

UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU

ECOLE SUPERIEURE DES SCIENCES DE LA SANTE

ANNEE 1989 - THESE N° 16

**PREMIER ESSAI D'UN VACCIN CONTRE
LE PALUDISME EN AFRIQUE : Bobo-Dioulasso
(Burkina Faso)**

THESE

**pour obtenir le DOCTORAT en MEDECINE
Présentée et Soutenue Publiquement le 22 Juin 1989**

DIPLOME D'ETAT

Par
Maxime Koiné DRABO
né le 31 Janvier 1962 à Koudougou

JURY :

Président : Prof. René HOUIN

Membres : Prof. Lamine DIAKHATE

Prof. Yves LANSON

Prof. Ag. T.R. GUIGUEMDE

Directeur de Thèse :

Prof. Ag. T.R. GUIGUEMDE

ECOLE SUPERIEURE DES SCIENCES DE LA SANTE

PERSONNEL DE L'E.S.S.S.

Directeur

Rambre Moumouni OUMINGA

Directeur des Etudes

Pascal BONKOUNGOU

Chef des Services Administratifs :

Kayira BANSE

UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU
Ecole Supérieure des Sciences de la Santé
(E. S. S. S.A.)

LISTE DES ENSEIGNANTS DE L'E. S. S. S.A.

ENSEIGNANTS PERMANENTS

Professeurs titulaires

- | | |
|----------------------------|--|
| - Rambré Moumouni OUIMINGA | Anatomie organogenèse et
Chirurgie |
| - Hilaire TIENDREBEOGO | Séméiologie et Pathologie
médicales |

Professeur associé

- | | |
|--------------------|----------------|
| - François CANONNE | Santé publique |
|--------------------|----------------|

Maîtres de Conférences Agrégés

- | | |
|----------------------------|--------------------------|
| - Amadou SANOU | Chirurgie |
| - Bolilwendé Robert SOUDRE | Anatomie pathologique |
| - Tinga Robert GUIGUEME | Parasitologie |
| - Julien YILBOUDO | Orthopédie-Traumatologie |
| - Bibiane KONE | Gynécologie-Obstétrique |
| - Alphone SAWADOGO | Pédiatrie |

Maître Assistant

- | | |
|---------------------------|---------------|
| - Innocent Pierre GUISSOU | Pharmacologie |
|---------------------------|---------------|

Maître Assistant Associé

- | | |
|------------------|--------------|
| - Ould MOHAMMEDI | Dermatologie |
|------------------|--------------|

Assistants chefs de Clinique

- | | |
|---|------------------------|
| - Pascal BONKOUNGOU | Gastro-Entérologie |
| - Boukari Joseph OUANDAOGO | Cardiologie |
| - Kongoré Raphaël OUEDRAOGO | Chirurgie |
| - Tanguet OUATTARA | Chirurgie |
| - R. Joseph KABORE | Gynéco-Obstétrique |
| - Mamadou Patrice ZEI | " |
| - Luc SAWADOGO | " |
| - Philippe ZOURE | " |
| - Saidou Bernard OUEDRAOGO | Radiologie |
| - François René TALL | Pédiatrie |
| - Issa SANOU | Pédiatrie |
| - Toungo Christian SANOU
(in memoriam) | Oto Rhino Laryngologie |

Assistant Chef de Clinique Associé

- Gérard MITELBERG Psychiatrie

Assistants

- Raphaël DAKOURE Anatomie-Chirurgie
- Lady Kadiatou TRAORE Parasitologie
- Mamadou SAWADOGO Biochimie

Assistant associé

- Akpa Raphaël GBARY Epidémiologie

Chargés de cours

- Annette SCHWEICH Physiologie
- Jean LANDOIS Chirurgie
- Daniel TRANCHANT Endocrinologie
- GALIN Oto-Rhino-Laryngologie

ENSEIGNANTS NON PERMANENTS

Institut des Sciences de la Nature (I.S.N.)

Maîtres de Conférences

- Sita GUINKO Biologie cellulaire
- S. Alfred TRAORE Immunologie

Maître assistant

- Didier ZONGO Génétique

Assistant

- Makido B. OUEDRAOGO Génétique
- Jeanne MILLOGO T.P. Biologie cellulaire
- Raymond FELENTOUGOURI T.P. Biologie cellulaire

Institut de Mathématiques et de Sciences physiques(I.M.P.)

Maître de Conférence

- Akry COULIBALY Mathématiques

Maîtres Assistants

- Gontibo J.B. OUEDRAOGO Physique
- Aboubakary SEYNOU Statistiques

Institut de Chimie (I.N.C.)

Maître de Conférence

- Laou Bernard KAM Chimie

Ecole Supérieure des Sciences Economiques (E. S. S. EC.)

Maitre Assistant

- Tobo Hervé KABORE Economie-Gestion

ENSEIGNANTS VACATAIRES

- Mme Henriette	BARY	Psychologie
- Dr. Harouna	OUEDRAOGO	Psychiatrie
- Dr. Jean Zézouma	SANOU	Psychiatrie
- Dr. Bruno	ELOLA	Anesthésie-Réanimation
- Dr. Jean	KABORE	Neurologie
- Dr. Michel	SOMBIE	Planification
- Dr. Adama	LENGANI	Néphrologie
- Mr. Abdoulaye	KEITA	Planification
- Mr. René	DALLA	Planification
- Mlle Rasmata	TRAORE	T.P. Bactériologie
- Mr. Casimir	KADEBA	T.P. Bio

ENSEIGNANTS MISSIONNAIRES

A.U.P.E.L.F.

Pr. Lamine DIAKHATE	Hématologie (Dakar)
Pr. Abibou SAMB	
Bactériologie-Virologie(Dakar)	
Pr. José-Marie AFOUTOU	Histologie-Embryologie
(Dakar)	
Mr. Nakhtar WADE	Bibliographie (Dakar)
Pr. H.K.A. EDEE	Biophysique (Lomé)

O. M. S.

Dr. Jean-Jacques BERJON	
Histologie-Embryologie(Greteil)	
Dr. Frédérick GALLEY	Anatomie Pathologique
(Lille)	
Dr. Moussa TRAORE	Neurologie (Bamako)
Pr. Auguste KADIO	Pathologie infectieuse
et	
	parasitaire (Abidjan)
Pr. Jean Marie KANG	Dermatologie (Abidjan)
Pr. Arthur N'GOLET	Anatomie pathologique
	(Brazzaville).

DEDICACES

Au Peuple Burkinabè

**Pour tes nombreux sacrifices consentis pour ma
formation puisse ce travail te reconforter. Bientôt, à ton service
je devrai mériter ta confiance.**

A mon Père

Enseignant depuis 1951 tu t'es porté de bonne heure au premier rang du combat contre l'analphabétisme pour l'édification d'une nation libre et prospère. Tu continues ce dur combat, sacrifiant ainsi cette retraite bien méritée. Je comprends pourquoi tu portes ce titre de "Chevalier de l'Ordre National du Mérite Voltaïque". Ton fils est fier de toi et ce travail est une récompense de tes nombreuses peines.

A ma Mère

Maman, si jamais j'avais manqué un petit instant de ton affection, j'aurais été aujourd'hui méconnaissable. Les mots me font défaut pour continuer...
Ce travail t'est particulièrement dédié

A mes frères et soeurs

- Antoinette
- Rose
- Lucien
- Claude
- Salomon

Fraternellement, du courage !

Au Professeur GUIGUENDE Tinga Robert et à sa famille

Plus particulièrement

- à **Madame GUIGUENDE**

J'ai bénéficié de vos conseils et de votre affection tout au long de mes études secondaires et supérieures. Que d'efforts vous avez consenti pour moi pendant toutes ces années passées dans votre foyer. Je ne pourrai jamais vous remercier suffisamment. Votre persévérance au travail et votre dévouement pour le prochain me servira toujours de précieux exemple.

- et au **Professeur GUIGUENDE**

Vous avez toujours guidé attentivement les pas de votre fils que je suis. Que Dieu vous donne une longue vie.

A tous mes Oncles et Tantes

- Thiéba Mory Maurice (in memorium)
 - YAMEOGO Blandine
 - BORO Douna
- affectueuses reconnaissances

A la famille Thiéba

- Emmanuel
 - Serge
 - Daniel
 - Paul
 - Patrice
 - Eric
 - Sidiki
 - Goulé
 - Jacques
- indefectible attachement

A YAMEOGO Gustave

Tu restes pour moi un exemple de courage à suivre et à dépasser.

A mes cousins et cousines

Profondes affections

A CISSE Sidi et famille

En témoignage de toute ma sympathie

A mes amis

OUEDRAOGO Oumarou
CISSE Ali
KALMOGO Clovis Ignace
ZEMANI S. "Abou"
OUEDRAOGO Pascaline

A notre Maître le Professeur OUIHINGA R. Mounouni

Doyen de l'Ecole Supérieure des Sciences de la Santé.
Nous vous prions de trouver ici l'expression de notre
respectueuse reconnaissance

A notre Maître le Professeur SAVADOGO Alphonse

Nous admirons votre constante amabilité, votre
disponibilité et votre souci de rigueur scientifique.
Veuillez accepter ici le témoignage de notre profonde
reconnaissance.

A tous ceux qui nous ont enseignés

Au Professeur FERNEX H.)
Aux Docteurs STURCHLER D.) de la Fondation Roche de Bâle
Etlinger H.)

Au Docteur HALLER L. de la fondation Roche Abidjan.

Touver ici l'assurance de votre profonde reconnaissance

Au Docteur OUEDRAOGO Jean Bosco

Pour votre sollicitude et votre disponibilité,
merci infiniment

Au Docteur GBARY Akpa Raphaël

Sincères remerciements !

**A tout le Personnel du Service de Parasitologie du Centre
Muraz grâce à qui nous avons pu réaliser le travail.**

**A tous ceux qui ont contribué directement ou indirectement à
l'élaboration de ce travail.**

A nos Juges

- René HOUIN
- Pierre SALIOU
- Yves LANSON

Vos multiples tâches ne vous ont pas empêchés d'accepter siéger pour examiner notre Travail. Nous vous en remercions très respectieusement.

A notre Directeur de Thèse

**Le Médecin Colonel Tinga Robert GUIGUENDE
Professeur Agrégé de Parasitologie
Expert de l'Organisation Mondiale de la Santé**

Vos nombreuses qualités humaines qui sont: l'ardeur au travail, la modestie et vos qualités de chercheur qui sont: la rigueur scientifique et la clairvoyance, forcent partout l'admiration et le respect.

Nous avons eu la chance de bénéficier de votre enseignement de qualité. C'est une fois de plus une chance et un plaisir pour nous de réaliser ce travail sous votre éclairage et votre guide.

L'idée de ce travail est la votre, vous l'avez conçue dans la recherche des solutions aux difficiles problèmes des maladies parasitaires avec les retombées possibles pour les autres maladies.

Pas à pas, inlassablement, méthodiquement vous nous avez initié à la recherche. Nous ne manquerons jamais l'occasion de travailler avec vous.

Puissiez-vous trouver ici l'infime expression de notre reconnaissance et de notre dévouement.

L'Ecole Supérieure des Sciences de la Santé a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

**PREMIER ESSAI D'UN
VACCIN CONTRE LE PALUDISME
EN AFRIQUE
BOBO-DIOULASSO ;
BURKINA FASO**

S O M M A I R E

	Pages
I Introduction	2
II Enoncé du problème	3
III Rappels	5
1- Historique	6
2- Aspects épidémiologiques	6
3- Aspects cliniques	6
4- Aspects thérapeutiques	6
5- Aspects immunologiques du paludisme	7
5.1.-Rappel du cycle évolutif des plasmodiums	7
5.2.-Interaction hôte-parasite	7
IV Revue de la littérature	11
1- Tentative de vaccination	12
1.1.- Utilisation des formes sexuées du parasite	12
1.2.- Utilisation des formes asexuées du parasite	12
1.3.- Utilisation des sporozoïtes	12
1.4.- Conclusion	14
V Objectifs de l'essai	19
1- Objectif général	20
2- Objectifs spécifiques	20
VI Methodologie	21
1- Le cadre d'étude (la Vallée du Kou)	22
2- Le vaccin antsporzoïte de l'essai:(NANP)3-TT-	24
3- Le protocole d'étude	24
3.1.- Les critères de sélection des sujets pour l'essai.	24
3.2.- Les vaccins administrés	26
3.3.- Les doses vaccinales	25
3.4.- La taille des échantillons	25
3.5.- Le déroulement de l'essai	25
3.6.- Le calendrier d'administration des vaccins	26
3.7.- Le choix de la période et de la durée de l'étude.	26
3.8.- La tolérance vaccinale	26
3.9.- L'examen clinique	27

3.10. -Diagnostic biologique de l'infection plasmodiale	28
3.11. -Les critères de diagnostic de l'accès palustre	28
4- Le plan de travail	29
5- L'analyse des données collectées	29
5.1. - Les principales variables étudiées	29
5.2. - Les paramètres d'efficacité	29
5.3. - Les paramètres d'inocuité	30
5.4. - Les hypothèses principales à vérifier	30
5.5. - L'analyse statistique	30
6- Les aspects éthiques	30
VII - Résultats et Interprétations	33
1- Répartition des sujets étudiés	34
2- La tolérance vaccinale	35
3- Evolution du poids et de l'hématocrite des enfants au cours de l'étude	36
4- Résultats parasitologiques et cliniques du paludisme	36
5- Résultats immunologiques	40
VIII- Discussion des résultats	47
1- De la tolérance et de l'inocuité du vaccin (NANP)3-TT	47
2- de l'immunogénéicité et de l'efficacité du vaccin	47
IX - Conclusion	49
X - Références Bibliographiques	50
Annexes	51

I - INTRODUCTION

II.- ENONCE DU PROBLEME

I. Introduction

Le paludisme, première endémie mondiale est une parasitose provoquée par un protozoaire du genre *Plasmodium* dont 4 espèces infestent l'homme : *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. vivax*.

Le paludisme à *plasmodium falciparum* est le plus grave, car, responsable de décès, de complications neurologiques, pulmonaires, rénales chez les personnes non "immunes". L'Afrique Tropicale fait essentiellement partie des régions où aucune mesure de lutte anti-paludique efficace n'existe, alors que le *Plasmodium falciparum* constitue l'espèce parasitaire dominante.

La situation de ces 15 dernières années montre clairement qu'on ne pourra éradiquer le paludisme dans le monde avec les moyens actuels; et l'on a donc basé la stratégie antipaludique en cours sur des concepts réalistes de lutte (2) que les services de soins de santé primaires contribuent largement à mettre en oeuvre (40). Toutefois, même avec des objectifs plus modestes, on doit faire face aux mêmes types de contraintes que pour l'éradication mondiale du paludisme, à savoir des difficultés financières, administratives et des problèmes techniques.

Ces derniers comprennent une extension de la résistance des anophèles (vecteurs) aux insecticides(33), l'apparition et la propagation de la polychimiorésistance de *P. falciparum* dans de vastes régions tropicales...

Ces obstacles ont partiellement rendu caduque d'arsenal de lutte anti-paludique.

Face à cette situation très préoccupante les recherches en cours se multiplient pour améliorer les armes de lutte. L'élaboration d'un vaccin anti-palustre se situe avec d'autres types de recherches au premier rang, et succède de plus en plus d'espoir. -

II. Enoncé du problème

Le paludisme représente l'un des plus graves problèmes de santé publique pour les régions de la ceinture de pauvreté de la planète. Mortelle et invalidante, cette parasitose a toujours compromis le développement socio-économique des zones infestées. Depuis LAVERAN (1880) la connaissance des cycles biologiques du parasite et du vecteur, a permis d'élaborer des stratégies de lutte de plus en plus efficaces. Des victoires décisives ont été remportées aux USA, en ITALIE, à CUBA, où les populations ne connaissent plus la maladie depuis plus d'un quart de siècle.

Cependant le fléau continue de sévir intensément en Amérique Latine, en Asie, et en Afrique. Ce sont plus de 2,7 milliards d'individus, soit 56% de la population mondiale qui vivent dans des régions impaludées où aucune mesure de lutte efficace n'a été trouvée. Environ 48 % des cas notifiés annuellement à l'OMS proviennent des régions sub-sahariennes d'Afrique (2).

Les habitants de ces régions, soumis alors aux infections régulières, développent lentement pour se défendre, une immunité naturelle. Cet état de prémunition (Sergent 1963), leur permet de supporter des charges parasitaires élevées.

Avant d'en arriver là, les individus restent très vulnérables, particulièrement au *Plasmodium falciparum*. Les enfants pendant leur intermède immunitaire, les femmes enceintes, les habitants des régions à transmission sporadique, et ceux nouvellement en contact avec le parasite, composent le grand groupe à risque.

C'est particulièrement chez les enfants que l'on rencontre assez fréquemment les formes neutrières du paludisme avec tous leurs cortèges de complications et décès. Le paludisme est la première cause de mortalité au sein de ce groupe à risque en Afrique sub-saharienne (2). Plusieurs armes de lutte sont actuellement employées : la chimioprophylaxie systématique, mal acceptée des enfants, souvent mal conduite et favorisant la sélection de souches plasmodiales résistantes; la chimiothérapie précoce des cas confirmés de paludisme, rendue difficile par le polymorphisme clinique de la maladie, qui complique alors le diagnostic de certitude; la chimiothérapie des accès fébriles intégrée au système de Soins de Santé Primaires qui connaissent des problèmes d'approvisionnement en médicaments anti-paludiques (les zones rurales étant d'accès difficile en saison pluvieuse, période de transmission intense) ; enfin la lutte anti-vectorielle individuelle et collective, coûteuse, parfois astringente et nécessitant une planification rigoureuse.

Tous ces moyens de lutte d'efficacités relatives limitent certes les risques pour les groupes vulnérables. Mais les enfants payent encore de leur vie ou des séquelles, l'acquisition et l'entretien d'un état de prémunition.

L'induction artificielle et précoce d'un état de prémunition chez les enfants et sujets neufs peut leur éviter les effets morbides et létaux du paludisme. Dans nos régions où son éradication est impossible à court terme, la mise au point d'un vaccin efficace représente un atout fort utile pour impérativement contrôler la maladie.

L'intensification de la recherche les dix dernières années a abouti à la mise au point de vaccins à base d'antigènes plasmodiaux. Le (NANP)₃ est un vaccin antisporezoitaire de synthèse, dont les essais ont été concluants en laboratoire et chez des volontaires.

Cette étude qui est la première en Afrique, se propose de tester son efficacité à immuniser des enfants vivant en zone d'endémie palustre.

III. RAPPELS

- 1. Historique**
- 2. Aspects épidémiologiques**
- 3. Aspects cliniques**
- 4. Aspects thérapeutiques**
- 5. Aspects immunologiques**

1. Historique

Le paludisme est une maladie parasitaire dont l'origine se perd dans la nuit des temps. Les premières descriptions cliniques sont mentionnées dans le papyrus d'Ebers datant du règne d'Amenophis I^{er} (1550 avant Jésus Christ), (36). Le paludisme a rythmé les pages de l'histoire de l'humanité. Il participe aux victoires, aux défaites militaires, à l'expansion économique et démographique. L'agent vecteur du paludisme a été découvert le 6 Novembre 1880 à Constantine, et présenté à l'Académie des Sciences sous le nom d'Oscillaria malariae, le 24 Octobre 1881 par LAVERAN. Le cycle biologique le fut plus tardivement. Jusqu'à l'entre-deux-guerres le seul schizontocide connu était la quinine extraite de l'écorce de quina ; son origine est controversée (11).

2. Aspects épidémiologiques

La symptomatologie clinique varie en fonction des faciès épidémiologiques eux-mêmes liés à d'autres facteurs : zone de transmission, réceptivité des individus.

Le polymorphisme épidémiologique explique la notion "des paludismes" ainsi que la difficulté de préciser les critères de diagnostic de l'accès palustre.

3. Aspects cliniques

La physiopathologie de la maladie est assez mal connue. Plusieurs théories sont émises pour expliquer les mécanismes de constitution des différents symptômes.

Le paludisme infection asymptomatique constitue la première endémie mondiale. Mais la place réelle du paludisme maladie dans la pathologie générale, la morbidité, la mortalité sont très mal connues. Il semble apparaître que le poids du paludisme dans la santé publique des pays d'endémie, doit être très variable d'une zone à l'autre.

4. Aspects thérapeutiques

L'isolement des différents alcaloïdes extraits de l'écorce de quina a permis des progrès considérables dans le traitement du paludisme. Entre les 2 guerres, les recherches ont abouti à la synthèse de molécules possédant l'activité de la quinine : amino-4-quinoléines (chloroquine, amodiaquine...). L'apparition et la propagation de la polychimiorésistance a fait progresser la recherche d'autres antipaludéens : les dérivés alcaloïdes synthétiques du quina comme la méfloquine ; le ginqhaosu et ses dérivés ; certains antibiotiques (cyclines...).

Les schémas thérapeutiques diffèrent selon les faciès épidémiologiques et l'évolution de la polychimiorésistance de certaines souches plasmodiales.

5. Aspects Immunologiques du paludisme

5.1. Rappel du cycle évolutif des plasmodiums

Le cycle évolutif des espèces plasmodiales se déroule en une phase sexuée chez l'anophèle femelle (vecteur et hôte définitif) et une phase sexuée chez l'homme (hôte intermédiaire)

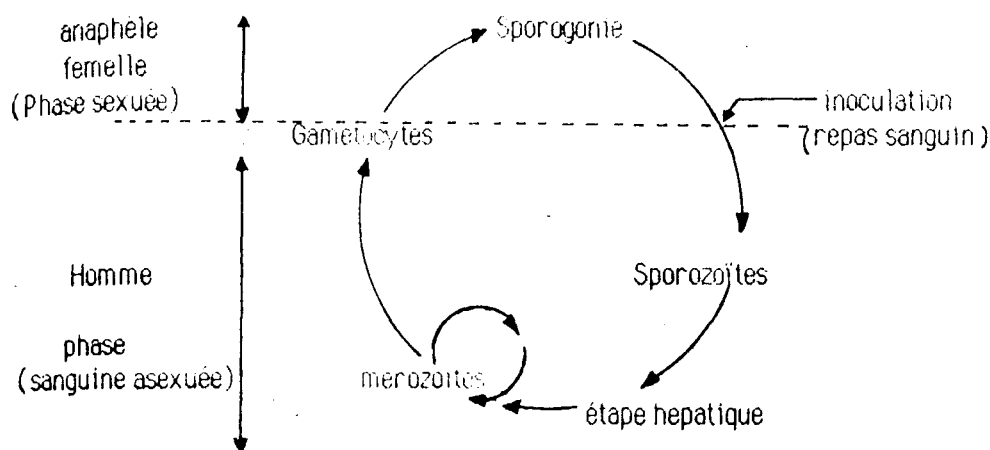


Figure 1 : Cycle évolutif du plasmodium

5.2. Interaction hôte-parasite

L'interaction entre l'hôte et le parasite est complexe ; l'hématozoaire doit éviter les défenses de l'hôte pour se développer et l'hôte doit éliminer le parasite.

5.2.1. Le parasite

- C'est en dehors des cellules sanguines et hépatiques que le parasite est le plus exposé aux mécanismes de défenses de l'hôte. Les mécanismes d'évitement mis en jeu ne sont pas entièrement élucidés : des variations antigéniques, une interférence avec le système de défense immunologique de l'hôte entraînant son dysfonctionnement ont été décrites (46). La biologie moléculaire des sporozoïtes et des mérozoïtes a été beaucoup étudiée.

- Les sporozoïtes représentent le stade infectant pour l'homme il y est introduit lors du repas sanguin de l'anophèle femelle (Fig. 1).

Les sporozoïtes acquièrent pendant leur séjour dans les glandes salivaires une protéine protectrice : la protéine circum

sporozoitaire ou CS (11) ; la CS abrite plusieurs épitopes immunodominants ; chacun de ces épitopes comporte une séquence d'acides aminés répétés en tandem plusieurs fois (37).

Il semblerait que la CS ne dévoile au système immunitaire de l'homme qu'un seul site vulnérable, le focalisant ainsi sur une seule cible dans un but d'évitement: Vanderlerg et coll (11).

La structure de la CS est la plus connue de toutes les protéines du sporozoite. Elle est identique chez toutes les espèces parasitant l'homme, à l'exception de la séquence des acides aminés. Le gène codant pour cette protéine a été isolé par Dame et coll (11). La protéine se compose de 412 acides aminés qui se répartissent schématiquement en trois régions: deux régions périphériques et une région centrale composée d'une séquence répétitive de 4 acides aminés: asparagine, alanine, asparagine, proline, répétée trente sept fois (NANP)³⁷ et de quatre séquences: asparagine, valine, acide aspartique, proline (NYNP)⁴. Cet épitope est environ 10⁸ fois présent à la surface du sporozoite de *Plasmodium falciparum*.

La masse moléculaire des différentes protéines CS est resumée dans le tableau suivant :

Tableau I (11)

espèces plasmodiales	Protéine de surface
<i>Plasmodium vivax</i>	45. 10 ³
<i>Plasmodium malariae</i>	non déterminée
<i>Plasmodium falciparum</i>	58. 10 ³

Il n'existe pas de réaction croisée entre les anticorps des plasmodium humains. L'immunité induite est spécifique d'espèce (10).

- Les merozoïtes: sont présents dans la circulation sanguine au moment de l'éclatement schizogonique. Des antigènes sécrétés à l'intérieur de la vacuole érythrocytaire sont relargués au moment de la libération des merozoïtes. De nombreux antigènes spécifiques apparaissent sur la surface des érythrocytes envahis par les *plasmodium falciparum* et *malariae*, ainsi que des modifications sous forme de protubérances.

-L'antigène S de *plasmodium falciparum*: polymorphe, différent d'un isolat à l'autre (47), tant par les déterminants antigéniques que par la taille de la protéine (1). Le gène codant pour cette protéine comprend une centaine de répétitions d'un motif de 11 acides aminés (15).

-RESA (Ring Erythrocyte Surface Antigen)
Cappel et coll (16) ont montré que cet antigène est présent dans

les formes tardives (schizontes murs) mais qu'on peut aussi détecter à la surface des érythrocytes infectés par les trophozoïtes. C'est une protéine de 290.000 da et, le gène codant pour RESA contient deux séries de répétitions en tandem d'aa (31)

-FIRA (Falciparum Interpersed Repeat Antigen)
cet antigène de 300.000 da a été étudié par Cowman et col (15).

- l'antigène majeur des schizontes, : 190.000 da
c'est probablement le mieux connu des antigènes érythrocytaires de *Plasmodium falciparum*. Il est hautement immunogène (35;38)

- l'antigène pPF.111
un antigène apparemment associé à la membrane des érythrocytes infectés par les stades tardifs et récemment étudié (31).

-CONCLUSION la biologie moléculaire est une étape essentielle à la connaissance du parasite, de son adaptation à l'hôte et, dans l'élaboration d'un vaccin. De plus en plus, la biologie moléculaire de toutes les formes du parasite est étudiée

5.2.2.L'Hôte intermédiaire (l'homme)

La multiplication du plasmodium peut entraîner la mort de l'hôte mais ce dernier développe des mécanismes protecteurs qui peuvent à la longue inhiber la croissance du parasite et supprimer ainsi le stimulus antigénique de l'immunité de protection.

a) Les mécanismes protecteurs: il en existe deux sortes

- la résistance naturelle Certaines espèces plasmodiales ne se développent pas bien chez des hôtes particuliers : les sujets drepanocytaires ou présentant un déficit en G6PD, ou du groupe Duffy négatif, ou beta thalassémique(11).

- la résistance acquise Dans les zones à forte endémicité, et où la maladie est sévère chez l'enfant, on a démontré l'existence d'une immunité héritée des mères immunes diminuant avec l'âge. Puis, lui succède une immunité induite et entretenue par les piqûres répétées des anophèles infectées. Cet état de résistance est appelé prémunition (Sergent 1963)

La prémunition est fonction de l'activité conjointe de facteurs humoraux et cellulaires, bien que l'état physiologique du sujet joue un rôle non négligeable.

b) les facteurs humoraux

La protection d'origine humorale a été démontrée par des expériences de transfert de sérums immuns à des animaux hôtes sains (10). Mais elle est moins forte que celle engendrée par la vaccination, ce qui confirme l'existence d'un autre mécanisme de protection (45) Des études faites en Thaïlande (45) et en Afrique (45) montrent que la réponse humorale aux infections naturelles de sporozoïtes se développe très progressivement. Les immunoglobulines non spécifiques de type IgM, IgG et IgA ont été retrouvées, qui ne protègent que partiellement contre l'expression clinique de la maladie. Weber et coll 1987 (20) remarquent que le niveau des anticorps est indépendant du nombre antérieur d'infections et n'est pas modifié au cours de l'accès palustre.

c) les facteurs cellulaires

Spitalny et coll (1977) ont montré que des souris vaccinées athymiques ou dépourvues de cellules T étaient incapables d'acquérir une protection contre l'infection d'épreuve par des sporozoïtes intacts (41). Le transfert passif de lymphocytes spléniques de souris vaccinées à d'autres saines, engendre chez les dernières une certaine protection contre l'infection d'épreuve. Good et coll (1987-1988) mettent en évidence une réponse cellulaire lors de l'administration d'un antigène sporozaitaire à un groupe de Thaïlandais (45). Elle est de courte durée et se perd après l'arrêt de la sensibilisation antigénique.

Les mécanismes d'expression de la réponse cellulaire restent à élucider ainsi que sa part dans la protection immunitaire.

IV. REVUE DE LA LITTÉRATURE

Les tentatives de vaccination

- 1. Avec les formes sexuées du parasite**
- 2. Avec les formes asexuées intra-cellulaires**
- 3. Avec les sporozoïtes**

1. Tentatives de vaccination

1.1. Utilisation des formes sexuées du parasites

La destruction des gamétocytes par une réaction immunologique aboutit à l'interruption de la chaîne de transmission de la maladie car, le vecteur ne s'infeste plus lors de son repas sanguin. Partant de ce postulat, de nombreux auteurs ont tenté de produire une immunité protectrice contre les gamétocytes, en utilisant différents hôtes (singes-oiseaux-souris), des types d'antigènes variés, et des voies d'administration. Les essais se trouvent résumés au Tableau I.

Dans la majorité des cas, l'immunité obtenue est forte car tous les gamétocytes du sang circulant perdent leur pouvoir infectant; cependant la gamétocytogenèse n'est pas affectée. L'immunité induite est spécifique de stade et d'espèce, et de courte durée (10). La cible des anticorps protecteurs semblent être des antigènes de surface du gamétocyte (10).

1.2. Utilisation des formes asexuées intra-cellulaire

Des auteurs ont tenté d'induire une immunité protectrice à partir de schizontes et merozoïtes. Le tableau II résume les essais. L'immunisation obtenue est beaucoup moins forte avec les gamètes (10). Le meilleur antigène semble être le mérozoïte vivant, introduit par voie intramusculaire répétée sur 1 à 2 mois, ou bien une fraction antigénique de la membrane du schizonte(10). L'adjuvant complet de Freund (FCA) est le meilleur mais toxique pour l'homme.

L'immunité protectrice est à prédominance humorale (32). Elle est spécifique de stade et d'espèce.

1.3. Utilisation des sporozoïtes

La destruction des sporozoïtes, avant l'invasion des cellules hépatiques, par des anticorps ou de cellules immunocompétentes aboutit à la rupture de la chaîne infectieuse avant le stade d'expression clinique. Les individus immunisés par les antigènes sporozoïtaires ne font plus d'accès palustres et ne transmettent pas aux moustiques des formes sexuées infectantes. Le sporozoïte est alors un candidat potentiel pour l'élaboration d'un vaccin.

L'immunogénicité du sporozoïte est presque exclusivement due à un seul antigène : la CS qui recouvre entièrement la surface du parasite (10).

Les nombreuses tentatives menées se trouvent résumées dans le Tableau III. Des observations capitales pour la poursuite des recherches sont alors faites.

1.3.1. Caractéristique de l'immunité induite

Elle se manifeste par la destruction rapide des sporozoïtes de réinfection avant leur enkystement dans le foie (38), et ne protège que partiellement contre l'expression clinique de la maladie. Elle permet seulement de supporter des charges élevées de parasites dans le sang. Certains anticorps monoclonaux de sujets vivant en régions d'endémies, inhibent *in vitro* l'invasion des cellules hépatiques par les sporozoïtes (14).

L'immunité induite est spécifique de stades et d'espèces.

1.3.2. La mise au point de vaccins anti-sporozoïtes

A partir des études biochimiques des sporozoïtes, des chercheurs mettent au point des vaccins basés sur des antigènes de la CS. Les polymères immunogènes utilisés sont obtenus soit par génie génétique ou par synthèse chimique.

a) le R₃₂ tet 32 : mis au point par Young et coll en 1985 (45) il représente: MDP-(NANP)₁₅ - MVDP - (NAN)₁₅ - MVDP tet 32 (A: alanine; M: methionine; A: acide aspartique; P: proline; M: arginine; V: valine ; tet: représente les 32 premiers acides aminés du genre codant pour la résistance à la tétracycline).

Ce vaccin induit chez des animaux de laboratoire l'apparition d'anticorps inhibant *in vitro* l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes (45).

b) le FSY₁ mis au point à partir du R₃₂ tet 32 par un groupe de chercheurs du WRATR (Walter Reed Army Institute of Research) (45)

c) le (NANP)₃ - TT C'est un peptide synthétique mis au point par un groupe de chercheurs de NYU (New York University) (18). Le (NANP)₃ a été conjugué à la toxine tétanique (TT) comme véhicule et a de l'hydroxyde d'aluminium comme adjuvant. C'est le premier vaccin à base d'antigènes synthétiques. (Herrington et al 1984) (18).

Le (NANP)₃ TT est le vaccin que nous utilisons dans l'essai.

1.3.3. Les essais vaccinaux

Une série d'essais ont été effectués avec le FSV₁ et le (NAMP)₃ entre 1986 et 1987 (Ballou et al, Herrington et al (29). Les tests d'inocuité d'immunogénicité et d'efficacité ont donné les résultats suivants consignés dans le tableau IV.

Tableau II Essais cliniques vaccinaux avec le (NAMP)₃-TT (11)

Etapas d'essai	Vaccins	
	FSV ₁	(NAMP) ₃ TT
Phase I (inocuité et immunogénicité)		
. Volontaires	15	35
. Doses (toutes les 4 semaines)	10-800ug (0-4-8)	20-160ug (0-4-8)
. Seroconversions	80%	62% (53% 100ug 71% 16µg)
. effets secondaires	mineurs	mineurs
Phase II (efficacité)		
-Volontaires		
Vaccinés	6	3
non vaccinés	2	4
-Resultat après exposition à l'infection sporozoitaire		
la protection vaccinale	1 ^a	1 ^a
la protection naturelle	0	0

-a- la période de prépatence clinique est d'un jour plus long chez les personnes vaccinées que chez celles non vaccinées.

1.4. Conclusion

Les résultats des essais vaccinaux loin d'être decevants, prouvent la nécessité d'approfondir les recherches sur les phénomènes immunologiques observés afin d'élucider certains aspects du problème qui se resument à :

- la détermination de la nature exacte de la relation immunologique hôte-parasite dans les régions d'endémie palustre
- la définition des conditions optimales pour l'induction et l'entretien d'une immunité fonctionnelle.

Tableau III : Tentatives de vaccination avec des gamètes de plasmodium (OCCGE inf. N° 92 1984).

Modèle expérimental	methode d'immunisation	Adjuvant	mode d'administration	Résultats	Auteurs
<u>P. fallax</u> oie	gamétocytes formolés	aucun	IV répétées	Immunité forte	Huff et al 1955
<u>P. gallinaceum</u> poussins	gametocytes formolés gamètes irradiés	- - -	IV répétées	Immunité forte	Huff et al Gwadz 1976 Carter et Chen 1976 Carter et al 1979
<u>P. yoelli</u> souris	gametes?	-	IV répétées	Immunité forte	Membis et Target 1979
<u>P. Knowlesi</u> Rhesus	gametes?	FCA FIA BCG DPT	IM répétées s/cut	Immunité partielle	Gwadz et Green 1979

Tableau IV : Tentatives de vaccination par les formes intraerythrocytaire de plasmodium (OCCGE inf. N° 92 1984)

Modèle expérimental	méthode d'immunisation	Adjuvant	Mode d'administration	Résultats	Auteurs
P. cathe- merium canaris	schizontes				Redmond 1939
	formoles ou chauffés		12 IV	I.* partielle	Gingrich 1941
P. Lophurea canards	schizontes libres tués	toxine	s/cut repetées	I. forte	Jacobs 1943
"	schizontes formoles	FCA	?	I. forte	Coffin 1951
P. galli- naceum poussins	schizontes tués	saponine	3 IV repetées	I. faible	Richards 1966
P. Lophurea caneton	Ag purifié	FCA	3 IM	I. forte	Kilejan 1978
P. berghei rats	schizontes desagrégées	FCA	1 à 5s/cut	protection proport ^{le} nbre s/c	Zuckher et al 1967
P. berghei rats	schizontes homogénéisés - schizontes irradiés	-		I. faible I. partielle	Desowctz 1967 Corra- detti et al 1966 Wellde et Sadum 1967
P. Knowlesie rhesus	schizontes tués	FCA FIA	differentes voies	I. forte parfois I. partielle	-Freund et al 1945 -Targett et Ful- ton 1965 -Brovon et al 1968

Tableau IV (suite)

Modèle experi mental	methode d'immuni sation	Adjuvant	Voie d'adminis tration	Résultats	Auteurs
<u>P. falcip.</u>	schizontes	FCA	IM répétées	I. d'inten sité	-Sao et al 1969
Aotus	irradiés	MDP		variable	-Wellde et al 1979
	merozoïtes				-Siddiqui et al 1977
	schizontes + merozoïte				-Mitchell et al 1978

Tableau Y : Tentatives de vaccination par les sporozoïtes de Plasmodium falciparum (OCCGE inf n° 92 1984)

modele expéri mental	methode d'immuni sation	Adjuvant	Voie d'adminis tration	Résultats	Auteurs
Poule <u>P.gallina</u> <u>cum</u>	Sporozoïtes attenués	- UV	IV	Protection	Mulluchan et al 1947
Souris et <u>P.berghei</u>	Sporozoïtes irradiés ou chauffés ou formolés ou lyophilisés	-	IV repetés	Protection d'intentisé variable	Musseinv et al 1967-1969 Beaudoin et al 1976 Vanderberg et al 1976 Verhave 1975
Rhesus et <u>P.knoulesi</u>	Sporozoïtes irradiés	FCA	IV IM piq. de mousti. irradiés	Protection variable	Gwady et al 1978 Chen 1974 Ward et Hayes 1972
Homme <u>P.vivax</u> et <u>P.falciparum</u>	Sporozoïte irradiée		IV IM piq. de mousti. irradiés	Protection variable	Boyd et Kitchen 1986 Clyde et al 1973-1975 Rieckmann et al 1974 Bray 1976

V. OBJECTIFS

1. Objectif général

2. Objectifs spécifiques

1. Objectif général

Etudier l'efficacité du vaccin antiparasitaire (NANP)₃-TT administré en même temps que certains vaccins du PEV* (DT Coq-Polio-Rougeole-Rubecole-Oreillons méningite), contre les accès palustres chez les enfants de 2 à 5 mois, dans la région d'endémie palustre de la Vallée du Kou (Bobo-Dioulasso, BURKINA FASO).

2. Objectifs spécifiques.

- 2.1. Identifier les effets secondaires induits par l'administration du vaccin (NANP)₃ -TT.
- 2.2. Dépister la survenue d'accès palustre chez tous les enfants
- 2.3. Déterminer tous les 30 jours :
 - la parasitémie
 - l'hématocrite des enfants vaccinés et des enfants non vaccinés
 - les titres d'anticorps spécifiques de (NANP)
- 2.4. Comparer statistiquement :
 - les titres d'anticorps
 - les différentes parasitémie
 - et les hématocrites des enfants vaccinés et des enfants non vaccinés

* Programme Elargi de Vaccination.

VI. METHODOLOGIE

- 1. Le cadre d'étude**
- 2. Le vaccin antisprozoïte de l'essai : (NANP)₃ - TT**
- 3. Protocole d'étude**
- 4. Les aspects éthiques**

1. Le cadre d'étude (la Vallée du Kou)

1.1. Situation

La Vallée du Kou (11°11 de latitude Nord, 4°20 de longitude Ouest (fig2) est une zone rizicole de 1000 hectares dans l'ouest du Burkina Faso, située à 30 km au nord de Bobo-Dioulasso. L'irrigation est le fait essentiel qui se fait grâce à un petit barrage sur une rivière permanente (le Kou) et un canal principal d'aménagé d'eau puis par un réseau de canaux. La riziculture se déroule en deux campagnes annuelles, l'une en saison des pluies, de Juillet à Novembre, l'autre dite de "contre saison" de Janvier à Juin.

Six villages construits entre 1970 et 1972 abritent 10.000 personnes majoritairement d'ethnie mossi. Les cases sont alignées, le plus souvent parallélepipediques, avec des murs en banco et un toit de tôle ondulée, d'autres sont circulaires avec un mur en banco et un toit cône en paille.

1.2. Le Climat

Il se caractérise par l'alternance de deux saisons : la saison des pluies de début Mai à fin Octobre avec un maximum de précipitation en Août; la saison sèche de début Novembre à fin Avril.

1.3. Epidémiologie

La faune culicidienne agressive pour l'homme se compose en majorité d'anophèles gambiae et anophèles funestus. La transmission est d'allure bimodale. (4) Elle présente 2 pics: le premier entre Mai et Juillet, le second entre Septembre et Novembre. *Plasmodium* est l'espèce principale. La seconde espèce est *malariae* fréquemment associée à *falciparum*.

1.4. Infrastructures Sanitaires

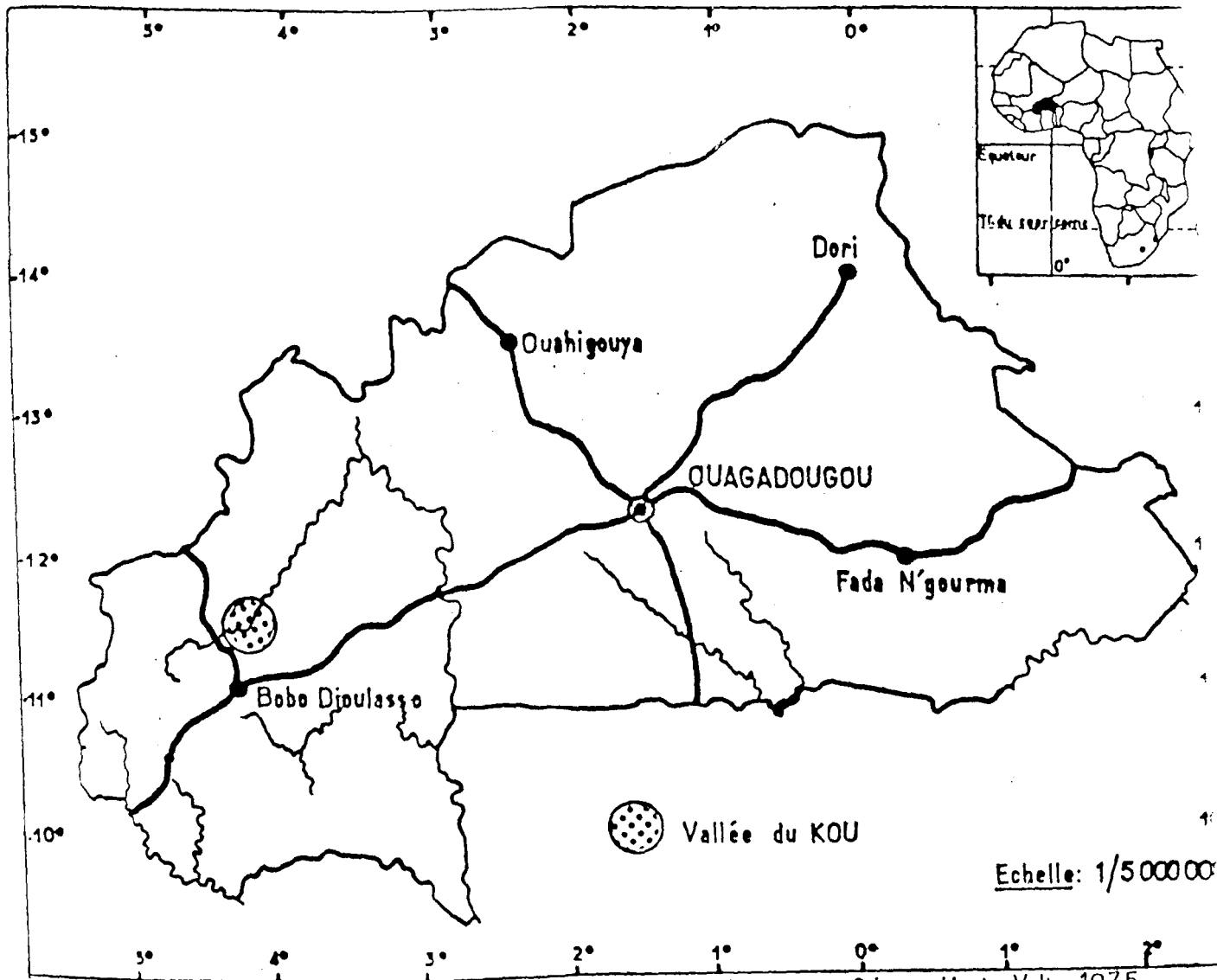
Elle se compose d'1 Centre SMI* et de 2 CSPS **

Deux infirmiers et deux auxiliaires accoucheuses y travaillent

* Santé Maternelle et Infantile

** Centre de Santé et de Promotion Sociale

Figure 2 LOCALISATION GEOGRAPHIQUE DE LA ZONE D'ETUDE (VALLEE DU KOU) -



Source: atlas jeune afrique, Haute Volta, 1975.

1.5. Le Choix du cadre d'étude

La Vallée du Kou a été retenue pour l'essai pour les raisons suivantes :

- la distance raisonnable (30 km) de Bobo qui nous facilite le suivi des enfants vaccinés.
- le faciès épidémiologique convenant à l'essai
- le regroupement des villages
- l'effectif de la population de la localité permettant d'obtenir l'échantillon d'enfants d'âge requis pour l'étude.
- la localité est bien connue sur le plan paludologique, l'Unité Paludologie du Centre Muraz y mène d'importantes études depuis 1978 : des études épidémiologiques, entomologiques, et de chimiorésistance avec Baudon D. (4,5,25) Carneval P. (5,9), Guiguemdé T.R. (24,25, 26), Robert V. (9).

2. Le vaccin antipaludique de l'essai: (NAMP)3 - TT

C'est un trimère antigénique de la protéine circumsporozoïtaire, synthétisé sous forme d'acétyl cystéine (NAMP)3 OH. Il a été associé à la toxine tétanique (TT) comme véhicule et à l'hydroxyde d'aluminium comme adjuvant. La mise au point dans les laboratoires F. Hoffman La Roche et Co (Bâle SUISSE), a respecté les critères standards de toxicité, pureté, stérilité et de stabilité du Laboratoire.

Notre vaccin a subi les trois premières phases du schéma global de la mise au point d'un vaccin antipaludique recommandé par l'OMS.

Les essais sur les souris de laboratoire ont donné des résultats favorables à part la formation d'un granulome au point d'injection (22;23).

Les essais sur 11 volontaires faits à l'hôpital Universitaire de Bâle (SUISSE) sont satisfaisants (43) : aucune réaction généralisée, seulement des douleurs et erythèmes bénins, et la séroconversion est obtenue dans 60% des cas. Des résultats similaires ont été obtenus chez 45 volontaires à l'Université du Maryland (USA) (29) et sur des volontaires en Thaïlande (45)...

3. Le Protocole d'étude

3.1. Les critères de sélection des sujets pour l'essai

L'étude a porté sur les enfants de 2 à 5 mois non encore vaccinés (sauf au BCG); ce sont donc les mêmes candidats des vaccins habituels du PEV.

- les **critères d'admission** sont :
 - . un poids corporel supérieur à 3 kg
 - . un bon état de santé
 - . le consentement des parents.

- les critères d'exclusion sont :

- . une fièvre en cours ($T_2 > 38^{\circ}\text{C}$)
- . une maladie aigüe ou chronique en cours
- . une complication pathologique
- . une goutte épaisse positive après recherche de *Plasmodium*

3.2. Les vaccins administrés

. Le vaccin anti-sporozoïtes sous la forme associée à la toxine tétanique (TT): (NANP)₃ -TT.

- . les vaccins suivants du PEV: D.T. Coq-Polio*
- . Autres vaccins: Oreillons, rubeole, rougeole

Tous les vaccins sont véhiculés dans le strict respect de la chaîne de froid.

3.3. Les doses vaccinales

- Pour (NANP)₃ -TT la dose de 100 ug (par injection) est retenue sur la base des essais d'inocuité et de tolérance effectués sur des individus. Les résumés des différents essais sont consignés en appendice I et II.
- Pour les autres vaccins les doses habituellement administrées ont été données.

3.4. La taille des échantillons

C'est un essai randomisé en double aveugle. Trois groupes d'enfants ont été constitués: un groupe témoin (I) et deux groupes d'essai (II et III). Compte tenu des perdus de vue au cours de l'étude et de l'effectif minimum permettant une comparaison statistique, chaque groupe comportera au départ 40 enfants au moins soit un total minimum de 120 enfants.

3.5. Le déroulement de l'essai

. Tous les enfants reçoivent les vaccins du PEV dans le galbe de l'épaule gauche.

Au niveau de l'épaule droite, ils reçoivent respectivement en sous-cutané:

- Pour le groupe témoin (I) 3 doses de TT
- Pour le groupe II 2 doses de TT et 1 dose de (NANP)₃ TT
- Pour le groupe III 3 doses de (NANP)₃ - TT

* Diphtérie, Tétanos, Coqueluche, Poliomyélite

. Les doses sont espacées d'un mois, et les vaccins contre les oreillons, la rubeole et la rougeole sont administrés à la fin de l'étude.

3.6. Le calendrier d'administration des vaccins

Il est résumé dans le tableau VI :

Tableau VI : Calendrier d'administration des vaccins.

Vaccins	J 0	J30	J60	J90	J 120	J 150	J180
<u>Groupe (témoin). I</u>							
Bras gauche TT		X	X	X			
Bras droit PEV		X	X	X			X
<u>Groupe II</u>							
Bras gauche - TT		X		X			
- (NANP) ₃ -TT			X				
Bras droit PEV		X	X	X			X
<u>Groupe III</u>							
Bras gauche : (NANP) ₃ -TT		X	X	X			
Bras droit PEV		X	X	X			X

3.7. Le Choix de la période et de la durée de l'étude

La période de Juin à Décembre a été retenue pour l'étude. La vallée du Kou (site d'essai) est une région d'holoendemicité palustre avec 2 pics de transmission se situant respectivement en Juillet et Octobre. Ces périodes de transmission intense du paludisme étaient les meilleures pour tester l'efficacité du vaccin.

Nous avons choisi la durée de 180 jours pour l'étude car les précédents essais qui ont eu lieu au USA et en Thaïlande font état d'un délai d'efficacité d'environ 30 jours pour une dose unique de (NANP)₃-TT (45:3). Nous avons choisi ce suivi de 3 mois après la dernière administration vaccinale compte tenu de nos doses pratiquées et pour recueillir plus de données.

3.8. La tolérance vaccinale

Les enfants qui font la fièvre après administration des vaccins et ne présentant aucune cause d'ordre infectieux, reçoivent du paracetamol (50 mg/kg) et au besoin sont soumis à un enveloppement froid. Toute étiologie retrouvée est adéquatement traitée.

Entre les séances les cas de maladies sont conduits à l'infirmerie de la zone, traitée et notification est faite à l'équipe de vaccination. Les accès palustres sont traités à la chloroquine à la dose de 25 mg/kg en 3 jours selon le schéma OMS.

3.9. L'examen clinique

Avant toute séance de vaccination chaque enfant subit un examen clinique complet comprenant: la prise du poids et de la température l'examen de la rate les prélèvements de sang pour la détermination de l'hématocrite la recherche de *Plasmodium* et les dosages immunologiques.

Après chaque séance de vaccination, les enfants sont gardés en observation pendant une heure afin de détecter d'éventuels effets secondaires: ils sont réexaminés 48 heures plus tard pour la recherche de réactions locales et pour la prise de température corporelle.

Tableau VII résume le calendrier des examens cliniques et biologiques pratiqués à chaque séance.

Tableau VII : Calendrier des examens cliniques et biologiques effectués.

Examen clinique	Jours										
	0	2	30	32	60	62	75	90	120	150	180
<u>examen physique</u>											
General (poids, température, pouls, rate)	X				X					X	
Les réactions immédiates	X		X		X						
Les réactions locales		X		X		X					
<u>Prélèvement biologique</u>											
Goutte épaisse/Frottis	X		X		X		X	X	X	X	X
Hématocrite	X		X		X		X	X	X	X	X
Prélèvement sérologique	X		X		X		X	X	X	X	X

3.10. Diagnostic biologique de l'infection Plasmodiale

3.10.1. Diagnostic parasitologique

Chez chaque enfant nous confectionnons tous les 30 jours sur une lame une goutte épaisse et un frottis pour l'identification des parasites. Après séchage à l'air libre, et fixation du frottis à l'alcool méthylique, la lame est colorée par la méthode de Field et laissée sécher sur un porte-objet.

La lecture microscopique des étalements se fait à l'objectif 100x immergé dans l'huile de cèdre, la densité parasitaire est exprimée en nombre d'hématie parasitées par microlitre (mm^3) de sang sur la goutte épaisse, en dénombrant les parasites pour 1000 globules blancs comptés. Le taux normal de leucocytes est le chiffre moyen de 10000/ mm^3 pour la tranche d'âge étudiée. L'identification de l'espèce plasmodiale est faite sur le frottis

3.10.2. Diagnostic séroimmunologique

Tous les 30 jours un échantillon de sang du bout de doigt est déposé sur du papier buvard (confetti), séché ensuite et conservé dans une enveloppe plastique. Les confetti sont déposés à l'abri de l'humidité dans une boîte contenant un dessiccateur et gardés à la température voisine de 37°C; ils sont ensuite envoyés à Bâle pour les tests immunologiques.

Pour le titrage des anticorps les tests sont réalisés en ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) selon la méthode décrite par Etlinger et coll 1988. (21) les antigènes utilisés sont le (NANP)50, et la TT, la BSA (Bovine Serum Albumine) servant comme contrôle. Les dilutions sont pratiquées de façon standard au 1/100^e pour la détermination des concentrations d'IgM et IgG après évaluation des densités optiques (DO) au spectrophotomètre. L'évolution des titres d'ac s'objective par la comparaison des valeurs de J0, J75 et J150.

3.10.3. La détermination de l'hématocrite.

L'hématocrite de chaque enfant est déterminée grâce à un microtube capillaire, tous les mois sur place à l'aide d'une microcentrifugeuse à pile.

3.11. Les critères de diagnostic de l'accès palustre.

Ils sont fondés sur la base d'études antérieures menées au Centre Muraz de Bobo-Dioulasso (45). Le diagnostic d'accès palustre (paludisme maladie) est porté devant la présence de l'association de :

- une température $\geq 38^\circ\text{C}$
- une densité parasitaire (DP) ≥ 10.000 Globules Rouges Parasités/ mm^3

- un traitement antimalarique efficace
- lorsque la fièvre est cliniquement inexplicquée on parle d'accès palustre simple; lorsque une autre étiologie infectieuse est prouvée on parle d'accès palustre associé.

4. Le plan de travail

Il est resumé dans le tableau VIII:

Tableau VIII Plan de travail

Opérations	J0	J2	J30	J32	J60	J62	J90	J150	J180
Vaccination	x		x		x				
Examen cliniques	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Goutte épaisse}									
Hématocrites }	x		x		x		x	x	x
Prélèvements } sérologique									

5. L'analyse des données collectées

L'analyse a été faite de façon manuelle et/ou avec un microordinateur (Macintosh Plus) permettant le contrôle systématique des données et la mémorisation des résultats sur disquette.

5.1. Les principales variables étudiées

Elles sont les suivantes :

- les titres des ac anti-sporozoïtes
- l'incidence par groupe de l'infection malarique
- la morbidité palustre par groupe (cas de paludisme infection et de paludisme maladie).
- les hématocrites
- les poids corporels

5.2 Les paramètres d'efficacité

Ils sont les suivants

- l'incidence du portage de parasite (incidence des cas de paludisme infection).
- l'incidence cumulée des accès palustres
- l'évolution comparée des moyennes des ac vaccinaux
- l'évolution comparée des hématocrites, poids corporelles
- les critères d'efficacité : a) l'immunogénicité, se définissant comme une augmentation des titres d'ac d'au moins 4 fois les titres initiaux (titres de J0). b) l'absence de parasites en fin d'immunisation par (NANP)₃-TT.

5.3. Les paramètres d'inocuité

Ils sont les suivants

- les réactions secondaires
- les décès en rapport avec le vaccin

5.4 Les hypothèses principales à vérifier

Elles sont les suivantes

- le vaccin est efficace, alors des différences significatives existent entre les groupes d'essai (II et III) et le groupe témoin (I).
- le vaccin n'est pas efficace : il n'y a pas de différence significatives

5.5. L'analyse statistique.

L'analyse est faite de façon manuelle et/ou avec un microordinateur. (Machintosh Plus).

- manuellement : par la méthode de Chi² de Yates
: par la méthode de Tukey (7).

6. Les aspects éthiques

Les essais sont menés conformément aux principes de la Déclaration d'Helsinki" concernant l'éthique des essais cliniques adoptée par l'AMS* en juin 1964 et amendée par la 29ème AMS (Tokyo, Octobre 1975) et la 35ème AMS (Venice Oct; 83).

Les habitants concernés (Vallée du Kou) ont été largement informés de ce que cette étude représente pour les enfants, par l'intermédiaire des structures médicales et para-médicales (infirmiers - assistantes sociales - matrones) Un consentement verbal des parents a été obtenu, et ils ont également été informés de la possibilité de se retirer de l'étude à n'importe quel moment.

Le vaccin n'a pas posé de problème de tolérance chez les 35 volontaires de Bâle (Suisse) (43) et chez les 30 enfants de la Vallée du Kou, chez qui des essais de tolérance ont été effectués. Quelques réactions locales passagères ont été observées.

Le protocole d'étude a été soumis à l'approbation du Ministère de la Santé et de l'Action Sociale du Burkina. Le Directeur provincial de la santé du Houet (dont dépend la Vallée du Kou) a assisté au démarrage de l'étude.

Appendice I

Essai clinique randomisé du vaccin antiparasitaire (NANP)₃-TT (RO 40-2361) et de l'interferon (IFN- (Ro 23.44000)réalisé en double aveugle avec un placebo de contrôle .

(ROCHE - Research report N° B - 117491) 3/11/88

Trente cinq volontaires adultes bien portants ont reçu chacun 2 doses de 200µg en IM de (NANP)₃-TT en 8 semaines d'intervalle. En plus un groupe a reçu un placebo(0,25.10⁶ IU) un second groupe : le même placebo (10⁻⁶ UI), et un 3ème groupe reçoit IFN gamma. On évalue la tolérance et l'immunogénicité du vaccin.

Aucun des participants n'a présenté de réaction d'intolérance immédiate, ni d'altération de l'état physique et biologique. Des réactions locales communes ont été observées: Une douleur à la première injection chez tous et chez 54% après la seconde . Une enflure au point d'inoculation dont la durée est plus longue(de 30 à 40 heures) dans le groupe 3 par rapport au groupe 1.

Après les 2 injections, la proportion de seroconversion après test immunologique (ELISA ou IFA) est de 71% après la première et de 80% après la seconde. Les pics de titre d'Ac sont sensiblement les mêmes dans les 3 groupes. La stimulation lymphocytaire *in vitro* est significative pour TT, mais elle ne l'est pas pour (NANP)₃.

Ces observations permettent de conclure que le vaccin est bien toléré et induit la synthèse d'anticorps. Mais l'utilisation d'IFN gamma aux doses de notre essai n'est pas un adjuvant utile

Appendice II

Essai clinique de la tolérance et de l'immunogénicité du vaccin anti-sporozoïte, (NANP)₃-TT (Ro 40.2361) chez des enfants d'Afrique de l'Ouest (Vallée du Kou - Burkina Faso).

ROCHE - Research report N° B - 117'492) 10/11/88.

Trente (30) enfants d'une zone rurale du Burkina Faso à paludisme meso et holoendémique, ont reçu une injection IM de (NANP)₃ aux doses suivantes :

- 200 µg pour le groupe d'enfant de 11 à 15 ans
- 160 µg - - - - - 6 à 10 ans
- 100 µg - - - - - 1 à 5 ans

Aucune réaction d'intolérance au niveau de l'état général, physique et biologique n'a été observée. Les réactions locales se limitaient à la douleur plus une induration au point d'injection. La fréquence de cas de réactions locales est plus élevée dans le dernier groupe (enfant moins âgés : 6/10).

Le taux d'IgG pour (NANP)₅₀ et de 40% pour TT .

Cet essai permet de conclure que le vaccin aux doses indiquées est bien toléré et induit une seroconversion chez les enfants antérieurement exposés au paludisme.

VII- RESULTATS ET INTERPRETATION

- 1. Répartition des sujets étudiés**
- 2. Tolérance vaccinale**
- 3. Evolution du poids et de l'hématocrite**
- 4. Resultats parasitologiques et cliniques**
- 5. Résultats immunologiques**

1. Répartition des sujets étudiés

Les résultats globaux de suivi individus par individus sont indiqués en Annexe.

Les enfants étudiés sont d'âge compris entre 2 et 5 mois avec une moyenne d'âge de 3 mois. Leur répartition par sexe et par groupe se trouve résumé dans le tableau qui suit .

Tableau IX : Répartition des enfants par sexe et par groupe au départ de l'étude.

Groupes	Sexe Féminin	Sexe Masculin	Total
I (Témoin)	17	24	41
II	23	20	43
III	21	18	39
TOTAL	61	62	123

La représentativité des 2 sexes est bien équilibrée sur l'ensemble de l'échantillon. Pour de multiples raisons le nombre d'enfants ayant pris le départ de l'essai se trouvera diminué à la fin. Le tableau qui suit compare la taille de l'échantillon au début et à la fin de notre essai.

1.2. Tableau X: Répartition par groupe des effectifs au départ et en fin d'étude.

Groupe	effectifs	
	Au départ	A la fin
I (Témoin)	41	34
II	43	36
III	39	33
TOTAL	123	103

Pour l'ensemble de l'étude le taux moyen de participation est de 83,76%. Les raisons qui ont souvent justifié les absences sont: les travaux agricoles (86%) les voyages (10%). Dans 4% des cas aucune justification n'a été trouvée.

Nous avons déploré 3 cas de décès, tous du groupe II.

- . Le premier est survenu 17 jours après la 2ème séance de vaccination et après un épisode de diarrhée aiguë ayant évolué pendant 2 semaines environ.
- . Le second fait suite à une méningite cérébrospinale survenue 38 jours après la 2ème séance de vaccination.
- . Le troisième est consécutif à une hydrocéphalie survenue 75 jours après la 2ème séance de vaccination.
- . Nous n'avons pas trouvé de rapport entre les 3 décès et l'administration du vaccin (NANP)₃-TT.

2. La tolérance vaccinale

Les enfants ont reçu au total 347 injections de TT ou de (NANP)₃-TT au bras droit et le même nombre en vaccins du PEV au bras gauche.

Aucune réaction généralisée n'a été observée après les séances de vaccination. Les réactions locales apparaissent toutes 48 heures après les séances et se répartissent comme on le voit dans le tableau XI.

Tableau XI : Répartition par groupe de l'existence ou non de réactions locales après les 3 séances de vaccination. (J2, J32, J62).

Groupe	Nombre de réactions					
	J2		J32		J62	
	Non	Oui	Non	Oui	Non	Oui
I (Témoin)	40	1	37	0	35	0
II	42	1	40	0	41	0
III	38	1	34	0	36	0
TOTAL	120	3	111	1	112	0

Les réactions s'observent dans les trois groupes, et se limitent à une induration de moins de 8 mm de diamètre au point d'injection et/ou à une douleur à la forte pression. Dans tous les cas nous n'avons pas observé de prurit. On remarquera, en comparant les réactions des groupes II et III que la répétition des doses n'a pas d'effet ni sur la nature, ni sur l'intensité des réactions locales.

3. Evolution du poids et de l'hématocrite des enfants au cours de l'étude.

La moyenne des poids et des hématocrites observés au cours de l'essai nous donne l'évolution par rapport aux valeurs de départ. Le tableau suivant nous resume par groupe cette tendance évolutive.

Tableau XII : Evolution par groupe des moyennes des valeurs des poids et des hématocrites observés pendant l'essai.

Groupes	I (témoin)	II	II
<u>Poids (kg)</u>			
moyenne J0	6.2	6.1	6.0
valeur de l'évolution	+ 1.4	+ 1.5	+ 1.5
<u>Hématocrite</u>			
moyenne J0	32	32	32
valeur de l'évolution	- 4	- 4	- 4

La tendance évolutive du poids est semblable dans tous les groupes avec un gain allant de 1,4 à 1,5.

La moyenne des hématocrites a baissé au cours de l'essai, uniformément dans les 3 groupes.

4. Résultats parasitologiques et cliniques du paludisme.

4.1. Les infections rencontrées au cours de l'étude sont dues principalement à *P. falciparum*. Nous avons observé 2 cas d'infection à *P. malariae* (associé à *P. falciparum*) et un seul cas de *P. ovale*, (non associé). Ces proportions des 3 espèces plasmodiales est conforme à leur répartition épidémiologique comme dans ce cadre d'étude. Les deux tableaux suivants comparent l'évolution entre les 3 groupes, du paludisme infection représenté par les proportions de GE positives.

Tableau XIII a : Evolution comparée des incidences du paludisme infection entre les groupes I (témoin) et III.

Groupe	Incidence							Incidence Globale
	J30	J60	J75	J90	J120	J150	J180	
I (témoin)	2/39	7/37	11/35	8/35	7/35	6/35	11/33	53/249
III	0/38	9/38	9/35	6/37	13/36	12/35	16/33	65/252
Chi 2 (yates)	0,48	0,03	0,43	0,15	1,52	1,72	0,54	1,97

Les différentes comparaisons statistiques des incidences périodiques donnent des Chi2 yates < 3,58 (Différence significative si Chi2 yate ≥ 3,58, pour un risque d'erreur < 5%).

Nous pouvons conclure que l'incidence du paludisme infection dans les groupes I (témoin) et III augmente du J0 au J180 de façon semblable.

Tableau XIIIb : Evolution comparée des incidences du paludisme infection dans les groupes II et III.

Groupes	Incidences							Incidences globales
	J30	J60	J75	J90	J120	J150	J180	
II	4/40	8/40	8/39	7/27	14/39	8/36	11/36	60/267
III	0/38	9/38	9/35	6/37	13/36	12/35	16/33	65/262
Chi 2 (Yates)	2,2	0,12	0,05	0,01	0,01	0,72	1,61	0,38

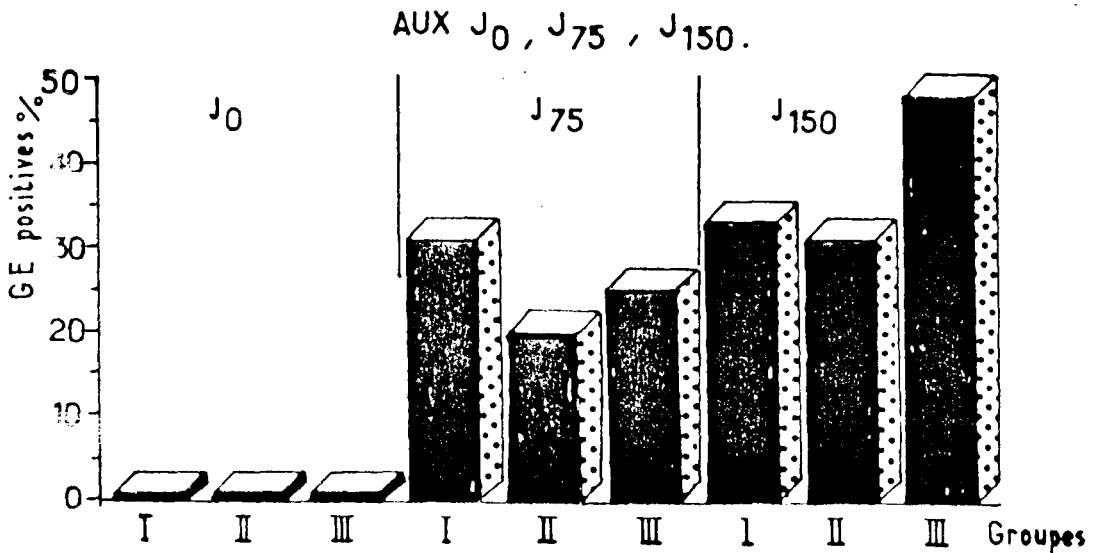
Ici également les comparaisons statistiques des incidences périodiques donnent des Chi 2 (Yates) < à 3,58.

Nous pouvons encore conclure que l'incidence du paludisme infection dans les groupes II et III augmentent du J0 au J180 de façon semblable.

En conclusion : l'évolution de l'incidence de l'infection palustre au sein des trois groupes respectifs au cours de l'essai est identique

La figure suivante est une représentation graphique de l'évolution de l'incidence de l'infection palustre dans les 3 groupes au (J0 J75 J180).

Figure 3 Evolution par groupe de l'incidence de l'infection palustre aux J0, J75, J150.



4.2. Distribution des densités parasitaires au sein des 3 groupes.

Nous avons utilisé la méthode de Tukey pour comparer la distribution des densités parasitaires observées dans les 3 groupes pour sa simplicité et son efficacité. En effet elle permet de connaître la médiane des DP et son intervalle de confiance sans condition de validité particulière: (taille de l'échantillon, type de distribution des DP) Cependant l'intervalle de confiance n'est calculé que pour un risque d'erreur < 5%

4.2.1. Etendue des densités parasitaires du groupe I (témoin).

Valeurs: 109-127-170-300-350-510-940-1100-1630-1830-2100-3170-5360-6910-7640-234060-25000-26150-31410-60000.

Valeur de la médiane : 1260

Valeurs de son intervalle de confiance: (933 - 17782).

4.2.2. Etendue des densités parasitaires du groupe II.

Valeurs: 100-113-140-160-186-190-204-220-229-270-280-530-600-800-960-1355-1390-1500-1600-1830-1890-2830-3100-5110-11280-12400-1500-32000-95000.

Valeur de la médiane : 871

Valeurs de son intervalle de confiance (400 - 1905).

4.2.3. Etendue des densités parasitaires du groupe III

Valeurs : 200-230-250-280-330-440-730-1080-1230-1320-1390-1630-2150-2160-3480-4000-4360-5160-5330-5790-6030-8120-9180-15300-26000-22360-26200-34000-36000-40400-48730.

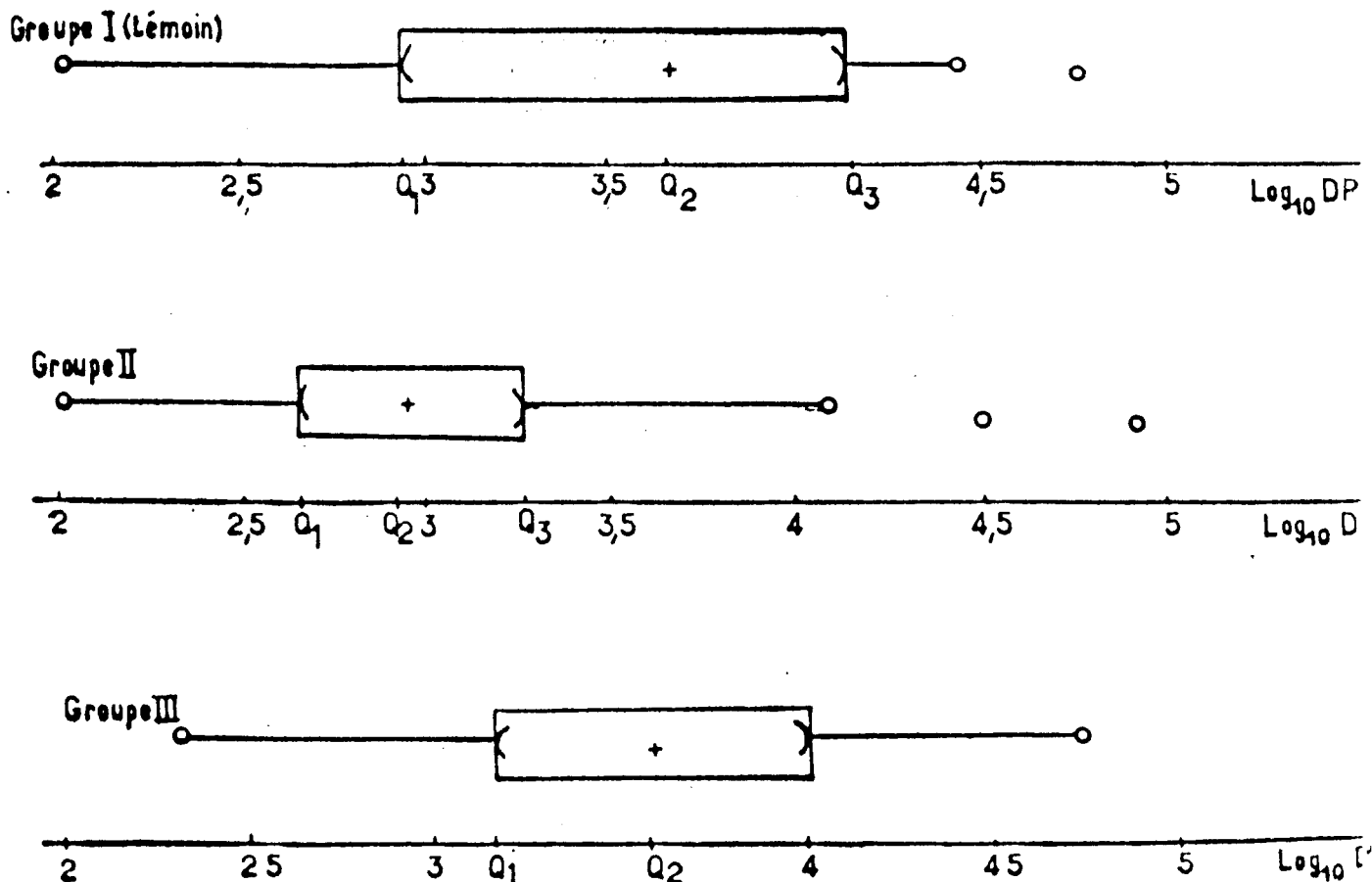
Valeur de la médiane : 3981

Valeurs de son intervalle de confiance: (1000-1698)

Ainsi les densités parasitaires maximales observées dans les 3 groupes sont :- DP = 50000 pour le groupe I (témoin)
- DP = 95000 pour le groupe II
- DP = 48730 pour le groupe III

La représentation graphique faite dans la figure suivante permet de comparer les médianes des 3 groupes.

Figure 4: Représentation graphique des médianes des densités parasitaires par groupe. (Après transformation logarithmique en base 10)



Q2 : Valeur de la médiane

Q1, Q3 : Quartiles

o : Valeurs extrêmes

() : Intervalle de confiance de la médiane

Nous constatons que les médianes des densités parasitaires des trois groupes sont semblables, car les intervalles de confiance se chevauchent.

Les densités parasitaires observées dans les groupes ne correspondent pas toutes à des états de paludisme clinique.

4.3. Les accès palustres observés au cours de l'essai.

Pendant l'essai nous avons observé en tout 3 cas de paludisme clinique (accès palustre). Ils sont du groupe II.

- Au jour J30 nous diagnostiquons le premier cas. Il s'agit d'un accès simple qui a duré 2 jours. L'hématocrite était à 28%, la DP à 15.000 GRP/mm³ et la température corporelle à 38,7°C.

- Le second au jour J60 est également un accès simple de 4 jours d'évolution avec un hématocrite à 28%, une DP à 11280GRP/mm³ et une température corporelle à 39,2°C.

- Le dernier cas, au jour J150 est un paludisme associé à une pneumopathie aiguë, avec un hématocrite à 30%, une DP à 5110GRP/mm³ et une température corporelle à 38,9°C.

4.4 Conclusion

Nous pouvons conclure que les trois groupes se ressemblent face au paludisme clinique. Les 3 cas observés dans le groupe II ne permettant pas d'établir l'existence d'une différence significative avec les 2 autres groupes (Chi² = 3,1, inférieur au seuil de signification (3,84) pour un risque d'erreur admissible $\leq 5\%$)

5. Résultats immunologiques

5.1. Les tests immunologiques effectués au cours de l'essai concernant les Ac anti(NANP)50 ont donné des résultats que nous avons répartis selon le type d'immuno globuline (IgB et IgM) et regroupés aux jours J0 - J75 - et J150.

Le tableau qui suit compare les résultats obtenus entre les trois groupes.

Tableau XIV : Répartition du nombre de séropositifs en IgG et en IgM dans les 3 groupes.

Seropositifs Groupes	J0		J75		J150	
	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG
I (témoin)	1/41	2/41	4/35	8/35	3/35	8/35
II	2/42	6/42	6/39	31/39	1/36	13/36
III	0/39	2/39	3/35	31/35	1/35	13/35

Les seules différences significatives que nous établissons, se trouvent entre le nombre de séropositifs en IgG du groupe I et celui du groupe II (Chi²=23,6 et alpha < 0,001) ; et entre le nombre de séropositifs en IgG du Groupe I et celui du groupe III (Chi² = 24,1 et alpha < 0,001)

Dans les autres cas de comparaison statistique les 3 groupes sont semblables. On constate que le nombre de seropositifs quelque soit la fraction d'Ac considérée augmente à partir de J0 et atteint un maximum à J75 pour diminuer au J150.

Le tableau qui suit donne les proportions de seroconversion et le nombre des enfants ayant plus que quadruplé à J75 leur titre d'ac par rapport à J0 ("seroconversion efficace").

Tableau XY. Répartition par groupe du nombre de seroconversion et de "seroconversion efficace" au jour J75.

Groupe	Nombre		Effectifs
	Sero conversion	Seroconversion efficace	
I (témoin)	7	2	35
II	27	22	39
III	29	21	35
Total	63	45	119

Le taux de "seroconversion efficace" est significativement plus élevé dans les groupes II 56% et III 60% par rapport au groupe I 5%.

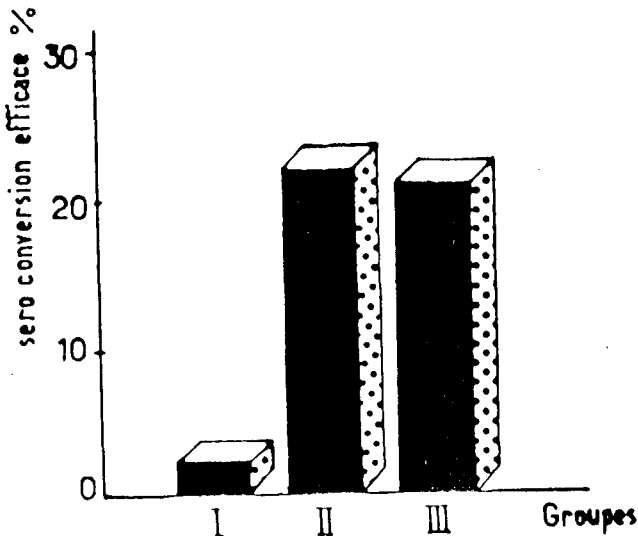
(comparaison entre I et III $\chi^2 = 23,3$ avec $\alpha < 0,001$)

comparaison entre I et II $\chi^2 = 22,1$ avec $\alpha < 0,001$)

Une différence significative s'établit donc entre le nombre de seroconversion dans chaque groupe d'essai (II et III) d'une part et celui du groupe I (témoin) d'autre part. Nous pouvons conclure que l'administration de (NANP)3-TT s'accompagnent de la synthèse d'Ac spécifiques

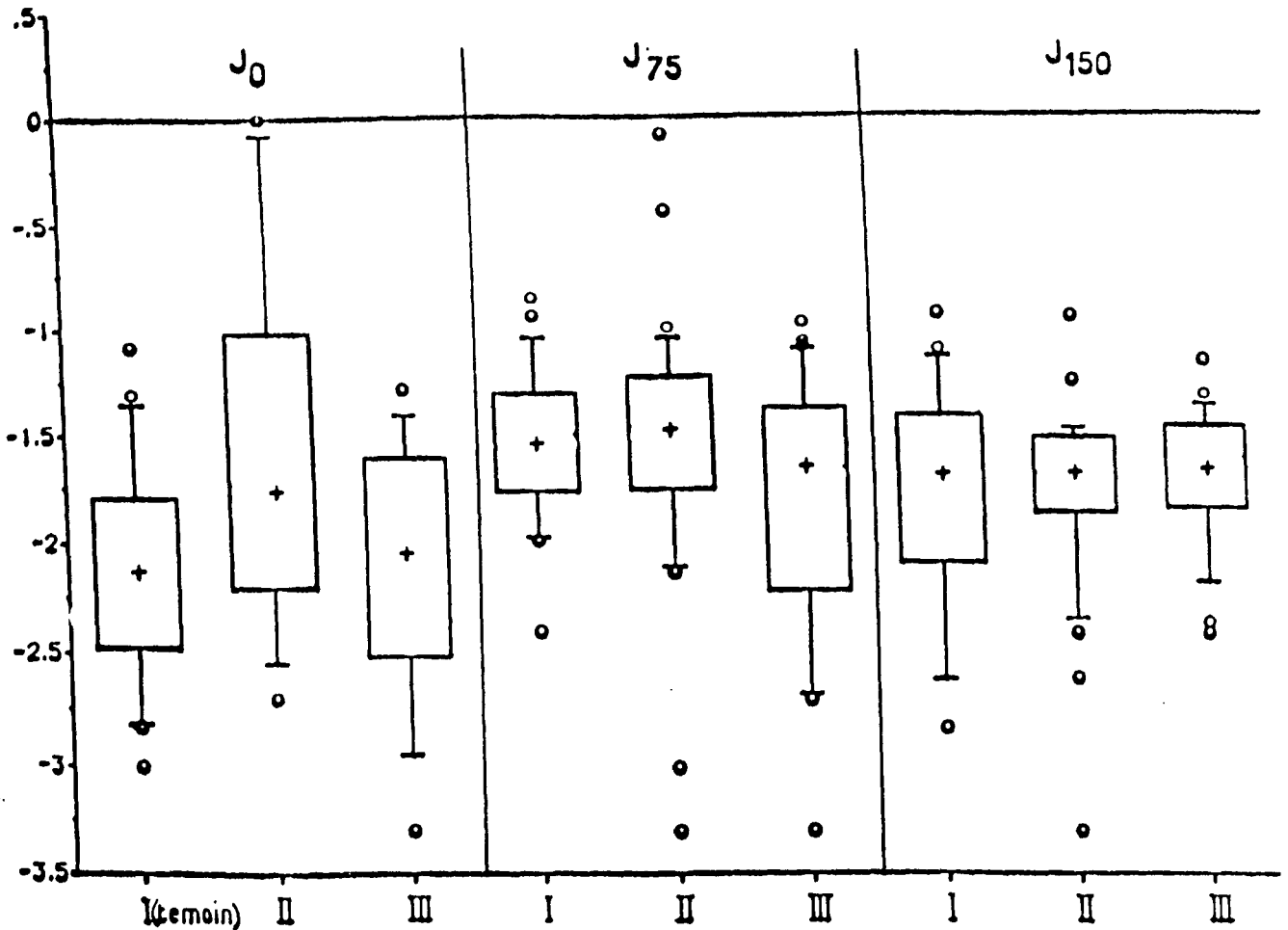
le vaccin est immunogène au vue de ces résultats. La figure qui suit est une représentation graphique du nombre de "seroconversion efficace" par groupe au J75.

Fig. 5 Nombre de "seroconversion efficace" par groupe au jour J75



Les deux figures suivantes représentent l'évolution par groupe des médianes des titres d'IgM et d'IgG aux J0, J75, J150.

Fig.6. Représentation des médianes des titres d'Ac IgM des 3 groupes respectifs aux J0 - J75 et J150.

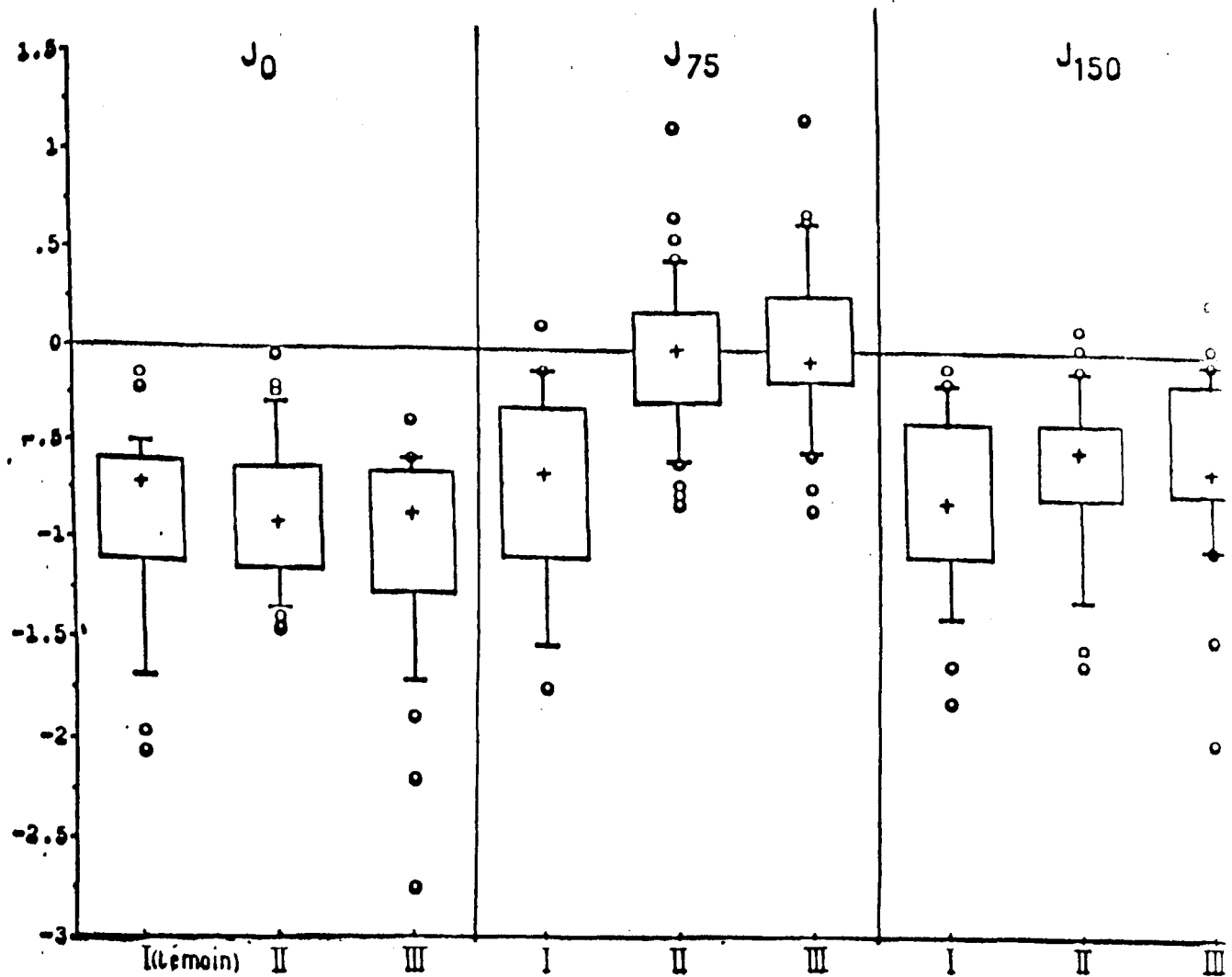


Les médianes des Ac de type IgM aux J0 - J75 et J150 sont semblables dans les 3 groupes (les intervalles de confiance se chevauchent).

On observe aussi pour tous les groupes une hausse légère des médianes des titres d'Ac IgM au J75 avec une tendance à la baisse au J150. La synthèse d'IgM spécifique de l'Antigène sporozoitaire n'est pas modifiée par l'administration di vaccin (NANP)3-TT.

L'évolution en plateau des IgM est le reflet de la transmission continue du paludisme dans la zone d'étude.

Fig. 7: Representation graphique des médianes des titres d'anticorps du type IgG des groupes respectifs (I. II. III.) aux jours: J0 - J75 - J150.



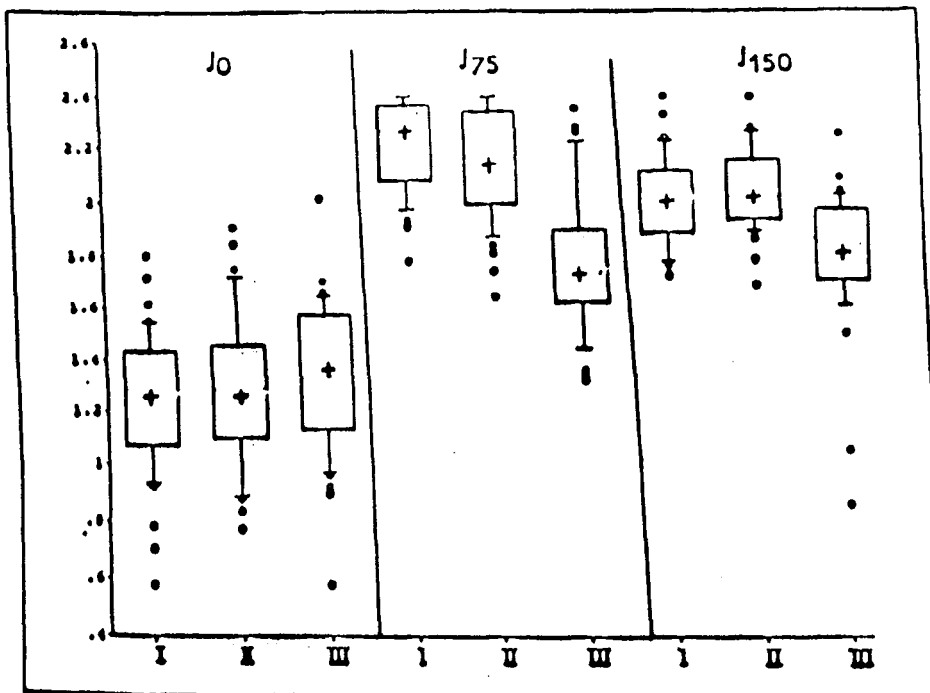
La médiane des Ac (IgG) s'élève au J75 et retombe au J150 pour les groupes II et III.

Cependant pour le groupe témoin (I) la médiane reste sensiblement au même niveau aux J0, J75 et J150. L'administration du vaccin (NANP)3-TT s'accompagne donc de la synthèse d'IgG spécifique de l'antigène sporozoitaire.

Le pic de la réponse immunologique visible au J75 pour les groupes d'essai II et III représente des gains respectifs au niveau des médianes de : + 0,70 et + 0,72 par rapport aux niveaux du J0. (le gain pour le groupe I est de 0,05).

5.2. :L'étude de la réponse immunologique à la TT a donné des titres d'Ac spécifiques dont les médianes se trouvent représentées dans la figure suivante .

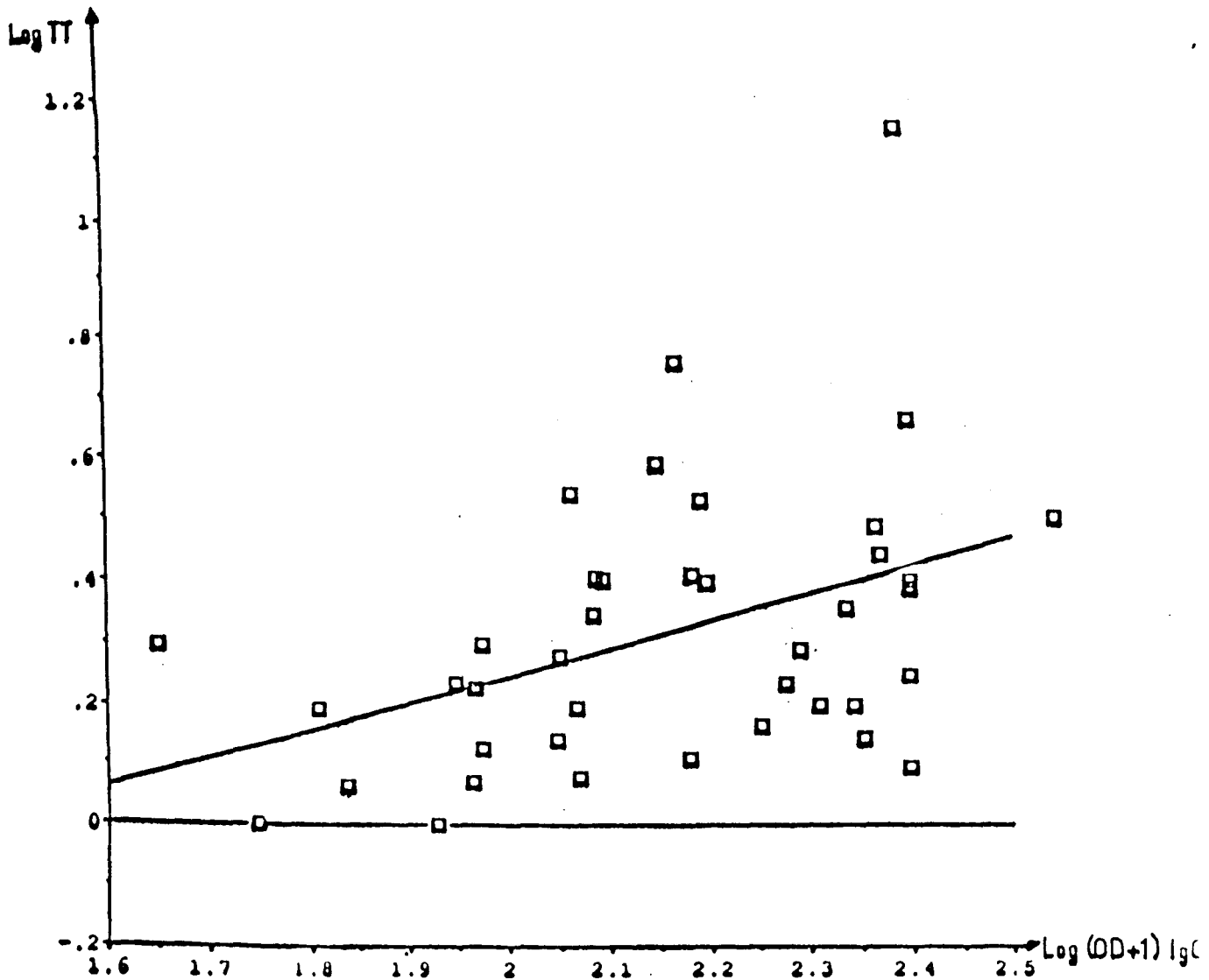
4.4.Fig. 7. Représentation graphique de la répartition des ac anti-TT(ELISA) par groupe au J0 - J75 - J150 après transformation logarythmique en base 10.



Les médianes des ac anti-TT de chaque groupe s'élève significativement à partir de J0 atteint un maximum à J75 et s'abaisse légèrement au J150. Cependant au J75 le niveau de la médiane du groupe III est significativement plus faible que celui des groupe I et II, cela est-il dû à une compétition entre le (NANP) et le TT ?.

La figure suivante compare l'évolution des titres d'IgG à celle des titres de TT.

4.5. Fig. 8: Représentation graphique de la tendance évolutive des IgG anti (NANP)50 en fonction des Ac anti-TT au J75 dans le groupe II (après transformation logarithmique en base 10).



On constate une corrélation positive entre les niveaux des ac anti TT et celui des IgG (NANP)5 (coefficient de corrélation $r = 0,28$). Dans le groupe III. On obtient une figure semblable. Nous ne pouvons pas établir l'existence d'une inhibition compétitive entre l'antigène sporozoitaire (NANP)3, et la toxine tétanique (TT) dans l'association vaccinale (NANP)-TT.

VIII-DISCUSSION DES RESULTATS

IX - CONCLUSION

VIII- Discussion des résultats

La randomisation de notre étude, l'utilisation de critères de sélection ont rendu les groupes identiques pour l'essai vaccinal. Nous pouvons effectivement constater que les moyennes des poids, hématokrites et parasitémies dans les 3 groupes sont semblables au jour J0. L'emploi de la méthode du "double aveugle" nous a permis de minimiser les biais couramment rencontrés dans ce type d'essai. Ces conditions indispensables ayant été réunies nous pouvons discuter les résultats obtenus.

1.1. De la tolérance et de l'inocuité du vaccin (NANP)3-TT.

Au cours de l'essai, nous n'avons observé ni réactions secondaires majeurs immédiates ou tardives, ni décès liés au vaccin. L'évolution du poids, de l'hématocrite et de la température des enfants est identique pour les 3 groupes. Les 4 cas d'induration bénigne au point d'injection sont les seules réactions locales observées. Ils seraient dus à l'adjuvant (hydroxyde d'aluminium) (46) et /ou à la toxine tétanique (TT).

En effet, 2 des 3 cas d'induration observés au jour J0 avaient seulement reçu du TT à l'épaule droite. La nature et l'intensité des réactions locales ne semblent pas liées au nombre d'injections reçues, puisque dans chaque groupe d'essai (II et III) nous n'observons pas d'induration aux 2ème et 3ème séances. Ces résultats démontrent que la triple dose vaccinale de 100µg de (NANP)3-TT est bien tolérée et sans danger pour les enfants de l'étude. Ils s'accordent avec ceux de LEVINE et coll 1986 (34) HERRINGTON et coll 1987 (17), STRURCHLER D et coll 1987 (43) ETLINGER et coll 1988 (21), GUIGUENDE T.R. et coll 1988 (26).

La baisse des hématokrites dans les 3 groupes au cours de l'essai peut être liée à la prévalence de l'infection palustre de 22 à 25% que nous avons observée dans les 3 groupes. Une évolution semblable des hématokrites a été décrite par GUIGUENDE T.R. et coll 1988 (26) au cours d'un essai de tolérance et d'immunogénicité du vaccin (NANP)3-TT chez des enfants de 1 à 10 ans.

1.2. De l'immunogénicité et de l'efficacité du vaccin.

Au cours de notre essai les Ac anti (NANP)3-TT ont été identifiées chez tous les enfants. La médiane des Ac du groupe témoin (I) reste sensiblement au même niveau aux jours J0, J75 et J150. Pour les 2 groupes d'essai (II et III) leurs médianes respectives s'élèvent ensemble, atteignent leurs maximum vers le jour J75 et reviennent au jour J150 au niveau de celle du groupe témoin (I). Cela est probablement dû aux infections naturelles pour le groupe témoin.

La synthèse des IgM est parallèle à celle des IgG comme l'avait déjà décrit Grown et coll 1988 (45). Cependant nous remarquons dans notre étude que la réponse vaccinale concerne plus la fraction IgG, car l'évolution des IgM reste identique pour les 3 groupes. La moyenne des titres d'Ac IgG au jour J75 est : $DO = 1340$ pour le groupe I, $DO = 1973$ pour le groupe II et $DO = 2376$ pour le groupe III.

La part du vaccin dans l'expression humorale représente alors 0,5 à 0,80 fois celle des infections naturelles. Les moyennes d'Ac IgG restent cependant très en dessous des titres observés par Etlinger et coll 1988 (21) chez des individus prémunis vivant dans une région d'endémie palustre du Kenya ($DO \geq 10.000$).

L'immunogénicité du vaccin est donc faible et de courte durée (inférieur à 150 jours). Levine M et coll 1988 (34) partagent cet avis ; mais nous ne retrouvons pas comme lui : 1) un lien entre le niveau des Ac anti (NANP)50 et le nombre de doses vaccinales administrées, 2) une inhibition compétitive entre (NANP)3 et TT.

La réponse humorale au (NANP)3-TT du jour J75 du groupe II ne semble pas atténuée par la préimmunisation au TT du jour Jo. Webster K.H et coll 1988 (45) quant à lui a constaté une réduction des Ac anti (NANP)3-TT chez les individus ayant reçu auparavant de la TT.

La prévalence du paludisme infection au cours de l'essai et son incidence au jour j75 sont semblables pour les 3 groupes. Les densités parasitaires réparties dans ces 3 groupes ne sont pas significativement différents. **Nous ne retrouvons donc pas une liaison entre l'ascension des Ac anti (NANP)50 et l'évolution de l'infection palustre dans les groupes d'essai (II et III).** Tout ceci nous incite à dire que la vaccination par le (NANP)3-TT ne confère pas une immunité protectrice. Stephen et coll 1986 (42) estiment, que ce fait serait dû au faible niveau des Ac vaccinaux obtenus. Cependant son hypothèse n'explique pas notre constat suivant : parmi les 2 enfants ayant eu les plus hauts titres d'Ac ($DO=13984$ et $DO=12800$) au jour J75, le premier a développé un accès palustre avec une DP de 23000 parasites/ μ l alors que d'autres enfants, avec des titres d'Ac bien plus faibles, ont supporté des charges parasitaires de 48500 et 95000 p/ μ l. Alors d'autres mécanismes (par exemple cellulaires) qui participent à l'expression immunitaire pourraient peut-être l'expliquer. Les prochaines études devront considérer ce volet pour une meilleure interprétation des résultats.

1.3. De la particularité de la population étudiée.

Notre étude longitudinale concerne les jeunes enfants de 2 à 5 mois dans une région palustre où la prémunition s'installe très progressivement jusqu'à l'âge de 9 à 12 ans. Boudin C. 1984 (8). Les études antérieures s'intéressaient pour la plupart à des sujets adultes vivants oui ou non en zone d'endémie palustre. (45), (42), (18), (26), (34). La comparaison des résultats tient peu compte des diverses particularités auxquelles pourrait être lié l'efficacité du vaccin.

L'essai du vaccin sur d'autres tranches d'âge (par exemple 3 à 5 ans) aurait peut-être donné d'autres résultats.

IX. CONCLUSION

L'étude de la tolérance et de l'efficacité du vaccin anti-sporozoïtes, (NANP)3-TT, nous a permis de conclure ce qui suit :

- La triple dose de 100 µg chacune de (NANP)3-TT, administrée en même temps que les vaccins du PEV, est bien tolérée et immunogène pour les enfants de 2 à 5 mois.
- Entre les 2 composantes antigéniques du vaccin (NANP)3-TT nous n'avons pas constaté une inhibition compétitive dans la réponse humorale spécifique.
- L'expression d'IgG induit par le vaccin contre le paludisme est de courte durée.
- La vaccination au (NANP)3-TT des enfants de 2 à 5 mois n'induit pas une immunité protectrice contre le paludisme .

L'inéficacité constatée du vaccin est-elle due à un niveau insuffisant des Ac, ou à une faiblesse de l'immunogénicité du trimère (NANP)3, ou encore y auraient-ils d'autres raisons? Sephen L H 1988(42), Webster K H 1988 (45) et Hockmeyer W.T. 1988 (30) suggèrent de nouvelles approches, afin d'améliorer l'efficacité des vaccins contre le paludisme. Elles sont axées sur: l'utilisation de fortes doses vaccinales; l'emploi de nouveaux adjuvants et protéines de liaison; l'étude du rôle des liposomes, des proteosomes et des lymphocytes dans la réponse vaccinale; la recherche de l'existence d'une restriction antigénique dans l'expression humorale et cellulaire.

Nos résultats laissent toutefois place à un espoir devant le pouvoir immunogène du vaccin (NANP)3-TT. Les recherches devront donc se poursuivre, et de telles études être répétées.

X - Références Bibliographiques

12. -Clyde D.F. ; Mc.Carthy V.L. ; Miller R.M. ; Woodward W.E.
Immunization of man against *falciparum* and vivax malaria by use
of attenuated sporozoite.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 24, 1975, pp. 397-401.
13. -Cochrane A.H. ; Nussenzweig R.S. ; Nardin E.H.
Immunization against sporozoites in malaria
(J.P. Kreired) Accadémic press 1980, 3; pp. 163-203
14. -Cohrane A.H. ; Santoro F. ; Nussenzweig R.S. ; Nussenzweig V.
Gwadz R.W.
Monoclonal antibodies identify the protective antigens of
sporozoites of *plasmodium knowlesi*.
Proc Natl. Acad. Sci. USA, 1982, 79; pp. 5651-5655.
15. -Coppel R.L. ; Cowman A.F. ; Lingelbach K.R. ; Brown G.V. ; Anders R.F.
Isolate specific S. antigen of *Plasmodium Falciparum* contains a
repeated sequence of eleven amino acids.
Nature 1983, 306; pp. 751-756.
16. -Coppel R.L. ; Cowman A.F. ; Anders R.F. ; Bianco A.E. ; Sant R.B.
Linglbach K.R. ; Brown J.V. ; Kemp D.G.
Immune sera recognize en erythrocytes A. *Plasmodium falciparum*
antigen composed of repeated amino acid sequences.
Nature 1984 (London), 310; pp. 789-792.
17. -Deïdre A. Herrington ; David F.C. ; Geneviève L. ; Manuel C. ;
James R.M. Jonathan D. ; Shaheda B. Arthur M.F. ; Edgar P.H.
Dieter G. ; Nardin E. ; Nussenzweig R.S. ; Nussenzweig V. ; Michaël
H. ; Levine M.M.
Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide
malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* sporozoites.
Nature vol. 328, 16 July 1987; pp. 257-259.
18. -Deïdre A. Herrington ; David F.C. ; Murphy J.R. ; Jonathan D.
Shaheda B. ; Edgar P.H. ; Elizabeht N. ; Nussezweig R.S. ;
Nussenzweig V. Myron M. L.
Malaria vaccines : experience with sporozoites vaccines against
falciparum malaria.
Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. HLTH Vol19 n°3
Sept. 1988; pp. 369-373.
19. -Deloron P. ; Pappaïoanou M. ; Campbell J.H. ; Khoromona
C.O. ; Heymann D. ; Nguyen-Dinh P.
Paludisme à *Plasmodium* chloroquinorésistant en Afrique de l'Est
Bull. Soc. Pathol. Exot. 1983, 76; pp. 364-368.
20. -Ellis C.
Cloning and expression in E coli of the malaria sporozoite
surface antigen gene from *Plasmodium Knowlesi*.
Nature, 1983, 302; pp. 536-538.

21. -Etlinger H.M. ; Arthur M.F. ; Dieter G. ; Edouard P.H. ; Max J. ; Richard J. ; Francesco S. ;Dieter Stürchler; Bela T. ; Arnold T. ; Hugues M.
Assessment in humans of a synthetic peptide based vaccine against the sporozoite stage of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*.
The journal of immunology Vol 140 Nº2 15 January 1988;
pp.626-633.
22. -Ettlin. R.
Roche Research Report B. 119'975 (1986)pp.1-14
23. -Ettlin R.
Roche Research Report B. 119'978 (1986)pp.1-16
24. -Guiguemde T.R. ; Gbary A.R. ; Ouedraogo J.B. ;
Surveillance de la chimiosensibilité de *Plasmodium falciparum* aux anti malariques en Afrique de l'Ouest :
Chloroquinosensibilité in vivo au BURKINA FASO (Région de Bobo-Dioulasso).
CRCP/OCCGE Rapport Nº 92/86/PAR-CM.
25. -Guiguemde T.R. ; J. Lebras; Baudon D. ; Ouédraogo J.B. ; Gbary A.R. ; Douchet C. ;
Baisse de la sensibilité et résistance de *Plasmodium falciparum* en Afrique de l'Ouest.
Publications Médicales Africaines Nº Spécial 1988 Nº 91 bis
pp.33-38.
26. -Guiguemde T.R. ;Ouédraogo J.B. ;Haller L. ;Etlinger H. ;Stürchler D
Tolerability of a single dose of Ro 40-2361 (Malaria sporozoite vaccine: (NANP)3-TT)in West african children. Final study
REPORT Roche Research Report Nº B 117'492; 1988.
27. -Guiseppe de Guidice;Howard. D.E. ; Chantal T. ; Stephan S.B. ; Niklauss W. ; Antonio V. ; Antonelo P. ; Antoine A.D. ; Thierry A.F. ;Paul H.L. ; Marcel T.
Antibodies to the repectitive epitope of plasmodium falciparum CS in a rural Tanzanian community; a longitudinal study of 132 childrens.
Am J. Trop. Med. Hyg. 36 (2); 1987 pp 203-212
28. -Hall Eichinger D.G. ; Arnot D.E. , Enea V. Ellis J.
Processing polymorphism, and biological significance of P.190 a major surface antigen of the erythrocytic forms of *Plasmodium falciparum*.
Molec. Biochem. Parasitol. 1984. 11; pp. 61-80.
29. -Herrington D.A. ; Clyde D.F. ; Losonsky G. ;Cortesia M. ;Davis J. ; Murphy J.R. ; Felix A.M. ; Heimer E.P. ; Jillesen D. ; Nardin E. ; Nussenzweig R.S. ; Nussenzweig V. Hollingdale M.R. ; Levin M.M. ;
Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide tetanus toxoid conjugate malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* sporozoites
Nature. 328 - 1987 pp. 257-263.

10. -Hockmeyer W.T. ; Ballou W.R. ; Wirtz R.A. ; Gordon D.M. Hollingdale M.R.
Sporozoite immunity and vaccine development
Prog. Allergy. Vol 41; pp. 1 -14 (Karger, Basel. 1988)
31. -Hommel M. ; David P.H. ; Oligino L.D.
Surface alterations of erythrocytes in *Plasmodium falciparum* malaria Antigen variation, antigenic variation and the role of the spleen
J. Exp. Med. 1983, 157; pp. 1137-1148.
32. -Kilejan A. Sharma Y.D. ; Karoui H. ; Naslund L. 1986
Histidine rich domain of the knob protein of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83; pp 6065-6069
33. -Kohler G. ; Milsten C.
Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity
Nature 1975, 256; pp. 495-497
34. -Levine James W. ; and Wayne T. Hockmeyer
Structure of the circumsporozoites gene in 18 strains of *Plasmodium falciparum*.
Mol. Biochem. Parasit. 152, 1986; pp. 305-316.
35. -Bride J.S. Newbold C.I. ; Anan R. ; 1985.
Polymorphism of a high molecular weigh schizont antigen of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*
J. Exp. Med., 161; pp. 160-180.
36. -Mc Ebell.
The papyrus Ebers. Levin & Munsksgaard (Copenhagen) 1937
37. -Nardin E.H. ; Nussenzweig R.S. Collins W.E. ; Harinasuta K.P. Chomcharn Y.
Circumsporozoites proteins of human malaria parasites *Plasmodium falciparum* & *P. vivax*.
J. Exp. Med. 1982, 156; pp 20-30.
38. -Nussenzweig R.S. ; Vanderberg J.P. ; Spitalny G.L. ; Orton C. ; Most H.
Sporozoites induced immunity in mammalian malaria. A Review.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 1972, 21 pp 722-728.
39. -Nussenzweig R.S.
Proceedings of the Conference on Malaria in Africa
Washington DC, USA, December 1-4; 1986. pp. 22-29.
40. -Perrin L.H.
Immunity to asexual erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*
Sciences 1982, 217; pp. 245-254

ANNEXES

LEXIQUE

- GROUP : Plainte = Group 1 (témoin)
- " ONCE NANP = Groupe II
- " THRICE NANP = Groupe III

- WG = Poids (WGt0 = poids au J0)
- PULS= pouls (puls 0 = pouls au J0)
- Resp = fréquence respiratoire (resp 0 = freq resp au J0)
- Temp = température (temp 0 = température J0)
- Phys = examen physique (Phys 0 = exam phys au J0)
- Hct = hématocrite (Hct 0 = hématocrite au J0)
- Idno = numero d'identification
- RESyst=réaction généralisée
- REloc= réaction locale
- Sme = goutte épaisse
- μ -BSA=titre anticorps après test avec BSA
- Y (1:100)= titre anticorps après test avec (NANP)50 dilution standard faite au 1/100^e
- YDiff = différence entre les titres (BSA) et les titres (NANP)50
- Ypos = différence positive entre titre (BSA) et titre (NANP)50
- TT = titre anticorps anti toxine tétanique.
- dDrop = départ.
- Ch = traitement par la chloroquine(Ch0 = traitement fait au J0)

Annexe 1 - Affections survenues pendant l'étude chez les sujets

	Intercurrent events & treatments	Ch30	Ch60	Ch75	Ch90	Ch120	Ch150	Obs(d)	dDrop	Reason
1		•	yes	•	•	•	•	150	•	•
2	d30: pneumonia: Bactrim	•	•	•	•	•	•	150	•	•
3		•	yes	yes	•	•	•	150	•	•
4		•	•	•	•	•	•	150	•	•
5	d60: cough: Bactrim	•	•	•	•	•	•	150	•	•
6		•	•	•	•	•	•	75	90	Depart
7		•	•	•	•	•	•	150	•	•
8		•	•	•	•	•	•	150	•	•
9		•	•	•	•	•	•	120	•	•
10	d75: absent for 6 wks	•	•	•	•	•	•	90	•	•
11		•	•	•	yes	yes	yes	150	•	•
12		•	yes	•	•	•	•	150	•	•
13		•	•	•	•	•	•	150	•	•
14		•	•	•	yes	•	•	150	•	•
15		•	•	•	•	•	•	150	•	•
16	d60: meningitis: hospitalized	yes	•	•	•	•	•	150	•	•
17		•	yes	•	•	•	•	60	75	Depart
18		•	yes	•	yes	•	yes	120	•	•
19		•	•	•	•	•	yes	150	•	•
20		•	•	•	yes	yes	•	150	•	•
21		•	•	•	•	•	•	150	•	•
22		•	•	•	•	•	•	0	30	Depart
23		•	•	yes	•	•	•	150	•	•
24		•	•	yes	yes	•	•	90	120	Other
25	Persistent parasitemia	yes	yes	•	•	•	•	150	•	•
26		•	•	•	•	yes	•	150	•	•
27		•	•	•	•	•	•	30	60	Depart
28		•	•	•	•	•	•	120	•	•
29		•	•	yes	•	•	•	150	•	•
30		•	•	•	•	•	•	0	30	Depart
31		•	•	•	•	•	•	150	•	•
32		•	•	•	•	yes	•	120	•	•
33		•	•	yes	•	•	•	150	•	•
34		•	•	yes	yes	•	•	150	•	•
35	d60: bronchitis: Bactrim	•	•	•	•	•	•	150	•	•
36		•	yes	•	•	•	•	150	•	•
37		•	•	•	•	•	•	150	•	•
38		•	•	yes	yes	•	•	150	•	•
39		•	•	•	•	•	•	150	•	•
40		•	•	•	•	•	•	150	•	•
41		•	•	•	•	•	yes	150	•	Depart
42		•	•	•	•	•	•	150	•	•
43		•	•	•	•	yes	•	150	•	•
44		•	yes	yes	•	yes	•	150	•	•
45		•	•	•	•	•	•	0	0	Depart
46	d60: conj	•	•	•	•	•	•	150	•	•
47		•	•	•	•	yes	yes	150	•	•
48		•	•	•	•	•	•	150	•	•
49	d60: conj; d150: missed final ev	•	•	•	•	•	•	120	150	•
50	d60: conj	•	•	•	•	yes	•	150	•	•
51	Wk 0: pyrexia	•	•	•	•	•	•	150	•	•
52	d60: diarrhea; died 2 Aug 88	•	•	•	•	•	•	30	60	Other
53		•	•	•	•	•	•	150	•	•
54		•	•	•	•	•	•	150	•	•
55	d75: meningitis; died 23 Aug 88	•	•	•	•	•	•	60	75	Other
56	d60: pneumonia: Terpone	•	•	•	•	yes	•	150	•	•
57		•	•	•	•	•	•	150	•	•
58		•	•	•	•	•	•	120	•	•
59	Wk 9: pneumonia: Neocodion	•	•	•	yes	yes	yes	150	•	•
60		•	•	•	•	•	•	150	•	•
61		•	yes	•	yes	yes	yes	150	•	•
62		•	•	yes	•	•	•	150	•	•
63		•	yes	•	•	•	•	150	•	•
64	Wk 9: pyrexia: Preponan	•	•	yes	•	yes	•	150	•	•
65		•	•	yes	•	•	yes	150	•	•
66		•	•	•	•	•	yes	150	•	•
67	d60: conj	•	•	•	•	•	•	150	0	Other
68		•	yes	•	•	•	•	150	•	•
69	d150: pyrexia; died 9 Oct 88	yes	•	•	•	•	yes	120	150	Other
70		•	•	•	•	•	•	150	•	•
71		yes	•	•	•	•	•	150	•	•
72		•	yes	•	•	•	•	150	•	•
73	d30: pyrexia	•	yes	•	•	•	•	60	75	Depart
74		•	•	•	•	•	•	150	•	•

Annexe 1 - suite

	Intercurrent events & treatments	Ch30	Ch60	Ch75	Ch90	Ch120	Ch150	Obs[d]	d0drop	Reason
75		•	•	yes	•	yes	yes	150	•	•
76		•	•	•	•	yes	•	150	•	•
77		•	yes	yes	yes	yes	yes	150	•	•
78	d30: pyrexia	yes	•	yes	yes	•	•	150	•	•
79		•	•	•	•	•	•	150	•	•
80	d60: pneumonia: Bactrim	•	•	•	•	•	•	150	•	•
81		•	•	•	•	•	•	150	•	•
82	d150: pneumonia	•	•	•	•	•	yes	150	•	•
83		•	yes	•	•	yes	yes	150	•	•
84		•	•	•	•	•	•	150	•	•
85	d60: pyrexia	•	yes	•	•	yes	•	150	•	•
86	d30: pneumonia: Bactrim; d 60&150: pyrexia	•	•	•	•	•	•	150	•	•
87		•	yes	•	yes	yes	yes	150	•	•
88	d60: conj	•	•	•	•	yes	•	150	•	•
89	d60: pyrexia	•	yes	•	•	•	•	150	•	•
90		•	•	•	•	•	•	60	75	Depart
91		•	•	•	•	•	•	150	•	•
92		•	•	•	•	•	•	150	•	•
93		•	•	•	•	•	•	150	•	•
94	d30: pneumonia: Bactrim	•	•	•	•	•	•	90	120	Other
95		•	•	•	•	•	•	150	•	•
96		•	•	•	•	•	•	120	•	•
97		•	•	•	•	•	•	150	•	•
98		•	yes	•	•	•	•	150	•	•
99	d0: pyrexia	•	•	•	•	•	•	120	•	•
100		•	•	yes	•	yes	yes	150	•	•
101		•	•	•	•	yes	•	150	•	•
102	d75&90: Pf plus Pm	•	•	yes	yes	•	•	150	•	•
103		•	•	•	•	•	yes	150	•	•
104		•	•	•	•	•	•	150	•	•
105		•	•	•	yes	yes	yes	150	•	•
106		•	•	yes	•	•	•	150	•	•
107		•	•	yes	•	•	yes	120	•	•
108		•	•	•	•	•	yes	150	•	•
109		•	•	•	•	•	•	120	•	•
110	d60: pyrexia: Preponon	•	•	yes	•	•	•	150	•	•
111	d0: pyrexia	•	yes	yes	•	•	•	150	•	•
112		•	•	•	•	•	•	120	150	Other
113	d60&75: absent for work	•	•	•	•	•	•	90	•	•
114	d60: pneumonia: Bactrim	•	yes	•	•	•	•	120	•	•
115		•	•	yes	•	yes	•	150	•	•
116	Wk 4: pneumonia: Terpine	•	yes	yes	•	yes	•	150	•	•
117		•	•	•	yes	yes	•	150	•	•
118	d0: pyrexia	•	•	•	•	•	•	150	•	•
119		•	•	•	•	yes	•	150	•	•
120		•	•	•	•	yes	•	150	•	•
121		•	yes	•	•	•	yes	150	•	•
122		•	•	•	yes	•	•	150	•	•
123		•	yes	•	•	•	•	120	•	•