

**UNIVERSITE
CHEIKH ANTA DIOP
DE DAKAR**

**FACULTE DE MEDECINE,
DE PHARMACIE ET
D'ODONTO-STOMATOLOGIE**

**UNIVERSITE
PIERRE ET MARIE CURIE
PARIS VI**

**ECOLE DOCTORALE
INTER///BIO**

**Etudes précliniques de candidats vaccins contre le paludisme:
analyses immuno-épidémiologiques et
validation d'un test fonctionnel de chimiluminescence**

THESE

SPECIALITE IMMUNOLOGIE

Pour obtenir le double grade de :

**DOCTEUR « ES SCIENCES PHARMACEUTIQUES »
(DIPLOME D'ETAT, délivré par l'UCAD)**

et

DOCTEUR « ES SCIENCES » DE L'UNIVERSITE PARIS VI

Présentée par :

M^{lle} Charlotte, Josépha JOOS

Soutenue publiquement à Dakar, Sénégal, le 29 juin 2007

JURY

Lamine DIAKHATE	Professeur (UCAD)
Alioune DIEYE	Professeur (UCAD) (rapporteur)
Ronald PERRAUT	Chef de Laboratoire (IPD)
Muriel DELEPIERRE	Directeur de Recherche (CNRS)
Shirley LONGACRE	Directeur de Recherche (CNRS)
Georges SNOUNOU	Directeur de Recherche (CNRS) (rapporteur)
Germain TRUGNAN	Professeur (Paris VI)

Directeurs de thèse : Pr Lamine DIAKHATE et Dr Ronald PERRAUT (UCAD)
Dr Muriel DELEPIERRE (Paris VI)

Je dédie ce travail :

➤ à mes parents et mes grands-parents qui m'ont soutenue durant toute ma scolarité et mon parcours universitaire. C'est grâce à eux que j'ai pu en arriver là aujourd'hui. Merci pour votre aide et votre patience dans les moments de stress intense.

➤ à mon frère, à cause du lien fort qui nous unit. Faites qu'il en soit toujours ainsi.

➤ à mon ami, pour sa patience quotidienne et le réconfort qu'il m'a procuré lors des moments de doutes.

➤ à l'ensemble de ma famille « élargie » et de mes amis, pour leur gentillesse et leur présence.

« 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

Je souhaitais préciser, avant d'exposer mon travail, les conditions un peu particulières dans lequel il a été réalisé.

Je ne suis ni immunologiste, ni pharmacienne, mais chimiste organicienne de formation. Après plusieurs stages en synthèses organiques de candidats vaccins anti-cancéreux, j'ai souhaité m'orienter vers l'étude biologique de candidats vaccins. J'ai également voulu connaître les réalités inhérentes à une autre culture, un autre pays, un autre continent. Certaines personnes ont trouvé mon projet « farfelu », d'autres ont cru en moi et m'ont aidé à le mettre en place et à le mener à bien.

Cette thèse a été menée 8 mois par an à l'Institut Pasteur de Dakar (Sénégal), et 3 mois par an à l'Institut Pasteur, Paris (France). L'Internet m'a été d'un grand secours, mes responsables se trouvant à Dakar, Paris mais également en Guadeloupe où l'initiateur de cette thèse, le Dr Ronald Perraut, a été muté à la fin de ma première année.

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier le Pr Solange Lavielle, le Pr Jean Delettré et l'équipe de la Présidence de Paris VI sans l'aide de qui cette thèse n'aurait jamais pu avoir lieu. Merci de tout cœur pour m'avoir aidée à surmonter les obstacles afin de pouvoir réaliser mon projet. Merci également à Mr le Recteur de l'UCAD et à Mr le Doyen de la Faculté de Médecine, Pharmacie et Odonto Stomatologie d'avoir accepté de valider la formation que nous leur proposons.

Je remercie également le Dr Odile Mercereau-Puijalon de m'avoir mise en contact avec les Dr Shirley Longacre et Ronald Perraut, avec qui cette thèse a pu être réalisée (chef de laboratoire et/ou directeur de thèse). Je les remercie ainsi que mes autres directeurs de thèse, le Pr Lamine Diakhaté, et le Dr Muriel Delepierre. Tous ont cru en moi et accepté de me suivre dans ce projet. Merci également au Pr Alioune Dieye, pour m'avoir permis de terminer ma thèse à l'Institut Pasteur de Dakar malgré la fermeture de mon laboratoire.

Je remercie Pharmaciens Sans Frontières - Comité International et l'Agence Universitaire de la Francophonie d'avoir également cru en mes capacités et de m'avoir accordé des bourses qui m'ont permis de me prendre en charge financièrement.

Au Sénégal, je remercie :

➤ l'Institut Pasteur de Dakar, et en premier lieu la Direction pour m'avoir accueillie dans ses laboratoires.

Merci aux membres de mon laboratoire d'Immunologie - Vaccinologie, le Dr Babacar Mbengue et Mr Babacar Diouf, pour m'avoir appris les bases nécessaires à la réalisation de cette thèse sans jamais me juger. Merci pour votre patience devant mes questions incessantes. Merci à Mr Bakary Diatta et Oumar Samb pour leur gestion du matériel de laboratoire et l'« athaïa » du midi.

Merci aux infirmières du service de biologie médicale, et plus particulièrement à Mme Stella Ndène et Amy Coly, qui m'ont permis d'avoir accès à du sang nouvellement prélevé pour les tests de chimiluminescence. Merci à leurs patients pour leur don.

Merci aux Dr Delphine Aldebert et Marie-Louise Varéla pour leur aide en cytofluorométrie.

Merci aux Dr Bachir Hatim, M.L. Varéla, à Mme Yacine Diouf-Seck et à Mr Stéphane Pellau de m'avoir régulièrement fourni des surnageants de culture pour une constitution plus rapide des stocks de mérozoïtes.

Merci aux Dr Aissatou Touré-Baldé et Ronan Jambou, ainsi qu'à leurs équipes, pour leur aide et collaboration. Que l'entraide qui règne entre les laboratoires dure toujours.

Merci à l'Unité d'épidémiologie pour m'avoir permis d'avoir accès aux informations de la base de données et au Dr Laurence Marrama de m'avoir aidée à la réalisation des études statistiques de protection clinique.

Merci au Pr Jean-Marie Dangou pour le soutien qu'il m'a toujours apporté.

Merci à tous les autres chercheurs, techniciens et personnels de l'Institut Pasteur de Dakar qui, à un moment ou à un autre, m'ont apporté leur aide ou leur soutien.

➤ l'IRD Dakar et particulièrement les Dr Jean-François Trape et Christian Boudin pour m'avoir fourni les données entomologiques relatives à mon étude.

➤ le Pr Tandakha Dieye pour m'avoir consacré un peu de son temps afin de m'expliquer les bases de l'immunologie, nécessaires à la compréhension de ma thèse.

➤ les habitants de Ndiop et Dielmo qui ont bien voulu participer à cette étude. Sans eux rien ne serait possible.

En France, je remercie :

➤ l'Institut Pasteur de Paris, et en premier lieu la Direction pour m'avoir acceptée dans ses locaux.

Merci aux membres de mon laboratoire de Vaccinologie-Parasitaire, les Dr Shirley Longacre, Hannah EJ Polson et Pierre Falanga et à Mme Sandrine Rosario pour leur aide et leur présence, même quand j'étais à 5000 km d'eux.

Merci au Dr Marie-Christine Wagner pour m'avoir donné de son temps afin de me former à la cytométrie en flux.

Merci à l'équipe du Dr Odile Mercereau-Puijalon pour m'avoir accueillie dans ses P2 et permis de manipuler la souche transgénique D10-PcMEGF. Et merci particulièrement au Dr Inès Vigan et à Mme Micheline Guillotte pour leurs conseils.

Merci à tous les autres chercheurs, techniciens et personnels de l'Institut Pasteur de Paris qui, à un moment ou à un autre, m'ont apporté leur aide ou leur soutien.

➤ l'école doctorale Inter///Bio via ses directeurs successifs, les Pr Jean Delettré et Germain Trugnan, pour leur soutien et les formations parallèles auxquelles ils m'ont permis de participer.

Aux Etats-Unis, je remercie :

➤ le NIH, et plus particulièrement les Dr CA Long, Samuel Moretz et Mr Ababacar Diouf, pour leurs conseils et explications concernant la technique GIA par dosage de la pLDH.

Merci enfin à mes Maîtres et Juges, Mesdames et Messieurs les Membres du Jury, pour votre bienveillance et vos remarques constructives.

GLOSSAIRE

Ac	Anticorps
ADCI	Antibody Dependent Cellular Inhibition / Inhibition cellulaire dépendante des anticorps
ADPm	Antibody Dependant Phagocytosis of merozoite / Phagocytose des mérozoïtes dépendante des anticorps
AIC	Akaike Informative Criterion / Critère d'Akaïké
Ag	Antigène
AMA	Apical Membrane Antigen / Antigène de la membrane apicale
APAD	3-Acetyl Pyridine Adénine Dinucléotide
ATP	Acide Tri-Phosphate
BSA	Bovin Serum Albumin / Albumine de bœuf
Bv	Baculovirus
CI	Intervalle de Confiance
CL	Chimiluminescence
CV	Coefficient de Variation
DO	Densité Optique
Ec	<i>Escherichia coli</i>
EGF	Epidermal Growth Factor / Facteur de croissance
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay / Test immuno-enzymologique
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter / Appareil de cytofluorométrie
FAD	Flavine Adenine Dinucleotide
FSC	Forward SCatter / Critère de taille en cytofluorométrie
GIA	Growth Inhibition Assay / Test d'inhibition de culture
GPI	Glycosyl Phosphatidyl Inositol
GR	Globules Rouges
GRp	Globules Rouges parasités
Hb	Hémoglobine
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution / Solution de Hanks
HE	Hydroéthidine
IgG	Immunoglobuline G
IRD	Institut de Recherche et Développement

IPD	Institut Pasteur de Dakar
kDa	kiloDalton
LDH	Lactate DesHydrogenase
MSA	Merozoite Surface Antigen / Antigène de surface du mérozoïte
MSP	Merozoite Surface Protein / Protéine de surface du mérozoïte
n	Nombre de cas étudiés
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (Hydrogéné)
Nox	NADPH oxydase enzymes
NS	Non Significatif
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
<i>P</i>	Facteur de significativité statistique
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
PA	Palo Alto
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell / monocyte
PcMEGF	<i>Plasmodium chabaudi</i> Mouse EGF / domaine EGF de la souche murine <i>Plasmodium chabaudi</i>
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PMMSA	Precursor of the Major Merozoite Surface Antigen / Précurseur de l'Antigène de surface majeur du mérozoïte
PNLP	Programme National de Lutte contre le Paludisme (Sénégal)
PNN	PolyNucléaire Neutrophile
RBM	Roll Back Malaria / Programme de l'OMS pour faire reculer le paludisme
rDO	ratio de Densité Optique
rho	Facteur de corrélation
rlu	relative light units / unité relative de luminescence
ROS	Reactive Oxygen Species / Espèces oxygénées actives
RR	Risque Relatif
SAB	Sérum de groupe sanguin AB (naïf)
SHI	Sérum Hyper Immun
SSC	Side Scatter / Critère de granulosité en cytofluorométrie
TrisHCl	2-Amino-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol, hydrochloride
TNF	Tumor Necrosis Factor
TO	Thiazole Orange

SOMMAIRE

	PAGE
<u>PAGE DE TITRE</u>	<u>i</u>
<u>DEDICACES</u>	<u>ii</u>
<u>EPIGRAPHE</u>	<u>iii</u>
<u>AVANT-PROPOS</u>	<u>iv</u>
<u>REMERCIEMENTS</u>	<u>v</u>
<u>GLOSSAIRE</u>	<u>viii</u>
<u>SOMMAIRE</u>	<u>x</u>
TABLE DES MATIERES	xii
TABLE DES ILLUSTRATIONS	viii
TABLE DES TABLEAUX	xxi
<u>INTRODUCTION</u>	<u>1</u>
<u>PARTIE I : CONTEXTE ET BIBLIOGRAPHIE</u>	<u>3</u>
1) Présentation historique et socio-économique du paludisme	3
2) Epidémiologie et clinique du paludisme	6
3) L'immunité anti-palustre	10
4) L'état actuel de la recherche vaccinale contre le paludisme	17
5) Contexte du sujet de travail	26
<u>PARTIE II : MATERIEL ET METHODES</u>	<u>46</u>
1) Les cohortes d'étude	46
2) Méthodologie des tests ELISA	52
3) Méthodes de purification des anticorps pour les analyses ciblant les antigènes	55
4) Culture de <i>Plasmodium falciparum</i>	56
5) Méthodologie pour le test de chimiluminescence	59
6) Méthodologie pour les tests d'inhibition de culture	61
7) Les analyses statistiques	64

PARTIE III : RESULTATS **66**

A/ ETUDE DES REPONSES ANTICORPS LIEES AUX CANDIDATS

VACCINS (TESTS ELISA) **66**

- 1) Prévalence des candidats vaccins : MSP1p19, MSP4p20, MSP5 et R23 66
- 2) Relations avec la protection clinique 77
- 3) Prévalence des IgG : classe et sous classes 85
- 4) Vérification des déplétions 92

B/ ANALYSE DE LA PHAGOCYTOSE DEPENDANTE DES ANTICORPS

PAR CHIMILUMINESCENCE **95**

- 1) Mises au point réalisées 96
- 2) Les IgG, effecteurs cellulaires de la phagocytose immune 108
- 3) Résultats obtenus avec la cohorte d'étude 112
- 4) Etude fonctionnelle des candidats vaccins 117

C/ ANALYSE DE L'INHIBITION DE CULTURE DEPENDANTE DES

ANTICORPS **124**

- 1) Lecture par cytométrie en flux 124
- 2) Lecture par absorbance : détection de la pLDH 131

PARTIE IV : DISCUSSION **135**

- 1) Les taux d'anticorps contre certains candidats vaccins leur corrélation avec la protection 136
- 2) Les tests fonctionnels : des références à définir 143
- 3) La chimiluminescence, un test fonctionnel reflet de l'immunité naturelle 147
- 4) Application directe de la chimiluminescence pour la sélection de candidats vaccins 150

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES **151**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **153**

ANNEXES : Articles **I**

RESUME ET ABSTRACT 4^{ème} page de couverture

TABLE DES MATIERES

	PAGE
INTRODUCTION	1
PARTIE I : CONTEXTE ET BIBLIOGRAPHIE	3
1) Présentation historique et socio-économique du paludisme	3
1.1) Historique du paludisme, apparition de la chimiorésistance	3
1.2) Le coût socio-économique du paludisme	4
2) Epidémiologie et clinique du paludisme	6
2.1) Mode de transmission de la maladie	6
2.2) La complexité du cycle parasitaire : un obstacle au développement du vaccin	6
2.2.1) <i>Cycle sexué chez le moustique : sporogonie</i>	7
2.2.2) <i>Cycle asexué chez l'homme : schizogonie</i>	8
2.3) Des accès cliniques d'intensités variables	10
3) L'immunité anti-palustre	10
3.1) L'immunité innée (cas des personnes drépanocytaires)	10
3.2) L'immunité acquise	11
3.2.1) <i>Définition de la prémunition</i>	11
3.2.2) <i>Immunité contre les stades sanguins – le cas des mérozoïtes</i>	12
3.2.3) <i>Le rôle des IgG</i>	15
3.2.4) <i>Le rôle des cellules immunitaires (polynucléaires, macrophages,...)</i>	16
4) L'état actuel de la recherche vaccinale contre le paludisme	17
4.1) Les différentes étapes du développement d'un vaccin : de la recherche à l'autorisation de mise sur le marché	17
4.2) Les obstacles liés à la réalisation des essais cliniques dans le développement vaccinal	19
4.3) Les différents essais vaccinaux actuellement en cours	20
5) Contexte du sujet de travail	26
5.1) Présentation des candidats vaccins étudiés	26
5.1.1) <i>MSP1p19 et le parasite transgénique d'étude D10-PcMEGF</i>	26
5.1.2) <i>MSP4p20</i>	27

5.1.3)	<i>MSP5</i>	30
5.1.4)	<i>R23 (R45)</i>	31
5.2)	Présentation des villages de Ndiop et Dielmo – Des sites d'étude privilégiés	32
5.2.1)	<i>Deux villages sénégalais situés dans deux zones d'endémies différentes</i>	32
5.2.2)	<i>Les différences de transmission</i>	33
5.2.3)	<i>Les différences de morbidité des villageois</i>	34
5.3)	Les tests fonctionnels	35
5.3.1)	<i>Les tests les plus connus</i>	36
5.3.1.1)	Les inhibitions de culture et de réinvasion	36
5.3.1.2)	L'ADCI	38
5.3.2)	<i>Un test à développer : la chimiluminescence</i>	40
5.3.2.1)	Les polynucléaires neutrophiles et leur action de phagocytose	40
5.3.2.2)	La poussée respiratoire, reflet de la phagocytose	42
5.3.2.3)	Diversité des protocoles du test de chimiluminescence	43
5.4)	Problématique	44

PARTIE II : MATERIEL ET METHODES **46**

1)	Les cohortes d'étude	46
1.1)	La population des villages de Ndiop et Dielmo	46
1.2)	Le suivi des populations	46
1.3)	La transversale Ndiop - Dielmo 2002	47
1.4)	Les sous cohortes d'étude et leur mode de sélection	50
1.4.1)	<i>Cohortes pour les tests fonctionnels</i>	50
1.4.2)	<i>Cohorte pour les études des réponses IgG (classe et sous classes)</i>	52
2)	Méthodologie des tests ELISA	52
2.1)	Méthode de travail	52
2.1.1)	<i>Méthodologie ELISA pour l'analyse de prévalence des candidats vaccins</i>	52
2.1.2)	<i>Méthodologie ELISA pour l'analyse des réponses IgG contre le mérozoïte (classe et sous classes) – méthode du Dr Remarque</i>	54
3)	Méthodes de purification des anticorps pour les analyses ciblant les antigènes	55
3.1)	Déplétions de sérums sur résine TALON	55
3.2)	Purifications d'IgG sur protéine G	56
4)	Culture de <i>Plasmodium falciparum</i>	56

4.1)	Conditions de culture	56
4.2)	Conditions particulières de culture pour D10-PcMEGF et pour D10-PfM3'	57
4.3)	Décongélation, synchronisation, congélation	58
5)	Méthodologie pour le test de chimiluminescence	59
<hr/>		
5.1)	Purification des mérozoïtes	59
5.2)	Purification des polynucléaires	59
5.3)	Conditions de réalisation du test de chimiluminescence	60
6)	Méthodologie pour les tests d'inhibition de culture	61
<hr/>		
6.1)	Conditions de réalisation du test d'inhibition de culture	61
6.2)	Lecture par cytofluorométrie	62
6.3)	Lecture par dosage de la pLDH	63
7)	Les analyses statistiques	64
<hr/>		
PARTIE III : RESULTATS		66

A/ ETUDE DES REPONSES ANTICORPS LIEES AUX CANDIDATS

VACCINS (TESTS ELISA)		66
<hr/>		
1)	Prévalence des candidats vaccins : MSP1p19, MSP4p20, MSP5 et R23	66
<hr/>		
1.1)	Prévalence pour toute la population d'étude	66
1.2)	Impact des classes d'âge sur les réponses anticorps	71
1.3)	Impact de la parasitémie circulante sur les réponses anticorps (Dielmo)	74
1.4)	Impact de l'hémoglobine AS sur les réponses anticorps	76
2)	Relations avec la protection clinique	77
<hr/>		
2.1)	Corrélations observées à Ndiop, mésoendémie	78
2.2)	Corrélations observées à Dielmo, holoendémie	81
3)	Prévalence des IgG : classe et sous classes	85
<hr/>		
3.1)	Les IgG totales	85
<hr/>		
3.1.1)	<i>Impact de l'âge sur les taux d'IgG</i>	87
3.1.2)	<i>Impact de l'hémoglobine AS sur les taux d'IgG</i>	87
3.1.3)	<i>Interrelations entre les réponses IgG liées aux candidats vaccins et les taux d'IgG</i>	87
3.1.4)	<i>Corrélation entre le taux d'IgG et la protection clinique</i>	88
3.2)	Les IgG non cytophiles	88
3.3)	Les IgG cytophiles	89

3.3.1)	<i>Impact de l'âge sur les taux d'IgG1 et IgG3</i>	90
3.3.2)	<i>Impact de l'hémoglobine AS sur les taux d'IgG1 et IgG3</i>	91
3.3.3)	<i>Confrontation des réponses IgG contre les candidats vaccins avec les taux d'IgG1 et IgG3</i>	91
4)	Vérification des déplétions	92

B/ ANALYSE DE LA PHAGOCYTOSE DEPENDANTE DES ANTICORPS

PAR CHIMILUMINESCENCE		95
1)	Mises au point réalisées	96
1.1)	Purification des mérozoïtes et validation du protocole	96
1.1.1)	<i>Qualité des mérozoïtes isolés par centrifugation</i>	96
1.1.2)	<i>Rôle de l'hémozoïne et des débris cellulaires dans la chimiluminescence</i>	97
1.1.3)	<i>Purification des mérozoïtes par flottaison sur Percoll</i>	98
1.1.4)	<i>Profils protéiques des préparations mérozoïtaires</i>	100
1.1.5)	<i>Vérification des quantités prédéfinies à utiliser dans le test</i>	101
1.2)	Purification des polynucléaires et conditions d'utilisation	101
1.2.1)	<i>Impact des monocytes en chimiluminescence</i>	102
1.2.2)	<i>Chimiluminescence et sang total</i>	102
1.2.3)	<i>Utilisation de polynucléaires de lapin</i>	103
1.2.4)	<i>Purification des polynucléaires par double ou simple gradient</i>	103
1.2.5)	<i>Optimisation de la réponse des polynucléaires</i>	104
1.2.6)	<i>Utilisation de tous types de donneurs et de pools de polynucléaires</i>	105
1.3)	Standardisation des résultats	106
2)	Les IgG, effecteurs moléculaires de la phagocytose immune	108
2.1)	IgG et chimiluminescence	108
2.2)	Impact des sous classes d'IgG : IgG1 et IgG3	111
3)	Résultats obtenus avec la cohorte d'étude	112
3.1)	Résultats globaux : comparaison des deux villages	112
3.1.1)	<i>Corrélation ente l'ADPm et l'âge</i>	113
3.1.2)	<i>Corrélation entre l'ADPm et la parasitémie circulante</i>	114
3.1.3)	<i>Corrélation entre l'ADPm et l'hémoglobine AS</i>	115
3.1.4)	<i>Corrélation entre l'ADPm et la protection clinique</i>	115
4)	Etude fonctionnelle des candidats vaccins	117
4.1)	Etude à partir des sérums déplétés	118

4.2)	Etude en chimiluminescence des mérozoïtes transgéniques D10-PcMEGF	120
4.3)	Effet de la surcharge des sérums en Ac anti-MSP4p20	121
4.4)	Corrélations entre les réponses obtenues en ELISA et celles en chimiluminescence	122

C/ ANALYSE DE L'INHIBITION DE CULTURE DEPENDANTE

DES ANTICORPS 124

1)	Lecture par cytométrie en flux	124
1.1)	Le choix du marqueur de fluorescence : HE à la place de TO	125
1.2)	Des problèmes de reproductibilité	127
1.2.1)	<i>Des doubles marquages impossibles</i>	127
1.2.2)	<i>Une autofluorescence qui n'en est pas une</i>	128
1.2.3)	<i>Un écrasement qui ne correspond pourtant pas à une mort cellulaire</i>	129
1.2.4)	<i>Remarques générales sur ces difficultés</i>	130
2)	Lecture par absorbance : détection de la pLDH	131
2.1)	Domaine de définition du test et conditions de réalisation	131
2.2)	Impact du Complément	132
2.3)	Des conditions standardisées non applicables dans nos conditions de croissance parasitaire	133

PARTIE IV : DISCUSSION 135

1)	Les taux d'anticorps contre certains candidats vaccins et leur corrélation avec la protection	136
1.1)	MSP1p19 : confirmation de son caractère majeur	136
1.2)	MSP4p20 : des études à approfondir	138
1.3)	MSP5 : un « nouveau » candidat vaccin prometteur	140
1.4)	R23 : des variabilités importantes	141
2)	Les tests fonctionnels : des références à définir	143
2.1)	Le test d'inhibition de culture : un test de référence difficile à adapter	143
2.2)	L'ADCI : un test difficile à reproduire ne pouvant pas encore devenir une référence	144
2.3)	La phagocytose des mérozoïtes en chimiluminescence : une variante simplifiée de l'ADCI ?	145
3)	La chimiluminescence, un test fonctionnel reflet de l'immunité naturelle	147

3.1)	Un test ne dépendant pas exclusivement de la quantité d'anticorps	147
3.2)	Amélioration de la méthode par utilisation de cytokines ?	147
3.3)	Un test fonctionnel associé à la protection clinique	148
4)	Application directe de la chimiluminescence pour la sélection de candidats vaccins	150

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES **151**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **153**

ANNEXES **I**

1) Article 1 : soumis à Vaccine **I**

JOOS (C.), MARRAMA (L.), POLSON (H.E.J.), CORRE (S.), DIATTA (A.M.), MBENGUE (B.), DIOUF (B.), TRAPE (J.F.), TALL (A.), LONGACRE (S.), PERRAUT (R.) - Antibody dependent oxidative burst and phagocytosis of *Plasmodium falciparum* merozoites by activated neutrophil: a functional assay for malaria vaccine candidate.

2) Article 2 : avant soumission **XII**

JOOS (C.), POLSON (H.E.J.), MARRAMA (L.), SOKHNA (C.), MERCEREAU-PUJALON (O.), CRABB (B.S.), PERRAUT (R.), LONGACRE (S.) - Antibodies specific for two leading malaria vaccine candidates are major components of antibody dependent neutrophil activation by merozoites.

RESUME ET ABSTRACT **4^{ème} page de couverture**

TABLE DES ILLUSTRATIONS

	PAGES
Figure 1 : Répartition mondiale des pays souffrant de paludisme et de pauvreté	5
Figure 2 : Cycle sexué chez le moustique	7
Figure 3 : Phase asexuée pré-érythrocytaire	8
Figure 4 : Le cycle érythrocytaire	9
Figure 5 : Incidence de la morbidité à Ndiop selon le type d'hémoglobine	11
Figure 6 : Constitution d'un mérozoïte	13
Figure 7 : Processus d'invasion d'un globule rouge par un mérozoïte	14
Figure 8 : Les 3 types de constructions vaccinales pour MSP4	29
Figure 9 : Suivi de production de MSP4-40 et MSP4modII	29
Figure 10: Situation des villages de Ndiop et Dielmo sur la carte du Sénégal	32
Figure 11 :Images satellites « Quickbird » de Dielmo, prises en saison sèche	33
Figure 12 :Représentation du nombre mensuel de piqûres infectantes par habitant	34
Figure 13 :Incidence de la morbidité à Ndiop répartie selon les trois classes d'âge	35
Figure 14 :Représentation schématique du phénomène observé en ADCI	39
Figure 15 :Le phagosome	40
Figure 16 :Génération de l'anion superoxyde (réaction simplifiée)	41
Figure 17 :Phagocytose par des neutrophiles humains de billes de latex opsonisées	42
Figure 18 : Oxydation du luminol	43
Figure 19 :Distribution des valeurs des ratios de DO associés aux 4 candidats vaccins	69
Figure 20 :Répartition des réponses Ac par village et classe d'âge	72
Figure 21 :Répartition des réponses anticorps en fonction de l'importance de la parasitémie circulante asymptomatique à Dielmo	75
Figure 22 :Répartition des taux d'IgG spécifiques suivant le type d'hémoglobine	77
Figure 23 :Incidence des accès palustres par classe d'âge et importance de la réponse Ac anti-MSP1p19 à Ndiop	79
Figure 24 :Incidence moyenne des accès palustres par classe d'âge et importance de la réponse Ac anti-MSP5 à Ndiop	81
Figure 25 :Incidence des accès palustres par classe d'âge et importance de la réponse Ac anti-MSP1p19 à Dielmo	83

Figure 26 :Incidence des accès palustres par classe d'âge et importance de la réponse Ac anti-MSP5 à Dielmo	85
Figure 27 :Augmentation de la réponse IgG visant le mérozoïte par classe d'âge	87
Figure 28 :Taux d'IgG1 et d'IgG3 dirigés contre le mérozoïte par classes d'âge	91
Figure 29 :Spécificité et efficacité de la déplétion	93
Figure 30 :Phagocytose par les PNN des préparations mérozoïtaires	95
Figure 31 :Visualisation d'un mérozoïte par microscopie électronique	96
Figure 32 : Comparaison de l'impact de l'hémozoïne et débris cellulaires avec celui des mérozoïtes purifiés dans le test de phagocytose	98
Figure 33 :Différence d'intensité de luminescence suivant les méthodes de préparation des mérozoïtes	99
Figure 34 : Comparaison des diverses préparations mérozoïtaires par gels de protéines	100
Figure 35 : Courbes effet dose de la quantité de mérozoïtes utilisée dans le test de CL	101
Figure 36 : Comparaison des deux méthodes de purification : importance de la quantité sur la qualité	104
Figure 37 : Test de CL réalisé avec différents donneurs et un pool de PNN	105
Figure 38 :Différents profils de CL pouvant être ramenés à une même valeur d'ADPm	107
Figure 39 :Répartition des réponses en ADPm pour 7 sérums testés sous leur forme sérum, sérum décomplémenté, sérum déplété en IgG, IgG totales purifiées.	108
Figure 40: A - Distribution de la réponse en ADPm à Ndiop ; B - Répartition des niveaux d'IgG totales contre les Ag du mérozoïtes selon l'ADPm	109
Figure 41 :Western-blot de préparations mérozoïtaires selon la valeur d'ADPm	110
Figure 42 :Distribution des taux d'IgG1 (A) et d'IgG3 (B) suivant les groupes de répondeurs en ADPm.	111
Figure 43 :Distribution de la réponse ADPm en fonction de la zone d'endémie	113
Figure 44 :Moyennes d'ADPm observées par classes d'âge et par village	113
Figure 45 : Impact de la parasitémie circulante dans les deux zones d'étude	114
Figure 46 : Stratification de la réponse en ADPm par rapport à l'intensité de la parasitémie à Dielmo	115
Figure 47 : Impact des déplétions des anticorps de différents candidats vaccins sur la réponse en ADPm	119
Figure 48 : Différences d'ADPm obtenues selon l'expression ou non de <i>PfMSP1p19</i>	121
Figure 49 : Détection par thiazole orange d'une culture parasitaire âgée	125
Figure 50 : Détection par hydroéthidine d'une culture parasitaire âgée	126

Figure 51 : Détection d'une culture parasitaire composée d'anneaux et trophozoïtes par TO ou HE	126
Figure 52 : Visualisation de globules rouges sains marqués par TO et HE, selon le type de réglage réalisé	128
Figure 53 : « Fuite » de fluorescence plus ou moins importante sur la diagonale	129
Figure 54 : Tassement de la réponse en FL2	130
Figure 55 : Impact du type de plaque et du type de dépôt sur le dosage de la pLDH	131
Figure 56 : Pourcentages d'inhibition de culture parasitaire suivant que les sérums soient décomplémentés ou non	133

TABLE DES TABLEAUX

		PAGES
Tableau I :	Référencement des différentes protéines du mérozoïte connues	14
Tableau II :	Caractéristiques des différentes phases d'essais cliniques	19
Tableau III :	Candidats vaccins en développement clinique	20
Tableau IV :	Les populations d'étude visualisées par cohortes et classes d'âge	49
Tableau V :	Caractéristiques autres que l'âge pour les deux cohortes principales	51
Tableau VI :	Récapitulatifs des DO, unités et rDO obtenus pour les candidats vaccins testés sur la double transversale	68
Tableau VII:	Colinéarités entre les réponses antigéniques liées aux différents candidats vaccins étudiés	71
Tableau VIII :	Réponses anticorps (rDO) par village et par classe d'âge	72
Tableau IX :	Réponses Ac en fonction de l'importance de la parasitémie circulante asymptomatique à Dielmo	75
Tableau X :	Les taux d'anticorps suivant le type d'hémoglobine : AS ou normal	76
Tableau XI :	Régressions de Poisson pour l'étude du risque d'accès palustres en fonction de la réponse Ac anti-MSP1p19 à Ndiop	79
Tableau XII :	Régression de Poisson pour l'étude du risque d'accès palustres en fonction de la réponse Ac anti-MSP5 à Ndiop	80
Tableau XIII :	Régression de Poisson pour l'étude du risque d'accès palustres en fonction de la réponse Ac anti-MSP1p19 à Dielmo	82
Tableau XIV :	Régression de Poisson pour l'étude du risque d'accès palustres en fonction de la réponse Ac anti-MSP5 à Dielmo	84
Tableau XV :	Visualisation des unités titres des IgG1 et IgG3 visant le mérozoïte en fonction des classes d'âge	90
Tableau XVI :	Corrélation des IgG1 et IgG3 avec les candidats vaccins	91
Tableau XVII :	Régressions de Poisson pour l'étude du risque d'accès palustres en fonction de l'ADPm à Ndiop	116
Tableau XVIII :	Régressions de Poisson pour l'étude du risque d'accès palustres en fonction de l'ADPm à Dielmo	117
Tableau XIX :	Corrélations de Spearman entre les réponses Ac et l'ADPm	122