M. R., and & Tabatabaie S. T., 2014.** - Achievements of malaria elimination program in the face of a difficult situation of population movement with appropriate use of available resources, involvements of research entities and academia. *Malar. J.*, **13 (Suppl 1)**: P75.
- RBM, 2016.** - Malaria report. <http://www.rollbackmalaria.org/>. Consulté le 24 Avril 2016
- Richards J. S., Arumugam T. U., Reiling L., Healer J., Hodder A. N., Fowkes F. J., Cross N., Langer C., Takeo S., Uboldi A. D., Thompson J. K., Gilson P. R., Coppel R. L., Siba P. M., King C. L., Torii M., Chitnis C. E., Narum D. L., Mueller I., Crabb B. S., Cowman A. F., Tsuboi T., & Beeson J. G., 2013.** - Identification and prioritization of merozoite antigens as targets of protective human immunity to *Plasmodium falciparum* malaria for vaccine and biomarker development. *J. Immunol.*, **191 (2)**: 795-809.
- Rafaramino F., Maminirina R. A. M., Razafindrabe J. A. B., Rabarijaona L., A. Randriamampandry A., Rakotobe P., 2001.** Aspects épidémiologiques du lymphome de Burkitt de l'enfant à Madagascar *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, **94(5)**: 385-388
- Raso G., Silue K.D., Vounatsou P., Singer B.H., Yapi A., Tanner M., Utzinger J., N'goran E.K., 2009.** Spatial risk profiling of *Plasmodium falciparum* parasitaemia in a high endemicity area in Côte d'Ivoire. *Malar. J.*, **8**: 252
- Richards J. S., & Beeson J. G., 2009.** - The future for blood-stage vaccines against malaria. *Immunol. Cell Biol.*, **87 (5)**: 377-390.
- Riley E. M., Morris-Jones S., Blackman M. J., Greenwood B. M., and Holder A. A., 1993.** - A longitudinal study of naturally acquired cellular and humoral immune responses to a merozoite surface protein (MSP1) of *Plasmodium falciparum* in an area of seasonal malaria transmission. *Parasite Immunol.*, **15 (9)**: 513-524.
- Ritter K., Kuhlencord A., Thomssen R., & Bommer W., 1993.** - Prolonged haemolytic anaemia in malaria and autoantibodies against triosephosphate isomerase. *Lancet*, **342 (8883)**: 1333-1334.

- Rogier C., & Trape J. F., 1995.** - Study of premunition developpement in holo-and meso-endemic malaria areas in Dielmo and Ndiop (Senegal): preliminary results, 1990-1994. *Med. Trop. (Mars)*, **55**: 71-76.
- Ross R., 1897.** - On some Peculiar Pigmented Cells Found in Two Mosquitos Fed on Malarial Blood. *Br. Med. J.*, **2 (1929)**: 1786-1788.
- Rougemont A., Breslow N., Brenner E., Moret A. L., Dumbo O., Dolo A., Soula G., & Perrin L., 1991.** - Epidemiological basis for clinical diagnosis of childhood malaria in endemic zone in West Africa. *Lancet*, **338 (8778)**: 1292-1295.
- RTS S. C. T. P., 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. *The Lancet*, **386 (9988)**: 31-45.
- Russo-Marie F., 1998.** - L'inflammation. *John Libbey Eurotext, Paris*, 567p.
- Ruxin J., Paluzzi J. E., Wilson P. A., Tozan Y., Kruk M., & Teklehaimanot A., 2005.** - Emerging consensus in HIV/AIDS, malaria, tuberculosis, and access to essential medicines. *Lancet*, **365 (9459)**: 618-621.
- Sarr J. B., Pelleau S., Toly C., Guitard J., Konate L., Deloron P., Garcia A., & Migot-Nabias F., 2006.** - Impact of red blood cell polymorphisms on the antibody response to *Plasmodium falciparum* in Senegal. *Microbes Infect.*, **8 (5)**: 1260-1268.
- Satoguina J., Walther B., Drakeley C., Nwakanma D., Oriero E. C., Correa S., Corran P., Conway D. J., & Walther M., 2009.** - Comparison of surveillance methods applied to a situation of low malaria prévalence at rural sites in The Gambia and Guinea Bissau. *Malar. J.*, **8**: 274.
- Schofield L., & Grau G. E., 2005.** - Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat. Rev. Immunol.*, **5 (9)**: 722-735.
- Schreiber N., Brattig N., Evans J., Tsiri A., Horstmann R. D., May J., & Klinkert M. Q., 2006.** - Cerebral malaria is associated with IgG2 and IgG4 antibody responses to recombinant *Plasmodium falciparum* RIFIN antigen. *Microbes Infect.*, **8 (5)**: 1269-1276.
- Semblat J. P., Raza A., Kyes S. A., and Rowe J. A., 2006.** - Identification of *Plasmodium falciparum* var1CSA and var2CSA domains that bind IgM natural antibodies. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **146**: 192-197.
- Sergent E., 1950.** - Definition of immunity & premunition. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, **79**: 786-797.

- Shamuradova L., Alieva S., Kurdova-Mintcheva R., Rietveld A., Cibulskis R., Ejov M., Karrieva B., & Newman R. D., 2012.** - Achieving malaria elimination and certification in Turkmenistan. *Malar. J.*, **11** (Suppl 1):O11
- Silvie O., Franetich J. F., Charrin S., Mueller M. S., Siau A., Bodescot M., Rubinstein E., Hannoun L., Charoenvit Y., Kocken C. H., Thomas A. W., Van Gemert G. J., Sauerwein R. W., Blackman M. J., Anders R. F., Pluschke G., & Mazier D., 2004.** A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J. Biol. Chem.*, **279** (10): 9490-9496.
- Sinclair D., Donegan S., & Lalloo D. G., 2011.** - Artesunate versus quinine for treating severe malaria. *Cochrane Database Syst. Rev.* (3): CD005967.
- Sinton J. A., and Mulligan H. W., 1933.** - A Critical Review of the Literature relating to the Identification of the Malarial Parasites recorded from Monkeys of the Families *Cercopithecidae* and *Colobidae*. *Records of the Malaria Survey of India*, **3**: 381-443.
- Sompwe E. M., Cilundika M. P., Mashinda K. D., Lutumba T. P., Mapatano M. A., & Luboya N. O., 2016.** - Parasitémie asymptomatique chez les enfants de moins de 5 ans, enfants en âge scolaire et prise en charge des épisodes fébriles dans les ménages de Lubumbashi, République Démocratique du Congo *The Pan African Medical Journal*, **24**: 94.
- Sotgiu S., Angius A., Embry A., Rosati G., & Musumeci S., 2008.** - Hygiene hypothesis: innate immunity, malaria and multiple sclerosis. *Med. Hypotheses*, **70** (4): 819-825.
- Stephens 1922.** - A new malaria parasite of man. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **16**: 383-388.
- Stepniewska K., Ashley E., Lee S. J., Anstey N., Barnes K. I., Binh T. Q., D'Alessandro U., Day N. P., de Vries P. J., Dorsey G., Guthmann J. P., Mayxay M., Newton P. N., Olliaro P., Osorio L., Price R. N., Rowland M., Smithuis F., Taylor W. R., Nosten F., & White N. J., 2010.** - *In vivo* parasitological measures of artemisinin susceptibility. *J. Infect. Dis.*, **201** (4): 570-579.
- Stevenson M. M., & Riley E. M., 2004.** - Innate immunity to malaria. *Nat. Rev. Immunol.*, **4** (3): 169-180.
- Stewart L., Gosling R., Griffin J., Gesase S., Campo J., Hashim R., Masika P., Mosha J., Bousema T., Shekalaghe S., Cook J., Corran P., Ghani A., Riley E. M., & Drakeley C., 2009.** - Rapid assessment of malaria transmission using age-specific sero-conversion rates. *PLoS One*, **4** (6): e6083.

- Strachan D. P., 1989.** - Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*, **299 (6710)**: 1259-60.
- Stricker K., Vuus, J., Jepsen S., Oeuvray C., & Theisen M., 2000.** - Conservation and heterogeneity of the glutamate-rich protein (GLURP) among field isolates and laboratory lines of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **111 (1)**: 123-130.
- Struik S. S., & Riley E. M., 2004.** - Does malaria suffer from lack of memory? *Immunol. Rev.*, **201**: 268-90.
- Sturrock H. J., Hsiang M. S., Cohen J. M., Smith D. L., Greenhouse B., Bousema T., & Gosling R. D., 2013.** - Targeting asymptomatic malaria infections: active surveillance in control and elimination. *PLoS Med.*, **10 (6)**: e1001467.
- Sutherland C. J., Tanomsing N., Nolder D., Oguike M., Jennison C., Pukrittayakamee S., Dolecek C., Hien T. T., do Rosario V. E., Arez A. P., Pinto J., Michon P., Escalante A. A., Nosten F., Burke M., Lee R., Blaze M., Otto T. D., Barnwell J. W., Pain A., Williams J., White N. J., Day, N. P., Snounou G., Lockhart, P. J., Chiodini P. L., Imwong M., & Polley S. D., 2010.** Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite *Plasmodium ovale* occur globally. *J. Infect. Dis.*, **201 (10)**: 1544-50.
- Tanabe K., Mackay M., Goman M., & Scaife J. G., 1987.** - Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Mol. Biol.*, **195**: 273-287.
- Tangpukdee N., Duangdee C., Wilairatana P., & Krudsood S., 2009.** - Malaria diagnosis: a brief review. *Korean J. Parasitol.*, **47 (2)**: 93-102.
- Taylor-Robinson A. W., Phillips R. S., Severn A., Moncada S., & Liew F. Y., 1993.** - The role of TH1 and TH2 cells in a rodent malaria infection. *Science*, **260 (5116)**: 1931-1934.
- Ternynck T., Bleux C., Gregoire J., Avrameas S., & Kanellopoulos-Langevin C., 1990.** - Comparison between autoantibodies arising during *Trypanosoma cruzi* infection in mice and natural autoantibodies *J. Immunol.*, **144 (4)**: 1504-1511.
- Ternynck T., Falanga P. B., Unterkirscher C., Gregoire J., da Silva L. P., & Avrameas S., 1991.** - Induction of high levels of IgG autoantibodies in mice infected with *Plasmodium chabaudi*. *Int. Immunol.*, **3 (1)**: 29-37.
- Theisen M., Soe S., Oeuvray C., Thomas A. W., Vuust J., Danielsen S., Jepsen S., & Druilhe P., 1998.** - The glutamate-rich protein (GLURP) of *Plasmodium falciparum* is a target for antibody-dependent monocyte-mediated inhibition of parasite growth in vitro. *Infect. Immun.*, **66 (1)**: 11-17.


- Theisen M., Vuust J., Gottschau A., Jepsen S., & Høgh B., 1995.** - Antigenicity and immunogenicity of recombinant glutamate-rich protein of *Plasmodium falciparum* expressed in *Escherichia coli*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **2** (1): 30-34.
- Thien M., Phan T. G., Gardam S., Amesbury M., Basten A., Mackay F., & Brink R., 2004.** Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. *Immunity*, **20** (6): 785-798.
- Thomas A. W., Trape J. F., Rogier C., Goncalves A., Rosario V. E., & Narum D. L., 1994.** - High prevalence of natural antibodies against *Plasmodium falciparum* 83-kilodalton apical membrane antigen (PF83/AMA-1) as detected by capture-enzyme-linked immunosorbent assay using full-length baculovirus recombinant PF83/AMA-1. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **51** (6): 730-740.
- Toure-Balde A., Sarthou J. L., Aribot G., Michel P., Trape J. F., Rogier C., & Roussilhon C., 1996.** - *Plasmodium falciparum* induces apoptosis in human mononuclear cells. *Infect. Immun.*, **64** (3): 744-750.
- Toure O. A., Assi S. B., N'Guessan T. L., Adjé G. E., Ako A. B., Brou M. J., Ehouman M. F., Gnamien L. A., Coulibaly M. A., Coulibaly B., Beourou S., Bassinka I., Soumahoro A., Kadjo F., & Tano M. A., 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.
- Tran T. M., Ongoiba A., Coursen J., Crosnier C., Diouf A., Huang C. Y., Li S., Doumbo S., Doumtabe D., Kone Y., Bathily A., Dia S., Niangaly M., Dara C., Sangala J., Miller L. H., Doumbo O. K., Kayentao K., Long C. A., Miura K., Wright G. J., Traore B., & Crompton P. D., 2014.** - Naturally acquired antibodies specific for *Plasmodium falciparum* reticulocyte-binding protein homologue 5 inhibit parasite growth and predict protection from malaria. *J. Infect. Dis.*, **209** (5): 789-798.
- Trape J. F., Tall A., Diagne N., Ndiath O., Ly A. B., Faye J., Dieye-Ba F., Roucher C., Bouganali C., Badiane A., Sarr F. D., Mazonot C., Toure-Balde A., Raoult D., Druilhe P., Mercereau-Puijalon O., Rogier C., & Sokhna C., 2011.** - Malaria morbidity and pyrethroid resistance after the introduction of insecticide-treated bednets and artemisinin-based combination therapies: a longitudinal study. *Lancet Infect. Dis.*, **11** (12): 925-932.

- Vallely A., Vallely L., Chungalucha J., Greenwood B., & Chandramohan D., 2007.** - Intermittent preventive treatment for malaria in pregnancy in Africa: what's new, what's needed? *Malar. J.*, **6**: 16.
- Van Velthuysen M. L., & Florquin S., 2000.** - Glomerulopathy associated with parasitic infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, **13** (1): 55-66, table of contents.
- Wang L., Black C. G., Marshall V. M., & Coppel R. L., 1999.** - Structural and antigenic properties of merozoite surface protein 4 of *Plasmodium falciparum*. *Infect. Immun.*, **67** (5): 2193-2200.
- Wang L., Richie T. L., Stowers A., Nhan D. H., & Coppel R. L., 2001.** - Naturally acquired antibody responses to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 4 in a population living in an area of endemicity in Vietnam. *Infect. Immun.*, **69** (7): 4390-4397.
- Weiss G. E., Crompton P. D., Li S., Walsh L. A., Moir S., Traore B., Kayentao K., Ongoiba A., Doumbo O. K., Pierce S. K., 2009.** - Atypical memory B cells are greatly expanded in individuals living in a malaria-endemic area. *J. Immunol.*, **183**: 2176-2182.
- White M. T., Griffin J. T., Akpogheneta O., Conway D. J., Koram K. A., Riley E. M., & Ghani A. C., 2014.** - Dynamics of the antibody response to *Plasmodium falciparum* infection in African children. *J. Infect. Dis.*, **210** (7): 1115-1122.
- White N. J., Pukrittayakamee S., Hien T. T., Faiz M. A., Mokuolu O. A., Dondorp A. M., 2014.** - Malaria. *lancet*, **383** (9918): 723-735
- WHO, 2000.** - Malaria, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **94** (Suppl): 1-90.
- WHO, 2006.** - Malaria vector control and personal protection : report of a WHO study group. <http://www.who.int/iris/handle/10665/43425>. Consulté le 20 Octobre 2014.
- Wilson A. L., 2011.** - A systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of intermittent preventive treatment of malaria in children (IPTc). *PLoS One*, **6**(2): e16976.
- Wozencraft A. O., Lloyd C. M., Staines N. A., & Griffiths V. J., 1990.** - Role of DNA-binding antibodies in kidney pathology associated with murine malaria infections. *Infect. Immun.*, **58** (7): 2156-2164.
- Yang C., Shi Y. P., Udhayakumar V., Alpers M. P., Pova M. M., Hawley W. A., Collins W. E., & Lal A. A., 1995.** - Sequence variations in the non-repetitive regions of the liver stage-specific antigen-1 (LSA-1) of *Plasmodium falciparum* from field isolates. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **71** (2): 291-294.

- Yavo W., Konate A., Kassi F. K., Djohan V., Angora E. K., Kiki-Barro P. C., Vanga-Bosson H., & Menan E. I., 2015.** - Efficacy and Safety of Artesunate-Amodiaquine versus Artemether-Lumefantrine in the Treatment of Uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria in Sentinel Sites across Cote d'Ivoire. *Malar. Res. Treat.*, 2015, 878132.
- Yavo W., Konate A., Mawili-Mboumba D. P., Kassi F. K., Tshibola Mbuyi M. L., Angora E. K., Menan E. I., & Bouyou-Akotet M. K., 2016.** - Genetic Polymorphism of msp1 and msp2 in *Plasmodium falciparum* Isolates from Cote d'Ivoire versus Gabon. *J. Parasitol. Res.*, 2016, 3074803.
- Yoder B. J., & Goodrum K. J., 2001.** - *Plasmodium chabaudi chabaudi*: B-1 cell expansion correlates with semirésistance in BALB/cJ mice. *Exp. Parasitol.*, **98 (2)**: 71-82.
- Zhang Z. H., Jiang P. H., Li N. J., Shi M., & Huang W., 2005.** - Oral vaccination of mice against rodent malaria with recombinant *Lactococcus lactis* expressing MSP-1(19). *World J. Gastroenterol.*, **11 (44)**: 6975-6980.
- Zhou Z. H., Zhang Y., Hu Y. F., Wahl L. M., Cisar J. O., & Notkins A. L., 2007.** - The broad antibacterial activity of the natural antibody repertoire is due to polyreactive antibodies. *Cell Host Microbe*, **1 (1)**: 51-61.
- Zhu J., & Hollingdale M. R., 1991.** - Structure of *Plasmodium falciparum* liver stage antigen-1. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **48 (2)**: 223-6.
- Zongo I., Dorsey G., Rouamba N., Dokomajilar C., Sere Y., Rosenthal P. J., & Ouedraogo J. B., 2007.** - Randomized comparison of amodiaquine plus sulfadoxine-pyrimethamine, artemether-lumefantrine, and dihydroartemisinin-piperaquine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Burkina Faso. *Clin. Infect. Dis.*, **45 (11)**: 1453-1461.
- Zouali M., Druilhe P., Gentilini M., & Eyquem A., 1982.** - High titres of anti-T antibodies and other haemagglutinins in human malaria. *Clin. Exp. Immunol.*, **50 (1)**: 83-91.

ANNEXES

Annexe 1

	Unité d'Immunologie	Codification : MO MG PX_1
	MODE OPERATOIRE	Version : 2013_01 Page 166 sur 5
MO pour le Couplage d'antigènes sur billes magnétiques Magpix		

VALIDATION

REDIGE PAR

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

VERIFICATEUR

Vérification Technique et qualité			

APPROBATEUR

--	--	--	--

<i>A remplir uniquement pour les copies</i>	
Exemplaire N° :	Attribué à :

1) Objet

L'objet de ce MO est de décrire les étapes à suivre afin de coupler par méthode covalente des Antigènes (protéines) sur les billes Luminex magnétiques à l'aide d'un kit de couplage commercial

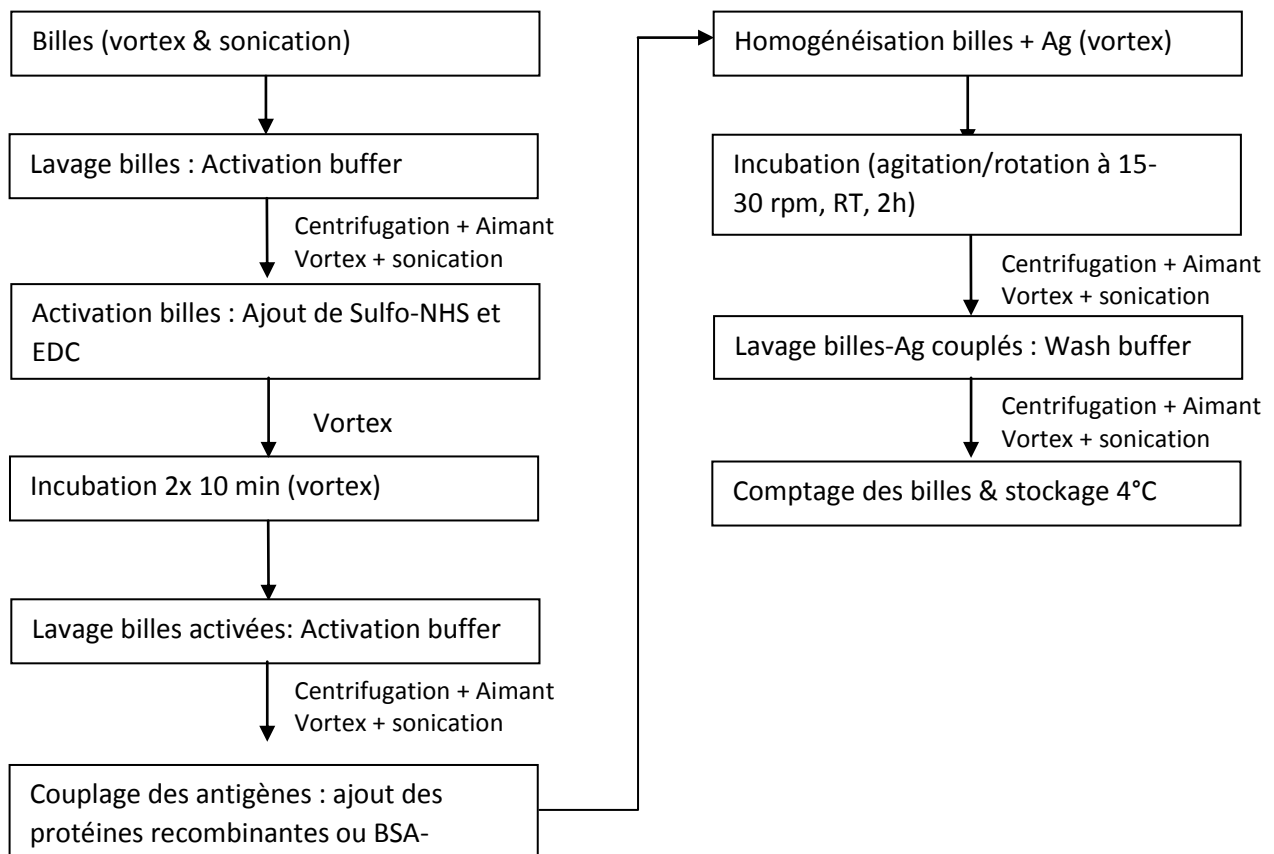
2) Matériel et réactifs

- Billes magnétiques Luminex MagPlex Microspheres (Cat# MC1XXXX-01,..& MC10XXX-ID)
- xMAP Antibody Coupling (AbC) Kit contenant :

- o EDC [Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride (EDC or EDAC)] Reagent (10 mg)
- o Sulfo-NHS (250 µL)
- o Activation Buffer (45 mL) : capuchon vert
- o Wash Buffer (30 mL) : capuchon blanc
- o Tubes de couplage "low binding" 1.5 mL (x10)
- o Pipettes jetables (x20) = pipettes d'aspiration
- EDC (Pierce, 10mg, Ref-77149)
- Sonicateur (= bain ultrasons)
- Centrifugeuse pour tubes eppendorf 1.5/2.0 ml
- Agitateur rotatif
- Aimants de paillasse pour tube eppendorf 1.5 mL :
 - o 1 Luminex Tube Magnetic Separator pour 1 tube 1.5/2.0 ml
 - o 1 rack BILATEST magnetic separator M12 pour 12 tubes 1.5/2.0 ml

3) Modalités

Attention : toutes les étapes doivent être réalisées à l'abri de la lumière directe (pénombre)



4) Protocole

couplage pour 2.5×10^6 billes (région basse concentration) ou 5×10^6 billes/tube

- A- Les billes magnétiques doivent être tenues à l'abri de la lumière tout au long du couplage (recouvrir les tubes de couplage avec du papier alu).**
- B- Utiliser un jeu de pipette d'aspiration par région de billes : 1 pipette pour l'Activation Buffer et une pipette pour le Wash Buffer.**
- C- Les billes s'agrègent : bien vortexer + sonication à chaque étape.**
- D- Le couplage et la stabilité des antigènes peuvent être affectés par la température. Eviter de réaliser le couplage si la température ambiante $> 22-24^{\circ}\text{C}$. Réaliser la manipulation tôt le matin (dès 7h00).**

1- Laisser les billes et les réactifs du kit de couplage revenir à température ambiante pendant 20-30 min

2- Identifier et couvrir de papier alu les tubes de couplage "low binding" 1.5 mL du kit

3- Identifier les pipettes du kit :

- Région et antigène
- Activation buffer vs Wash

4- Bien séparer les billes : Vortex (10s) et sonication (10s) des flacons de billes magnétiques (Répéter 3 fois).

5- Transférer les billes dans un tube de couplage "low binding" 1.5 mL

6- Centrifuger à $\geq 8000\text{g}$ (centrifugeuse REMI : 8000 rpm) pendant 3 min

7- Placer le tube sur l'aimant de paillasse pour 12 tubes eppendorf 1.5 mL pendant ≥ 4 min

8- Placer le tube sur le mini aimant de paillasse pour 1 tube eppendorf 1.5 mL pendant 1 min

9- Enlever le surnageant en utilisant les pipettes « Activation buffer » du kit en maintenant le tube sur le mini-aimant

10- Laver les billes (x2)

- Ajouter 500 μL d'Activation Buffer
- Vortex (10s) et sonication (10s)
- Centrifuger, $\geq 8000\text{g}$, 3 min
- Placer le tube sur l'aimant de paillasse pour 12 tubes pendant ≥ 4 min
- Placer le tube sur le mini aimant de paillasse pendant 1 min
- Enlever le surnageant en utilisant les pipettes marquées « Activation buffer » du kit

- 11- Ajouter l'Activation Buffer au culot de billes QSP 480 μ L
 - Ex : s'il reste 50 μ l dans le culot, ajouter (480 - 50 =) 430 μ l d'Activation Buffer
 - NB : les tubes de couplage sont gradués (1ère graduation = 100 μ l)

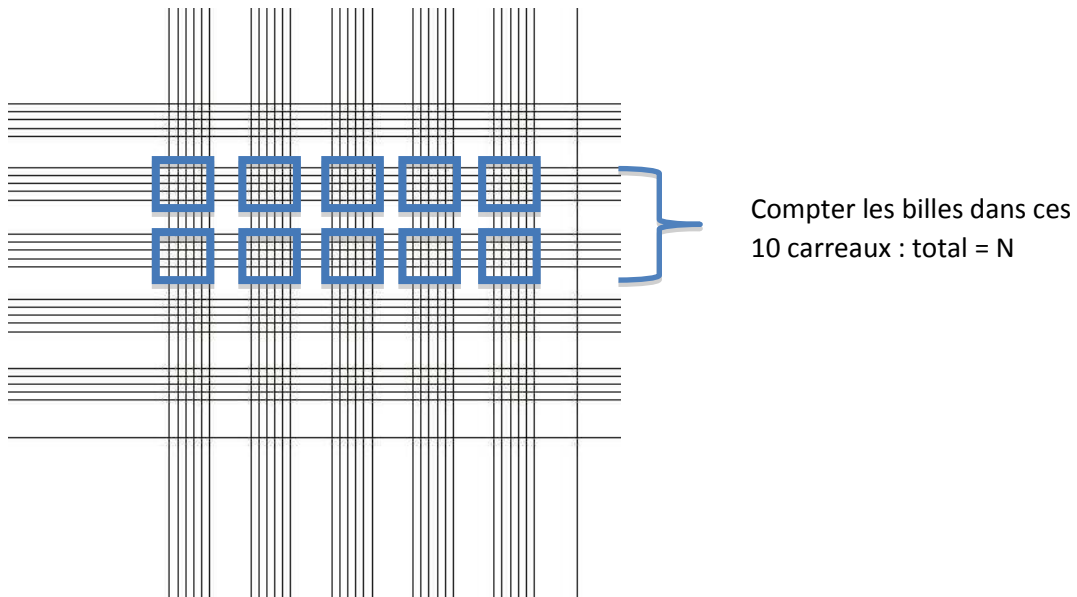
- 12- Vortex (10s) et sonication (10s)
- 13- Vortexer + homogénéiser par inversion le tube de Sulfo-NHS
- 14- Ajouter 10 μ L de Sulfo-NHS aux billes
- 15- Préparer la solution d'EDC
 - Ajouter 250 μ L d'activation buffer au 10 mg d'EDC
 - Homogénéiser par inversion + vortex
 - Attention : la solution d'EDC s'utilise extemporanément & rapidement. Elle ne peut jamais être réutilisée. Il s'agit donc d'un réactif précieux, limitant l'usage du kit.

- 16- Ajouter 10 μ L d'EDC aux billes/sulfo-NHS
- 17- Vortexer
- 18- Incuber 10 min à température ambiante à l'abri de la lumière
- 19- Vortexer
- 20- Incuber 10 min à température ambiante à l'abri de la lumière
- 21- Centrifuger à $\geq 8000g$ (centrifugeuse REMI : 8000 rpm) pendant 3 min
- 22- Placer le tube sur l'aimant de paille pour 12 tubes eppendorf 1.5 mL pendant ≥ 4 min
- 23- Placer le tube sur le mini aimant de paille pour 1 tube eppendorf 1.5 mL pendant 1 min
- 24- Enlever le surnageant en utilisant les pipettes « Activation buffer » du kit en maintenant le tube sur le mini-aimant

- 25- Laver les billes (x3)
 - Ajouter 500 μ L d'Activation Buffer
 - Vortex (10s) et sonication (10s)
 - Centrifuger, $\geq 8000g$, 3 min
 - Placer le tube sur l'aimant de paille pour 12 tubes pendant ≥ 4 min
 - Placer le tube sur le mini aimant de paille pendant 1 min
 - Enlever le surnageant en utilisant les pipettes « Activation buffer » du kit

- 26- Ajouter l'antigène (protéine recombinante ou peptide-BSA) :
- 5 µg d'Ag pour 10⁶ billes = 12.5 µg d'Ag pour 2.5*10⁶ billes ou 25 µg d'Ag pour 5*10⁶ billes
 - X µL Ag + Activation buffer qsp 500 µL
 - Ajouter dans l'ordre l'Activation Buffer puis l'Ag
 - Remplir le tableau de l'Annexe 1
- 27- Vortexer 10 sec
- 28- Incuber pendant 2h à température ambiante sous agitation (rotation) les billes activées et les antigènes. Homogénéiser par inversion 1h après le début de l'incubation.
- Placer les tubes de couplage 1.5 mL dans un tube Falcon 15 ml, sans capuchon
 - Couvrir la partie supérieure du tube Falcon de papier alu, de façon à couvrir et maintenir le tube de couplage dans le tube Falcon
- 29- Centrifuger à ≥ 8000g (centrifugeuse REMI : 7500 rpm) pendant 3 min
- 30- Placer le tube sur l'aimant de paillasse pour 12 tubes eppendorf 1.5 mL pendant ≥4 min
- 31- Placer le tube sur le mini aimant de paillasse pour 1 tube eppendorf 1.5 mL pendant 1 min
- 32- Enlever le surnageant en utilisant les pipettes « Activation buffer » du kit en maintenant le tube sur le mini-aimant
- 33- Laver les billes (x3)
- Ajouter 500 µL de Wash Buffer
 - Vortex (10s) et sonication (10s)
 - Centrifuger, ≥ 8000g, 3 min
 - Placer le tube sur l'aimant de paillasse pour 12 tubes pendant ≥4 min
 - Placer le tube sur le mini aimant de paillasse pendant 1 min
 - Enlever le surnageant en utilisant les pipettes « Wash » du kit
- 34- Reprendre les billes-Ag dans 1 mL de Wash Buffer (ajuster en fonction de la quantité résiduel de wash buffer)
- 35- Vortex (10s) et sonication (10s)
- 36- Laver les flacons bruns opaques de stockage des billes avec du Wash buffer
- 37- Transférer les billes-Ag couplés dans leur flacon brun opaque d'origine
- 38- Comptage des billes-Ag sous cellules de Malassez
- Mélanger 20 µL billes + 20 µL PBS (ou bleu trypan ou wash buffer)

- Monter la lamelle orthoplane sur la cellule de Malassez en humidifiant les 2 supports. La lamelle doit tenir toute seule si l'on renverse la cellule.
- Remplir la chambre à l'aide d'une micropipette en faisant attention (1) à remplir l'entièreté de la chambre, (2) à ne pas faire déborder le liquide en dehors de la chambre, (3) à ne pas contaminer la chambre voisine.
- Compter le nombre de billes dans 10 carreaux quadrillés (contenant chacun 4*5 petits carrés) = N



- Nombre de billes / mL = $N * 10000 * 2$ (dilution)
- Comme la cellule de Malassez contient 2 chambres, on peut compter la concentration en billes de 2 régions dans une cellule montée
- Pour plus de facilité, introduire les comptages dans le tableur excel « Etape 38 - Comptage des billes en cellule de Malassez et calculs des dilutions pour le multiplex »

39- Passer le multiplex à vide sur le MagPix pour contrôler le nombre de billes :

- Sur une plaque Corning sur laquelle au moins 2 puits sont disponibles, diluer un volume contenant théoriquement 2000 billes/région (Caractéristiques du multiplex brut : Volume/éch (µl) à tester) QSP 120 µl en duplicate
- Activer le MagPix et l'ordinateur. Ouvrir le logiciel xPONENT. Sélectionner le protocole « Comptage billes » (prélèvement de 80µl). Vérifier la localisation des puits à tester (A1-H12). Cliquer sur Run.
- Introduire les résultats dans la feuille excel « Etape 39 - Comptage des billes sur MagPix et ajustement des dilutions pour le multiplex ». Cette feuille est liée à l'étape précédente dans le document excel.
- Si le comptage moyen de billes est <2000 billes/région sur le MagPix, recalculer la dilution et le volume final à ajouter à chaque échantillon en fonction du comptage du nombre moyen de billes.
- Si l'un des comptages est inférieur à la moyenne-2 ET (colonne Validation min de billes), ajouter de la solution en monoplex correspondante pour ajuster à la moyenne.
- Ajuster le volume de la solution de billes multiplexées afin d'obtenir un volume pratique à l'emploi.

40- Stockage des billes-Ag à 4°C, à l'abri de la lumière

5) Commentaires

6) Destinataires

- Techniciens
- Scientifiques
- Archives techniques

Publications et événements scientifiques

Liste des publications de cette thèse

David Koffi, Andre Offianan Toure, Marie louise Varela, Ines Vigan-womas, Sylvain Beourou, et al.. 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* (2015) 14:509

David Koffi, Marie louise Varela, Ines Vigan-womas, Sylvain Beourou, Andre Offianan, Toure, Joseph A. Djaman, Ronald Perraut. Longitudinal analysis of antibody responses in symptomatic malaria: Pitfall to differentiate evolution of parasite transmission in a peri-urban site of Cote d'Ivoire between 2010 and 2013 (*Plos one* 2017)

David Koffi, Nicolas Tchichek, Fabien Herbert, Delphine Génete, Pierre Andre Cazenave, Djaman A. Joseph, Sylviane Pied. Analysis of Autoantibody Profiles in Asymptomatic Malaria and relationship with transmission level in Three Sentinel Sites of Cote d'Ivoire **in manuscript**

RESEARCH

Open Access



Analysis of antibody profiles in symptomatic malaria in three sentinel sites of Ivory Coast by using multiplex, fluorescent, magnetic, bead-based serological assay (MAGPIX™)

David Koffi^{1,4†}, André Offianan Touré^{1†}, Marie-Louise Varela², Inès Vigan-Womas³, Sylvain Béourou¹, Somela Brou⁴, Marie-France Ehouman⁴, Laetitia Gnamien⁴, Vincent Richard⁵, Joseph Allico Djaman⁴ and Ronald Perraut^{2*}

Abstract

Background: Advances in malaria control have reduced the burden of disease resulting from exposure to parasite infections. The consequences on naturally acquired immunity are unclear. A magnetic bead-based immunoassay (MBA) to assess antibody levels in populations living in endemic areas was previously evaluated. In this study, the effect of clinical attacks on immunity was analysed in three sentinel sites of Ivory Coast.

Methods: Recombinant proteins or peptides derived from liver or blood stage antigens of *Plasmodium falciparum* (CSP, LSA1₄₁, LSA3, SALSA, PF13-DBL1 α ₁, GLURP, AMA1, MSP1p19, MSP4p20), the CSP of *Plasmodium malariae* and the salivary glands antigen of *Anopheles gambiae* (gSG6) were covalently linked to a colour-coded microsphere (Luminex™ beads) for the multiplex assay. ELISA was used for whole parasite extract antigen. Blood samples (n = 94) of patients consulting for symptomatic malaria attacks and living in three different malaria endemic settings (rural and periurban) were analysed.

Results: Highly variable seroprevalence of antibody responses against parasite antigens was found ranging from 3 (gSG6) to 97 % (MSP4p20). A marked prevalence and significantly higher level of antibodies was found in patients from the rural site (Korhogo), those harbouring the lowest level of parasitaemia. The use of whole schizont extract could not discriminate immunity level, contrary to parasite-derived recombinant proteins or peptides. Prevalence of responders to LSA1₄₁ and levels of antibodies to PF13 were significantly different between the three settings. Moreover, the post-treatment clearance of parasites was clearly associated with a significantly higher level of antibody response for almost 50 % of the parasite antigens tested.

Conclusion: The multiplex MBA-Magpix technology assay provides an accurate high throughput monitoring of parasite-specific antibodies during symptomatic malaria. The levels of antibody responses may provide a risk criterion with respect to the degree of parasitic infection. Additionally, they can be used as an indicator in the implementation of malaria prevention and local control strategies.

*Correspondence: perraut@pasteur.sn

[†]David Koffi and André Offianan Touré contributed equally to the work reported

² Unité d'Immunologie, Institut Pasteur de Dakar, Dakar, Sénégal
Full list of author information is available at the end of the article

Keywords: Malaria, *Plasmodium falciparum*, ELISA, IgG, Surface antigens, Multiplex, MAGPIX, Ivory Coast, Symptomatic malaria, Biomarkers

Background

Malaria is caused by a protozoan parasite of the genus *Plasmodium*. In Ivory Coast, malarial endemicity has been shown to be heterogeneous, depending upon various bio-ecological areas [1]. The spread and occurrence of malaria varies widely between villages and even within the same village. Malaria surveillance is monitored through a national malaria control programme (NMCP) and follow-up with relevant sentinel sites around the country. It has been established that areas of unstable, low, malaria transmission such as Gambia and Kenya are characterized by a persistent risk of clinical malaria in older children and adults whereas in areas with stable, high-level of malaria transmission the risk of clinical malaria decreases markedly after the age of 5 years [2, 3].

In the recent years, the large-scale deployment of combined interventions strategies, including insecticide impregnated bed nets, rapid diagnostic tests and efficient combination therapy, led to a decrease of malaria burden in several sub-Saharan African areas [4]. Several tools are useful for follow-up progress of controls and decrease of malaria burden. For estimating the risk of malaria transmission or infection, the entomological inoculation rate (EIR) is considered as a gold standard. The EIR is estimated by the number of mosquito bites per man per night multiplied by the proportion of sporozoite positive mosquitoes [5]. Presently, with the decreasing transmission rate resulting from enlarged control programmes and scarcity of positive mosquitoes makes this method labour-intensive.

Another potential indicator of malaria transmission relies on ELISA-based serology investigations by measuring antibody responses against a set of antigens to evaluate exposure, such as mosquito salivary antigen [5–7], or different parasite-associated target antigens potentially associated with protection to malaria [8–10]. However, this technique can be used only for a limited number of antigens. Therefore, new strategy such as multiplex fluorescent bead-based assays have been developed by Luminex® Corporation and allows the simultaneous testing of several serological markers together, providing capacity for accurate high throughput monitoring of malaria immunity [11–14].

Passive transfer experiments demonstrated that antibodies are major determinants of malarial protective immunity in human [15, 16]. Immunoglobulin G (IgG) antibody responses to a number of vaccine candidate antigens, including pre-erythrocytic antigens

circumsporozoite protein (CSP) [17], liver-stage antigen 1 (LSA1) [17, 18], the blood-stage antigens as the merozoite surface protein 1 (MSP1) [19–21] and the Apical Membrane Antigen 1 (AMA1) [22]. These antigens have been associated with protection from clinical malaria in an area of stable transmission. Antibody responses to such vaccine candidates can also be investigated for use as indicators of past and recent malaria transmission. In the context of ongoing malaria elimination strategy, changes and variations of antibody responses in different settings could take place as useful monitoring tool requiring combination of different markers [10, 11, 19, 20, 23].

In the present study, malaria-related immunity was analysed by measuring antibody responses against 12 recombinant and peptide parasite antigens in individuals from Ivory Coast using a magnetic bead-based multiplex assay [24]. This pilot study involved an array of antigens previously investigated [11, 13] with the aim to provide immunology-related study in populations from this country. Recruitment involved three groups of approximately 30 patients on the day of consultation for clinical attacks in distinct geographical and malaria transmission settings.

Different profile and levels of antibody responses from malaria symptomatic patients according to different transmission settings were evidenced. These results indicate that the antibody response to antigens derived from *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae* or *Anopheles gambiae* can also be used as relevant biomarkers to evaluate follow-up and prevention measures at community level.

Methods

Study area, procedures for recruitment

Subjects were recruited in Korhogo, Man and Abobo, three Ivorian malaria-endemic areas included in the Sentinel National Network for Surveillance of Malaria. The protocol of surveillance was approved by the National Committee of the Ministry of Health. Individual informed written consent was obtained from participants/parents/guardians. In case of an illiterate patient, his/her thumb impression and signature of an independent witness were obtained. The study was conducted in accordance with the local laws and regulations, International Conference on Harmonization—Good Clinical Practice (ICH-GCP). The protocol was reviewed and approved by the Comité National d’Ethique et de Recherche de Côte d’Ivoire (N°56/MSLS/CNER-dkn).

Patients were enrolled in the pilot study in September–November 2013, after the rainy season i.e., after the peak of transmission.

Korhogo, located at 9°53' latitude north and 6°49' longitude west, bordering Mali and Burkina Faso, is a savannah area with a tropical climate and a transmission period of 6–8 months. The village of Man is located in the western forest and mountain area, at 7°24' of latitude north, 7°33' longitude west. Rainfall is abundant (1800 mm/year) and transmission occurs for 8–12 months. The site of Abobo is located in the southern part of the township of Abidjan, characterized by the presence of a lagoon with transmission occurring year round.

Recent data on the cumulative EIR in Korhogo [25] or Man were not available [26]. However, in the absence of exact EIR, morbidity data collected from health facility records in 2013, shown in Table 1, reflect the high level of transmission in these endemic areas.

This study involved 94 patients consulting for symptomatic fever in health centres: formation sanitaire Anonkoua-Kouté, centre de santé petit Paris, centre de santé urbain de 'Libreville', the respective healthcare centre in Abobo, Korhogo, Man. Patients were treated and followed up according to the standard national procedure. Diagnosis of malaria includes rapid diagnostic test (RDT), blood sampling for biological investigations and blood smear for parasite counting. Parasitaemia was counted on thick blood smears by two experienced microscopists. In case of discrepancy, smears were confirmed by a third counting. Characteristics of the three groups are summarized in Table 1. All patients were hospitalized, treated and followed up daily from day 0 to day 3 with artemether–lumefantrine combination. Parasitaemia was recorded every 24 h, up to two consecutive negative blood smears.

Parasite clearance time (PCT) and its related clinical phenotype (delayed PCT) were recorded for each patient. These indicators are defined respectively as the time between treatment and the first negative slide, and as the proportion of patients still parasitaemic on days 2 or 3. An individual questionnaire for each patient recorded gravity symptoms (graded as none, moderate, intense), the use of bed nets and previous unprescribed individual use of anti-malarials. For all patients, almost complete PCT within 4 days was observed after treatment. The procedure included a recall of patients on days 7, 14, 21, 28, and 42 for confirmation of complete cure, tolerability and parasitological monitoring. No recrudescence of infections was recorded in any patients followed up. Plasma samples after biology processing at day 0 were collected upon centrifugation, and stored at -20°C until further analysis.

Antigens and peptides

Three soluble recombinant proteins and eight peptides conjugated to bovine serum albumin (BSA) specific to *P. falciparum*, *P. malariae* and *A. gambiae* salivary peptide gSG6 antigen (Ag) were included. BSA provided by peptide manufacturer was used as carrier control. The peptides used in this study were designed as already described [11]. A N-terminal cysteine residue was added to allow a unidirectional coupling to BSA and was done by the manufacturer (GenScript HK Inc., Hong Kong, China.). Purity of each BSA-peptide was estimated >85 % by HPLC and mass spectrometry. The sequence of the peptides used was as follows:

CSP: (NANP)₉-NVDPNVDPC;
LSA1₄₁: LAKEKLQEQQSDLEQERLAKEKLQEQQSDL
EQERLAKEKEKLQC;

Table 1 Context and characteristics of the study population

Characteristics	Abobo	Korhogo	Man
Geographical situation	Township Abidjan	Northern Savannah	Western forest
N° patients	31	32	31
N° children <5 years old	3	5	10
Age mean–median (range)	14–9.5 (2–54)	19.6–10.5 (1–70)	13.9–10 (1–59)
Mean parasitaemia and [range parasitaemia] (in trophozoite per mL)	103,706 (3480–832,000)	28,474 (2030–92,800)	52,336 (247–465,800)
Haemoglobin: mean [range]–G/L	10.9 (8.1–12.9)	10.7 (6.3–16.1)	9.2 (6.0–12.5)
Thrombocytes: mean [range]–10 ³ /μL	141 (32–309)	188 (37–530)	189 (26–536)
Duration of transmission season	All year	6–8 months	8–12 months
Individual use of LLINs*	27 %	10 %	20 %
Prevalence of clinical malaria**	5.2 %	14.7 %	18.3 %
% individuals with parasite clearance >24 h	90 %	13 %	32 %

* Long-lasting impregnated nets: individual inquiry for use of bed nets before consultation

** The mean national level of prevalence of clinical malaria in Ivory Coast is 10.57 % (2013)

LSA3: VLEESQVNDIFNSLVKSVQEQQHNVG;
 GLURP: EDKNEKGQHEIVEVEEILC;
 SALS: SAEKKDEKEASEQGEESHKKENSQESAC;
 AMA1: YKDEIKKEIERESKRIKLNNDNDDEGNKKIAP
 RIFISDDKDSLKC;
P. malariae CSP: (NAAG)₉-NDAGC and
A. gambiae salivary peptide 1 (gSG6-P1): EKVVVDRDN
 VYCGHLDCTRVATFC.

The procedure for production and purification of the NTS-DBL1 α 1 domain of the PfEMP1 (*P. falciparum* Erythrocyte Membrane Protein-1) adhesin encoded by the 3D7/PF13 *var* gene has been reported elsewhere [27]. Soluble recombinant protein corresponding to *P. falciparum* MSP1p19 and MSP4p20 was produced in the baculovirus/insect cell expression system and purified by metallo-affinity chromatography as described [28].

Coupling of antigen to beads

The covalent coupling of three recombinant antigens (PF13, PfMSP4p20 and PfMSP1p19) Ags and all the eight peptides to carboxylated magnetic Luminex microspheres by the carbodiimide reaction (Luminex Corp, Austin, USA) was done using the xMAP[®] Antibody Coupling Kit (ref 4050016, Luminex Corp, Austin, USA) according to the manufacturer's instructions as already detailed by Perraut et al. (25). Briefly, 2.5×10^6 beads from regions 26 to 39 were used in a working volume of 500 μ L. All washing steps, buffer changing after 1–2 min centrifugation at $8000 \times g$, magnetic pelleting with the Luminex[®] Magnetic plate separator (Luminex Corp, Austin, USA), vortexing and sonication in water-bath sonicator to disperse the beads was done following manufacturer's instructions. After carbodiimide hypochloride (EDC) activation step, 5 μ g of Ag per million beads was added in the activation buffer and kept under rotation mixing in the dark for 2 h. After pelleting and washing, the supernatant was removed and replaced by 1 mL wash buffer and kept in the dark at 2–8 °C. Final count of remaining beads using cell counter showed a mean recovery of 98 % of the coupled beads. Efficient coupling of Ag was controlled using positive individual and pool of human sera. The coupled microspheres were kept in the washing/storage buffer at 4 °C in the dark until use.

Bead-based assay for IgG antibodies

The custom-made Magnetic Bead-based MAGPIX[®]-Luminex Assay (MBA), performed in a dimly lit room, has been adapted to parallel the working steps used in the standard ELISA technique as previously described [24]. Plates included two positive controls: a pool of human Immune IgG (kind gift from Prof M Hommel) and a pool of 25 sera from clinically immune adults living in

the village of Dielmo (a holo-endemic area of transmission in Senegal). Pools of European and African non-immune sera were included as negative control. Briefly, 2.5 μ L aliquots containing 3000 beads per Ag from mix of microspheres, kept in an opaque vial, were dispensed to individual wells of a white, polystyrene, opaque, round-bottomed microtitre plate (Ref 103977741, Fisher Scientific, Illkirch, France). Duplicates of 100 μ L plasma diluted 1:100 in PBS Tween 0.01 % BSA 1 % (PBSB) was added in wells, mixed and incubated with the beads protected from light on a microplate shaker (IKA[®]MTS, Wilmington, NC, USA) at 350 rpm for 45 min. After removal of plasma and two washing steps with 100 μ L PBSB, 100 μ L of phycoerythrin-labelled goat anti-human IgG diluted 1:500 in PBSB was added (gamma-chain specific, F(ab')₂ from Sigma, P-8047 St. Louis, MO, USA) and incubated in the dark with shaking at 350 rpm for 45 min. After two washes with 100 μ L/well of PBSB, the beads were then resuspended in 120 μ L PBSB and analysed on a Multiplex MAGPIX system (Millipore, USA) using the xPONENT 4.1 manufacturer's software for acquisition. Antibody responses were expressed in median fluorescence intensity (MFI) per sample; individual positivity was considered when the signal was greater than [mean MFI signal +3 SD of 6 naïve control sera] as already described [12].

ELISA procedure

IgG responses were quantified by ELISA in duplicate plasma samples diluted 1:100 as previously described using whole parasite extract Ag from schizonts 07/03 Dielmo strain adapted to culture [21, 29, 30]. The same positive and negative controls used for MBA were used in each assay as standards for plate comparability: 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 sera. Results were expressed as OD ratio = OD sample/OD naïve serum pool [30, 31]. Sera showing an OD ratio >2 were considered sero-positive, corresponding to the mean OD of naïve controls +2 SD.

Statistical analysis

Antibody levels and prevalence of responders in different groups were compared using the Mann-Whitney signed rank test, the Spearman rank correlation test for non-normally distributed paired data and the Fisher exact test. In case of multiple associated comparisons, Bonferroni correction was applied. Statistical analyses were performed using Statview 5.0 (SAS Institute Inc. 2011. Base SAS[®] 9.3 Procedures Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.) and R (R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing. Vienna, Austria. 2014).

To study the correlation between level of parasitaemia and levels of antibody responses, a log transformation was used. The log-transformed data were shown distributed according to normal law using Shapiro–Wilk test. So these variables were transformed into normally distributed variables before being included in the models. Generalized linear model was used to compare parasitaemia level (considered as dependent variable) to each clinical sign and setting (categorical variables) and antibody responses.

Results

Characteristics of the cohort

Recruitment was done after the rainy season for 30 patients per village, a limited proportion of children under 5 years old were included, except in Man (ten children vs five and three in Khorogo and Abobo, respectively). Mean age of the three groups was similar without any significant difference in the age distribution between the three settings (Table 1).

As shown in Table 1 and Fig. 1, levels of parasitaemia measured upon recruitment were highly variable, with significantly lower levels in Korhogo, compared to the other settings ($P < 10^{-3}$). These three settings are high risk for malaria, the prevalence of clinical malaria in Abobo is approximately 50 % lower than the mean national level and 150 % lower compared to the rural villages. Of note, urban patients recruited in Abobo suffered highly parasitic clinical episodes: 10 and 30 % of the patients harboured $<10,000$ or $>100,000$ trophozoites per μL , respectively, compared to 26 and 16 % in Man, and 56 and 0 % in Korhogo for these cut-off parasitaemia levels.

Importantly, treatment was highly efficient: 55, 42 and 3 % of patients overall cleared their parasitaemia in 24, 48 and 72 h, respectively. As detailed in Table 1, the most efficient clearance of parasites was observed in Korhogo followed by Man and then Abobo villages.

Prevalence of antibody responses

Prevalence of antibody responses in the three settings against the 12 biomarkers is summarized in Table 2. Prevalence levels were highly variable, ranging from 3 % (IgG to gSG6 peptide) to 97 % (IgG to MSP4p20). For each setting, the overall mean level of prevalence increased from 37 % in Man, 42 % in Abobo, to 66 % in Korhogo.

As detailed in Table 2, statistical comparisons of prevalence regarding individual biomarkers showed almost no significant differences between Man and Abobo except for LSA1₄₁. In Korhogo, prevalence of antibody responses was significantly higher compared to the two other villages for CSP, LSA1₄₁, SALSA, AMA1, MSP4p20, and *P. malariae* CSP. Prevalence of responders to PF13 was significantly lower in Abobo (45 %) compared to the

two other settings (71 %, 91 % in Man and Korhogo, respectively).

Levels of IgG antibodies responses in the three settings

Levels of antibody responses are summarized in Table 2, they are stated as Mean values and range [minimum–maximum] in ODratio and MFI. Comparison of levels of antibody responses are illustrated in Fig. 1 as box plot for all antigens (Fig. 1a, b, c) and whole parasite extract (Fig. 1e). As evidenced in Fig. 1, there are strong and selectively higher antibody responses against all biomarkers in individuals from the village of Korhogo, compared to the other settings ($P < 10^{-3}$). When comparing responses to biomarkers in Abobo vs Man, no significant differences appeared except for PF13 ($P = 0.04$). Of note, the IgG response against whole parasite extract (from Senegalese strain 07/03) did not significantly discriminate any significant high level of antibody response in Korhogo as did the set of biomarkers.

Inter-relation of antibody responses and correlation of antibody responses with age

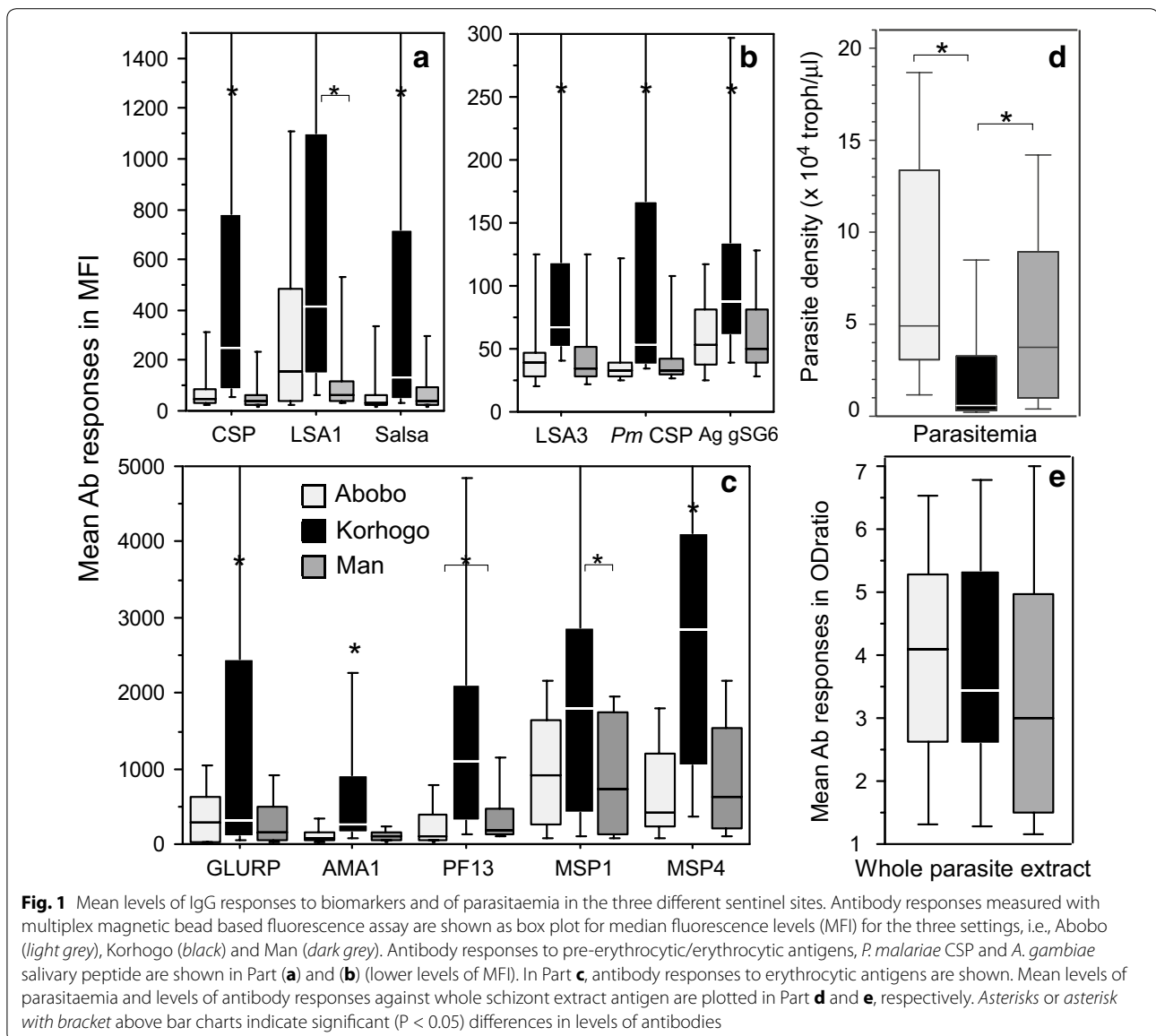
Results of analysis for inter-relation between antibody responses against the different targets and the age of individuals are detailed in Table 3. The results calculated after Bonferroni correction for multiple comparisons was also included. There was no significant correlation between age and antibody responses against all targets except for GLURP peptide ($\rho = 0.5$, $P < 10^{-3}$). As summarized in Table 3, a strong interrelation between antibody responses to almost all target antigens was found, with an exception for somatic antigen and MSP1p19. Inter-relation between antibody responses was not significant for whole schizont extract antigen and MSP1p19; it was intermediate for LSA3 and GLURP peptides.

Relationship of antibody responses with circulating parasitaemia, haematological measures and clinical criteria

There was no correlation between parasitaemia observed at recruitment (or log-transformed parasite density) with antibody responses against all antigens except a significant negative correlation with IgG responses to LSA3 ($P < 10^{-3}$) $\rho = -0.35$ and PF13 ($P < 10^{-4}$) $\rho = -0.41$.

When stratifying parasite densities under and over 50,000 trophozoites per μL , only antibody responses to PF13 remained significantly lower ($P = 0.01$) in individuals with high levels of parasites (approximately one-third of the overall cohort). A significant relationship was found between parasitaemia and thrombocytaemia ($P < 0.001$), thrombocytaemia decreased when parasitaemia increased.

The relationship between immune responses and the efficiency of treatment was analysed by stratifying



clearance of parasitaemia between early (<24 h) and later (48–72 h) delay of blood smear negativation. As shown in Fig. 2, there was a general trend for higher antibody levels in individuals with rapid clearance. In this group, higher levels were found significant for 50 % of the biomarkers, i.e., LSA3, SALSA, AMA1, PF13, MSP4p20, and *Pm*CSP.

When investigating correlates with the records of clinical signs, a significant relationship was found only between parasitaemia and nausea ($P < 0.01$), parasitaemia was higher in patients with nausea. In the multivariate analysis, studying the relationship of parasitaemia with PF13, LSA3, thrombocytaemia, nausea, village, the last model was based only on PF13 and thrombocytaemia. Parasitaemia decreased with PF13 level and increased when thrombocytaemia decreased.

Discussion

The present study was undertaken to draw a first profile of antibody responses to a large array of antigens in three sentinel settings for malaria national surveillance and treatment in Ivory Coast, a country with a high level of endemicity [4]. There are few large-scale studies analysing precisely the prevalence of *P. falciparum* malaria and its recent history in Ivory Coast. However, observed *P. falciparum* prevalence in previous surveys from central and south-central Ivory Coast [1, 32, 33] underlined that malaria is highly endemic and characterized by considerable heterogeneity. In addition, the complex local social-ecological contexts, including population influx, might play a role resulting in an increase of presumed and reported clinical cases from 2.8 to 4.7 million in 2012

Table 2 Levels and prevalence of IgG antibody responses in the different sentinel sites

Antibody responses to	Abobo			Korhogo			Man		
	IgG levels ^f	%	P ^a	IgG levels	%	P ^b	IgG levels	%	P ^c
Scz_Ag ^e	4.1 (1–7.3)	84	NS ^d	3.9 (1–10.4)	81	NS	3.6 (1–11)	68	NS
CSP	110 (16–920)	26	<10 ⁻³	602 (26–2834)	75	<10 ⁻³	133 (21–2139)	13	NS
LSA1 ₄₁	376 (22–1475)	61	<0.05	1112 (31–8171)	84	<10 ⁻³	188 (27–1774)	32	<0.04
LSA3	70 (16–676)	10	NS	143 (40–1035)	31	NS	79 (19–637)	10	NS
SALSA	112 (18–886)	19	<10 ⁻³	785 (26–7656)	59	<0.004	74 (22–376)	23	NS
AMA1	145 (21–814)	39	<10 ⁻³	713 (47–3337)	84	<10 ⁻³	142 (37–747)	35	NS
GLURP	403 (20–2006)	45	NS	1485 (38–7701)	50	NS	344 (29–1440)	35	NS
MSP1p19	1031 (34–2834)	81	NS	2203 (77–9058)	88	NS	946 (42–3305)	68	NS
MSP4p20	817 (22–4231)	77	<0.03	3125 (90–10,674)	97	0.013	831 (49–2455)	74	NS
PF13	351 (21–3820)	45	<10 ⁻³	1887 (67–10,036)	91	NS	402 (33–1601)	71	NS
CSP <i>P. malariae</i>	60 (24–370)	10	<0.016	232 (33–3202)	38	<0.005	47 (25–267)	6	NS
gSG6 <i>An. gambiae</i>	66 (18–219)	6	NS	126 (25–452)	16	NS	83 (25–744)	3	NS

P Significant differences of prevalence by Fisher exact test

^a Abobo vs Korhogo, ^b Korhogo vs Man, ^c Man vs Abobo, ^d NS non-significant, ^e ELISA measure of antibody responses against schizont extract expressed as mean OD ratio, ^f Mean [minimum–maximum] antibody responses expressed in OD ratio (schizont extract) and MFI

and 2013, respectively [4]. Transmission can also change depending upon climate and rainfall [34], as well as potential changes of vector behaviour, such as adaptation of *A. gambiae* to polluted water [35] or the strong natural heterogeneity in entomologic parameters of malaria transmission [36].

In this context, affordable tools for evaluation and monitoring of malaria control interventions, such as immune biomarkers, can play a valuable role [9–11, 14]. Indeed, individual risk of infective bites depends substantially of the use of bed nets, and here the proportion of use was declared <30 % and slightly different between the settings Abobo > Man > Korhogo (Table 1). In addition, deep change in behaviour of *A. gambiae* sub-population can add a possible source of increasing transmission [37].

Recruitment of patients with non-severe clinical malaria was a first pilot approach, regarding which clinical infection by *P. falciparum* strongly stimulates immune responses against all components of the parasite. Thus, all patients had a comparable, individual, clinical susceptibility to infection that necessitated consultation and hospitalization, independently of the setting and the individual natural history of infection. There was a clear and highly significant, unexpected, difference of antibody responses between one of the setting (Korhogo) and the other two.

Most sero-epidemiology studies rely on cross-sectional or longitudinal follow-up of individuals before or after clinical episodes, including prospective analysis to establish relationship between antibody responses against one antigen [17–19, 21–23, 38] or several antigens and protection against clinical malaria [20, 39].

Excepting individuals with active asymptomatic parasite carriage, almost all studies involve a relatively stable state in host-parasite interaction, an approach in which serological analyses are potentially relevant indicators of malaria transmission [10, 40]. For example, a single antigen AMA1 has been used for mapping effectiveness of control intervention [41]; in another case, several antigens were used as markers of exposure and malaria risk [39]. A similar methodology was undertaken in this study, underlining a clear significant higher immunological background in Korhogo. In this site, transmission reflected by prevalence of clinical malaria, was high but slightly lower than in Man. Here, as the recruitment involved symptomatic cases, antibodies measured against targeted antigens may play no causal role in protection but rather reflect the individual boosting capacity of immune responses. A higher level of antibody responses against the set of antigens was found in individuals with significantly stronger immune background but still susceptible to parasite invasion with clinical attack. This could explain the absence of relationship between parasitaemia and antibody responses observed, despite significant inter-relation between antibody responses.

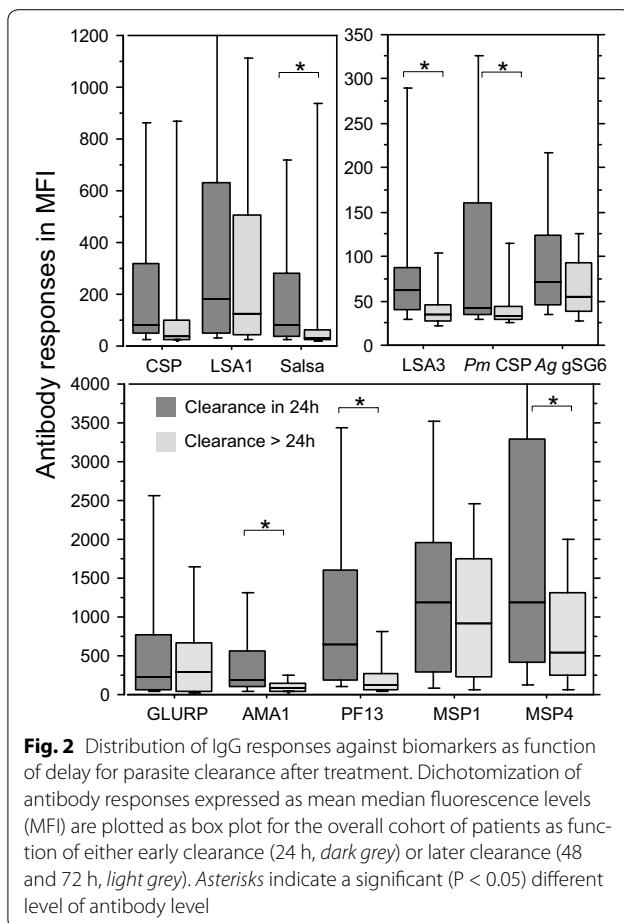
Interestingly, the whole parasite extract from 07/03 in vitro-adapted strain from Dielmo has been already used as a relevant marker for follow-up of immunity levels [29, 42, 43], but did not correlate with clinical protection in prospective studies [21]. In Ivory Coast, levels and prevalence of antibody responses to the whole parasite extract did not show any difference between the three settings, contrary to defined antigens in Korhogo. Such discrepancy could be related to some substantial difference between this

Table 3 Reciprocal inter-relation between age and IgG responses to the different biomarkers

Antigens	MSP4		CSP		LSA1		LSA3		GLURP		Salsa		MSP1		PF13		AMA1		PmCSP		Saliv		schz07/03													
	Rho	P	P _B	Rho	P	P _B	Rho	P	P _B	Rho	P	P _B	Rho	P	P _B	Rho	P	P _B	Rho	P	P _B	Rho	P	P _B	Rho	P	P _B									
CSP	0.46	<10 ⁻³	Y																																	
LSA1	0.24	0.02	NS	0.49	<10 ⁻³	Y																														
LSA3	0.34	<10 ⁻²	NS	0.43	<10 ⁻³	Y	0.16	0.1	NS																											
GLURP	0.34	<10 ⁻²	NS	0.42	<10 ⁻³	Y	0.32	<10 ⁻²	NS	0.33	<10 ⁻²	NS																								
Salsa	0.44	<10 ⁻³	Y	0.63	<10 ⁻³	Y	0.28	<10 ⁻²	NS	0.43	<10 ⁻³	Y	0.48	<10 ⁻³	Y																					
MSP1	0.37	<10 ⁻³	Y	0.25	0.01	NS	0.28	<10 ⁻²	NS	0.21	0.04	NS	0.26	0.01	NS	0.20	0.05	NS																		
PF13	0.44	<10 ⁻³	Y	0.39	<10 ⁻³	Y	0.21	0.04	NS	0.39	<10 ⁻³	Y	0.33	<10 ⁻²	NS	0.54	<10 ⁻³	Y	0.06	0.51	NS															
AMA1	0.46	<10 ⁻³	Y	0.52	<10 ⁻³	Y	0.18	0.07	NS	0.49	<10 ⁻³	Y	0.33	<10 ⁻²	NS	0.76	<10 ⁻³	Y	0.22	0.03	NS	0.54	<10 ⁻³	Y												
PmCSP	0.40	<10 ⁻³	Y	0.48	<10 ⁻³	Y	0.22	0.03	NS	0.54	<10 ⁻³	Y	0.37	<10 ⁻³	Y	0.55	<10 ⁻³	Y	0.0	0.1	NS	0.55	<10 ⁻³	Y	0.53	<10 ⁻³	Y									
Saliv	0.26	0.01	NS	0.32	<10 ⁻²	NS	0.04	0.64	NS	0.37	<10 ⁻³	Y	0.11	0.3	NS	0.39	<10 ⁻³	Y	0.29	<10 ⁻²	NS	0.41	<10 ⁻³	Y	0.46	<10 ⁻³	Y	0.30	<10 ⁻²	NS						
schz07/03	0.20	0.06	NS	0.20	0.04	NS	0.20	0.04	NS	0.06	0.5	NS	0.42	<10 ⁻³	Y	0.24	0.02	NS	0.25	0.01	NS	0.3	<10 ⁻²	NS	0.24	0.017	NS	0.14	0.17	NS	0.15	0.14	NS			
Age	0.21	0.04	NS	0.36	<10 ⁻²	NS	0.18	0.07	NS	0.15	0.14	NS	0.50	<10 ⁻³	Y	0.32	<10 ⁻²	NS	0.0	0.1	NS	0.3	<10 ⁻²	NS	0.20	0.05	NS	0.29	0.005	NS	0.03	0.73	NS	0.30	<10 ⁻²	NS

* Probability of correlation after bonferoni correction for all determinations (n = 78; P < 0.0006), Y significant, NS non significant

In this double entry table are summarized results from reciprocal analysis of correlation between antibody responses to all antigens, and between age and antibody responses on the last line. Strong inter-relation between IgG responses against all antigens was evidenced (55 were significant out of 66, P < 0.05), remaining significant for 30 out of 66 after Bonferoni correction (P < 0.0006). Age correlated with antibody responses for 7/12 antigens remaining significant only for GLURP antigen after Bonferoni correction



particular Senegalese strain and the circulating strains in Ivory Coast. This observation has to be further confirmed by testing a reference strain and/or a locally adapted strain.

One main question raised by the measure of multiplex reactogenicity profile on day of consultation is the search for potential immune marker(s) able to predict a differential susceptibility to the observed level of infection. Only two antigens induced antibody responses significantly different between the sites of Abobo and Man: the incidence of responders to LSA1₄₁ and the levels of antibody responses to PF13. PfEMP1–PF13 antigen was shown as a relevant biomarker of cumulative acquisition of immunity in endemic setting [27, 44] and appeared significantly related to parasite levels. Such capacity has to be further confirmed with larger cohorts from more settings.

Susceptibility to infection can be reflected by the level of parasitaemia and by the degree of individual severity of clinical signs. The level of parasitaemia was significantly lower in Korhogo compared to the two other sites and there was a clear decreasing gradient of high level parasitaemia from Abobo (30 %) to Man (16 %) and Korhogo (0 %). The multivariate analysis investigating correlation

between level of parasitaemia, according to each clinical signs and setting, underlined only nausea as a significant clinical sign. This is in line with observation that severity of clinical outcome in a mild malaria episode is not related to the level of parasitaemia or acquired immunity, once susceptible [45]. However, despite substantial difference in the magnitude of parasite invasion according to the setting, treatment was 100 % efficient by 72 h. Within the period covered by this study, there was no indication of delayed response to artemisinin combination therapy (ACT). Parasites were cleared rapidly, leaving very few patients with a low parasitaemia on day 3: only 1.5 % of the patients were still positive on day 3 which is under the threshold of 3 % indicating delayed response [46].

Importantly, this study shows clearly the potential impact of host immunity on malaria treatment outcome. A fast clearance of circulating parasite (24 h) was associated with higher level of immunity. This general trend, shown in Fig. 2, was significant for 50 % of the biomarkers. These results are in agreement with several studies involving sulfadoxine–pyrimethamine or amodiaquine treatment, showing a significant association of higher levels of antibodies to GLURP [47], AMA1 [48] and MSP1 [49] antigens with a lower risk of treatment failure. Another study showed the contribution of antibodies to the Ring Erythrocyte Surface antigen to the therapeutic response in Thai patients treated with artesunate [50]. Indeed, the positive contribution of host immunity for rapid parasite clearance underlined in this study is outlined by multi-site recruitment testing, contrary to previous investigations [47–50]. The use of antibody responses to biomarkers underlined clearly the site of Korhogo as different from the other two; parasite transmission seems to remain high, marked by higher boosting capacity of antibody responses. Such observation could possibly be related to lower application of individual prevention measures. This was confirmed by a two–three-times lower utilization of bed nets, as recorded by individual questionnaire, and the differential impact on antibody responses to gSG6 salivary peptide. However, such individual behaviour has to be further confirmed. Serological tools, such as *Anopheles* salivary peptide gSG6-P1 antigen, have been shown to be a new relevant marker of risk for malaria transmission [5–7, 51–53]. A significant higher level of IgG against the salivary peptide in Korhogo compared to other villages was found. However, seroprevalence did not significantly differ and MFI levels were low compared to other biomarkers. This lower sensitivity may be related to the intrinsic multiplex technique compared to ELISA, based on a high concentration of peptide coating (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and lower serum dilution for detection (1:20 instead of 1:100 in MBA) [5]. Further analysis

using this biomarker may rather require ELISA than MBA for enhanced sensitivity.

Accurate analysis of immune responses from malaria symptomatic individuals can underline heterogeneity in individual degree of exposure and bring important information on the effective application of control measures at a community level.

Conclusion

This pilot study suggests that measures of antigen reactivity profiles using the MBA can conveniently contribute to follow-up and monitoring of integrated malaria control measures. A panel of antigens, covering targets from different parasite stages is preferentially required, including antigens from other *Plasmodium* species. However, further investigations are required, including antigen targets from other species, enlarged to multiple sites and comprising enrolment of young individuals. Immunity profiling using biomarkers has the potential for immunological mapping of intervention and help with prevention measures towards malaria elimination.

Authors' contributions

AOT, RP, IVW, and JAD designed and initiated the study. AOT, DK and SB supervised the collection of field samples and clinical data. DK and MLV conducted the laboratory experiments and statistical analyses, with help from RP, VR and AOT. RP drafted most of the paper, with important input from DK, MLV and AOT and comments from other authors. Figures and Tables were prepared by RP and DK. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Unité de Paludologie, Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, Abidjan, Côte d'Ivoire. ² Unité d'Immunologie, Institut Pasteur de Dakar, Dakar, Sénégal. ³ Unité d'Immunologie des Maladies Infectieuses, Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo, Madagascar. ⁴ UFR Biosciences, Université Félix Houphouët Boigny, Abidjan, Côte d'Ivoire. ⁵ Unité d'Epidémiologie, Institut Pasteur de Dakar, Dakar, Sénégal.

Acknowledgements

We are particularly grateful to Dr. Shirley Longacre who generously provided the PfMSP1p19 and MSP4 and to Dr. Odile Mercereau Pujalon who provided Pf13 antigen and substantial support to the study. We thank Pr Alioune Dieye, Dr. Aïssatou Touré for support from the laboratories. We are grateful to Pr Mireille Dosso for constant support of the project and to Dr. Sylviane Pied (Institut Pasteur, Lille) for critical reading and helpful comment of the manuscript.

The work was supported by grants from the Institut Pasteur Foundation, and grants from Institut Pasteur ACIP N 25_2012 and from the Rotary International associated with Rotary Paris Alliance and Rotary Dakar Almadies.

Competing interests

The authors declared that they have no competing interests.

Received: 20 October 2015 Accepted: 9 December 2015

Published online: 21 December 2015

References

- Knoblauch AM, Winkler MS, Archer C, Divall MJ, Owuor M, Yapo RM, et al. The epidemiology of malaria and anaemia in the Bonikro mining area, central Cote d'Ivoire. *Malar J*. 2014;13:194.
- Snow RW, Omumbo JA, Lowe B, Molyneux CS, Obiero JO, Palmer A, et al. Relation between severe malaria morbidity in children and level of *Plasmodium falciparum* transmission in Africa. *Lancet*. 1997;349:1650–4.
- Hay SI, Noor AM, Simba M, Busolo M, Guyatt HL, Ochola SA, et al. Clinical epidemiology of malaria in the highlands of western Kenya. *Emerg Infect Dis*. 2002;8:543–8.
- WHO. World Malaria Report 2014. Geneva, World Health Organization; 2014. http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/en/ 2014.
- Durnez L, Van Bortel W, Denis L, Roelants P, Veracx A, Trung HD, Sochantha T, et al. False positive circumsporozoite protein ELISA: a challenge for the estimation of the entomological inoculation rate of malaria and for vector incrimination. *Malar J*. 2011;10:195.
- Badu K, Siangla J, Larbi J, Lawson BW, Afrane Y, Ong'echa J, et al. Variation in exposure to *Anopheles gambiae* salivary gland peptide (gSG6-P1) across different malaria transmission settings in the western Kenya highlands. *Malar J*. 2012;11:318.
- Drame PM, Poincignon A, Dechavanne C, Cottrell G, Farce M, Ladepko R, et al. Specific antibodies to *Anopheles* gSG6-P1 salivary peptide to assess early childhood exposure to malaria vector bites. *Malar J*. 2015;14:285.
- Sagna AB, Gaayeb L, Sarr JB, Senghor S, Poincignon A, Boutouaba-Combe S, et al. *Plasmodium falciparum* infection during dry season: IgG responses to *Anopheles gambiae* salivary gSG6-P1 peptide as sensitive biomarker for malaria risk in Northern Senegal. *Malar J*. 2013;12:301.
- Badu K, Afrane YA, Larbi J, Stewart VA, Waitumbi J, Angov E, et al. Marked variation in MSP-119 antibody responses to malaria in western Kenyan highlands. *BMC Infect Dis*. 2012;12:50.
- Bretscher MT, Supargiyono S, Wijayanti MA, Nugraheni D, Widyastuti AN, Lobo NF, et al. Measurement of *Plasmodium falciparum* transmission intensity using serological cohort data from Indonesian school children. *Malar J*. 2013;12:21.
- Corran P, Coleman P, Riley E, Drakeley C. Serology: a robust indicator of malaria transmission intensity? *Trends Parasitol*. 2007;23:575–82.
- Ambrosino E, Dumoulin C, Orlandi-Pradines E, Remoue F, Toure-Balde A, Tall A, et al. A multiplex assay for the simultaneous detection of antibodies against 15 *Plasmodium falciparum* and *Anopheles gambiae* saliva antigens. *Malar J*. 2010;9:317.
- Fouda GG, Leke RF, Long C, Druilhe P, Zhou A, Taylor DW, Johnson AH. Multiplex assay for simultaneous measurement of antibodies to multiple *Plasmodium falciparum* antigens. *Clin Vacc Immunol*. 2006;13:1307–13.
- Kerkhof K, Canier L, Kim S, Heng S, Sochantha T, Sovannaroth S, et al. Implementation and application of a multiplex assay to detect malaria-specific antibodies: a promising tool for assessing malaria transmission in southeast Asian pre-elimination areas. *Malar J*. 2015;14:338.
- Sarr JB, Orlandi-Pradines E, Fortin S, Sow C, Cornelle S, Rogerie F, et al. Assessment of exposure to *Plasmodium falciparum* transmission in a low endemicity area by using multiplex fluorescent microsphere-based serological assays. *Parasite Vectors*. 2011;4:212.
- Bouharoun-Tayoun H, Attanath P, Sabchareon A, Chongsuphajaisidhi T, Druilhe P. Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. *J Exp Med*. 1990;172:1633–41.
- Cohen S, Mc GI, Carrington S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature*. 1961;192:733–7.
- John CC, Tande AJ, Moormann AM, Sumba PO, Lanar DE, Min XM, et al. Antibodies to pre-erythrocytic *Plasmodium falciparum* antigens and risk of clinical malaria in Kenyan children. *J Infect Dis*. 2008;197:519–26.
- Migot-Nabias F, Deloron P, Ringwald P, Dubois B, Mayombo J, Minh TN, et al. Immune response to *Plasmodium falciparum* liver stage antigen-1: geographical variations within Central Africa and their relationship with protection from clinical malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000;94:557–62.
- Branch OH, Udhayakumar V, Hightower AW, Oloo AJ, Hawley WA, Nahlen BL, et al. A longitudinal investigation of IgG and IgM antibody responses to the merozoite surface protein-1 19-kiloDalton domain of *Plasmodium falciparum* in pregnant women and infants: associations with febrile illness, parasitemia, and anemia. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;58:211–9.
- Osier FH, Fegan G, Polley SD, Murungi L, Verra F, Tetteh KK, et al. Breadth and magnitude of antibody responses to multiple *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with protection from clinical malaria. *Infect Immun*. 2008;76:2240–8.

22. Perraut R, Marrama L, Diouf B, Sokhna C, Tall A, Nabeth P, et al. Antibodies to the conserved C-terminal domain of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 and to the merozoite extract and their relationship with in vitro inhibitory antibodies and protection against clinical malaria in a Senegalese village. *J Infect Dis*. 2005;191:264–71.
23. Nebie I, Diarra A, Ouedraogo A, Soulama I, Bougouma EC, Tiono AB, et al. Humoral responses to *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens and association with incidence of clinical malaria in children living in an area of seasonal malaria transmission in Burkina Faso, West Africa. *Infect Immun*. 2008;76:759–66.
24. Riley EM, Morris-Jones S, Blackman MJ, Greenwood BM, Holder AA. A longitudinal study of naturally acquired cellular and humoral immune responses to a merozoite surface protein (MSP1) of *Plasmodium falciparum* in an area of seasonal malaria transmission. *Parasite Immunol*. 1993;15:513–24.
25. Perraut R, Richard V, Varela ML, Trape JF, Guillotte M, Tall A, et al. Comparative analysis of IgG responses to *Plasmodium falciparum* MSP1p19 and PF13-DBL1alpha1 using ELISA and a magnetic bead-based duplex assay (MAGPIX(R)-Luminex) in a Senegalese meso-endemic community. *Malar J*. 2014;13:410.
26. Escudie A, Hamon J, Godin J. Malaria and the significance of its transmission in the Man region, Ivory Coast Republic (in French). *Rivista di malariologia*. 1962;41:9–28.
27. Betsi AN. la riziculture et le paludisme dans la région forestière ouest de la Côte d'Ivoire. *Cah Agricultures*. 2003;12:341–6.
28. Vigan-Womas I, Guillotte M, Juillerat A, Vallieres C, Lewit-Bentley A, Tall A, et al. Allelic diversity of the *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 entails variant-specific red cell surface epitopes. *PLoS One*. 2011;6:e16544.
29. Bonnet S, Petres S, Holm I, Fontaine T, Rosario S, Roth C, et al. Soluble and glyco-lipid modified baculovirus *Plasmodium falciparum* C-terminal merozoite surface protein 1, two forms of a leading malaria vaccine candidate. *Vaccine*. 2006;24:5997–6008.
30. Aribot G, Rogier C, Sarthou JL, Trape JF, Balde AT, Druihe P, et al. Pattern of immunoglobulin isotype response to *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens in individuals living in a holoendemic area of Senegal (Dielmo, West Africa). *Am J Trop Med Hyg*. 1996;54:449–57.
31. Perraut R, Marrama L, Diouf B, Fontenille D, Tall A, Sokhna C, et al. Distinct surrogate markers for protection against *Plasmodium falciparum* infection and clinical malaria identified in a Senegalese community after radical drug cure. *J Infect Dis*. 2003;188:1940–50.
32. Perraut R, Guillotte M, Drame I, Diouf B, Molez JF, Tall A, et al. Evaluation of anti-*Plasmodium falciparum* antibodies in Senegalese adults using different types of crude extracts from various strains of parasite. *Microbes Infect*. 2002;4:31–5.
33. Koudou BG, Doumbia M, Janmohamed N, Tschannen AB, Tanner M, Hemingway J, et al. Effects of seasonality and irrigation on malaria transmission in two villages in Cote d'Ivoire. *Ann Trop Med Parasitol*. 2010;104:109–21.
34. Koudou BG, Tano Y, Keiser J, Vounatsou P, Girardin O, Klerou K, et al. Effect of agricultural activities on prevalence rates, and clinical and presumptive malaria episodes in central Cote d'Ivoire. *Acta Trop*. 2009;111:268–74.
35. Raso G, Schur N, Utzinger J, Koudou BG, Tchicaya ES, Rohner F, et al. Mapping malaria risk among children in Cote d'Ivoire using Bayesian geo-statistical models. *Malar J*. 2012;11:160.
36. Awolola TS, Oduola AO, Obansa JB, Chukwurar NJ, Unyimadu JP. *Anopheles gambiae* s.s. breeding in polluted water bodies in urban Lagos, southwestern Nigeria. *J Vector Borne Dis*. 2007;44:241–4.
37. Fontenille D, Lochoarn L, Diagne N, Sokhna C, Lemasson JJ, Diatta M, et al. High annual and seasonal variations in malaria transmission by anophelines and vector species composition in Dielmo, a holoendemic area in Senegal. *Am J Trop Med Hyg*. 1997;56:247–53.
38. Riehle MM, Guelbeogo WM, Gneme A, Eiglmeier K, Holm I, Bischoff E, et al. A cryptic subgroup of *Anopheles gambiae* is highly susceptible to human malaria parasites. *Science*. 2011;331:596–8.
39. Perraut R, Joos C, Sokhna C, Polson HE, Trape JF, Tall A, et al. Association of antibody responses to the conserved *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 5 with protection against clinical malaria. *PLoS One*. 2014;9:e101737.
40. Greenhouse B, Ho B, Hubbard A, Njama-Meya D, Narum DL, Lanar DE, et al. Antibodies to *Plasmodium falciparum* antigens predict a higher risk of malaria but protection from symptoms once parasitemic. *J Infect Dis*. 2011;204:19–26.
41. Druihe P, Pradier O, Marc JP, Miltgen F, Mazier D, Parent G. Levels of antibodies to *Plasmodium falciparum* sporozoite surface antigens reflect malaria transmission rates and are persistent in the absence of reinfection. *Infect Immun*. 1986;53:393–7.
42. Cook J, Kleinschmidt I, Schwabe C, Nseng G, Bousema T, Corran PH, et al. Serological markers suggest heterogeneity of effectiveness of malaria control interventions on Bioko Island, equatorial Guinea. *PLoS One*. 2011;6:e25137.
43. Diop F, Richard V, Diouf B, Sokhna C, Diagne N, Trape JF, et al. Dramatic declines in seropositivity as determined with crude extracts of *Plasmodium falciparum* schizonts between 2000 and 2010 in Dielmo and Ndiop. *Senegal. Malar J*. 2014;13:83.
44. Perraut R, Mercereau-Puijalon O, Diouf B, Tall A, Guillotte M, Le Scanf C, et al. Seasonal fluctuation of antibody levels to *Plasmodium falciparum* parasitized red blood cell-associated antigens in two Senegalese villages with different transmission conditions. *Am J Trop Med Hyg*. 2000;62:746–51.
45. Vigan-Womas I, Guillotte M, Le Scanf C, Igonet S, Petres S, Juillerat A, et al. An in vivo and in vitro model of *Plasmodium falciparum* rosetting and autoagglutination mediated by varO, a group A var gene encoding a frequent serotype. *Infect Immun*. 2008;76:5565–80.
46. Rogier C, Ly AB, Tall A, Cisse B, Trape JF. *Plasmodium falciparum* clinical malaria in Dielmo, a holoendemic area in Senegal: no influence of acquired immunity on initial symptomatology and severity of malaria attacks. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;60:410–20.
47. Stepniewska K, Ashley E, Lee SJ, Anstey N, Barnes KI, Binh TQ, et al. In vivo parasitological measures of artemisinin susceptibility. *J Infect Dis*. 2010;201:570–9.
48. Enevold A, Nkya WM, Theisen M, Vestergaard LS, Jensen AT, Staalsøe T, et al. Potential impact of host immunity on malaria treatment outcome in Tanzanian children infected with *Plasmodium falciparum*. *Malar J*. 2007;6:153.
49. Keh CE, Jha AR, Nzarubara B, Lanar DE, Dutta S, Theisen M, et al. Associations between antibodies to a panel of *Plasmodium falciparum* specific antigens and response to sub-optimal antimalarial therapy in Kampala, Uganda. *PLoS One*. 2012;7:e52571.
50. Mawili-Mboumba DP, Borrmann S, Cavanagh DR, McBride JS, Matsiegui PB, Missinou MA, et al. Antibody responses to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 and efficacy of amodiaquine in Gabonese children with *P. falciparum* malaria. *J Infect Dis*. 2003;187:1137–41.
51. Mayxay M, Chotivanich K, Pukrittayakamee S, Newton P, Looareesuwan S, White NJ. Contribution of humoral immunity to the therapeutic response in *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65:918–23.
52. Poinsignon A, Cornelle S, Mestres-Simon M, Lanfrancotti A, Rossignol M, Boulanger D, et al. Novel peptide marker corresponding to salivary protein gSG6 potentially identifies exposure to Anopheles bites. *PLoS One*. 2008;3:e2472.
53. Rizzo C, Ronca R, Fiorentino G, Verra F, Mangano V, Poinsignon A, et al. Humoral response to the *Anopheles gambiae* salivary protein gSG6: a serological indicator of exposure to Afrotropical malaria vectors. *PLoS One*. 2011;6:e17980.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



RESEARCH ARTICLE

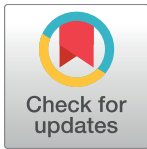
Longitudinal analysis of antibody responses in symptomatic malaria cases do not mirror parasite transmission in peri-urban area of Cote d'Ivoire between 2010 and 2013

David Koffi^{1,2}, Marie-Louise Varela³, Cheikh Loucoubar⁴, Sylvain Beourou¹, Inès Vigan-Womas^{5,6}, Aissatou Touré³, Joseph Allico Djaman², André Offianan Touré¹, Ronald Perraut³*

1 Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, Unité de Paludologie, Abidjan, Côte d'Ivoire, **2** Université Félix Houphouët Boigny, UFR Biosciences, Abidjan, Côte d'Ivoire, **3** Institut Pasteur de Dakar, Unité d'Immunologie, Dakar, Sénégal, **4** Institut Pasteur de Dakar, G4 Biostatistiques Bioinformatique et Modélisation, Dakar, Sénégal, **5** Institut Pasteur, Unité d'Immunologie Moléculaire des Parasites, Paris, France, **6** Institut Pasteur de Madagascar, Unité d'Immunologie, Antananarivo, Madagascar

* These authors contributed equally to this work.

* perraut@pasteur.sn



OPEN ACCESS

Citation: Koffi D, Varela M-L, Loucoubar C, Beourou S, Vigan-Womas I, Touré A, et al. (2017) Longitudinal analysis of antibody responses in symptomatic malaria cases do not mirror parasite transmission in peri-urban area of Cote d'Ivoire between 2010 and 2013. PLoS ONE 12(2): e0172899. doi:10.1371/journal.pone.0172899

Editor: Georges Snounou, Université Pierre et Marie Curie, FRANCE

Received: November 5, 2016

Accepted: February 10, 2017

Published: February 28, 2017

Copyright: © 2017 Koffi et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: The work was supported by grants from the Institut Pasteur Foundation, and grants from Institut Pasteur ACIP N°25_2012 and from the Rotary International associated with Rotary Paris Alliance and Rotary Dakar Almadies. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Background

In the agenda towards malaria eradication, assessment of both malaria exposure and efficacy of anti-vectorial and therapeutic strategies is a key component of management and the follow-up of field interventions. The simultaneous use of several antigens (Ags) as serological markers has the potential for accurate evaluation of malaria exposure. Here we aimed to measure the longitudinal evolution of the background levels of immunity in an urban setting in confirmed clinical cases of malaria.

Methods

A retrospective serological cross-sectional study on was carried out using 234 samples taken from 2010 to 2013 in peri-urban sentinel facility of Cote d'Ivoire. Antibody responses to recombinant proteins or BSA-peptides, 8 *Plasmodium falciparum* (PfAMA1, PfMSP4, PfMSP1, PfEMP1-DBL1 α 1-PF13, PfLSA1-41, PfLSA3-NR2, PfGLURP and PfCSP), one *P. malariae* (PmCSP) and one *Anopheles gambiae* salivary (gSG6-P1) antigens were measured using magnetic bead-based multiplex immunoassay (MBA). Total anti- *P. falciparum* IgG responses against schizont lysate from african 07/03 strain (adapted to culture) and 3D7 strain was measured by ELISA.

Results

High prevalence (7–93%) and levels of antibody responses to most of the antigens were evidenced. However, analysis showed only marginal decreasing trend of Ab responses from 2010 to 2013 that did not parallel the reduction of clinical malaria prevalence following the

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

implementation of intervention in this area. There was a significant inverse correlation between Ab responses and parasitaemia ($P < 10^{-3}$, $\rho = 0.3$). The particular recruitment of asymptomatic individuals in 2011 underlined a high background level of immunity almost equivalent to symptomatic patients, possibly obscuring observable yearly variations.

Conclusion

The use of cross-sectional clinical malaria surveys and MBA can help to identify endemic sites where control measures have unequal impact providing relevant information about population immunity and possible decrease of transmission. However, when immunity is substantially boosted despite observable clinical decline, a larger cohort including asymptomatic recruitment is needed to monitor the impact of control measures on level of immunity.

Introduction

Plasmodium falciparum malaria remains a major threat in tropical and sub-tropical regions, with nearly 50% of the world population exposed to infective bites by Anopheles mosquitoes and almost half million deaths annually [1]. Scaling up of integrated interventions strategies including artemisinin-based combination therapy (ACT), universal coverage with long-lasting insecticide-impregnated bed nets (LLINs), systematic diagnosis using rapid tests (RDTs) and intermittent preventive treatment in vulnerable target groups have considerably reduced the burden of malaria in many countries and saved more than a million lives since the year 2000, most of them among children under 5 years of age [2].

Presently, the number of malaria cases is still very high (more than 214 million malaria cases) as well as the number of deaths (236 000–635 000 according to the WHO 2015). Furthermore, in addition to the threats associated with the emergence of resistance to artemisinin in Southeast Asia and insecticides in Africa, malaria rebound in some countries like Rwanda, Sao Tome, Principe and Zambia that were the leaders in the early upgrade of fighting efforts [2].

Monitoring changes in malaria transmission intensity and disease prevalence through surveillance allows health authorities to evaluate health services and plan control programs.

Sero-surveillance is based on the use of *Plasmodium* species-specific antibodies as indicators for exposure, transmission, and immunity. Such tool has a significant potential for contributing to the effectiveness of malaria control and elimination program. Antibodies are very sensitive marker of malaria exposure in low-transmission settings and reflect cumulative exposure over a period of time, which is useful in areas with highly seasonal transmission [3,4]. Although this approach was used historically as part of malaria control programs, its use was not developed in part because of the lack of standardized antigens and methodology [4]. Of more than 5,000 proteins expressed by the *Plasmodium* species, few have been examined in any detail, and there is a trend towards further development of sero-epidemiological analysis for monitoring malaria control and elimination. A comprehensive evaluation of candidate antigens as biomarkers is required to identify those antibody responses that are most sensitive for detecting changes in transmission. Studies employing protein microarrays [5] or expanded repertoires of purified antigens [6] are beginning to address this knowledge gap, and it is likely that multiple antigens will need to be included in serologic assays [4,5,6,7].

Several teams use sero-epidemiology analysis in low transmission settings focusing investigations on change of seroprevalence levels. They use results from cross-sectional studies to build mathematical seroconversion rate models and predict decline of malaria transmission [8].

In addition, few analyses were focused on symptomatic cases. Parasite invasion and multiplication in human strongly stimulates immune responses leading to possible higher individual antibody responses in more exposed persons that thereby possess a higher degree of acquired immunity [9,10]. Thus, Ab responses measured during symptomatic episode rather represent surrogates of an effective immune background depending upon duration and intensity of parasitemia before treatment. Cross sectional analysis of randomly recruited symptomatic and well documented cases from sentinel sites in Cote d'Ivoire, showed that multi-target measure of Ab responses could represent surrogates of actual immune background [11].

In the present study, we used a similar approach in a longitudinal manner by recruiting individuals living in Abobo from 2010 to 2013, a peri-urban setting of Côte d'Ivoire with high continuous parasite transmission. We aimed to verify here if previous observation in different settings was available in the same setting where an increased efficient malaria control program was applied from 2010 to 2013. Antibody responses against 12 antigens targets was analyzed using a magnetic bead-based multiplex assay [12] together with IgG responses to whole parasite extract with ELISA. Results showed that the profile of antibody responses did not reflect the evolution of the decreasing transmission resulting from increased prevention measures and actions at community level.

Material and methods

Study area, procedures for recruitment

Subjects were recruited in Abobo, a periurban Ivorian malaria endemic area included in the Sentinel National Network for Surveillance of Malaria. The site of Abobo is located in the southern part of the township of Abidjan, characterized by the presence of the laguna and a parasite transmission occurring all year round.

The study was conducted in accordance with the local laws and regulations, International Conference on Harmonization—Good Clinical Practice (ICH-GCP). The protocol was reviewed and approved by the Comité National d'Ethique et de Recherche de Côte d'Ivoire (N°56/MSLS/CNER-dkn). Individual written informed consent was obtained from participants/parents/guardians. In case of an illiterate patient, his/her thumb impression and signature of an independent witness were obtained.

There was a particular exception in 2011 where young asymptomatic individuals were recruited in a transversal survey. This particular survey was done under request and ethical approbation from the Ministry of health (N°01/MSHP /064) as routine recruitment was not possible at the hospital because of the civil war. The parents or guardians and school administrator were duly informed of the objectives and methodology of this survey, they agreed to participate to the study and provided useful information about their children. This survey involved 207 volunteer school children (6 to 15 years old) with normal axillary temperature <37.5°C. They were examined for parasite positivity: 59 individuals were positive by RDT including 35 individuals positive by blood smear.

The overall study involved 234 individuals, 175 patients consulting for symptomatic fever in healthcare center formation sanitaire Anonkoua-Kouté in Abobo, and 59 schoolchildren in 2011. Symptomatic patients were treated and followed-up according to the standard national procedure. Diagnosis of malaria includes RDT test, blood sampling for biological investigations and blood smear for parasite counting. Parasitemia was counted on thick blood smears

Table 1. Context and characteristics of the study population.

Year of recruitment	2010	2011	2012	2013
Month of sampling	October	June	August	September
No of individuals	57	35 24*	56	62
Proportion M/F (%)	26/31 (46%)	31/28 (53%)	32/24 (57%)	24/38 (39%)
Age [median min-Max]	8.0 [2–12]	11.0 [6–16] 11.0 [9–13]*	12.5 [1–52]	13.0 [2–68]
Hemoglobin mean (SD)	9.8 (1.9)	11.8 (1.3)	11.0 (2.0)	10.7 (1.7)
% of anemia \leq 9 g/dL	32%	0%	14%	21%
Platelets mean (SD)	127 (64)	232 (84)	162 (122)	148 (73)
Mean parasitemia (parasitemia SD)	90213 (100278)	8103 (19598)	34942 (28473)	61731 (88462)
Parasitemia in different age-groups				
\leq 5 years old.	115518	na	51737	85555
[min-max]	[1331–341700]	na	[6000–99860]	[2300–200000]
6–10 years old.	91269	2892	39937	74604
[min-max]	[1845–336830]	[0–20520]	[7920–97340]	[2180–198600]
11–15 years old.	54926	11182	41460	87268
[min-max]	[1764–174879]	[0–106800]	[6400–86340]	[7894–587000]
> 15 years old.	na	na	21470	28235
[min-max]	na	na	[1160–86280]	[2100–84307]

* individuals from asymptomatic recruitment in 2011 with negative RDT

doi:10.1371/journal.pone.0172899.t001

by two experienced microscopists. In case of discrepancy, smears were confirmed by a third counting. Characteristics of the followed groups are summarized in Table 1. All consultants were treated with ACT, according to the national therapeutic policy. They were hospitalized, treated and followed-up daily from day 0 to day 3 in the healthcare center. Parasitaemia were recorded every 24 hours up to two consecutive negative blood smear of patient. The parasite clearance time (PCT) is recorded for each patient, an indicator defined as the time between treatment and the first negative slide.

For all patients, almost complete parasite clearance within 3 days was observed after treatment. In 2012 and 2013, 88% and 55% of treated individuals cleared their parasitemia in 24h, respectively.

Plasma samples were collected after biology processing at day 0 upon centrifugation, and stored at -20°C until further analysis.

No entomological data were available for the area of Abobo. However, in the absence of exact EIR, overall morbidity data collected from health facility records in 2013 signifies the high level of transmission in this endemic area.

Antigens and peptides

Three soluble recombinant proteins and 8 peptides conjugated to BSA (Bovine Serum Albumin) specific to *P. falciparum*, *P. malariae* and *Anopheles gambiae* salivary peptide gSG6 antigen (Ag) were included. BSA provided by peptide manufacturer was used as carrier control. The peptides used in our studies were designed as already described [13], a N-terminal cysteine residue was added to allow a unidirectional coupling to BSA by the manufacturer (GenScript HK Inc., Hong Kong, China, or Genecust, France). Purity of each BSA-peptide was estimated >85% by HPLC and mass spectrometry. A summary of antigens and peptides used is given in Table 2.

Table 2. Summary of antigens used for measurement of Ab responses.

Antigen	Protein or peptides	Antigen from	Stage of expression ¹	Sequence and/or Reference
CSP	Peptide	<i>P. falciparum</i>	sporozoite/hepatic stage	NANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNVDPNVDP
LSA1 ₄₁	Peptide	<i>P. falciparum</i>	intra-hepatocyte	LAKEKLQEQQSDLEQERLAKEKLQEQQSDLEQERLAKEKEKLQC
LSA3	Peptide	<i>P. falciparum</i>	blood stages	VLEESQVNDIFFNSLVKSVQEQEQHNVC
SALSA	Peptide	<i>P. falciparum</i>	merozoite	SAEKKDEKEASEQGEESHKKENSQESAC
GLURP	Peptide	<i>P. falciparum</i>	merozoite/schizont	EDKNEKGQHEIVEVEEILC
AMA1	Peptide	<i>P. falciparum</i>	sporozoite/merozoite	YKDEIKKEIERESKRIKLNNDNDEGKIIAPRIFISDDKDSLKC
PF13	Protein	<i>P. falciparum</i>	mature blood stages	DBL1 domain of 3D7-PF13_0003 var gene
MSP1p19	Protein	<i>P. falciparum</i>	merozoite	Bonnet et al, Vaccine 2006
MSP4p20	Protein	<i>P. falciparum</i>	merozoite	Bonnet et al, Vaccine 2006
PmCSP	Peptide	<i>P. malariae</i>	sporozoite	NAAGNAAGNAAGNAAGNAAGNAAGNAAGNAAGNAAGNAAGNDAGC
gSG6	Peptide	<i>A. gambiae</i>	Salivary gland	EKVWVDRDNVYCGHLDCTRATFC
BSA	-	control		

¹ pre-erythrocytic and/or erythrocytic localization of Ag tested (from www.plasmodb.org)

doi:10.1371/journal.pone.0172899.t002

The procedure for production and purification of the NTS-DBL1 α 1 domain of the PfEMP1 (*P. falciparum* Erythrocyte Membrane Protein-1) adhesin encoded by the 3D7/PF13 var gene has been reported elsewhere [14]. Soluble recombinant protein corresponding to *P. falciparum* MSP1p19 and MSP4p20 were produced in the baculovirus / insect cell expression system and purified by metallo-affinity chromatography as described [15,16].

Coupling of Ag to beads

The covalent coupling of recombinant antigens (PF13, MSP4p20 and MSP1p19), BSA and all the 8 peptides to carboxylated magnetic Luminex microspheres was done by the carbodiimide reaction (Luminex corp, Austin, USA) using the xMAP[®] Antibody Coupling Kit following manufacturers' instructions (ref 40–50016, Luminex corp, Austin, USA).

Briefly, 2.5x10⁶ beads from regions 26 to 39 and 5 μ g Ag per million beads in a working volume of 500 μ L were used. All steps of washings, buffer changing after 1–2 min centrifugation at 8000 x g, magnetic pelleting using the Luminex[®] Magnetic plate separator (Luminex corp, Austin, USA), vortexing and sonication in water-bath sonicator to disperse the beads, carbodiimide hypochloride (EDC) activation, conjugation under rotation mixing and final pelleting of conjugated beads was done as already described [11,12,17]. Final count of remaining beads using cell counter showed a mean recovery of 96% of the coupled beads. Efficient coupling of Ag was controlled using positive individual and pool of human sera. The coupled microspheres were kept in the washing/ storage buffer at 4°C in the dark until use.

Bead-based assay for IgG antibodies

The Magnetic Bead-based MAGPIX[®]-Luminex Assay (MBA) was used to parallel the working steps used in the standard ELISA technique as already described [11,12,17]. 2.5 μ L aliquots of the mix of microspheres containing 3000 beads per Ag were distributed to individual wells of a white polystyrene opaque round bottom microtiter plate (Ref.103977741, Fisher Scientific, Illkirch, France). 100 μ L plasma diluted 1:100 in PBS Tween 0.01% BSA 1% (PBSB) was added in duplicate wells, mixed and incubated with the beads protected from light on a microplate shaker. After removal of plasma and two washing steps with 100 μ L PBSB, 100 μ L phycoerythrin-labeled goat anti-human IgG diluted 1:500 (gamma-chain specific, F(ab')₂ fragment-R-phycoerythrin (Sigma, P-8047 St. Louis, MO) in PBSB was added and incubated in the dark

with shaking. The beads were finally resuspended in 120 μ L PBSB after two washes and analyzed on a Multiplex MAGPIX system (Millipore, USA) using the xPONENT 4.1 software for acquisition. Antibody responses were expressed in median fluorescence intensity (MFI) per sample as stated by manufacturer's instructions; individual positivity was considered when the signal was greater than 2 x [mean MFI signal + 3 SD of 6 naïve control sera].

ELISA procedure

IgG responses to whole parasite extract Ag using 07/03 Dielmo strain were quantified by ELISA in duplicate plasma samples diluted 1:100 as previously described [18,19,20]. Positive and negative controls were included in each assay *ie* a pool of 25 sera from clinically immune adults living in the village of Dielmo (a holoendemic area of transmission in Senegal) and a pool of European and/or African non-immune, respectively. Results were expressed as OD ratio = OD sample / OD naive serum pool [19,21]. Sera showing an OD ratio >2 (corresponding to the signal of naive controls + 3 SD) were considered sero-positive for prevalence analysis.

Statistical analysis

Antibody levels and prevalence of responders in different groups were compared using the Mann-Whitney signed rank test, the Spearman rank correlation test for non-normally distributed paired data and the fisher exact test. P values <0.05 were considered significant. Statistical analyses were performed with R and Statview 5.0 (SAS Institute) software.

To study the correlation between level of parasitaemia and levels of antibody responses a log transformation has been used. The log-transformed data were shown distributed according to normal law using Shapiro test. The log-transformed were included in a generalized linear model adjusted for age to analyse distribution of parasitaemia level—considered as dependent variable—as function of antibody responses to different targets.

Results

Indicators for effective field application of malaria prevention measures

As illustrated on Fig 1, there was a strong increase of prevention measures against malaria from 2010 to 2013 in Abobo with highly significant results. There was a substantial decrease of clinical malaria reports falling of 77% from 231‰ to 52‰ (Fig 1a), an observation that paralleled a 55% decrease of distribution and use of ACT treatments (Fig 1b). Indeed, prevention measures were accompanied by a strong implementation of distribution of impregnated bed-nets (Fig 1c) for coverage of population. In 2013, the % of coverage by LLIN's reached 44.6% with an overall ongoing objective of 60% of coverage for the population in Abobo, a goal almost reached in 2016. All data are from Ministry of Health (RASS 2013—Rapport Annuel des Service de Sante, Ministère de la Sante et de la Lutte contre le SIDA, Côte Ivoire)

Characteristics of the cohort

Recruitment was done during the rainy season (from May to November). As shown in Table 1, overall mean age was low 13.5 (median = 11; 1–68 years) with variable ranges from 2010 to 2013. Of the four groups, one was significantly younger than the others *ie* in 2010, because of the heterogeneity from the available serum biobanks. To overcome such heterogeneity for analysis, individuals were categorized in 4 age-groups for further comparisons *ie* \leq 5; 6–10; 11–15; >15 years old (see Table 1).

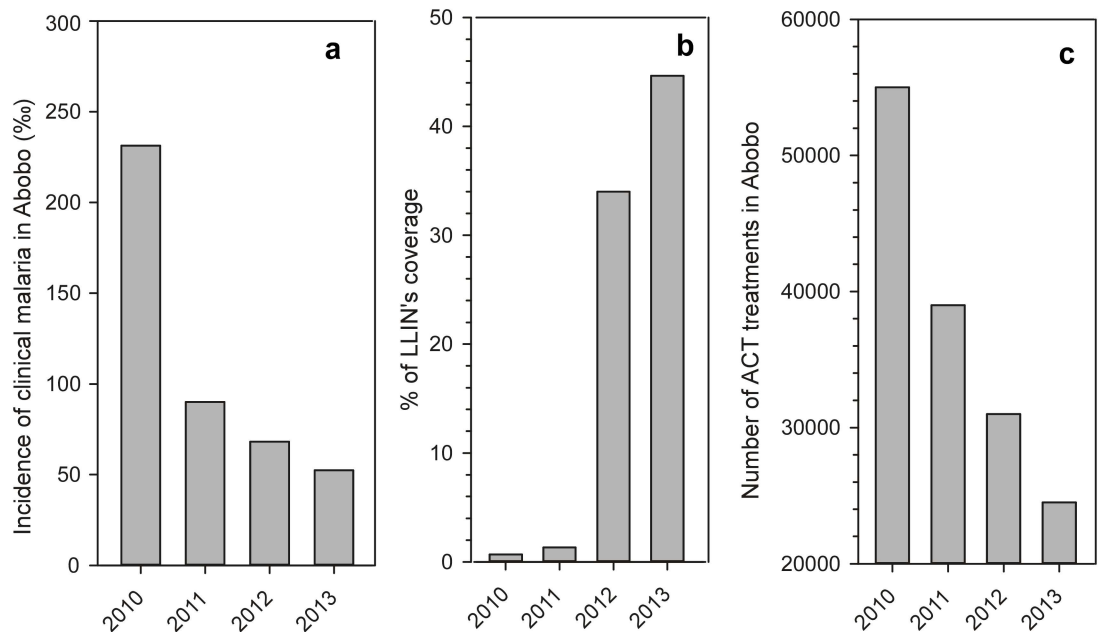


Fig 1. Indicators of malaria prevention measures in Abobo from 2010 to 2013. Longitudinal annual profiles of incidence of clinical malaria (a), percentage of population coverage by LLIN distribution (b) and number of ACT treatments distributed (c) are shown as histogram plots. These indicators illustrate the substantial increase of prevention measures from 2010 to 2013 (data from RASS 2013—Rapport Annuel des Service de Sante, Ministère de la Sante et de la Lutte contre le SIDA, Côte Ivoire).

doi:10.1371/journal.pone.0172899.g001

As shown in Table 1, levels of parasitemia measured upon recruitment were highly variable, with significant lower level in 2011 compared to the other years ($P < 0.001$). As a matter of fact, cross sectional recruitment from 2011 was different, involving asymptomatic individuals. Interestingly, in these individuals parasite carriage was far from negligible: 27% had positive RDT, 16% had a positive blood smear. In the set of sample tested here, median parasitemia reached 3200 trophozoite per μl .

There was a significant relationship between parasitemia (or log of parasitemia) and age of symptomatic individuals sampled in 2010, 2012 and 2013 ($P < 0.001$, $\rho = -0.30$), but not in 2011.

Mean prevalence and levels of antibody responses

As summarized in Table 3, mean prevalence levels of responders were variable depending upon Ags rather than year of analysis, ranging from 2.9% (IgG to gSG6 peptide in 2011) to 97.1% (IgG to MSP4p20 and schizont extract in 2011). There was no significant difference for prevalence levels between the different years for any Ag. Level of prevalence was generally homogeneous for a given Ag, allowing stratification in 3 levels: (i) Ags strongly recognized $>70\%$ positivity (schizont extract, SALSA, PF13, MSP1p19, MSP4p20); (ii) an intermediate recognition level [70%-25%] for CSP, LSA1₄₁, GLURP and AMA1 antigens and; (iii) Ags weakly recognized $<25\%$ positivity (LSA3, PmCSP, gSG6).

Regarding mean levels of Ab responses, excluding year 2011, almost Ab responses did not differ significantly from 2010 to 2013.

Importantly, asymptomatic individuals recruited in 2011 showed high Ab levels comparable with those of symptomatic patients from years 2012 and 2013. When comparing 2010 to

Table 3. Mean levels and prevalence of IgG Ab responses to the panel of antigens.

Antigens	2010		2011				2012		2013	
	Mean Ab level	Prevalence	Mean ¹ Ab level	Prevalence ¹	Mean ² Ab level	Prevalence ²	Mean Ab level	Prevalence	Mean Ab level	Prevalence
Schiz. Extr.	3,4	92.9%	3,7	97.1%	3,1	91.7%	3,3	87.5%	3,4	88.5%
CSP	109	40.4%	79	20.0%	90	33.3%	148	32.1%	126	41.9%
LSA1 ₄₁	349	64.9%	177	25.7%	262	41.7%	281	48.2%	299	53.2%
LSA3	83	12.3%	78	8.6%	53	4.2%	72	5.4%	67	6.5%
SALSA	413	80.7%	1354	88.6%	1041	70.8%	1273	76.8%	993	71.0%
GLURP	219	49.1%	417	80.0%	294	62.5%	361	57.1%	345	66.1%
AMA1	208	56.1%	257	57.1%	246	41.7%	292	50.0%	341	40.3%
PF13	1220	93.0%	2291	94.3%	2189	83.3%	1792	89.3%	1759	82.3%
MSP1p19	3346	93.0%	2347	88.6%	1670	100%	3485	94.6%	3131	96.8%
MSP4p20	2269	93.0%	3371	97.1%	2839	91.7%	2605	91.1%	1872	93.5%
PmCSP	136	7.0%	269	25.7%	293	29.2%	138	8.9%	125	8.1%
gSG6	58	29.8%	34	2.9%	35	8.3%	40	8.9%	38	6.5%

¹Mean antibody levels and prevalence of individuals RDT positive in 2011

²Mean antibody levels and prevalence of individuals RDT negative in 2011

doi:10.1371/journal.pone.0172899.t003

2011, some significant differences ($P < 0.05$) were found: lower levels for CSP, LSA1₄₁, LSA3, higher for SALSA, GLURP, PF13 and MSP4p20.

Relationship between Ab responses and circulating parasitemia

The analysis of relationship between Ab levels and circulating parasitemia for symptomatic patients on years 2010, 2012 and 2013, showed a significant negative relationship for schizont extract, CSP and LSA1₄₁ Ags (spearman test, $P < 0.005$, $\rho = -0.25$). The use of log transformation for parasitemia data led to a similar significant relationship with the same Ag targets (spearman test, $P < 10^{-3}$, $\rho = -0.21$).

Further analysis was done by stratifying levels of parasitemia in 4 classes: (i) positive [$< 10^4$]; (ii) elevated [$10^4 - 5 \times 10^4$]; (iii) high [$5 \times 10^4 - 10^5$]; (iv) very high [$> 10^5$] trophozoite per μl . Levels of Ab responses were not significantly different as function of levels of parasitemia for any Ag in 2010. Analysis of 2012 cohort showed significant high Ab responses against CSP and LSA1₄₁ ($P < 0.01$) in individual with the lowest level of parasitemia compared to the highest one ($< 10^4$ vs $5 \times 10^4 - 10^5$ trophozoite per μl). For patients recruited in 2013, similar result was found for Ab responses against schizont extract Ag ($P < 0.01$).

Analysis for the group of individuals recruited in 2011 was done after stratification according to RDT: negative, positive with/without circulating parasite. As illustrated on Fig 2 (plotting of Ab responses to schizont extract and Ags strongly recognized), there was a trend for higher responses in RDT positive individuals and a slight decrease when circulating parasite was detectable by blood smear. Significant different level were found only for MSP4p20 ($P = 0.048$).

Multiple linear regression adjusted on age-groups including all years but 2011 showed no Ab responses significantly ($P < 0.05$) associated with lower parasitemia level (just reaching significant for schizont extract and CSP, $P = 0.05$).

When analyzing year 2011 only, Ab response to GLURP were significantly associated with lower parasitemia level ($P = 0.03$).

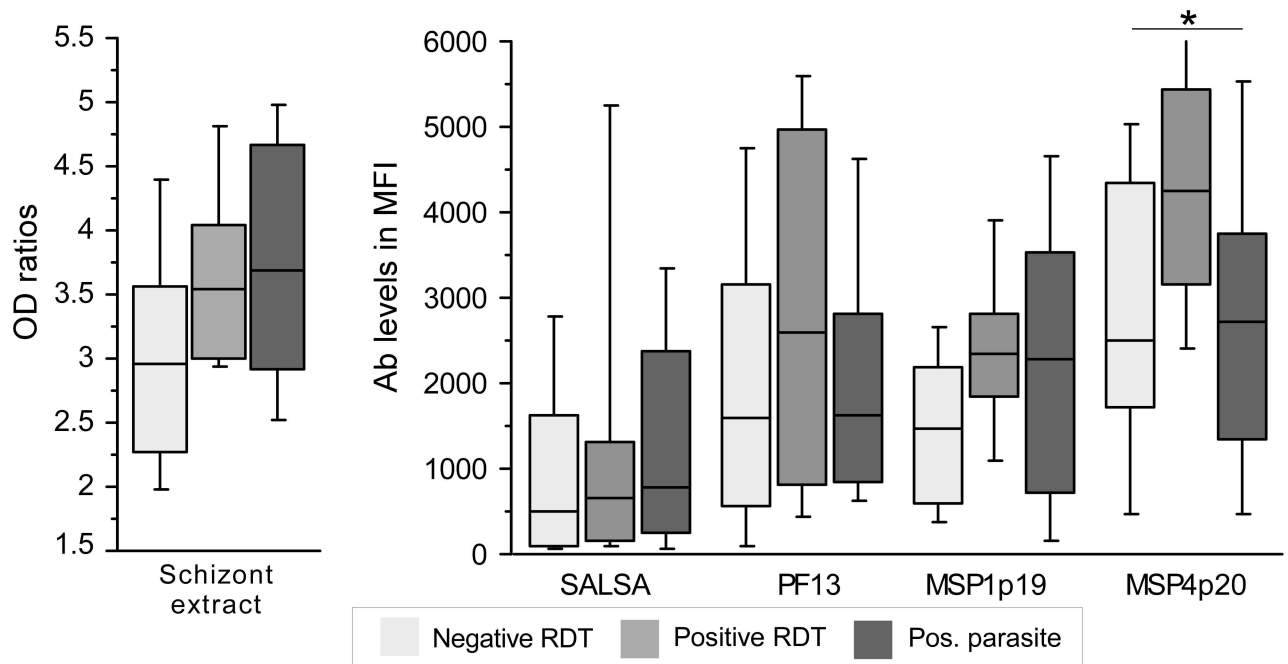


Fig 2. Ab responses as function of presence of circulating parasites in asymptomatic group recruited in 2011. Levels of Ab responses against schizont extract, SALSA, PF13, MSP4p20 and MSP1p19 are illustrated as boxplot for asymptomatic individuals recruited in 2011 as function of their parasite carriage *ie* RDT negative, RDT positive, RDT and blood smear positivity. Significant differences (Kruskal wallis test, $P < 0.05$) are indicated by an asterisk.

doi:10.1371/journal.pone.0172899.g002

When regression model included all years and was adjusted on age and years of follow-up, Ag targets associated with lower parasitemia were: GLURP ($P = 0.03$), MSP4p20 and PF13 ($P = 0.01$).

Age-groups associated longitudinal comparison of antibody levels in 2010, 2012 and 2013

Analysis of interrelation between antibody responses and age of individuals showed significant positive correlations ($P < 0.01$, Spearman rank test) for schizont extract CSP, SALSA, GLURP and PF13 Ags (ρ from 0.2 to 0.3).

Profiles of Ab responses by age-groups are shown on Figs 3 and 4. The age-related increasing profile of Ab responses from symptomatic patients regarding 5 strongly recognized Ag tested (SE, MSPs, SALSA and PF13) are observable on Fig 3, the profiles from the 7 other Ags are shown on Fig 4. A very limited year-associated decline of Ab responses from 2010 to 2103 was evidenced. Trend test from 2010 to 2013 (without 2011) adjusted on age groups showed significant trend for decrease only for Abs levels against gSG6 ($P < 0.001$)

Results from systematic year by year dichotomy comparisons (Mann Whitney test) are summarized in Table 4. The limited trend to decline when analyzing years 2010–2012 and 2013 was confirmed statistically. Only a slight decline was significant for PF13 Ag in younger age groups. Marginal significant decreases were evidenced in younger age-group for LSA1₄₁, LSA3 and gSG6 salivary peptide.

Discussion

There is a high level of malaria endemicity in Côte d'Ivoire [1] and a considerable heterogeneity in the geographic distribution of transmission intensity as function of climatic variation

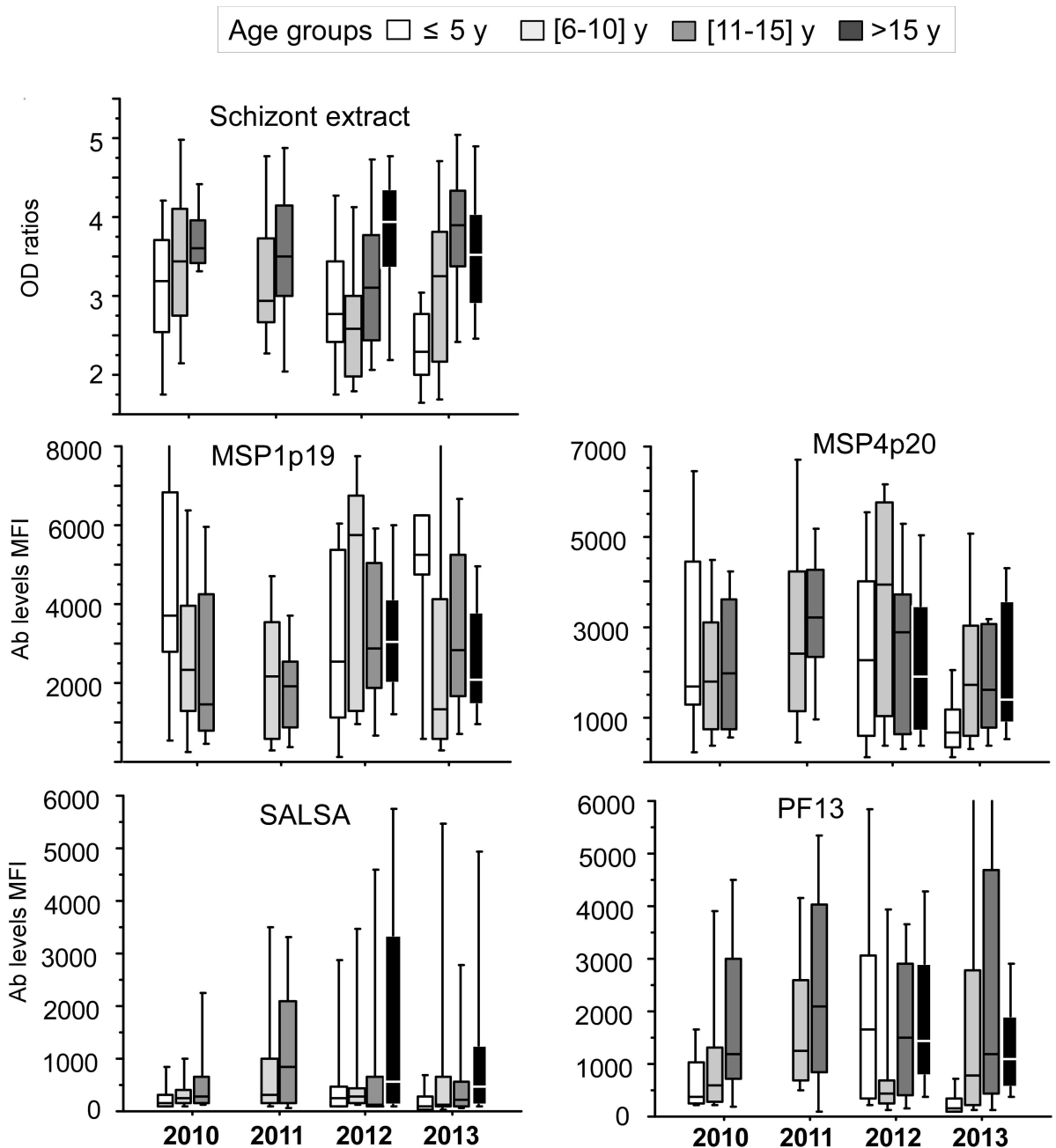


Fig 3. Ab responses against strongly recognized *P. falciparum* antigens in age-groups from 2010 to 2013. Profiles of antibody responses measured by ELISA or multiplex magnetic bead based fluorescence assay are plotted as mean OD ratio or Median fluorescence levels from 2010 to 2013 for individuals from 4 different age groups: < 5 years old (empty), 6-10yo (light grey), 11–15 years old (dark grey), >15 years old (black). Schizont extract and antigens strongly recognized are shown ie MSPs, SALSA and PF13.

doi:10.1371/journal.pone.0172899.g003

from north to south, and environmental factors including human activities [22,23,24]. National surveillance system reported an increase of presumed and clinical cases from 2.8 to 4.7 million in 2012 and 2013, respectively [1] highlighting the strengthening of the surveillance and recording process. However, malaria remains a major threat, responsible of 43% of the consultations in health center, with an important impact on children under 5 year old and

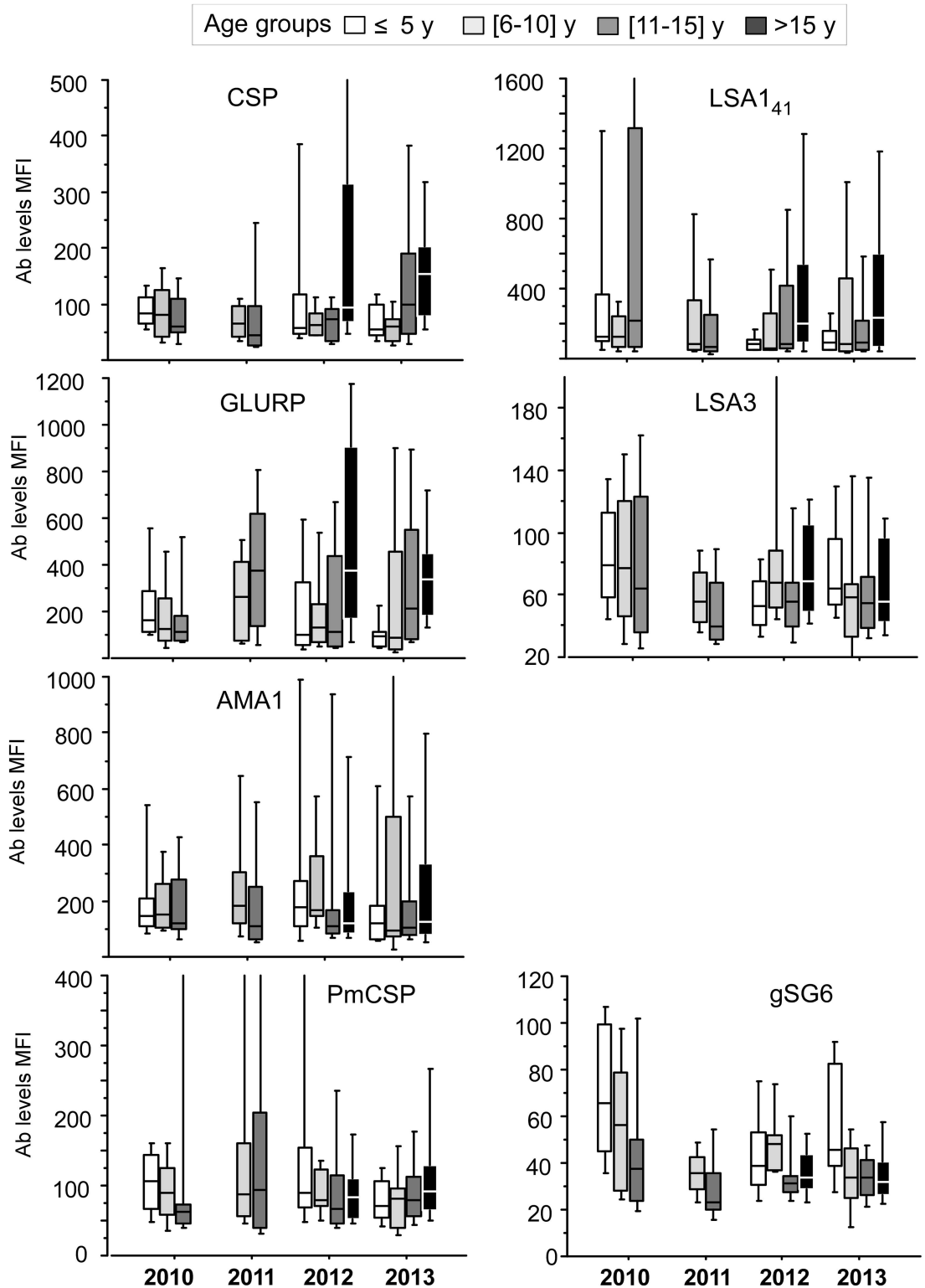


Fig 4. Age-group profiles of Ab responses against *Plasmodium* and *A. gambiae* antigens from 2010 to 2013. Antibody responses measured by magnetic bead based fluorescence assay are plotted as Median fluorescence levels from 2010 to 2013 for individuals from 4 different age groups: < 5 years old (empty), 6-10yo (light grey), 11–15 years old (dark grey), >15 years old (black). On this figure are plotted antibody responses to *P. falciparum* Ags tested not shown on Fig 3 together with *P. malariae* CSP and *A. gambiae* salivary peptide gSG6.

doi:10.1371/journal.pone.0172899.g004

Table 4. Systematic comparison year by year of levels of IgG Ab responses in age-stratified groups.

	2010 vs 2012				2010 vs 2013				2012 vs 2013				
	All	<6y	6_10y	11_15y	All	<6y	6_10y	11_15y	All	<6y	6_10y	11_15y	>15y
Schiz. Extrc.	ns	ns	0.01	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CSP	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
LSA1 ₄₁	ns	0.03	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
LSA3	ns	0.02	ns	ns	0.03	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
SALSA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
GLURP	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
AMA1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PF13	0.03	0.04	ns	ns	ns	0.01	ns	ns	ns	0.01	ns	ns	ns
MSP1p19	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
MSP4p20	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PmCSP	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
gSG6	0.003	0.01	ns	ns	ns	ns	0.04	ns	ns	ns	0.04	ns	ns

doi:10.1371/journal.pone.0172899.t004

pregnant women. Consequently, malaria has a strong socio-economic impact, responsible for 40% and 42% of school and working absenteeism, respectively. Families spend about 25% of their income for the treatment and prevention of malaria.

The scaling up of integrated interventions strategies, as reported for Abobo, showed clearly a substantial positive result between 2010 and 2013 in Abobo (Fig 1), underlining the necessity to increase monitoring and evaluation for close follow-up of elimination strategy.

A pilot study conducted in 3 different settings of Côte d’Ivoire highlighted the potential of *Plasmodium* species-specific antibodies as indicators for exposure when analyzing multi-target Ab responses in acute malaria patients from sentinel health center. Malaria transmission in these settings including Abobo was high; profile of antibody responses was found different according to the location of the setting, accurately reflecting the immune background [11]. A similar approach has been tested in the present study to investigate the longitudinal profile of antibody responses in the peri-urban sentinel setting of Abobo where malaria burden strongly decreased between 2010 and 2013.

Despite the observed decrease of malaria burden, analysis of the antibody responses to such array of antigens in this study could not sustain any substantial decrease of immune background level in those patients. Indeed, antibody responses were high as expected in individuals where parasite invasion induced clinical symptoms. The age-related significant increase of antibody responses found here witnesses a profile of a site with high ongoing endemic transmission, whose actual decrease is not yet reflected by detectable variation of the immune background. Several factors can contribute to this observation: firstly the recruitment of symptomatic individuals with high antibody boosting, secondly the short time frame of only two years between the strong implementation of prevention measures conducted in 2010–2011 and the latest measure in 2013 and thirdly the lack of biomarkers adapted to precise exposure estimates [25].

Studies using serological analyses as indicators of malaria transmission generally involve recruitments in a relatively stable state for host-parasite interaction, usually of asymptomatic individuals in different settings and/or in longitudinal manner. Several antigens have been used as markers of exposure and malaria risk [9,26], including comparable multiplex antigen arrays [13,27]. Reducing the number of antigens as biomarkers would be an optimal solution as described by Cook and al using a single antigen such AMA1 for mapping effectiveness of control intervention in an island environment of Guinea [28]. As a general matter, several

antigens are required at least for analyzing biomarkers of immunity that may probably differ from those used as biomarkers of exposure [25]. Several studies involved MSP1p19, AMA-1 and MSP2 as serological markers for medium and long-term indicator of malaria transmission in settings with various altitudes [29] or mapping heterogeneity of transmission in low endemic places [30]. However, until now, there are no clear correlates of anti-malarial immunity with antibody responses against a given target.

Numerous results and data underline antibodies to recombinant merozoite antigens as valuable biomarkers of immunity [6,31]. Therefore among these antigens, MSP1p19 is an interesting target for exposure and protection. It has been used as a relevant tool for longitudinal retrospective sero-surveillance in the Gambia providing valuable information about population immunity as well as exposure, as transmission declines and immunity wanes [8]. The baculovirus expressed recombinant MSP1p19 used here, with relevant conformational structure [32,33], was shown to correlate with protection [20] and had good concordance with ELISA measures when used coated on beads [12].

Altogether, analysis of antibody responses in case of longitudinal symptomatic malaria recruitment would rather require testing a multiplex array of antigens as a potential valuable tool. Antibody responses to different parasite targets and other plasmodium species were useful: in this study, IgG response to *Anopheles* salivary peptide gSG6-P1 antigen was the only indicator of a significant trend to decrease, a relevant marker of risk for malaria transmission already underlined [34,35].

Regarding parasitemia, no trend of differential susceptibility was evidenced in the different groups. Levels of parasitemia were comparable (except in asymptomatic individuals from 2011), in line with the almost similar levels of immunity measured in 2010, 2012 and 2013. Interestingly, young individuals harbored higher parasitemia and a significant relationship between high levels of Ab to GLURP, PF13 and MSP4p20 and lower parasitaemia was found. These results confirm that antimalarial antibodies may play an important supportive role in the therapeutic response to antimalarial drugs during acute falciparum malaria as already observed [36,37,38]. In 2013, the % of individual clearing their parasitemia in 24h was lower than in 2012 (55% vs 88%, $P < 10^{-3}$ by fisher exact test). Whether this observation relates with a lower efficient level of immunity for parasite clearance requires further longitudinal investigation on a larger cohort of individuals.

Taken together, this study lacked of power for analyzing potential decrease of immunity expected to parallel the observable decrease of malaria burden due to effectiveness of control measures. However, this study underlined several interesting information regarding analysis of immune responses in high endemic setting. The 2011 particular recruitment shows clearly that immune background and natural immunity are substantially high. A proportion of 27% of young schoolchildren had positive RDT, in these individuals 16% had circulating parasitemia over 10^5 trophozoite per micoliter of blood without any clinical symptoms. In these children, elevated antibody levels and prevalence against the array of antigens were found reaching higher levels than symptomatic individuals for SALSA, GLURP, PF13 and MSP4p20. In non-parasitized RDT positive individuals, there was a trend towards highest levels of antibody (Fig 3), indicating a background of robust induction of antibody responses and a persistence of antibodies from earlier infections without clinical manifestations [10]. It is likely that strong induction and boosting of antibody responses might occur in Abobo, which might have obscured the baseline antibody levels and consequently hiding the expected decrease of immune levels in symptomatic individuals as it has been observed in different settings [11]. Further investigations are needed, targeting a wider scale recruitment of population by including simultaneously cross sectional survey of asymptomatic schoolchildren and symptomatic patients.

Indeed, recruitment of symptomatic patients in sentinel centers is a convenient possibility for investigation and follow-up of malaria immune responses which is a mandatory public health structure that supports patients and relevant bio-clinical follow-up. However, this study showed clearly that active additional recruitment of asymptomatic individuals is needed for accurate analysis in such areas where malaria remains strongly endemic.

Conclusion

This longitudinal immuno-epidemiological study conducted in peri-urban endemic setting of Abobo shows that immunity profiling using biomarker has the potential for immunological mapping of intervention and help for prevention measures towards malaria elimination. However, analysis of longitudinal variations of immunity in high endemic setting requires further studies delineating the relationship between seroprevalence and transmission intensity. The limited but useful snapshot picture of the high immune background from this study underlines the need for multiple sero-surveys in enlarged cohort of individual among populations in Côte d'Ivoire with different levels of exposure for accurate immune profiling.

Acknowledgments

We are indebted to Dr Shirley Longacre who generously provided the PfMSP1p19 and MSP4 (Vaximax) and to Dr Odile Mercereau Puijalon (Institut Pasteur, Paris) for constant support to the study and providing PF13 antigen. We thank Pr Alioune Dieye for work support in the laboratories. We are grateful to Pr Mireille Dosso for constant support of the project.

Author Contributions

Conceptualization: AOT RP IVW AT JAD.

Data curation: RP CL AOT DK.

Formal analysis: RP CL AOT DK MLV.

Funding acquisition: RP AOT.

Investigation: RP AOT DK MLV.

Methodology: RP AOT MLV AT JAD SB.

Project administration: RP AOT MLV DK.

Resources: AOT RP IVW AT SB.

Software: CL RP.

Supervision: RP AOT.

Validation: RP CL IVW.

Visualization: RP DK.

Writing – original draft: RP DK AOT MLV.

Writing – review & editing: RP DK AOT MLV AT JAD CL SB.

References

1. WHO. WHO World Malaria Report 2014. http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/en/. 2014;(Dec 17,2012).

2. WHO. WHO World Malaria Report 2010, 2011, 2013. <http://www.who.int/malaria/publications/>. 2010,2011,2013.
3. Corran P, Coleman P, Riley E, Drakeley C. Serology: a robust indicator of malaria transmission intensity? *Trends Parasitol.* 2007; 23(12):575–82. Epub 2007/11/09. doi: [10.1016/j.pt.2007.08.023](https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.08.023) PMID: [17988945](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17988945/)
4. Drakeley C, Cook J. Chapter 5. Potential contribution of sero-epidemiological analysis for monitoring malaria control and elimination: historical and current perspectives. *Adv Parasitol.* 2009; 69:299–352. Epub 2009/07/23. doi: [10.1016/S0065-308X\(09\)69005-9](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(09)69005-9) PMID: [19622411](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19622411/)
5. Crompton PD, Kayala MA, Traore B, Kayentao K, Ongoiba A, Weiss GE, et al. A prospective analysis of the Ab response to *Plasmodium falciparum* before and after a malaria season by protein microarray. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(15):6958–63. Epub 2010/03/31. doi: [10.1073/pnas.1001323107](https://doi.org/10.1073/pnas.1001323107) PMID: [20351286](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20351286/)
6. Richards JS, Arumugam TU, Reiling L, Healer J, Hodder AN, Fowkes FJ, et al. Identification and prioritization of merozoite antigens as targets of protective human immunity to *Plasmodium falciparum* malaria for vaccine and biomarker development. *J Immunol.* 2013; 191(2):795–809. Epub 2013/06/19. doi: [10.4049/jimmunol.1300778](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300778) PMID: [23776179](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23776179/)
7. Osier FH, Fegan G, Polley SD, Murungi L, Verra F, Tetteh KK, et al. Breadth and magnitude of antibody responses to multiple *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with protection from clinical malaria. *Infect Immun.* 2008; 76(5):2240–8. Epub 2008/03/05. doi: [10.1128/IAI.01585-07](https://doi.org/10.1128/IAI.01585-07) PMID: [18316390](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18316390/)
8. van den Hoogen LL, Griffin JT, Cook J, Sepulveda N, Corran P, Conway DJ, et al. Serology describes a profile of declining malaria transmission in Farafenni, The Gambia. *Malaria journal.* 2015; 14:416. Epub 2015/10/27. doi: [10.1186/s12936-015-0939-1](https://doi.org/10.1186/s12936-015-0939-1) PMID: [26492873](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26492873/)
9. Greenhouse B, Ho B, Hubbard A, Njama-Meya D, Narum DL, Lanar DE, et al. Antibodies to *Plasmodium falciparum* antigens predict a higher risk of malaria but protection from symptoms once parasitemic. *J Infect Dis.* 2011; 204(1):19–26. Epub 2011/06/02. doi: [10.1093/infdis/jir223](https://doi.org/10.1093/infdis/jir223) PMID: [21628654](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21628654/)
10. Akpogheneta OJ, Dunyo S, Pinder M, Conway DJ. Boosting antibody responses to *Plasmodium falciparum* merozoite antigens in children with highly seasonal exposure to infection. *Parasite Immunol.* 2010; 32(4):296–304. Epub 2010/04/20. doi: [10.1111/j.1365-3024.2009.01193.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2009.01193.x) PMID: [20398230](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20398230/)
11. Koffi D, Toure AO, Varela ML, Vigan-Womas I, Beourou S, Brou S, et al. Analysis of antibody profiles in symptomatic malaria in three sentinel sites of Ivory Coast by using multiplex, fluorescent, magnetic, bead-based serological assay (MAGPIX). *Malaria journal.* 2015; 14(1):509. Epub 2015/12/23.
12. Perraut R, Richard V, Varela ML, Trape JF, Guillotte M, Tall A, et al. Comparative analysis of IgG responses to *Plasmodium falciparum* MSP1p19 and PF13-DBL1alpha1 using ELISA and a magnetic bead-based duplex assay (MAGPIX(R)-Luminex) in a Senegalese meso-endemic community. *Malaria journal.* 2014; 13:410. Epub 2014/10/19. doi: [10.1186/1475-2875-13-410](https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-410) PMID: [25326042](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25326042/)
13. Ambrosino E, Dumoulin C, Orlandi-Pradines E, Remoue F, Toure-Balde A, Tall A, et al. A multiplex assay for the simultaneous detection of antibodies against 15 *Plasmodium falciparum* and *Anopheles gambiae* saliva antigens. *Malar J.* 2010; 9:317. Epub 2010/11/10. doi: [10.1186/1475-2875-9-317](https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-317) PMID: [21059211](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21059211/)
14. Vigan-Womas I, Guillotte M, Juillerat A, Vallieres C, Lewit-Bentley A, Tall A, et al. Allelic diversity of the *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 entails variant-specific red cell surface epitopes. *PLoS One.* 2011; 6(1):e16544. Epub 2011/02/08. doi: [10.1371/journal.pone.0016544](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016544) PMID: [21298021](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21298021/)
15. Bonnet S, Petres S, Holm I, Fontaine T, Rosario S, Roth C, et al. Soluble and glyco-lipid modified baculovirus *Plasmodium falciparum* C-terminal merozoite surface protein 1, two forms of a leading malaria vaccine candidate. *Vaccine.* 2006; 24(33–34):5997–6008. Epub 2006/07/04. doi: [10.1016/j.vaccine.2006.04.069](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.04.069) PMID: [16814434](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16814434/)
16. Polson HE, Conway DJ, Fandeur T, Mercereau-Puijalon O, Longacre S. Gene polymorphism of *Plasmodium falciparum* merozoite surface proteins 4 and 5. *Mol Biochem Parasitol.* 2005; 142(1):110–5. Epub 2005/05/10. doi: [10.1016/j.molbiopara.2005.02.009](https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.02.009) PMID: [15878789](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15878789/)
17. Perraut R, Varela ML, Mbengue B, Guillotte M, Mercereau-Puijalon O, Vigan-Womas I. Standardization of a multiplex magnetic bead-based assay for simultaneous detection of IgG to *Plasmodium* antigens. *J Immunol Tech Infect Dis.* 2015; 4(2):1–8.
18. Aribot G, Rogier C, Sarthou JL, Trape JF, Balde AT, Druilhe P, et al. Pattern of immunoglobulin isotype response to *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens in individuals living in a holoendemic area of Senegal (Dielmo, west Africa). *Am J Trop Med Hyg.* 1996; 54(5):449–57. Epub 1996/05/01. PMID: [8644897](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8644897/)
19. Perraut R, Marrama L, Diouf B, Fontenille D, Tall A, Sokhna C, et al. Distinct surrogate markers for protection against *Plasmodium falciparum* infection and clinical malaria identified in a Senegalese

- community after radical drug cure. *J Infect Dis.* 2003; 188(12):1940–50. Epub 2003/12/16. doi: [10.1086/379838](https://doi.org/10.1086/379838) PMID: [14673775](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14673775/)
20. Perraut R, Marrama L, Diouf B, Sokhna C, Tall A, Nabeth P, et al. Antibodies to the conserved C-terminal domain of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 and to the merozoite extract and their relationship with in vitro inhibitory antibodies and protection against clinical malaria in a Senegalese village. *J Infect Dis.* 2005; 191(2):264–71. Epub 2004/12/21. doi: [10.1086/426398](https://doi.org/10.1086/426398) PMID: [15609237](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15609237/)
 21. Perraut R, Guillotte M, Drame I, Diouf B, Molez JF, Tall A, et al. Evaluation of anti-*Plasmodium falciparum* antibodies in Senegalese adults using different types of crude extracts from various strains of parasite. *Microbes Infect.* 2002; 4(1):31–5. Epub 2002/02/05. PMID: [11825772](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11825772/)
 22. Knoblauch AM, Winkler MS, Archer C, Divallo MJ, Owuor M, Yapo RM, et al. The epidemiology of malaria and anaemia in the Bonikro mining area, central Cote d'Ivoire. *Malar J.* 2014; 13:194. Epub 2014/06/03. doi: [10.1186/1475-2875-13-194](https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-194) PMID: [24884607](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24884607/)
 23. Koudou BG, Doumbia M, Janmohamed N, Tschannen AB, Tanner M, Hemingway J, et al. Effects of seasonality and irrigation on malaria transmission in two villages in Cote d'Ivoire. *Ann Trop Med Parasitol.* 2010; 104(2):109–21. Epub 2010/04/22. doi: [10.1179/136485910X12607012374154](https://doi.org/10.1179/136485910X12607012374154) PMID: [20406578](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20406578/)
 24. Koudou BG, Tano Y, Keiser J, Vounatsou P, Girardin O, Klero K, et al. Effect of agricultural activities on prevalence rates, and clinical and presumptive malaria episodes in central Cote d'Ivoire. *Acta Trop.* 2009; 111(3):268–74. Epub 2009/05/20. doi: [10.1016/j.actatropica.2009.05.006](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.05.006) PMID: [19450537](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19450537/)
 25. Helb DA, Tetteh KK, Felgner PL, Skinner J, Hubbard A, Arinaitwe E, et al. Novel serologic biomarkers provide accurate estimates of recent *Plasmodium falciparum* exposure for individuals and communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2015; 112(32):E4438–47. Epub 2015/07/29. doi: [10.1073/pnas.1501705112](https://doi.org/10.1073/pnas.1501705112) PMID: [26216993](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26216993/)
 26. Druilhe P, Pradier O, Marc JP, Miltgen F, Mazier D, Parent G. Levels of antibodies to *Plasmodium falciparum* sporozoite surface antigens reflect malaria transmission rates and are persistent in the absence of reinfection. *Infect Immun.* 1986; 53(2):393–7. Epub 1986/08/01. PMID: [3525412](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3525412/)
 27. Sarr JB, Orlandi-Pradines E, Fortin S, Sow C, Cornelle S, Rogerie F, et al. Assessment of exposure to *Plasmodium falciparum* transmission in a low endemicity area by using multiplex fluorescent microsphere-based serological assays. *Parasite Vectors.* 2011; 4:212. Epub 2011/11/09.
 28. Cook J, Kleinschmidt I, Schwabe C, Nseng G, Bousema T, Corran PH, et al. Serological markers suggest heterogeneity of effectiveness of malaria control interventions on Bioko Island, equatorial Guinea. *PLoS One.* 2011; 6(9):e25137. Epub 2011/10/08. doi: [10.1371/journal.pone.0025137](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025137) PMID: [21980386](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21980386/)
 29. Drakeley CJ, Corran PH, Coleman PG, Tongren JE, McDonald SL, Carneiro I, et al. Estimating medium- and long-term trends in malaria transmission by using serological markers of malaria exposure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2005; 102(14):5108–13. Epub 2005/03/29. doi: [10.1073/pnas.0408725102](https://doi.org/10.1073/pnas.0408725102) PMID: [15792998](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15792998/)
 30. Bousema T, Youssef RM, Cook J, Cox J, Alegana VA, Amran J, et al. Serologic markers for detecting malaria in areas of low endemicity, Somalia, 2008. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16(3):392–9. Epub 2010/03/06. doi: [10.3201/eid1603.090732](https://doi.org/10.3201/eid1603.090732) PMID: [20202412](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20202412/)
 31. Fowkes FJ, Richards JS, Simpson JA, Beeson JG. The relationship between anti-merozoite antibodies and incidence of *Plasmodium falciparum* malaria: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* 2010; 7(1):e1000218. Epub 2010/01/26. doi: [10.1371/journal.pmed.1000218](https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000218) PMID: [20098724](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20098724/)
 32. Holm I, Nato F, Mendis KN, Longacre S. Characterization of C-terminal merozoite surface protein-1 baculovirus recombinant proteins from *Plasmodium vivax* and *Plasmodium cynomolgi* as recognized by the natural anti-parasite immune response. *Mol Biochem Parasitol.* 1997; 89(2):313–9. Epub 1997/11/19. PMID: [9364976](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9364976/)
 33. del Portillo HA, Longacre S, Khouri E, David PH. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1991; 88(9):4030–4. Epub 1991/05/01. PMID: [2023952](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2023952/)
 34. Badu K, Siangla J, Larbi J, Lawson BW, Afrane Y, Ong'echa J, et al. Variation in exposure to *Anopheles gambiae* salivary gland peptide (gSG6-P1) across different malaria transmission settings in the western Kenya highlands. *Malar J.* 2012; 11:318. Epub 2012/09/12. doi: [10.1186/1475-2875-11-318](https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-318) PMID: [22963464](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22963464/)
 35. Poinsignon A, Cornelle S, Mestres-Simon M, Lanfrancotti A, Rossignol M, Boulanger D, et al. Novel peptide marker corresponding to salivary protein gSG6 potentially identifies exposure to *Anopheles* bites. *PLoS One.* 2008; 3(6):e2472. Epub 2008/06/26. doi: [10.1371/journal.pone.0002472](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002472) PMID: [18575604](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18575604/)

36. Goh YS, Peng K, Chia WN, Siau A, Chotivanich K, Gruner AC, et al. Neutralizing Antibodies against *Plasmodium falciparum* Associated with Successful Cure after Drug Therapy. PLoS One. 2016; 11(7): e0159347. Epub 2016/07/20. doi: [10.1371/journal.pone.0159347](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159347) PMID: [27427762](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27427762/)
37. Mawili-Mboumba DP, Borrmann S, Cavanagh DR, McBride JS, Matsiegui PB, Missinou MA, et al. Antibody responses to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 and efficacy of amodiaquine in Gabonese children with P. falciparum malaria. J Infect Dis. 2003; 187(7):1137–41. Epub 2003/03/28. doi: [10.1086/368414](https://doi.org/10.1086/368414) PMID: [12660928](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12660928/)
38. Mayxay M, Chotivanich K, Pukrittayakamee S, Newton P, Loareesuwan S, White NJ. Contribution of humoral immunity to the therapeutic response in falciparum malaria. Am J Trop Med Hyg. 2001; 65(6):918–23. Epub 2002/01/17. PMID: [11791999](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11791999/)

Evènements scientifiques

Durant ce programme de thèse, des participations à différents évènements scientifiques, sur le plan national, sous-régional et international, ont favorisé le contact et l'échange avec les experts dans le domaine d'étude ainsi que d'autres disciplines scientifiques. Lors de ces rencontres, les travaux de cette thèse ont également été présentés sous forme de communication orale ou poster :

- Poster presentation at luminex corporation meeting 2016 xMAP Connect in Amsterdam, the Netherlands. From November, 16-17, 2016
- Poster presentation at luminex corporation meeting 2015 xMAP Connect in Amsterdam, the Netherlands. From November, 25-26, 2015
- Poster presentation at the annual congress of french Association of Parasitology and Mycology in Bordeaux (France) from May 20-22, 2015
- Oral presentation in congress of African Parasitology Society (SOAP), December, 3-5, 2014, University Felix Houphouet Boigny of cocody, Abidjan (Ivory Coast)
- Oral presentation in inaugural session SIGID (System Immunology and Genetic of Infectious Diseases) in France, Pasteur institute in lille 5 february 2015
- Attending The fifth West African Regional Workshop on Cell Biology of Infectious Pathogens june 17-28, 2013 Departement of Biochemistry, cell and molecular biology, University of Ghana, Legon, Accra



Longitudinal analysis of antibody responses in symptomatic malaria by using multiplex, fluorescent, magnetic, bead-based serological assay (MAGPIX™) in a peri-urban site of Cote d'Ivoire between 2010 and 2013

David KOFFI^{1,4,5}, Marie-Louise VARELA², Cheikh Loucoubar², Inès VIGAN-WOMAS³, Aissatou TOURE², Offianan Andre TOURE¹, Joseph Allico DJAMAN^{1,4}, Sylviane PIED⁵ and Ronald PERRAUT²

1 Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, Unité de Paludologie, Abidjan, Côte d'Ivoire

2 Institut Pasteur de Dakar, Unité d'Immunologie, Dakar, Sénégal

3 Institut Pasteur de Madagascar, Unité d'Immunologie, Antananarivo, Madagascar

4 UFR BIOSCIENCES, university FHB of Cote d'Ivoire

5 CIL, Inserm U1019/CNRS UMR8204, Institut Pasteur de Lille, France and Centre d'Immunologie, Institut Pasteur, Paris, France

Background and Aim

On the road towards malaria eradication, assessment of both malaria exposure and efficacy of anti-vectorial and therapeutic strategies is a key component of management and the follow up of field interventions. The simultaneous use of several antigens (Ags) as serological markers has the potential for accurate evaluation and monitoring of malaria exposure. Here we aimed to measure longitudinal evolution of immune background in an urban setting recruiting confirmed clinical malaria consultants.

Methods

A retrospective serological cross-sectional study was carried out using 234 samples taken from 2010 to 2013 in peri-urban sentinel facility of Cote d'Ivoire. Antibody responses to recombinant proteins or BSA-peptides *ie* 8 antigens from: (i) *Plasmodium falciparum* (PfAMA1, PfMSP4, PfMSP1, PfEMP1-DBL1 α 1-PF13, PflSA1-41, PflSA3-NR2, PfGLURP and PfCSP); (ii) *P. malariae* (PmCSP); (iii) *Anopheles gambiae* salivary (gSG6-P1) were measured using magnetic bead-based multiplex immunoassay (MBA). Total anti- *P. falciparum* IgG responses against schizont lysate from african 07/03 strain (adapted to culture) and 3D7 reference strain was measured by ELISA.

Results

A high prévalence (7-93%) and high levels of antibody responses to most of the antigens were found. However, analysis revealed only a marginal decreasing trend of Ab responses from 2010 to 2013 that did not parallel the observed reduction of clinical malaria prévalence following the implementation of intervention in this area. There was a significant inverse correlation between Ab responses and parasitaemia ($P < 10^{-3}$, $\rho = 0.3$). The particular recruitment of asymptomatic individuals in 2011 underlined a substantial background level of immunity reaching almost equivalent levels as symptomatic patients, possibly obscuring clear yearly expected decay variations.

Conclusion:

The use of cross-sectional clinical malaria surveys and MBA can help to identify endemic sites where control measures have unequal impact providing relevant information about population immunity and possible decrease of transmission. However, when immunity is substantially boosted despite observable clinical decline, enlarged cohort, including asymptomatic recruitment, are needed to monitor the impact of control measures on immunity level.



Multiplex antibody profiling using a magnetic bead-based multiplex assay (MAGPIX®-Luminex) for monitoring immunity levels and help guiding integrated malaria control measures in Ivorian communities

David KOFFI ^{1,4}, Offianan Andre TOURE ¹, Marie-Louise VARELA ², Inès VIGAN-WOMAS ³,
Aissatou TOURE², Joseph Allico DJAMAN ^{1,4} Sylviane PIED ⁵and Ronald PERRAUT ²

1 Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, Unité de Paludologie, Abidjan, Côte d'Ivoire

2 Institut Pasteur de Dakar, Unité d'Immunologie, Dakar, Sénégal

3 Institut Pasteur de Madagascar, Unité d'Immunologie, Antananarivo, Madagascar

4 UFR BIOSCIENCES, university FHB of Cote d'Ivoire

5 CIIL, Inserm U1019/CNRS UMR8204, Institut Pasteur de Lille, France and Centre d'Immunologie, Institut Pasteur, Paris, France

Background: Advances in malaria control have reduced the burden of disease exposure to parasite infections. The consequences on naturally acquired immunity are unclear. We have previously validated a magnetic bead-based immunoassay (MBA) to assess antibody levels in populations living in endemic areas. The impact of malaria control on immunity was monitored using MBA in sentinel sites from Ivory Coast, in patients consulting for symptomatic malaria attacks.

Material and Methods: Based on novel magnetic-bead-based-immunoassays using the MagPix®-Luminex technology, several parameters including antigen amounts for coupling, plasma dilution and bead quantity were optimized. Under these conditions, antibody responses to recombinant proteins or BSA-peptides including 8 *Plasmodium falciparum* (PfAMA1, PfMSP4, PfMSP1, PfEMP1-DBL1 α 1-PF13, PfLSA1-41, PfLSA3-NR2, PfGLURP and PfCSP), one *P. malariae* (PmCSP) and one *Anopheles gambiae* salivary (gSG6-P1) antigens were simultaneously investigated. Total anti- *P. falciparum* IgG responses against schizont lysate from African 07/03 strain (adapted to culture) and reference 3D7 strain was measured. Blood samples (n = 94) of patients consulting for symptomatic malaria attacks and living in three different malaria endemic settings (rural and periurban) were analysed.

Results: There was a strong negative correlation between multiplex-MFI antibody of all antigens and parasitaemia. We found variable seroprevalence of Ab responses in the three sentinel sites against biomarkers, but only LSA1_41 marked significant difference between the three villages. IgG response against whole schizont extract of 07/03 and 3D7 strain did not permit to discriminate immunity level in the three villages, contrary to biomarkers. A high prevalence of IgG to *P. malariae* CSP underlines the importance of this species behind *falciparum* in clinical burden of malaria in Côte d'Ivoire.

Conclusion : The MBA Magpix technology is robust and can be conveniently implemented in laboratories established in endemic areas. Symptomatic malaria leads to strong Ab responses against a large array of target antigens. Only the analysis of Ab responses in a multiplex system, validates an accurate differential indicator of the level of immunity. Biomarkers such as those used here, can serve as a risk criterion with respect to the degree of parasitic infection, and an indicator of implementation of strategies for prevention and control at the local level.

Paving the way for Research on Global Health and One Health

International Scientific Symposium
Institut Pasteur International Network

Paris, October 14th-16th, 2015

Immunity profiling as a biomarker of integrated malaria control measures in Senegalese and Ivorian communities using a magnetic bead-based multiplex assay (MAGPIX®-Luminex)

Perraut R¹, Varela ML¹, Koffi D², Toure A¹, Tall A³, Trape JF⁴, Sokhna C³, Vigan-Womas I^{5,6}, Béourou S², Mercereau-Pujalon O⁵, Touré AO² & Richard V²

¹Institut Pasteur de Dakar, Unités d'Immunologie et d'Immunogénétique, Dakar, Sénégal

²Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, Malariology Unit, Abidjan, Côte d'Ivoire

³Institut Pasteur de Dakar, Unité d'Epidémiologie, Dakar, Sénégal

⁴Institut de Recherche pour le Développement (IRD), URMITE, Dakar, Sénégal

⁵Institut Pasteur, Unité d'Immunologie Moléculaire du Parasite, 25 Rue du Dr Roux, 75015 Paris, France

⁶Institut Pasteur de Madagascar, Unité d'Immunologie des Maladies Infectieuses, Antananarivo, Madagascar

Background: Advances in malaria control have reduced the burden of disease and exposure to parasite infections. The consequences on naturally acquired immunity is unclear. We have previously validated a magnetic bead-based immunoassay (MBA) to assess antibody levels in populations living in endemic areas. The impact of malaria control on immunity was monitored using MBA in two different endemic settings in Sénégal and in sentinel sites from Cote d'Ivoire.

Methods: Cross-sectional blood samples collected in 2002 and 2013 were analysed in two Senegalese villages, Dielmo and Ndiop, where malaria decreased from holoendemic and mesoendemic respectively, in 2002 to pre-elimination in both settings in 2013. Symptomatic malaria cases were recruited in endemic sentinel sites of Cote d'Ivoire: Abobo (township), Korogho (northern savannah) and Man (western forest). Recombinant proteins or peptides derived from *P. falciparum* liver or blood stages (CSP, LSA1₄₁, LSA3, SALSA, PF13-DBL1 α , GLURP, AMA1, MSP1p19, MSP4), *P. malariae* CSP and *An. Gambiae* gSG6, covalently linked to a color-coded microsphere (Luminex™ beads) were used in multiplex assay (MBA). Classical ELISA was used for somatic Ag (AgT).

Results: From 2002 to 2013, prevalence and levels to the *P. falciparum* multiplex biomarkers decreased by a mean of 65% and 60% in Dielmo and Ndiop, ranging from 50% (MSP1p19) to 72% (GLURP), reaching similar age-associated profile in both settings, with a barely detectable response in <7y children. In Cote d'Ivoire, seroprevalence and antibody levels showed significant differences between the three sites. Parasitemia and antibody levels were inversely correlated, and dependent on the endemic setting (Korhogo > Man > Abobo). A high prevalence of IgG to *P. malariae* CSP suggested a significant contribution of this species to malaria in Cote d'Ivoire.

Conclusion: The age-associated antibody profiles reflected the level of endemicity in Senegal as well as in Cote d'Ivoire. Reducing transmission induced profound changes in the age-associated antibody distribution in Senegal. In cross-sectional clinical malaria surveys, MBA can also identify endemic sites where control measures have unequal impact. MBA thus provides relevant information about population immunity and is a convenient biomarker of transmission decline. Sero-surveillance has the potential to help monitoring progress in malaria control.



CONGRES DE LA SOCIETE FRANCAISE
DE PARASITOLOGIE

20-21-22 MAI 2015

Domaine du Haut-Carré
43 rue Pierre Noailles, 33400
TALENCE (BORDEAUX)

Use of biomarkers of antibody responses in symptomatic malaria to differentiate epidemiological context: a pilot study in three sentinel sites of Cote d'Ivoire with multiplex fluorescent magnetic bead-based assay (MAGPIX™)

David KOFFI^{1,4}, Offianan Andre TOURE¹, Marie-Louise VARELA², Inès VIGAN-WOMAS³, Aissatou TOURE², Joseph Allico DJAMAN^{1,4}, Sylviane PIED⁵ and Ronald PERRAUT²

1 Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, Unité de Paludologie, Abidjan, Côte d'Ivoire

2 Institut Pasteur de Dakar, Unité d'Immunologie, Dakar, Sénégal

3 Institut Pasteur de Madagascar, Unité d'Immunologie, Antananarivo, Madagascar

4 UFR BIOSCIENCES, university FHB of Cote d'Ivoire

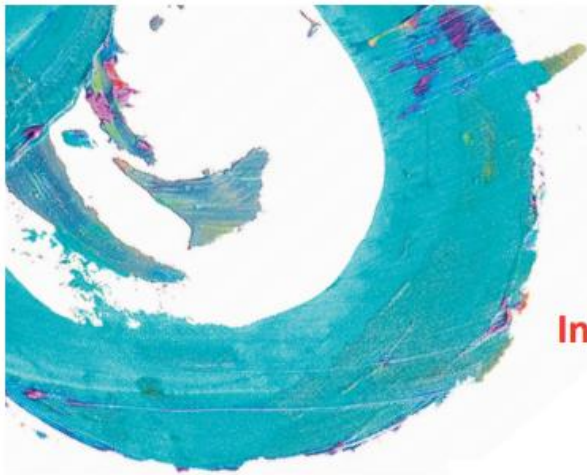
5 CIIL, Inserm U1019/CNRS UMR8204, Institut Pasteur de Lille, France and Centre d'Immunologie, Institut Pasteur, Paris, France

Background: In the context of the agenda of malaria eradication, assessment of both malaria exposure and efficacy of anti-vectorial and therapeutic strategies is a key component of management and the follow-up of field interventions. The simultaneous uses of several antigens (Ags) as serological markers lead to potential accurate evaluation of malaria exposure. Usually, recruitment of large number of exposed asymptomatic individuals is required for analysis. Here we recruited patients consulting with confirmed clinical malaria in different settings and used a novel cost-effective, compact and reliable magnetic bead-based multiplex immunoassay (MBA) using the MAGPIX®-Luminex system.

Material and Methods: Based on a novel magnetic-bead-based-immunoassays using the MagPix®-Luminex technology, several parameters including antigen amounts for coupling, plasma dilution and bead quantity were optimized. Under these conditions, antibody responses to recombinant proteins or BSA-peptides including 8 *Plasmodium falciparum* (PfAMA1, PfMSP4, PfMSP1, PfEMP1-DBL1 α 1-PF13, PflSA1-41, PflSA3-NR2, PfGLURP and PfCSP), one *P. malariae* (PmCSP) and one *Anopheles gambiae* salivary (gSG6-P1) antigens were simultaneously investigated. Total anti-*P. falciparum* IgG responses against schizonte lysate from Africa 07/03 strain (adapted to culture) and 3D7 strain was measured by ELISA. To up-date the data on malaria burden, a cross-sectional study was carried out in 2013 at the population level in 3 sentinels with different transmission intensities in Cote d'Ivoire.

Results: There was a strong negative correlation between multiplex-MFI antibody of all antigens and parasitaemia. We found variable seroprévalence of Ag in the three sentinel site against biomarkers, but only LSA1_41 marked significant difference between the three villages. IgG response against whole schizonte extract of 07/03 and 3D7 strain can't permit to discriminate immunity level in the three villages. We also found high prévalence of *P. malariae*, highlighting the importance of this specie behind falciparum in clinical burden of malaria in Cote d'Ivoire.

Conclusion : The MBA Magpix technology is robust and can be conveniently implemented in laboratories established in endemic areas. Symptomatic malaria leads to strong Ag responses against the target antigens. Only the analysis Ab responses in a multiplex system with defined Ag, validates an accurate differential indicator of the level of immunity. Biomarkers used can serve as a risk criterion with respect to the degree of parasitic infection, and to evaluate the implementation of strategies for prevention and control at the local level.



System
Immunology and
Genetics of
Infectious
Diseases

Laboratoire International Associé

Inaugural session of SIGID in France

Institut Pasteur de Lille - 5 February 2015

9.00 - 12.00 am - amphithéâtre de l'IBL

Analysis of antibody responses in symptomatic malaria to differentiate epidemiological context: a pilot study in three sentinel sites of Cote d'Ivoire with multiplex fluorescent magnetic bead-based assay (MAGPIX™)

David KOFFI¹, Offianan Andre TOURE¹ Marie-Louise VARELA², Inès VIGAN-WOMAS³, Joseph Allico DJAMAN¹ and Ronald PERRAUT²

1 Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, Unité de Paludologie, Abidjan, Côte d'Ivoire

2 Institut Pasteur de Dakar, Unité d'Immunologie, Dakar, Sénégal

3 Institut Pasteur de Madagascar, Unité d'Immunologie, Antananarivo, Madagascar

Background: Monitoring changes in malaria transmission intensity and disease prevalence through surveillance allows health authorities to plan and evaluate health services and control programs. Here we use several antigens (Ags) as serological markers, with the magnetic bead-based immunoassay (MBA) to evaluate malaria exposure in three different sentinel site of Cote d'Ivoire.

Methods: Recombinant proteins or peptides derived from liver or blood stage antigens of *Plasmodium falciparum* (CSP, LSA141, LSA3, SALSA, PF13-DBL1 α 1, GLURP, AMA1, MSP1p19, MSP4p20), the CSP of *Plasmodium malariae* and the salivary glands antigen of *Anopheles gambiae* (gSG6) were covalently linked to a colour-coded microsphere (Luminex™ beads) for the multiplex assay. ELISA was used for whole parasite extract antigen. Blood samples (n = 94) of patients consulting for symptomatic malaria attacks and living in three different malaria endemic settings (rural and periurban) were analysed.

Results: Highly variable seroprevalence of antibody responses against parasite antigens was found ranging from 3 (gSG6) to 97 % (MSP4p20). A marked prevalence and significantly higher level of antibodies was found in patients from the rural site (Korhogo), those harbouring the lowest level of parasitaemia. The use of whole schizont extract could not discriminate immunity level, contrary to parasite-derived recombinant proteins or peptides. Prevalence of responders to LSA141 and levels of antibodies to PF13 were significantly different between the three settings. Moreover, the post-treatment clearance of parasites was clearly associated with a significantly higher level of antibody response for almost 50 % of the parasite antigens tested.

Conclusion: The multiplex MBA-Magpix technology assay provides an accurate high throughput monitoring of parasite-specific antibodies during symptomatic malaria. The levels of antibody responses may provide a risk criterion with respect to the degree of parasitic infection. Additionally, they can be used as an indicator in the implementation of malaria prevention and local control strategies

Données magpix et Elisa au niveau des sites sentinelles

Sample	age	DO	ratio	95		45		43		45		145		43		105		71		59		56		88		35	
				msp4	rep	CSP	rep	LSA1	rep	LSA3	rep	GLURP	rep	Salsa	rep	MSP1	rep	PF13	rep	AMA1	rep	Pm CSP	rep	Saliv	rep	BSA	
01-003	20	0,57	4,8	879	1	920	1	1475	1	27	0	1410	1	886	1	766	1	246	1	195	1	37	0	53	0	24	
01-004	12	0,45	4,0	1216	1	69	0	869	1	35	0	672	1	29	0	2148	1	58	0	68	0	31	0	57	0	31	
01-005	14	0,63	5,2	541	1	66	0	39	0	47	0	409	1	306	1	316	1	3820	1	146	1	69	0	102	0	43	
01-006	7	0,19	2,2	1651	1	23	0	986	1	20	0	970	1	21	0	1658	1	68	0	40	0	25	0	30	0	20	
01-007	40	0,53	4,5	1031	1	212	1	1309	1	23	0	727	1	105	1	888	1	174	1	258	1	27	0	36	0	24	
01-008	2	0,19	2,4	2034	0	30	0	79	0	40	0	34	0	29	0	180	0	62	0	69	0	36	0	55	0	34	
01-009	20	0,87	6,9	80	1	35	0	34	0	47	0	74	0	25	0	177	0	741	1	58	0	32	0	64	0	30	
01-010	14	0,36	3,4	2904	1	36	0	27	0	43	0	57	0	249	1	403	1	102	0	453	1	157	1	60	0	35	
01-011	54	0,81	6,5	410	1	94	1	484	1	41	0	652	1	59	0	1598	1	148	1	53	0	29	0	117	0	23	
01-012	3	0,07	1,3	283	1	63	0	215	1	259	1	38	0	35	0	1646	1	60	0	87	0	33	0	51	0	34	
01-013	46	0,81	6,5	1590	1	469	1	157	1	676	1	1166	1	60	0	226	1	102	0	158	1	370	1	56	0	22	
01-014	12	0,62	5,2	606	1	69	0	284	1	39	0	292	1	372	1	1551	1	631	1	33	0	27	0	41	0	22	
01-015	5	0,78	6,3	264	1	29	0	46	0	34	0	380	1	62	0	2150	1	259	1	814	1	28	0	118	0	25	
01-021	18	0,65	5,4	1305	1	45	0	149	1	62	0	563	1	33	0	1791	1	131	0	129	1	36	0	67	0	33	
01-022	3	0,09	1,4	380	0	96	1	115	1	50	0	38	0	24	0	1192	1	77	0	43	0	31	0	207	1	32	
01-023	12	0,07	1,3	49	1	34	0	27	0	29	0	27	0	37	0	61	0	73	0	118	1	28	0	40	0	29	
01-024	8	0,64	5,3	1276	1	118	1	36	0	33	0	635	1	664	1	765	1	47	0	79	0	31	0	20	0	20	
01-026	8	0,52	4,5	1113	1	96	1	483	1	35	0	78	0	35	0	577	1	832	1	110	0	33	0	45	0	33	
01-027	9	0,59	4,9	4231	0	46	0	114	1	44	0	271	0	53	0	1395	1	626	1	236	1	70	0	86	0	48	
01-028	6	0,08	1,3	24	0	16	0	24	0	16	0	20	0	18	0	224	1	21	0	21	0	25	0	18	0	18	
01-029	10	0,26	2,6	127	1	21	0	37	0	219	1	90	0	82	0	75	0	447	1	564	1	311	1	46	0	23	
01-030	18	0,43	3,8	730	1	34	0	465	1	21	0	393	1	22	0	62	0	82	0	68	0	35	0	30	0	21	
01-031	12	0,27	2,7	714	1	545	1	1285	1	31	0	30	0	29	0	468	1	195	1	49	0	98	0	43	0	31	
01-032	8	0,47	4,1	413	0	27	0	344	1	39	0	2006	1	30	0	1747	1	630	1	112	0	44	0	39	0	26	
01-033	8	0,46	4,1	164	1	27	0	451	1	39	0	39	0	28	0	919	1	80	0	56	0	37	0	104	0	34	
01-034	9	0,45	4,0	284	1	27	0	35	0	57	0	245	0	41	0	1573	1	158	1	132	1	39	0	219	1	30	
01-035	9	0,83	6,6	244	1	46	0	50	0	27	0	289	0	26	0	2254	1	54	0	161	1	26	0	66	0	22	

01-036	16	0,37	3,4	348	1	29	0	948	1	43	0	30	0	23	0	2834	1	56	0	40	0	30	0	36	0	26
01-037	8	0,93	7,3	240	0	23	0	221	1	21	0	554	1	20	0	943	1	59	0	26	0	24	0	21	0	20
01-038	15	0,48	4,2	179	0	46	0	856	1	46	0	284	0	42	0	1355	1	811	1	93	0	35	0	92	0	26
02-001	7	0,01	0,8	4550	1	688	1	5022	1	69	0	4044	1	77	0	2576	1	6345	1	306	1	3202	1	452	1	54
02-002	8	0,94	7,4	2625	1	235	1	2124	1	67	0	1688	1	2332	1	1825	1	1955	1	1169	1	38	0	274	1	33
02-003	10	1,36	10,4	3085	1	1008	1	793	1	71	0	774	1	48	0	2098	1	67	0	105	0	37	0	53	0	26
02-005	5	0,38	3,5	413	1	199	1	1810	1	51	0	79	0	130	1	749	1	2831	1	285	1	426	1	123	0	46
02-006	29	0,02	1,0	4630	1	108	1	99	1	51	0	245	0	198	1	3435	1	3418	1	336	1	57	0	71	0	42
02-007	22	0,77	6,2	1968	1	1635	1	998	1	65	0	4104	1	5617	1	5266	1	265	1	3081	1	51	0	379	1	49
02-008	43	0,60	5,0	3509	1	271	1	2303	1	1035	1	617	1	53	0	325	1	1448	1	229	1	1093	1	92	0	25
02-009	20	0,38	3,5	9602	1	226	1	195	1	66	0	381	1	301	1	8673	1	1846	1	1453	1	56	0	153	0	52
02-011	12	0,70	5,7	1302	1	721	1	575	1	163	1	864	1	1019	1	226	1	886	1	160	1	53	0	80	0	64
02-013	42	0,26	2,6	206	1	62	0	714	1	196	1	275	0	55	0	1786	1	216	1	165	1	59	0	119	0	85
02-014	1	0,01	1,0	1822	1	2200	1	1445	1	307	1	3098	1	2041	1	2752	1	1166	1	147	1	140	1	44	0	33
02-015	24	0,33	3,1	948	1	839	1	360	1	61	0	5175	1	1034	1	1223	1	781	1	209	1	160	1	133	0	44
02-016	24	0,32	3,0	1112	1	2834	1	1201	1	41	0	5848	1	756	1	3771	1	427	1	118	1	53	0	125	0	32
02-017	50	0,37	3,4	871	1	91	1	135	1	106	1	58	0	136	1	460	1	339	1	503	1	44	0	132	0	56
02-018	10	0,35	3,2	1077	1	1171	1	8171	1	42	0	143	0	103	1	91	0	167	1	888	1	38	0	38	0	29
02-019	8	0,10	1,5	1245	1	26	0	31	0	41	0	38	0	40	0	106	0	3454	1	151	1	35	0	82	0	36
02-020	10	0,28	2,7	1762	1	693	1	45	0	26	0	49	0	35	0	156	0	1710	1	76	0	919	1	52	0	25
02-028	45	1,11	8,6	4207	1	90	1	163	1	40	0	1806	1	721	1	1870	1	681	1	2218	1	334	1	66	0	27
02-030	70	0,78	6,3	8118	1	2587	1	359	1	327	1	341	1	196	1	5642	1	1264	1	2199	1	333	1	134	0	46
02-032	6	0,25	2,6	4096	1	65	0	84	0	68	0	174	0	41	0	631	1	162	1	134	1	40	0	65	0	40
02-034	1,0	0,01	0,9	90	0	52	0	662	1	60	0	42	0	31	0	1233	1	91	0	89	0	37	0	39	0	34
02-038	2	0,81	6,5	925	1	658	1	465	1	252	1	4962	1	654	1	81	0	1598	1	2385	1	125	1	68	0	28
02-041	35	0,57	4,8	4124	1	83	0	215	1	67	0	226	0	116	1	1441	1	1006	1	599	1	37	0	83	0	35
02-042	3	0,70	5,7	3294	1	715	1	798	1	84	0	232	0	60	0	1882	1	1392	1	200	1	170	1	157	0	25
02-046	11	0,34	3,2	8924	1	371	1	327	1	668	1	7701	1	7656	1	1105	1	874	1	166	1	321	1	72	0	47
02-049	64	0,38	3,5	1019	1	1110	1	67	0	51	0	3326	1	577	1	394	1	2270	1	589	1	187	1	114	0	25

02-069	1	0,19	2,2	3838	1	53	0	289	1	40	0	38	0	47	0	77	0	1907	1	202	1	35	0	49	0	35
02-074	2	0,15	1,8	1790	1	318	1	89	1	88	0	41	0	26	0	3610	1	75	0	47	0	33	0	56	0	30
02-079	4	0,08	1,4	3519	1	102	1	290	1	64	0	61	0	82	0	2678	1	8149	1	300	1	48	0	109	0	55
03-003	20	0,32	4,0	910	1	60	0	42	0	28	0	183	0	22	0	67	0	1306	1	38	0	25	0	160	0	22
03-006	5	0,56	6,4	624	1	40	0	86	0	33	0	30	0	46	0	3305	1	105	0	107	0	29	0	98	0	26
03-007	2	0,27	3,6	232	1	45	0	73	0	54	0	59	0	86	0	82	0	1070	1	213	1	42	0	79	0	50
03-008	1	0,04	1,1	100	0	52	0	45	0	78	0	175	0	143	1	111	0	328	1	148	1	45	0	140	0	60
03-009	2	0,31	3,0	447	1	26	0	125	1	26	0	42	0	28	0	1890	1	167	1	54	0	30	0	25	0	24
03-011	59	1,31	10,0	670	1	67	0	52	0	637	1	1014	1	95	1	1130	1	1051	1	747	1	170	1	27	0	22
03-012	1	0,97	7,6	72	0	63	0	206	1	41	0	52	0	40	0	1792	1	238	1	97	0	36	0	82	0	36
03-015	3	0,15	1,9	88	0	27	0	29	0	35	0	33	0	26	0	86	0	160	1	61	0	31	0	121	0	33
03-016	6	0,58	4,9	2062	1	30	0	656	1	30	0	33	0	36	0	1138	1	167	1	46	0	30	0	28	0	29
03-017	1,0	0,59	5,0	122	0	67	0	55	0	38	0	33	0	55	0	941	1	87	0	203	1	30	0	43	0	32
03-018	8	0,19	2,1	2455	1	25	0	65	0	33	0	49	0	27	0	724	1	501	1	46	0	43	0	44	0	30
03-021	57	0,43	3,8	377	1	65	0	32	0	54	0	287	0	29	0	77	0	117	0	44	0	51	0	43	0	44
03-022	10	0,62	6,6	1141	1	27	0	27	0	76	0	1440	1	30	0	1873	1	240	1	146	1	33	0	744	1	26
03-023	12	0,08	1,3	49	0	30	0	69	0	36	0	49	0	27	0	49	0	161	1	49	0	34	0	62	0	35
03-024	5	0,08	1,4	215	1	25	0	81	0	26	0	30	0	24	0	1435	1	96	0	40	0	30	0	110	0	26
03-025	14			214	1	19	0	40	0	28	0	889	1	21	0	44	0	141	1	40	0	33	0	94	0	24
03-026	10	0,08	1,3	179	0	21	0	55	0	26	0	525	1	23	0	1749	1	70	0	37	0	27	0	38	0	23
03-028	17	0,09	1,5	694	1	636	1	63	0	33	0	157	0	66	0	1956	1	209	1	153	1	74	0	50	0	32
03-029	13	0,06	1,2	2291	1	26	0	35	0	80	0	624	1	41	0	1704	1	122	0	105	0	31	0	51	0	32
03-030	56	0,21	2,6	649	1	116	1	128	1	528	1	719	1	376	1	406	1	295	1	582	1	41	0	42	0	23
03-031	21	0,51	5,5	2306	1	155	1	1774	1	43	0	82	0	94	1	535	1	1291	1	234	1	39	0	46	0	38
03-032	3	0,15	2,0	137	0	24	0	37	0	31	0	29	0	29	0	81	0	104	0	97	0	28	0	59	0	29
03-034	15	0,36	4,1	230	1	28	0	504	1	19	0	381	1	67	0	154	0	616	1	98	0	267	1	33	0	20
03-035	6	0,28	3,3	1600	1	39	0	458	1	39	0	819	1	281	1	807	1	188	1	121	1	43	0	43	0	24
03-036	25	0,27	3,2	273	1	2139	1	106	1	22	0	374	1	24	0	157	0	211	1	75	0	29	0	29	0	23
03-037	3	0,04	1,0	246	1	30	0	28	0	32	0	29	0	26	0	42	0	33	0	64	0	29	0	40	0	30

03-039	10	0,01	0,7	1343	1	25	0	37	0	30	0	214	0	35	0	736	1	95	0	69	0	26	0	60	0	24
03-040	4	0,17	2,3	1757	1	57	0	61	0	48	0	48	0	39	0	1322	1	154	1	204	1	34	0	60	0	38
03-041	12	0,09	1,5	1959	1	80	0	35	0	193	1	1392	1	328	1	1952	1	422	1	263	1	34	0	76	0	30
03-042	13	0,55	5,9	1613	1	26	0	88	1	23	0	67	0	106	1	292	1	1601	1	105	0	44	0	87	0	23
03-044				445	1	359	1	563	1	21	0	836	1	879	1	420	1	170	1	46	0	160	1	27	0	23
03-045	4	0,22	2,7	838	1	29	0	43	0	38	0	322	1	29	0	2395	1	564	1	103	0	31	0	38	0	31

Données densitométriques de l'auto-réactivité au niveau des sites sentinelles

No	groups	S0	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20
01-003	abobo	0,19	0,33	0,12	0,27	0,3	0,44	0,64	0,52	1,1	0,42	1,26	1,90	0,36	0,24	0,17	1,63	0,85	0,09	0,2	0,19	0,11
01-004	abobo	0,95	0,61	0,52	0,61	0,6	0,39	0,73	0,77	0,8	1,11	1,65	0,69	0,51	0,91	0,36	0,85	0,42	0,45	0,733	0,08	0,10
01-005	abobo	0,24	0,2	1,17	0,4	0,9	0,46	0,82	0,7	1,1	1,32	0,73	1,56	3,12	1,18	0,97	0,54	0,68	0,11	0,396	0,51	0,30
01-006	abobo	0,89	0,25	0,15	0,33	0,5	0,47	0,42	0,43	0,5	0,55	0,40	0,27	0,19	0,19	0,14	1,94	0,38	0,22	0,436	0,34	0,20
01-007	abobo	0,00	0,05	0,14	0,69	0,7	0,47	1,09	0,6	0,7	0,81	0,29	0,85	0,33	0,17	0,13	0,77	0,44	0,39	0,131	0,13	0,26
01-008	abobo	0,10	0,12	0,17	0,37	0,6	0,83	0,82	0,97	1,3	0,54	0,66	0,83	0,42	0,38	0,24	0,44	0,35	0,09	0,178	0,25	0,15
01-009	abobo	0,98	0,68	0,96	1,44	2	1,6	2,52	1,3	4,5	1,27	2,99	2,52	1,03	0,98	0,83	0,92	0,40	6,71	3,266	0,18	0,39
01-010	abobo	1,20	0,31	0,24	0,22	0,4	0,33	0,46	0,96	1,6	2,81	0,27	0,73	0,61	0,51	0,62	0,38	0,37	0,34	0,43	0,21	1,92
01-011	abobo	0,27	0,24	0,15	0,21	0,2	0,22	0,27	0,31	0,9	0,63	1,08	1,67	0,27	0,48	0,32	1,24	0,42	0,09	0,252	0,21	0,10
01-012	abobo	1,01	0,91	0,89	0,07	0,5	0,28	0,26	0,27	0,5	0,31	0,64	0,72	0,41	0,55	0,28	0,49	0,21	0,26	0,419	0,17	0,17
01-013	abobo	0,71	0,14	0,33	0,95	1,8	2,32	2,83	5,34	2,8	0,45	1,60	4,27	1,68	1,15	1,29	0,82	2,21	0,35	0,215	0,24	0,31
01-014	abobo	0,49	0,44	0,55	0,42	0,4	0,47	0,49	1,16	0,9	0,28	0,60	0,42	0,13	0,27	0,17	0,50	0,64	0,21	0,39	0,37	0,57
01-015	abobo	0,54	0,29	0,29	0,23	0,6	0,73	0,51	0,51	0,9	0,59	0,58	1,23	0,5	0,66	0,35	0,62	0,43	0,1	0,12	0,24	0,06
01-021	abobo	1,20	0,85	0,82	1,1	1	0,83	0,67	1,22	1,1	0,96	0,78	0,96	0,35	0,34	0,08	0,92	0,42	0,48	0,343	0,32	0,95
01-022	abobo	1,29	0,01	0,01	0,02	0	0,02	0,11	0,62	0,4	0,42	0,02	0,05	0,09	0,05	0,01	0,02	0,00	0	0,002	0,00	0,00
01-	abobo	0,56	0,26	0,16	0,29	0,4	0,42	0,37	0,51	1	0,28	0,51	0,69	0,46	0,32	0,24	0,34	0,46	0,18	0,208	0,15	0,99

023																						
01-024	abobo	0,10	0	2,92	0,08	0,4	0,76	1,43	2,18	1,5	4,17	2,64	3,57	1,91	0,86	0,66	9,30	7,05	0,06	0,33	1,31	0,02
01-026	abobo	0,93	0,28	1,47	0,33	1	0,74	1,09	1,03	1,1	1,41	1,39	0,68	0,5	0,65	0,36	0,97	0,32	0,33	0,223	0,14	0,25
01-027	abobo	0,18	0,12	0,17	0,3	0,4	0,31	0,59	0,45	0,6	0,17	0,21	0,68	0,5	0,25	0,34	0,42	0,23	0,2	0,323	0,14	0,15
01-028	abobo	0,63	0,69	0,40	0,22	0,2	0,2	0,39	0,94	0,5	0,31	0,38	0,51	0,53	0,35	0,27	0,38	0,26	0,15	0,245	0,20	0,30
01-029	abobo	0,00	0	0,00	0,03	0,1	0,08	0,14	1,11	1,1	0,24	0,04	0,12	0,2	0,18	0,03	0,08	0,01	0	0,001	0,00	0,00
01-030	abobo	0,11	1,19	1,03	0,38	1	0,54	0,83	1,04	1,2	0,51	0,92	1,22	0,37	0,36	0,11	0,40	0,16	0,13	0,183	0,15	0,17
01-031	abobo	0,29	0,62	0,31	0,46	0,6	0,66	0,56	0,45	0,9	0,43	0,37	0,57	0,14	0,13	0,05	0,41	0,25	0,17	0,286	0,31	0,10
01-032	abobo	0,15	0,16	0,13	0,24	0,3	0,82	1,93	1,12	1,3	0,49	0,68	0,93	0,28	0,37	0,33	0,35	0,32	0,17	3,544	0,23	0,17
01-033	abobo	0,34	0,61	0,36	0,35	0,5	0,42	0,37	0,73	0,7	0,3	0,49	0,60	0,06	0,03	0,11	0,50	0,36	0,21	1,536	0,43	0,57
01-034	abobo	0,48	0,52	0,40	0,59	0,5	0,41	0,45	0,88	1,1	0,32	0,39	0,47	0,17	0,26	0,19	0,66	0,34	0,12	0,359	0,29	0,28
01-035	abobo	1,67	0,12	0,10	0,33	0,3	0,44	0,78	1,11	1,2	0,34	0,55	0,65	0,2	0,40	0,32	0,68	0,39	0,16	0,182	0,15	0,18
01-036	abobo	0,20	0,26	0,16	0,26	0,3	0,29	0,33	0,65	1,2	0,32	0,60	0,76	0,36	0,36	0,22	0,41	0,27	0,17	0,222	0,17	1,53
01-037	abobo	0,00	0	0,00	0,01	0	0,08	0,24	0,75	1,2	0,34	0,36	0,65	0,21	0,15	0,12	0,39	0,25	0,01	0,024	0,02	0,01
01-038	abobo	1,14	0,41	0,35	0,44	0,9	0,72	1,31	0,77	1	1,62	1,24	1,07	3,48	4,41	1,53	0,80	0,60	0,19	0,141	0,07	0,12
01-039	abobo	0,00	0,01	0,01	0,02	0,1	0,2	0,19	0,8	1	0,13	0,16	0,23	0,12	0,04	0,03	0,13	0,00	0	0,005	0,03	0,01
02-	koro	0,02	0,4	0,76	0,84	0,9	1,16	1,69	3,64	2,1	0,72	1,14	2,16	1,12	1,44	0,65	2,36	0,62	1,4	0,393	0,27	0,42

001																						
02-002	koro	0,06	0,22	0,22	0,71	1,9	2,64	4,98	3,26	1,8	2,59	2,52	3,73	2,69	1,30	1,01	2,71	1,12	0,17	0,43	0,65	0,20
02-003	koro	0,06	0,37	0,29	0,25	0,3	0,26	0,44	0,43	0,9	0,38	0,47	0,40	0,24	0,33	0,15	0,63	0,24	0,05	0,155	0,13	0,10
02-004	koro	0,20	0,3	0,10	0,25	0,5	0,72	0,37	0,86	1,1	0,28	0,51	0,89	0,46	0,72	0,31	0,29	0,12	0,05	0,117	0,25	0,04
02-005	koro	0,01	0,07	0,56	0,67	0,7	0,97	1,16	1,45	1,6	0,45	0,99	1,48	0,95	1,20	0,96	0,83	0,59	0,11	0,173	0,24	0,50
02-006	koro	2,75	0,39	0,68	0,61	1,9	2	1,42	0,56	2,1	2,32	0,94	0,43	0,39	0,87	2,74	2,84	0,98	1,01	1,208	0,26	0,22
02-007	koro	0,51	0,55	0,37	0,28	0,5	0,57	0,69	0,99	0,9	1,18	0,98	1,06	0,47	0,52	0,2	0,56	0,57	0,26	0,526	0,16	0,51
02-008	koro	0,94	0,45	0,36	0,62	1,6	1,21	1,18	0,75	0,9	6,04	3,64	0,57	0,5	0,57	0,25	0,70	0,47	0,24	0,235	0,13	0,14
02-009	koro	0,74	0,43	0,47	0,54	0,8	0,45	0,63	1,23	1,7	0,37	1,08	1,27	0,95	0,73	0,25	0,64	0,45	0,35	0,525	0,98	0,52
02-011	koro	0,28	0,33	0,17	0,11	0,1	0,14	0,14	0,57	0,9	0,34	0,66	0,55	0,1	0,17	0,25	0,40	0,13	0,1	0,257	0,21	0,09
02-012	koro	0,00	0,01	0,04	0,01	0,1	0,08	0,16	0,41	0,7	0,6	0,41	1,13	2,46	2,19	0,18	0,90	0,37	0	0	0,00	0,03
02-013	koro	4,47	0,21	0,35	0,77	1,5	1,53	1,99	4,46	1,8	1,68	1,07	2,05	1,75	1,71	1	1,21	0,26	0,22	0,084	0,11	0,27
02-014	koro	0,36	0,39	0,23	0,08	0,4	5,38	2,76	1,77	1	0,37	1,04	1,65	0,32	0,33	0,3	0,44	0,35	0,11	0,248	0,24	0,19
02-015	koro	0,90	0,96	0,77	0,88	1	0,89	0,71	0,76	0,8	0,71	0,98	1,28	0,72	0,66	0,42	0,58	0,63	0,2	0,181	0,23	0,86
02-016	koro	0,61	0,9	0,95	0,57	0,4	0,33	0,58	0,64	0,8	1,28	1,35	1,61	0,6	0,43	0,13	0,82	0,39	0,35	0,059	0,33	0,27
02-018	koro	0,39	0,16	0,12	0,18	0,4	0,42	0,37	0,84	1	0,41	0,69	0,68	0,5	0,41	0,33	0,40	0,20	0,2	0,271	0,27	0,13
02-	koro	0,04	0,11	0,16	0,24	0,8	0,87	1,36	1,44	2,6	0,81	0,90	1,11	0,67	0,57	0,66	1,03	0,67	0,2	0,234	0,19	0,12

019																						
02-023	koro	1,01	0,41	0,29	0,19	0,1	0,16	2,27	1,54	2,7	0,36	3,72	1,71	0,35	0,74	0,31	0,60	0,26	0,29	0,386	0,37	1,31
02-028	koro	0,60	0,5	0,42	1,05	2,5	2,24	3,55	2,5	1,8	4,06	2,50	3,20	2,37	1,92	1,61	1,39	2,91	0,29	0,894	0,54	0,16
02-030	koro	0,48	0,4	0,63	0,93	1,3	0,89	3,80	2,21	2,4	3,16	2,29	5,55	2,12	2,61	0,89	0,93	1,88	0,95	0,482	0,64	0,50
02-032	koro	0,68	0,6	0,36	0,41	0,7	0,74	0,82	0,55	1	0,68	0,72	0,87	0,39	0,78	0,48	0,53	0,83	0,15	0,342	0,38	0,35
02-033	koro	0,60	0,59	3,49	0,64	0,6	0,39	0,52	0,42	0,8	1,27	0,87	0,81	0,65	0,44	0,09	0,62	0,22	0,39	0,221	0,13	0,73
02-034	koro	2,35	1,11	0,49	0,63	1,3	1,14	0,84	1,03	1,2	0,94	1,83	1,44	1,05	1,00	0,64	0,83	0,47	0,11	0,292	0,28	0,10
02-037	koro	0,04	0,41	0,84	1,23	1	1,17	0,94	1,53	1,2	0,76	0,89	1,36	0,9	0,75	0,45	0,84	0,41	0,4	0,504	0,35	0,34
02-038	koro	0,28	0,49	0,47	0,6	0,8	0,81	1,09	1,21	1,5	0,71	1,73	3,53	1,68	1,36	0,56	0,64	0,36	0,14	0,108	0,21	0,29
02-041	koro	0,81	1,2	0,68	1,08	1,5	1,04	1,34	1,2	1,4	1,3	1,12	1,54	1,65	1,35	0,26	1,80	0,51	0,14	0,494	0,70	1,45
02-042	koro	0,30	0,39	0,73	1,63	3,1	2,4	2,76	2,33	2,6	1,52	1,26	2,51	1,87	2,54	0,66	3,72	1,13	0,31	0,739	1,11	0,31
02-046	koro	0,16	0,34	0,22	0,5	0,4	0,37	0,65	0,76	0,9	1,22	1,36	4,64	3,76	1,88	1,33	0,86	1,04	0,1	0,144	0,16	0,14
02-049	koro	0,55	0,34	0,06	0,36	0,8	0,85	1,22	1,05	1,8	0,4	0,96	1,78	0,84	0,58	0,36	0,64	0,34	0,17	0,277	0,16	0,11
02-069	koro	1,18	0,82	0,38	0,27	0,5	0,67	0,90	0,79	0,6	0,33	0,59	0,66	0,37	0,14	0,17	0,44	0,40	0,27	0,263	0,18	0,47
02-074	koro	0,76	0,49	0,54	0,43	0,5	0,25	0,18	0,31	0,6	0,42	0,42	0,55	0,19	0,38	0,18	0,46	0,39	0,08	0,103	0,21	0,11
02-079	koro	0,12	0,13	0,16	0,11	0,3	0,26	0,40	0,68	1,1	0,39	0,47	0,66	0,41	0,33	0,18	0,51	0,24	0,18	0,309	0,16	0,08
03-	Man	1,81	0,39	0,15	0,52	0,8	0,81	0,60	0,49	0,7	0,64	0,82	0,52	0,51	0,64	0,51	0,50	0,15	0,35	0,113	0,10	0,13

008																						
03-009	Man	0,05	0	0,00	0,18	0,2	0,27	0,95	1,31	1,2	1,65	0,86	1,18	0,63	0,52	0,38	1,23	1,58	0,01	0,054	0,06	0,00
03-010	Man	2,21	0,92	1,62	1,78	2,3	1,66	1,53	1,02	0,9	1,95	4,02	3,54	2,7	1,37	0,43	2,52	0,32	1,3	0,207	0,74	1,22
03-011	Man	1,97	2,43	1,80	1,8	2,5	2,57	2,21	1,47	4,6	4,42	5,48	1,23	0,58	1,33	2,13	4,97	6,79	0,54	0,771	0,68	4,02
03-012	Man	0,21	0,62	0,26	0,56	0,4	0,34	0,33	0,53	0,7	0,21	0,28	0,41	0,16	0,26	0,12	0,26	0,18	0,17	0,176	0,07	0,14
03-015	Man	0,25	0,05	0,08	0,14	0,2	0,18	0,42	0,46	0,6	0,18	0,14	0,31	0,59	0,24	0,13	0,26	0,16	0,04	0,079	0,11	0,13
03-016	Man	0,99	0,59	0,19	0,67	1,4	1,4	2,09	1,68	1,5	0,61	1,44	1,96	1,39	0,81	0,65	0,87	0,79	0,09	0,262	0,17	0,17
03-017	Man	1,57	0	0,03	0,03	0,2	0,27	0,39	0,98	0,6	0,55	0,05	0,23	0,24	0,19	0,01	0,20	0,15	0,05	0,02	0,00	0,01
03-018	Man	0,60	0,29	0,18	0,27	0,5	0,6	0,83	0,97	1,7	0,2	0,68	0,60	0,21	0,24	0,21	0,40	0,32	0,31	0,414	0,15	1,03
03-019	Man	2,03	2,33	1,61	0,28	0,4	0,82	1,14	1,37	0,8	0,77	2,49	2,31	0,72	0,41	0,42	1,15	0,34	0,3	0,18	1,15	1,49
03-020	Man	0,75	0,45	0,15	0,33	0,6	0,3	0,37	0,75	0,8	0,93	1,46	1,54	0,37	0,33	0,15	1,14	0,44	2,66	0,511	0,32	0,25
03-021	Man	0,39	0,5	0,31	0,56	0,4	0,34	0,31	0,28	0,6	0,44	0,27	0,35	0,19	0,18	0,08	0,43	0,11	0,72	5,042	0,21	0,34
03-022	Man	1,60	1,15	0,67	0,24	0,5	0,67	0,86	0,73	0,7	1,24	4,12	5,28	0,65	0,63	0,26	0,82	1,65	0,28	0,576	0,32	0,70
03-023	Man	0,28	0,01	0,03	0,17	0,3	0,24	0,54	1,36	1,6	0,71	0,55	0,90	0,42	0,45	0,42	1,40	3,14	0,01	0,03	0,19	0,01
03-024	Man	1,12	0,73	0,52	0,44	0,8	0,71	0,87	1,38	1,4	0,5	0,82	1,61	0,78	3,85	0,58	1,17	0,46	0,48	0,081	0,16	0,68
03-026	Man	0,74	0,33	0,27	0,21	0,4	0,59	0,69	0,83	1	0,42	0,54	1,03	0,27	0,35	0,23	0,57	0,43	0,2	1,645	0,23	0,65
03-	Man	0,18	0,44	0,22	0,21	0,2	0,39	0,55	0,79	1,2	0,27	0,79	0,77	0,16	0,13	0,18	0,58	0,64	0,2	0,219	0,15	0,11

028																						
03-029	Man	0,58	0,21	0,34	0,47	0,9	0,55	1,42	1,05	1,2	0,47	0,56	4,14	1,91	0,81	0,96	0,96	0,74	0,08	0,436	0,41	0,39
03-030	Man	0,75	0,35	1,49	1,16	2,1	3,33	4,78	1,93	4	1,45	1,41	1,20	0,35	0,93	1,47	4,28	2,50	0,12	0,19	0,54	0,20
03-031	Man	0,49	0,29	0,24	0,48	0,5	0,4	0,50	0,59	1,5	0,23	0,71	0,92	0,4	1,13	0,74	0,48	0,48	0,27	0,353	0,34	0,56
03-032	Man	0,21	0,2	0,23	0,44	0,8	0,43	0,82	0,78	0,7	0,39	0,28	0,90	2,82	0,69	0,45	0,40	0,30	0,04	0,137	0,52	0,26
03-033	Man	0,66	0,86	1,31	1,88	2	1,38	1,17	0,45	1	1,52	1,17	1,56	0,95	0,73	0,23	1,36	0,52	0,21	0,102	0,20	0,77
03-034	Man	1,23	0,25	0,69	0,24	0,7	1,32	1,49	0,76	0,8	0,63	1,46	1,48	1,98	2,00	0,71	1,16	0,29	0,21	0,232	0,11	0,30
03-035	Man	0,25	0,23	0,14	0,54	1	0,82	1,13	0,78	1,6	0,86	0,53	1,38	1,79	0,64	0,47	0,97	0,96	0,11	0,294	0,42	0,43
03-036	Man	0,33	0,27	0,19	0,26	0,3	0,07	0,68	1,23	1,8	0,15	0,34	0,56	0,23	0,60	0,14	0,46	0,19	0,07	0,113	0,12	0,57
03-037	Man	0,13	0,27	0,20	0,21	0,3	0,43	0,34	0,43	0,9	0,27	0,53	0,60	0,34	0,45	0,25	0,42	0,16	0,03	0,016	0,13	0,06
03-039	Man	0,32	0,54	0,61	0,42	0,3	0,15	0,22	0,55	2,4	1,23	0,80	0,86	0,22	0,37	0,16	0,64	0,33	0,25	0,155	1,83	0,06
03-040	Man	1,16	1,17	0,92	0,47	0,6	0,56	0,74	0,69	0,7	0,5	0,55	0,61	0,51	0,32	0,24	0,39	0,31	0,19	0,275	0,22	0,29
03-041	Man	0,68	0,65	0,54	0,5	0,7	0,55	0,93	0,76	2,6	0,95	1,80	1,99	0,38	0,86	0,41	0,93	1,79	0,76	0,95	0,58	0,75
03-042	Man	0,14	0,52	0,39	0,56	0,4	0,68	0,47	0,52	2,1	0,85	2,23	2,74	0,57	0,91	0,43	1,18	0,81	0,14	0,178	0,20	0,09
03-045	Man	0,19	0,28	0,16	0,28	0,4	0,29	0,46	0,88	0,9	0,25	0,18	1,09	1,18	0,33	0,19	0,45	0,41	0,04	0,121	0,22	0,11

Données densitométriques de l'auto-réactivité des différents phénotypes cliniques étudiés

No	group s	S0	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20
ANKO 01	EC	3,14	0,61	1,20	1,64	1,23	0,58	0,15	0,88	1,31	2,18	1,77	1,80	1,11	0,88	0,26	0,44	0,10	0,43	0,38	0,61	0,65
ANKO 04	EC	0,13	0,27	0,33	0,65	0,59	0,25	0,63	1,35	1,05	0,47	1,65	5,79	0,78	0,41	0,39	1,21	0,40	0,18	0,27	0,45	0,14
ANKO 05	EC	0,47	0,32	0,25	0,92	1,27	0,67	0,57	0,63	2,31	0,74	0,89	1,48	0,90	0,63	0,46	1,34	0,42	0,83	0,32	0,55	0,24
ANKO 10	EC	0,12	0,55	0,41	0,47	0,77	0,86	0,78	0,59	0,84	0,74	1,09	1,33	0,57	0,44	0,33	0,54	0,31	0,30	0,46	0,50	0,24
ANKO 13	EC	13,8 1	2,02	4,28	3,24	6,75	6,36	4,57	2,98	4,11	8,63	3,69	7,23	5,94	8,21	5,66	3,49	0,44	0,17	0,32	1,88	1,23
ANK 014	EC	0,18	0,08	0,10	1,91	2,66	1,32	2,37	1,00	1,54	1,81	0,46	0,91	1,00	1,42	0,65	2,92	0,96	0,17	0,08	0,12	0,44
ANKO 15	EC	0,64	0,46	0,20	0,62	1,41	0,88	0,66	1,02	0,94	0,42	0,63	0,87	0,22	0,32	0,94	0,83	0,62	0,16	0,02	0,31	0,13
ANKO 17	EC	0,53	0,95	4,26	0,99	1,25	1,27	2,36	3,21	1,98	1,44	2,74	3,54	1,47	2,09	0,72	5,00	1,98	0,58	0,40	0,41	0,75
ANKO 19	EC	0,39	0,68	0,35	0,46	0,97	2,01	1,31	0,77	1,57	0,59	0,80	1,46	1,20	0,68	0,93	0,49	0,68	0,15	0,50	0,20	0,27
ANKO 20	EC	1,25	0,77	0,96	0,45	0,53	0,56	0,51	1,48	2,54	1,99	0,70	1,28	0,80	0,78	0,24	1,52	0,97	0,22	0,20	0,49	0,76
ANKO 21	EC	0,95	0,45	0,37	0,16	0,34	0,33	0,82	1,32	1,25	2,09	0,98	1,66	0,53	0,40	0,18	0,79	0,06	0,07	0,06	0,26	0,32
ANKO 22	EC	0,14	0,72	0,46	0,72	1,06	1,02	1,08	1,25	1,63	0,37	0,74	1,44	0,90	0,85	0,57	0,60	0,46	0,09	0,06	0,18	0,59
ANKO 23	EC	0,42	0,29	0,30	0,32	0,40	0,32	0,47	0,95	1,31	0,44	0,68	1,38	0,67	0,92	0,66	0,59	1,01	0,18	0,36	0,33	0,25
ANKO 33	EC	0,44	0,38	0,54	1,01	1,10	0,79	0,60	0,65	0,85	0,47	1,18	1,27	0,79	0,99	0,62	0,71	0,59	0,14	0,43	0,44	0,31
ANKO 36	EC	1,36	0,74	0,54	0,57	1,32	1,18	1,47	0,66	0,90	2,18	2,07	1,31	1,44	1,59	0,92	1,30	1,98	1,26	2,71	0,25	1,82
ANKO 38	EC	0,30	0,42	0,15	0,46	0,88	1,35	1,14	0,47	1,03	1,22	0,55	1,09	1,18	0,72	0,41	0,40	0,82	0,19	0,16	0,13	0,31
ANKO 41	EC	2,29	1,15	1,09	0,25	1,30	1,30	1,36	1,29	1,57	0,95	1,17	1,63	1,52	0,90	0,81	0,61	0,86	0,14	0,72	0,36	0,30
ANKO 44	EC	1,01	0,38	0,27	0,24	0,95	0,60	0,86	0,72	0,65	3,65	2,48	0,47	0,65	0,86	0,52	0,36	0,17	0,33	0,25	0,17	0,29
ANKO 46	EC	0,52	0,68	0,89	0,69	0,57	0,63	0,90	1,18	1,36	0,49	0,66	0,90	0,66	0,70	0,44	0,49	0,43	0,04	0,11	0,11	0,21
ANKO 48	EC	0,09	0,28	0,55	0,20	0,14	0,38	1,11	1,13	1,87	0,50	1,25	0,81	0,48	0,94	0,34	0,43	0,21	0,03	0,10	0,10	0,12
ANKO 49	EC	0,53	0,38	0,15	0,53	1,07	1,07	1,41	1,01	1,63	0,92	1,53	1,52	0,79	0,99	1,23	0,69	0,95	0,31	0,35	0,23	0,14

ANKO 54	EC	2,12	0,15	0,67	1,52	1,23	0,67	0,28	0,77	1,45	1,36	0,89	1,02	0,57	0,54	0,33	1,00	0,11	0,37	0,45	0,74	0,41
ANKO 57	EC	0,14	0,36	0,19	0,32	0,99	2,46	1,50	1,21	1,39	2,21	1,20	2,37	0,91	0,77	0,57	4,03	0,81	0,26	0,77	0,33	0,11
ANKO 62	EC	0,33	0,43	0,60	0,64	0,92	0,86	0,90	1,01	1,25	0,66	1,44	1,98	0,69	0,99	0,91	1,18	2,66	0,33	2,29	0,58	0,70
ANKO 66	EC	0,00	0,00	0,02	0,26	0,38	0,34	0,36	0,53	0,72	1,54	0,41	0,84	0,52	0,38	0,29	0,66	0,22	0,02	0,00	0,00	0,02
ANKO 67	EC	2,31	0,16	0,20	11,1 6	17,8 4	12,8 6	4,22	1,37	1,33	9,92	10,1 6	12,5 1	8,46	7,37	2,96	1,55	0,00	0,06	0,00	0,02	0,27
ANKO 68	EC	0,37	0,45	0,37	0,53	0,98	0,70	0,48	1,20	1,50	1,82	0,62	0,95	0,43	0,28	0,06	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
ANKO 70	EC	0,31	0,44	0,95	0,37	0,27	0,22	0,28	0,72	1,07	1,73	1,09	2,68	2,12	1,49	0,60	1,26	0,35	0,04	0,00	0,01	0,00
ANKO 72	EC	0,33	0,52	0,71	0,52	0,75	0,54	0,45	0,97	0,83	0,69	0,58	0,81	1,43	1,48	0,29	0,35	0,26	0,06	0,19	0,15	0,18
ANKO 73	EC	4,56	0,74	2,22	1,30	1,46	1,55	2,12	2,26	2,20	2,38	2,67	4,33	2,87	2,62	1,61	1,68	0,76	0,32	0,40	0,39	1,00
ANKO 78	EC	2,42	0,30	0,78	1,21	2,91	2,37	1,35	1,96	2,13	2,55	2,26	3,53	2,52	2,93	2,49	2,00	0,04	0,16	0,74	0,57	0,82
ANKO 84	EC	1,31	1,56	0,82	0,93	2,02	4,81	4,56	2,42	2,30	1,64	2,47	3,98	2,95	2,67	1,84	1,54	0,84	0,09	0,77	0,60	0,41
ANKO 85	EC	1,17	0,68	0,40	1,35	1,22	0,93	1,42	2,15	2,36	1,51	0,94	1,38	1,91	4,31	0,45	0,37	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
ANKO 87	EC	3,90	0,68	0,83	3,41	3,81	1,65	0,20	2,27	2,47	2,39	2,36	3,17	2,42	2,63	1,53	0,94	0,15	0,34	0,83	1,10	1,10
ANKO 90	EC	0,91	0,74	0,56	1,35	3,56	3,06	7,63	3,13	2,66	3,80	4,02	5,98	3,49	2,44	4,62	2,36	1,09	0,51	0,67	0,38	0,48
ANKO 91	EC	1,57	0,32	0,98	0,47	0,63	0,80	0,79	1,28	1,34	0,96	0,87	1,34	1,17	1,11	0,62	1,59	0,74	0,45	0,27	0,57	0,82
ANKO 92	EC	0,02	0,01	0,02	0,27	0,26	0,25	0,30	0,69	0,83	0,96	0,14	0,30	0,19	0,20	0,02	2,36	0,52	0,00	0,00	0,00	0,00
ANKO 93	EC	3,15	0,24	0,25	0,69	0,86	0,57	1,11	2,94	3,01	2,86	1,55	2,98	19,7 3	14,9 0	0,52	0,25	0,00	0,07	0,16	0,46	0,82
ANKO 94	EC	4,76	1,10	1,41	1,49	1,52	2,05	1,92	3,13	2,52	4,78	1,83	2,95	13,3 2	12,0 2	1,50	4,30	0,34	0,24	0,09	5,40	0,17
ANKO 96	EC	3,41	0,40	2,47	3,80	2,74	1,58	4,36	2,73	2,65	4,37	1,53	4,79	3,42	3,04	0,75	2,48	1,53	0,30	0,26	0,70	0,66
ANK1 93	EC	0,62	1,87	0,26	1,08	1,64	1,40	1,68	1,45	1,66	0,64	1,20	2,04	1,61	1,83	0,69	0,98	0,86	0,13	0,68	0,48	0,61
ANK1 96	EC	0,24	0,14	0,59	0,97	0,89	0,71	0,98	1,81	1,35	0,70	2,66	4,60	1,99	2,30	1,40	0,70	0,71	0,66	0,23	0,50	1,07
AK00 6	AS	0,08	1,07	1,13	1,96	2,58	2,24	5,02	3,89	2,35	2,94	2,84	4,68	1,63	2,63	0,82	2,11	0,75	0,57	0,57	0,22	0,73

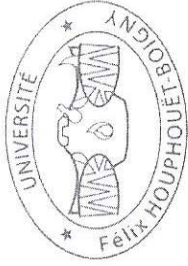
AK101	AS	0,37	0,74	1,21	1,43	1,41	1,28	1,01	0,79	1,40	0,31	0,56	0,60	0,33	0,54	0,34	0,52	0,31	0,30	0,35	0,11	0,13
AK200	AS	0,30	1,21	0,44	0,89	1,55	1,37	1,53	1,88	1,51	0,78	1,41	1,94	1,80	3,64	1,65	2,41	1,01	0,20	0,25	0,22	0,48
PA14007	AS	0,70	0,48	0,43	0,78	1,19	1,03	1,58	0,89	1,69	1,85	1,41	2,58	1,17	1,23	0,65	1,38	0,93	0,36	0,70	0,50	0,32
PA14013	AS	0,22	0,49	0,67	0,58	0,85	1,33	0,96	0,50	0,66	1,03	0,49	0,90	0,53	0,69	0,46	1,35	0,64	0,20	0,24	0,28	0,20
PA14014	AS	1,97	0,89	0,63	1,34	2,31	1,70	1,36	1,80	3,61	1,33	1,35	2,19	0,84	2,92	0,45	1,08	5,49	1,70	0,64	0,41	0,65
PA14022	AS	0,17	0,24	0,23	1,30	2,39	0,57	2,78	0,84	1,49	0,82	0,85	2,17	2,32	2,69	1,31	1,24	1,09	0,59	1,10	0,72	0,94
PA14023	AS	0,52	0,79	0,38	0,26	0,54	0,40	2,46	2,50	3,57	2,07	3,95	5,14	3,60	2,69	1,69	2,17	1,12	1,02	0,60	0,38	0,24
PA14024	AS	0,63	0,38	0,37	0,27	0,98	0,80	0,87	0,78	0,95	0,47	0,92	1,41	0,86	0,61	0,70	1,14	1,03	0,28	0,39	0,29	0,28
PA14025	AS	0,42	0,52	0,39	0,62	1,08	1,23	1,21	1,52	1,48	1,44	0,92	2,68	1,11	1,39	1,62	0,73	1,14	0,68	0,95	0,90	0,16
PA14026	AS	0,25	0,57	0,83	0,58	0,64	0,61	1,10	1,84	1,58	1,28	2,99	6,70	2,05	1,55	0,57	0,83	0,71	0,24	0,44	0,33	0,24
PA14043	AS	0,10	0,28	0,12	0,34	0,49	0,59	1,11	1,38	1,20	0,86	0,67	1,00	0,65	0,70	0,60	0,82	0,59	0,22	0,22	0,23	0,07
PA14044	AS	3,48	0,92	1,21	0,45	1,07	1,02	0,98	0,73	0,87	1,54	1,97	1,31	0,99	1,02	0,52	0,68	0,29	0,12	0,16	0,14	0,27
PA14045	AS	0,54	1,91	0,77	1,41	2,12	1,07	1,61	1,54	1,51	3,53	2,00	10,20	3,63	2,60	2,92	1,46	0,64	0,14	0,17	0,11	0,17
PA14046	AS	0,75	0,81	0,62	0,60	1,11	1,08	0,84	1,67	0,83	0,87	0,77	1,80	0,82	0,67	0,52	0,85	0,20	0,26	0,21	0,39	0,29
PA14051	AS	1,93	0,87	0,48	0,81	1,24	1,10	1,09	1,84	2,17	2,02	3,43	2,47	0,91	1,05	0,83	0,67	0,51	0,58	1,17	2,17	0,57
PA14055	AS	1,28	1,03	0,74	1,10	1,42	1,38	1,66	1,44	1,82	0,87	1,97	4,77	1,71	1,42	0,70	0,76	1,56	0,26	0,85	0,57	0,73
PA14063	AS	0,58	0,60	0,90	1,33	1,54	1,73	2,07	2,72	2,50	2,93	9,08	10,44	6,51	5,88	3,78	0,67	1,53	0,16	0,72	1,01	1,11
PA14066	AS	2,74	1,84	0,23	0,61	0,68	0,61	0,73	0,95	1,86	0,36	0,84	1,55	1,01	0,93	0,85	0,67	0,34	0,16	0,18	0,29	0,11
PA14067	AS	1,12	1,42	1,03	1,50	1,65	1,62	1,87	1,27	1,43	0,77	1,75	3,54	1,86	1,76	1,45	1,58	1,31	0,72	1,00	0,28	0,33
PA14073	AS	1,30	1,01	0,41	1,06	1,52	1,04	1,14	1,15	1,28	0,34	1,00	2,29	1,06	0,99	0,79	0,85	0,75	0,12	0,45	0,42	0,30
PA14084	AS	0,21	0,21	0,33	0,31	0,59	0,56	1,18	1,70	1,58	2,53	6,63	4,12	1,14	0,83	0,70	0,30	0,58	0,17	0,25	0,24	0,25
PA14085	AS	0,01	0,01	0,01	0,14	0,28	0,26	0,72	1,23	1,37	0,69	0,48	0,60	0,34	0,17	0,15	0,37	0,11	0,07	0,10	0,06	0,01

PA14 087	AS	2,45	0,50	0,46	0,62	1,24	0,94	1,04	0,47	0,75	1,03	1,05	0,83	1,02	1,48	0,82	0,66	0,49	0,27	0,22	0,19	0,31
PA14 096	AS	1,45	0,37	1,90	0,86	2,32	1,98	1,57	0,49	1,21	1,39	1,25	1,00	1,35	1,15	0,41	0,93	0,37	0,22	0,35	0,25	0,30
PA14 103	AS	0,32	0,17	0,20	0,47	0,62	0,27	0,59	0,63	1,06	0,33	0,31	0,67	0,48	0,60	0,41	0,49	0,38	0,40	0,16	0,20	0,17
PA14 109	AS	1,24	0,66	0,19	0,53	0,69	0,87	0,74	1,10	1,05	1,36	2,46	2,98	2,20	1,98	0,99	1,53	1,14	0,26	0,81	0,55	0,27
PA14 113	AS	0,56	0,75	0,68	0,43	0,68	0,83	0,78	0,56	0,63	0,22	0,27	1,03	0,15	0,40	0,15	0,50	0,41	0,07	0,08	0,20	0,20
PA14 116	AS	0,46	0,27	0,64	0,13	1,06	4,52	2,23	0,90	1,03	0,43	1,43	1,09	0,37	0,45	NaN	0,62	NaN	0,06	0,17	0,19	0,20
PA14 078	AS	0,12	0,34	0,60	0,98	1,21	1,39	1,25	1,22	2,28	1,07	1,58	1,88	0,86	0,71	0,47	0,61	0,82	0,16	0,52	0,70	0,12
4	MM	0,95	0,6	0,52	0,61	0,64	0,39	0,73	0,8	0,8	1,1	1,65	0,69	0,51	0,91	0,4	0,85	0,42	0,5	0,7	0,08	0,10
5	MM	0,24	0,2	1,17	0,4	0,86	0,46	0,82	0,7	1,1	1,3	0,73	1,56	3,12	1,18	1	0,54	0,68	0,1	0,4	0,51	0,30
6	MM	0,89	0,3	0,15	0,33	0,51	0,47	0,42	0,4	0,5	0,6	0,40	0,27	0,19	0,19	0,1	1,94	0,38	0,2	0,4	0,34	0,20
7	MM	0,00	0	0,14	0,69	0,66	0,47	1,09	0,6	0,7	0,8	0,29	0,85	0,33	0,17	0,1	0,77	0,44	0,4	0,1	0,13	0,26
8	MM	0,10	0,1	0,17	0,37	0,58	0,83	0,82	1	1,3	0,5	0,66	0,83	0,42	0,38	0,2	0,44	0,35	0,1	0,2	0,25	0,15
9	MM	0,98	0,7	0,96	1,44	1,98	1,6	2,52	1,3	4,5	1,3	2,99	2,52	1,03	0,98	0,8	0,92	0,40	6,7	3,3	0,18	0,39
10	MM	1,20	0,3	0,24	0,22	0,36	0,33	0,46	1	1,6	2,8	0,27	0,73	0,61	0,51	0,6	0,38	0,37	0,3	0,4	0,21	1,92
11	MM	0,27	0,2	0,15	0,21	0,18	0,22	0,27	0,3	0,9	0,6	1,08	1,67	0,27	0,48	0,3	1,24	0,42	0,1	0,3	0,21	0,10
12	MM	1,01	0,9	0,89	0,07	0,46	0,28	0,26	0,3	0,5	0,3	0,64	0,72	0,41	0,55	0,3	0,49	0,21	0,3	0,4	0,17	0,17
13	MM	0,71	0,1	0,33	0,95	1,83	2,32	2,83	5,3	2,8	0,4	1,60	4,27	1,68	1,15	1,3	0,82	2,21	0,4	0,2	0,24	0,31
14	MM	0,49	0,4	0,55	0,42	0,43	0,47	0,49	1,2	0,9	0,3	0,60	0,42	0,13	0,27	0,2	0,50	0,64	0,2	0,4	0,37	0,57
15	MM	0,54	0,3	0,29	0,23	0,58	0,73	0,51	0,5	0,9	0,6	0,58	1,23	0,5	0,66	0,3	0,62	0,43	0,1	0,1	0,24	0,06
21	MM	1,20	0,9	0,82	1,1	1	0,83	0,67	1,2	1,1	1	0,78	0,96	0,35	0,34	0,1	0,92	0,42	0,5	0,3	0,32	0,95
22	MM	1,29	0	0,01	0,02	0,01	0,02	0,11	0,6	0,4	0,4	0,02	0,05	0,09	0,05	0	0,02	0,00	0	0	0,00	0,00
23	MM	0,56	0,3	0,16	0,29	0,36	0,42	0,37	0,5	1	0,3	0,51	0,69	0,46	0,32	0,2	0,34	0,46	0,2	0,2	0,15	0,99
24	MM	0,10	0	2,92	0,08	0,35	0,76	1,43	2,2	1,5	4,2	2,64	3,57	1,91	0,86	0,7	9,30	7,05	0,1	0,3	1,31	0,02
26	MM	0,93	0,3	1,47	0,33	1,03	0,74	1,09	1	1,1	1,4	1,39	0,68	0,5	0,65	0,4	0,97	0,32	0,3	0,2	0,14	0,25
27	MM	0,18	0,1	0,17	0,3	0,38	0,31	0,59	0,5	0,6	0,2	0,21	0,68	0,5	0,25	0,3	0,42	0,23	0,2	0,3	0,14	0,15
28	MM	0,63	0,7	0,40	0,22	0,22	0,2	0,39	0,9	0,5	0,3	0,38	0,51	0,53	0,35	0,3	0,38	0,26	0,1	0,2	0,20	0,30
29	MM	0,00	0	0,00	0,03	0,12	0,08	0,14	1,1	1,1	0,2	0,04	0,12	0,2	0,18	0	0,08	0,01	0	0	0,00	0,00

30	MM	0,11	1,2	1,03	0,38	1	0,54	0,83	1	1,2	0,5	0,92	1,22	0,37	0,36	0,1	0,40	0,16	0,1	0,2	0,15	0,17
31	MM	0,29	0,6	0,31	0,46	0,59	0,66	0,56	0,4	0,9	0,4	0,37	0,57	0,14	0,13	0,1	0,41	0,25	0,2	0,3	0,31	0,10
32	MM	0,15	0,2	0,13	0,24	0,31	0,82	1,93	1,1	1,3	0,5	0,68	0,93	0,28	0,37	0,3	0,35	0,32	0,2	3,5	0,23	0,17
33	MM	0,34	0,6	0,36	0,35	0,48	0,42	0,37	0,7	0,7	0,3	0,49	0,60	0,06	0,03	0,1	0,50	0,36	0,2	1,5	0,43	0,57
34	MM	0,48	0,5	0,40	0,59	0,45	0,41	0,45	0,9	1,1	0,3	0,39	0,47	0,17	0,26	0,2	0,66	0,34	0,1	0,4	0,29	0,28
35	MM	1,67	0,1	0,10	0,33	0,3	0,44	0,78	1,1	1,2	0,3	0,55	0,65	0,2	0,40	0,3	0,68	0,39	0,2	0,2	0,15	0,18
36	MM	0,20	0,3	0,16	0,26	0,25	0,29	0,33	0,6	1,2	0,3	0,60	0,76	0,36	0,36	0,2	0,41	0,27	0,2	0,2	0,17	1,53
37	MM	0,00	0	0,00	0,01	0,03	0,08	0,24	0,8	1,2	0,3	0,36	0,65	0,21	0,15	0,1	0,39	0,25	0	0	0,02	0,01
38	MM	1,14	0,4	0,35	0,44	0,86	0,72	1,31	0,8	1	1,6	1,24	1,07	3,48	4,41	1,5	0,80	0,60	0,2	0,1	0,07	0,12
39	MM	0,00	0	0,01	0,02	0,05	0,2	0,19	0,8	1	0,1	0,16	0,23	0,12	0,04	0	0,13	0,00	0	0	0,03	0,01

REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE
Union-Discipline-Travail

*Ministère de l'Enseignement supérieur
et de la Recherche Scientifique*



22 BP : 582 Abidjan 22

PERMIS D'IMPRIMER LA VERSION CORRIGÉE DE LA THESE DE

Doctorat de l'Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY

Présenté par KOFFI David

THEME : Analyse immuno-épidémiologique des anticorps antiparasitaires et rôle du répertoire anticorps auto-réactifs dans la protection contre le Paludisme en Côte d'Ivoire

Vu et approuvé

Abidjan, le 07 février 2017

Le Directeur



KOUAMELAN Essetchi Paul
Professeur Titulaire

Vu et Permis d'Imprimer

Abidjan, le 07 février 2017

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



AFFIAN Kouadio
Professeur Titulaire

RESUME

Dans le paludisme, la réponse immune peut être analysée à la fois comme associée à la protection ou comme signature de l'infection. L'approche de deux aspects de cette réponse, anti-parasitaire et auto-réactive, phénomènes importants de l'interaction hôte-parasite, sont déterminants pour ce qui concerne la pathologie et représentent également une source d'informations épidémiologiques applicable pour la surveillance et le contrôle du paludisme.

Ce travail vise d'une part, à cibler l'application épidémiologique potentielle des mesures des réponses anticorps antiparasitaires par rapport aux variations de l'intensité de la transmission dans certains sites, et d'autre part analyser la contribution du répertoire anticorps auto-réactifs dans la protection clinique du paludisme en Côte d'Ivoire.

Trois sites sentinelles (Abobo, Korhogo et Man) géographiquement différents ont fait l'objet de recrutement à partir de patients symptomatiques. A Abobo, des enfants porteurs asymptomatiques de parasites ont été enrôlés pour étudier le rôle du répertoire auto-réactif et sa relation avec la protection clinique du paludisme. Un panel d'antigènes des stades pré-érythrocytaire et érythrocytaire du parasite a été utilisé pour mesurer les réponses anticorps et analyser la relation entre le degré d'immunité et le background épidémiologique liés aux mesures de lutte et contrôle sur les sites sentinelles.

Une stratégie quantitative de réponse anticorps (panama blot) a permis d'apprécier le répertoire auto-anticorps. L'analyse des réponses Anticorps utilisant un système multiplex ont démontré que le niveau d'immunité peut représenter un indicateur différentiel et un critère de risque par rapport au degré d'infection parasitaire. Ainsi les mesures de tels profils de réactivité peuvent contribuer positivement à un suivi différentiel et évolutif des mesures intégrées de lutte contre le paludisme.

Le second volet de notre étude montre l'existence d'une composante auto-réactive induite au cours de l'infection par Plasmodium associée au portage asymptomatique du paludisme. L'augmentation de cette réponse auto-réactive a été associée à une baisse de la réponse IgG totale antiparasitaire 3D7 chez les porteurs asymptomatiques. Cette réponse auto-réactive diminue quand les mesures de luttés et de contrôle du paludisme augmentent. Les réactivités d'IgG sériques contre les bandes de protéines S6, S10, S11, S12, et S13 d'extrait de cerveau (de poids moléculaire compris entre 50-75 kDa) discriminent les sites de transmission différente. Ces bandes pourraient abriter des protéines de l'hôte qui pourraient être utilisées comme marqueurs épidémiologiques.

Mots-clés : Magpix, auto-anticorps, IgG, P. falciparum, portage asymptomatique, Côte d'Ivoire

SUMMARY

Immune response in malaria is associated either with the protection or as a signature of the infection. Differential immune response, anti-parasitic and self-reactive responses are important phenomena of the host-parasite interaction regarding the pathology and also a source of epidemiological information relevant for monitoring and malaria control. This thesis aims on the one hand, to target potential epidemiological application of measures antibody responses levels to variations in the intensity of transmission in some sites, and also analyze the contribution of self-reactive antibody repertoire in clinical malaria protection in Ivory Coast. Three sentinel sites (Abobo, Korhogo and Man) were geographically diverse recruitment object from symptomatic patients. In Abobo, asymptomatic carriers of parasites children were enrolled to investigate the role of self-reactive repertoire and its relationship with clinical protection from malaria.

Recombinant proteins or peptides derived from liver or blood stage antigens of Plasmodium was used to measure antibody response and analyze the relationship between the degree of immunity and epidemiological background in sentinel sites. Human self-reactive antibody repertoires were analyzed by quantitative immunoblotting (panama blot).

The analysis of antibody responses using a multiplex immunoassay has shown that the level of immunity may be a differential indicator and a risk criterion with respect to the degree of parasitic infection. Thus measures such as reactivity profiles can contribute positively to differential and scalable integrated monitoring measures against malaria.

Furthermore the second part of our study shows the existence of induction of a self-reactive component in asymptomatic carriage of Plasmodium. The Increase of this self-reactive response was associated with a decrease in total IgG response against 3D7 in asymptomatic carriers. Ours results shown that the reactivity of serum IgG against the proteins bands S6, S10, S11, S12, and S13 of brain extract (of molecular weight between 50-75 kDa) discriminate different transmission sites. These bands could harbor host proteins that could be used as epidemiological markers.

Keywords: Magpix, IgG, P. falciparum, autoantibody, asymptomatic carrier, Cote d'Ivoire