

Ministère de l'Enseignement
Supérieur et de la Recherche
Scientifique



République du Mali

Un Peuple - Un But - Une Foi



FACULTÉ DE MÉDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTO-STOMATOLOGIE

Année universitaire 2008- 2009

Thèse N°...../M

TITRE

**L'IMPACT DE L'ALPHA-THALASSEMIE SUR LE
PALUDISME CHEZ LES ENFANTS DE 0 A 5 ANS DANS
LA VILLE DE KANGABA ET LE VILLAGE DE KELA**

THESE

Présentée et soutenue publiquement le...../...../2009

Devant la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie

Par

Mlle Mariam Soumaïla DOUMBIA

Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie
(Diplôme d'Etat)

JURY

Président : Pr Moussa Harama

Membre: Dr Sékou Bah
Dr Guimogo Dolo

Co-directeur : Dr Aldiouma Guindo

Directeur : Pr Mahamadou Traore

DEDICACES

Je dédie ce travail à **ALLAH**, le Tout Puissant, le très miséricordieux et à son prophète Mohamed (PSL), pour m'avoir donné la vie, le courage et la force nécessaire à mener ce travail.

A la mémoire de ma mère feu Kadidiatou Samaké

Je suis au grand regret que tu ne sois pas ici pour savourer le fruit de tant d'efforts et de sacrifices.

Tu nous as appris le travail bien fait, l'honnêteté et le respect du prochain. Nous garderons l'image de la mère exemplaire que tu fus.

Dors en paix chère maman!!!

A mon père Soumaila Doumbia

Inutile de dire quoi que ce soit car tu as tout donné pour que ce jour soit. Puisse **ALLAH** te garder encore longtemps parmi nous.

A ma mère Rokia Sacko

Ceci est le fruit de ton soutien constant, de tes prières et bénédictions. Ce modeste travail est et restera toujours le tien. **QU'ALLAH** te garde encore longtemps parmi nous.

A mon oncle Amadou Samaké

Plus qu'un oncle tu as été un père pour moi. Tu as toujours été présent autant pendant les moments gais que tristes, je ne te dirais jamais assez merci.

Ce travail est le tien cher oncle.

A mes frères Seydou Doumbia, Abdou Doumbia, Souleymane Doumbia, Kaïdara Doumbia, Adama Doumbia, Souleymane Samaké, Lassine Doumbia, Kassé Doumbia, Daouda Doumbia Mamadou Doumbia, Papou Samaké.

Le soutien social dont j'ai bénéficié de votre part a été d'un appui inestimable pour la réalisation de ce travail. Puisse Dieu renforce la solidarité au sein de la famille.

A mes sœurs Maïmouna Doumbia, Rabia Doumbia, Fatoumata Doumbia, Aminata Sissoko, Adiaratou Doumbia, Ramatou Doumbia, Salimata Doumbia, Sitan Doumbia, Bintou Samaké

Ce travail est le votre. A aucun moment je n'ai manqué de vos soutiens et de vos conseils. Vous m'avez entouré d'amour et de confort. Que Dieu vous préserve plus longtemps à nos cotés. Recevez ici toute ma modestie et mon attachement indéfectible.

A mes belles sœurs Tiguida Sissoko et Fily Camara

Vos soutiens ne m'ont jamais manqués durant toute ma carrière scolaire et universitaire. Recevez toute ma reconnaissance et merci pour tout.

Ce travail est le votre restons unis pour la vie.

A toute la population de Kangaba et Kela.

A tous les Enseignants de la Faculté de Médecine de Pharmacie et D'odonto-stomatologie.

REMERCIEMENT

A tout le personnel de la MRTC

Notamment: DR ANNOU MOISE SOMBORO, DR KADER DEMBELE,
DR SAIBOU DOUMBIA.

A mes collègues internes de la MRTC :

MAMADOU BALAM, BAKARY DEMBELE, SEKOU TRAORE,
DJENEBA FOFANA, MORY DOUMBIA.

A mes amis :

Bintou Maiga, Aminata Diakité, Mariam Bamba, Alimata Ouattara, Dr
Tidiani Bakayoko, Dr Mohamed Cissé, Leleki Ballo, Adama Keita, Issa
Diarra, Nouhoun Diallo, MAPI Traoré, Fatim Traoré, Dr Dramane Koné,
Doussou Coulibaly, Papou Ouattara, Alassane Diarra, Mohamed Yaya Djiré,
Cheik Oumar Doumbia , Allaye Koné, Yakouba Traoré, Awa Ouatarra,
Amadou Diarra.

Plus que des amis vous avez été des frères et sœurs pour moi.

Mes chers amis ce travail est le votre.

Que le Tout Puissant nous donne une longue vie pleine de succès, de
santé, et maintienne aussi longtemps que possible ce lien.

Trouvez ici l'expression de mes sentiments mérités.

MENTION SPECIALE

Pr Mahamadou Traore

Dr Guimogo Dolo

Dr. ALDIOUMA GUINDO

Dr. Seydina Diakité

Dr. Karim Traoré

Dr Bréhima Diakité

A notre maître et co-directeur de thèse

Docteur Aldiouma Guindo

- Pharmacien PHD

- Assistant de recherche au MRTC

-Chef de l'unité de polymorphismes des globules rouges et paludismes,

-Secrétaire Général de la SOMAHO (Société Malienne d'Hématologie et d'Oncologie).

Cher Maître,

Vous nous avez accueillis dans votre unité avec une extrême bienveillance et ouverture d'esprit ; vous nous avez donné le goût de la recherche.

Votre simplicité, votre rigueur scientifique et votre amour pour le travail bien fait font de vous un exemple à suivre.

Veillez trouvez ici le témoignage de notre profonde gratitude.

A notre maitre et président de Jury

Professeur Moussa Harama :

- Professeur titulaire de chimie organique**
- Chef du laboratoire de chimie à la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie**
- Professeur de Chimie Analytique Qualitative à la FMPOS,**

Cher maître

Vous êtes une source intarissable de savoir à laquelle plusieurs générations d'étudiants se sont abreuvées.

Beaucoup plus qu'un maître, vous êtes pour nous un père.

Nous avons toujours admiré votre constante disponibilité votre grande humilité et surtout votre force de travail.

En acceptant de présider notre jury de thèse avec spontanéité malgré vos multiples occupations, vous nous honorez et nous en sommes reconnaissants.

Veillez trouver ici l'expression de sincères remerciements et de notre indéfectible attachement.

A notre maitre et jury de thèse

Docteur SEKOU BAH

- PhD en pharmacologie;**
- Master en santé communautaire internationale;**
- Maître assistant en pharmacologie;**
- Pharmacologue à la Pharmacie Hospitalière du CHU du Point G.**

Cher Maitre,

C'est un grand honneur que vous nous faites en acceptant de siéger dans ce jury. Vous nous avez prouvé que nous pouvons compter sur votre disponibilité malgré votre calendrier chargé. Nous vous dédions cette thèse en reconnaissance de tout ce que vous avez fait pour nous.

Veillez cher maître recevoir nos hommages.

A notre maitre et jury de thèse

Dr Guimogo Dolo

- **PhD en parasitologie entomologie médicale**
- **Chef de section Biologie moléculaire à la FMPOS**
- **Chargé de l'enseignement de la génétique à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-stomatologie.**

Cher Maitre,

Avoir accepté de siéger dans notre jury constitue pour nous un grand honneur. La perspicacité et la grande valeur de vos suggestions ont contribué à enrichir ce travail.

Nous vous prions d'accepter aujourd'hui nos vifs et sincères remerciements et notre profonde reconnaissance.

A notre maitre et Directeur de Thèse

PR Mahamadou Traoré

- **Directeur de recherche à L'INRSP,**
- **Chef de laboratoire de génétique à l'INRSP,**
- **Responsable du cours de génétique à la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-stomatologie,**

Cher maitre,

Vous nous faite le grand honneur de nous confier le sujet de cette thèse malgré vos multiples occupations.

En nous suggérant ce travail, en nous guidant dans sa réalisation, vous nous avez appris à être clair et concis.

Soyez rassuré, cher Maitre de notre profond attachement.

Liste des signes et abréviations :

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P. Falciparum : Plasmodium falciparum

HbC : Hémoglobine C

HbS : Hémoglobine S

PCR : Polymérase Chain Reaction

GE : Goutte Epaisse

FM : Frottis Mince

HbA : Hémoglobine Adulte

HbF : Hémoglobine Fœtale

CLHP : Chromatographie Liquide à Haute Performance

VGM : Volume Globulaire Moyenne

TCMH : Teneur corpusculaire moyenne d'hémoglobine

CS Réf : Centre de Santé de Référence

FMPOS : Faculté de Médecine de Pharmacie et d'odonto-stomatologie

CsCom : Centre de Santé Communautaire

Il A : Interleukine A

mm Hg : Millimètre par Mercure

NO : Monoxyde d'azote

µl : Microlitre

mmol /lkcl : millimole par litre de chlorure de potassium

mmol/IMgcl2 : millimole par litre de dichlorure de magnésium

ADN : Acide Desoxy-nucléique

mmol/l : millimole par litre

Cm : centimètre

°c : degré celsius

Ng : nano gramme

SOMMAIRE	Page
I- Introduction.....	1-2
II-OBJECTIFS.....	3
1- Objectif Général.....	3
2- Objectif spécifique.....	3
III- GENERALITES.....	4
A- Paludisme.....	4
1- Définition	4-6
2- Classification.....	7
3-Transmission.....	7
4-Cycle évolutif.....	7-10
5- Manifestation.....	11-12
6- Critères de gravité.....	12-13
7- Physiopathologie du paludisme.....	13-15
8-Mécanisme immunologique.....	15-16
9-Diagnostique biologique du paludisme.....	16-17
B- thalassémie.....	18
1- Définitions et critères de diagnostique.....	18
2- Epidémiologie.....	18-19
3- Description clinique.....	21-23

4- Aspect génétique	23-24
C-Alpha-thalassémie et Paludisme	25
IV- METHODOLOGIE.....	26
1- Site d'étude.....	26
2- Période d'étude.....	26
3- Type d'étude.....	26
4- Population d'étude.....	26
5- Critère d'inclusion.....	28
6- Critère de non inclusion.....	28
7- Définition des cas.....	28
● Paludisme simple.....	28
● Paludisme grave.....	29
8-Paramètre mesure	29
8 1- Paramètre socio démographique	29
8 2- Paramètre biologique.....	29
A- technique d'analyse biologique.....	29
1- Principe.....	29
2- Mode opératoire.....	30
B-Extraction d'ADN par le kit QI AMP.....	34

C-Détection de 3.7 kb responsable de l'alpha thalassémie par PC.....	35-38
V- Résultat.....	40-46
VI- commentaire et discussion.....	47-49
VII- Conclusion et recommandation.....	50
VIII- Références Bibliographiques.....	51-55

I- Introduction :

Le paludisme est une érythrocytopathie fébrile et hémolysante causée par la piqûre d'un insecte du genre anophèle. Il est transmis par un parasite dont quatre espèces sont inféodées à l'homme : *plasmodium falciparum*, *plasmodium vivax*, *plasmodium ovale*, *plasmodium malariae*. *Plasmodium falciparum* est reconnu comme étant l'espèce responsable des formes graves de la malaria [36]. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le paludisme est responsable de 2,7 millions de décès par an avec 90 pour cent des cas survenant chez les enfants de moins de 5 ans [36]. Cependant la sévérité clinique d'une infection pourrait être influencée par les facteurs liés à l'individu atteint. Parmi ces facteurs on peut citer : l'ethnie, l'âge, le statut économique, et surtout les caractéristiques génétiques. A ce titre, les polymorphismes du globule rouge ont été longtemps associés à une protection contre les formes graves de paludisme à *P. falciparum*. L'exemple le plus débattu est celle conféré par l'hémoglobine S (HbS) contre le paludisme [34, 8, 24, 12, 27, 1]. L'hémoglobine C (HbC) qui est la deuxième hémoglobinoïde décrite a été également rattachée à la protection contre le paludisme grave [35, 19, 2, 28, 30]. Très récemment, le déficit en G6PD sous la forme hémizygote fut associé à la protection contre le paludisme [31, 5, 26, 23, 7]. Les thalassémies sont des anomalies de synthèse de l'Hb caractérisées par un défaut quantitatif de synthèse de la globine. Les plus connus sont l'alpha thalassémie et la beta thalassémie. La protection conférée par les thalassémies reste encore faiblement exploré faute d'étude de cohorte. Les seuls arguments en faveur de cette protection contre les formes graves de paludisme reposent sur la grande fréquence des alpha thalassémies dans les zones d'endémie palustre ou ayant connu une histoire d'endémie [14, 3, 25]. Disposant des données d'étude de cohorte, nous nous

proposons d'explorer l'hypothèse de la sélection des sujets porteurs du gène de l'alpha thalassémie contre les formes graves de paludisme à *P. falciparum* dans une population homogène du Mali.

II-Objectifs

1-Objectif général :

Etudier l'impact de l'alpha-thalassémie sur le paludisme chez les enfants de 0 à 5 ans dans la ville de Kangaba et le village de Kela.

2-Objectifs spécifiques :

- Déterminer la fréquence de l'alpha-thalassémie dans la population d'étude.
- Déterminer l'impact de l'alpha-thalassémie sur le paludisme grave dans la population d'étude.
- Déterminer l'influence de l'alpha-thalassémie sur les différents critères de gravité du Paludisme dans la population d'étude.

III- Généralité :

A-paludisme

Le paludisme est une érythrocytopathie fébrile et hémolysante due à la présence et à la multiplication dans l'organisme d'un hématozoaire du genre *plasmodium* transmis par l'anophèle femelle [36].

Sur plus d'une centaine d'espèces de *plasmodium* parasitant les mammifères, des rongeurs, des oiseaux ou même des batraciens, seules quatre sont spécifiques de l'homme et peuvent déclencher la maladie sous des formes plus ou moins graves. Ce sont :

- *Plasmodium falciparum*, à l'origine de la fièvre tierce maligne (espèce prédominante et responsable de 90% de la mortalité due au paludisme) ;

-*Plasmodium vivax* et *Plasmodium ovale* sont à l'origine de la fièvre tierce bénigne avec des rechutes jusqu'à 5 ans après la primo-infection

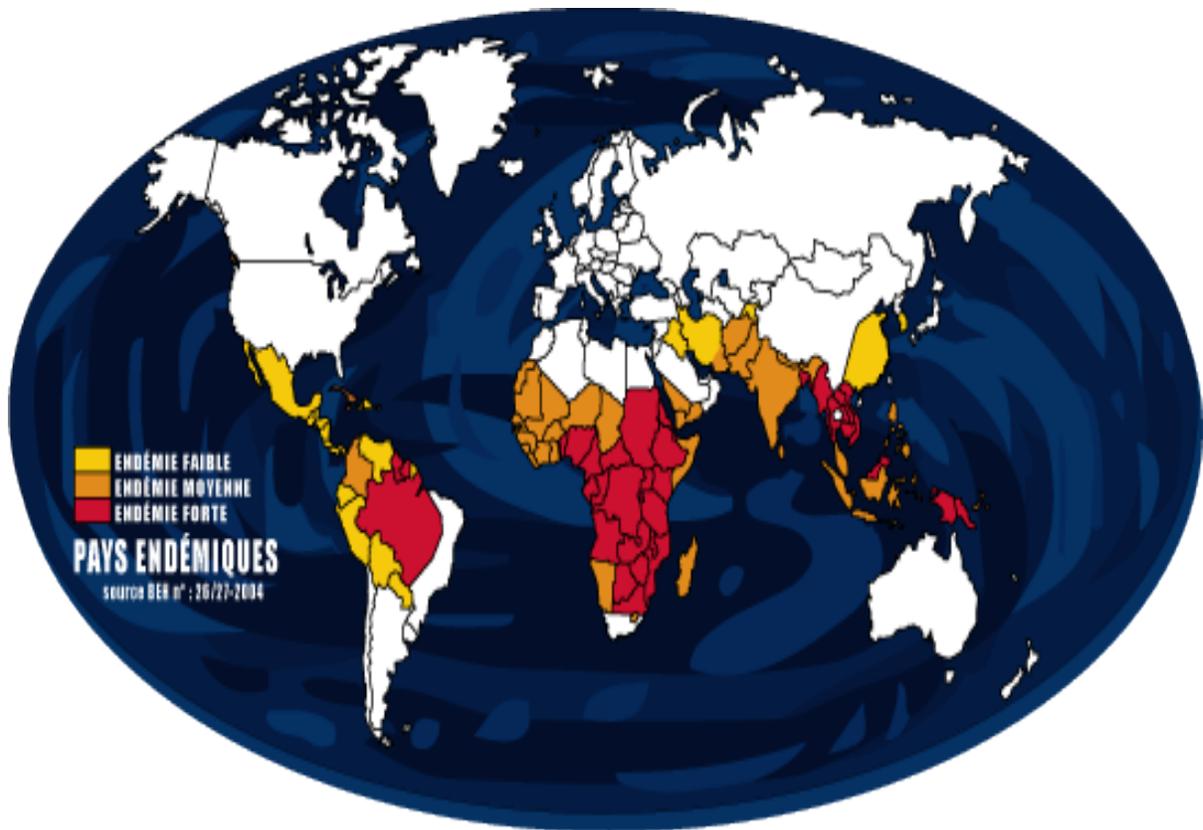
-*Plasmodium malaria*, à l'origine de la fièvre quarte peut provoquer des rechutes jusqu'à 20 ans après la primo-infection.

Avec 2,5 milliards de personnes exposées soit 40% de la population mondiale, 300 à 500 millions de malades dont 10 millions de cas graves, et 1,5 à 2,7 millions de décès par an, le paludisme est la plus importante parasitose dans le monde. Il constitue la première cause de mortalité et de morbidité en Afrique subsaharienne où environ 90% de ses victimes sont enregistrées, 10% en Asie et à l'Ouest de l'Océanie, et moins de 1 % en Amérique [36].

Environ 110 millions d'Africains vivent dans des zones exposées au risque d'épidémie de paludisme, l'OMS estime que 803.000 enfants de moins de 5 ans en Afrique subsaharienne sont morts du paludisme en 2000 et le nombre annuel de décès directement imputables au paludisme est estimé entre 1,1 et 1,3 million [29].

Selon le rapport de 2005 (OMS) sur le paludisme en Afrique, le paludisme serait responsable de près de 20% de décès d'enfants de moins de 5 ans en Afrique et le nombre annuel de décès infantiles dû au paludisme se situe entre 75000 et 200000. Il serait également responsable de 25 à 40% de toutes les consultations externes et 20 à 50% des hospitalisations dans les pays endémiques [29].

Au Mali, le paludisme serait responsable de 14 à 20% de mortalité juvénile [11] et 36% des fièvres chez les enfants de moins de 10 ans pendant la saison des pluies ainsi que 15% des hospitalisations des adultes [13]. L'espèce *Plasmodium falciparum* prédomine avec 85-90% de la formule parasitaire, suivie des espèces *Plasmodium malariae* (10 à 14%); *Plasmodium ovale* (1%) [20].



Carte actualisée en Octobre 2004 - Source BEH

Figure 1: répartition du Paludisme dans le monde (source:travelsante.com [6]).

1- Classification des parasites du paludisme

Les parasites responsables du paludisme appartiennent

- Au Règne des Protistes,
- A l'Embranchement des Apicomplexa (sporozoaires) caractérisés par la présence d'un complexe apical facilitant la pénétration dans la cellule hôte
- A l'Ordre des Haemosporoda
- A la Famille des Plasmodidae
- Au genre *Plasmodium*
- Aux espèces: *falciparum*, *vivax*, *malariae*, *ovale*.

2- La transmission du paludisme :

Il y a trois modes de transmission du paludisme :

- La transmission par piqûre d'un moustique femelle (anophèle).
- La transmission par transfusion sanguine ou par greffe d'organe.
- La transmission trans-placentaire de la mère à l'enfant.

3- Cycle évolutif de *P. falciparum* [33]

a- Chez l'homme :

L'homme est contaminé par la piqûre infestante de l'anophèle femelle. Les formes infectantes du parasite (sporozoïtes) contenues dans la salive sont injectées dans le tissu sous-cutané. A travers le sang ils atteignent le foie où chaque sporozoïte pénètre dans un hépatocyte. Ils s'y reproduisent de façon asexuée : c'est la schizogonie hépatique ou extra-érythrocytaire. Cette schizogonie aboutit à un trophozoïte endocytosomique qui grossit et dont le noyau se divise plusieurs fois. L'hépatocyte parasité éclate et les mérozoïtes libérés pénètrent dans la circulation des capillaires le jouxtant. Chaque mérozoïte va pénétrer dans une hématie.

Dans chaque hématie infestée par un mérozoïte va se dérouler un cycle de reproduction asexuée. Passage par les formes trophozoïtes jeunes (forme en anneau), puis schizonte mûr à nombre de noyaux défini: c'est la schizogonie érythrocytaire ou endo-érythrocytaire.

A l'issue de chaque cycle, les hématies parasitées éclatent de façon généralement synchrone et les mérozoïtes libérés envahissent des hématies saines. Plusieurs cycles se succèdent. Ce cycle dure 48-72 heures en fonction des espèces.

Après environ une semaine, certains mérozoïtes vont se distinguer en commençant le cycle sexué du parasite; les uns vont devenir des gamétocytes mâles, les autres deviendront des gamétocytes femelles.

Il faut retenir que : durant toute la partie du cycle de développement du parasite chez l'homme, celui-ci est sous forme haploïde.

b- Chez l'anophèle

Au cours de la piqûre, l'anophèle ingère des hématies parasitées, seuls les gamétocytes évolueront.

Dès leur arrivée dans l'estomac de l'anophèle, les gamétocytes mâles subissent l'exflagellation et donnent des gamètes mâles mobiles. Chaque gamétocyte femelle mûrit pour donner un gamète femelle volumineux et immobile.

La fécondation de chaque gamète femelle par un gamète mâle donne autant de zygotes appelés ookinètes (de oo = œuf et Kino = mobile) d'aspect vermiforme ($10 \mu\text{m} \times 3 - 4 \mu\text{m}$). Les ookinètes sont déformables (aspect amoeboïde) et se fixent aux cellules de la paroi stomacale si l'espèce d'anophèle convient au parasite. Les ookinètes s'insinuent entre les cellules

de la paroi stomacale du moustique et vont se localiser à la face externe de l'estomac, ils deviennent alors des oocystes.

La durée totale entre le repas contaminant du moustique et la sortie des ookinètes est de l'ordre de 24 heures.

Il faut retenir que : La forme diploïde du parasite est observée seulement au cours de cette brève période s'étendant de la fécondation du gamétocyte femelle par le gamétocyte mâle à la sporogonie.

A l'intérieur de l'oocyste vont se former des sporocystes qui donneront plusieurs centaines de sporozoïtes. A maturité, les oocystes éclatent et les sporozoïtes sont libérés dans l'hémolymphe, en 24 heures environ, la majorité d'entre eux va se concentrer dans les glandes salivaires. Lors de la piqûre d'un humain, l'anophèle injectera de plusieurs dizaines à plusieurs centaines de sporozoïtes

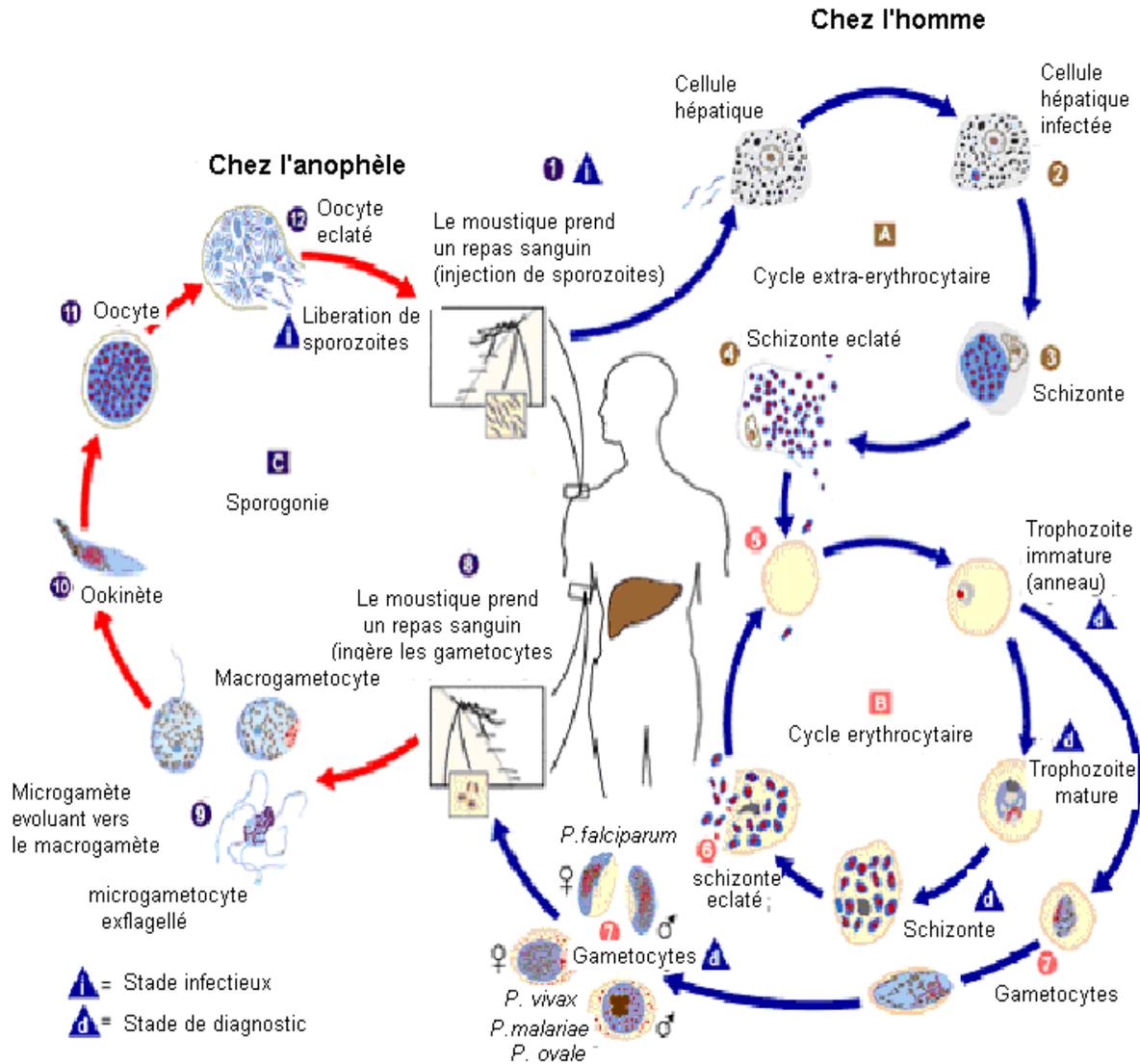


Figure2: Cycle de développement du plasmodium.

Source: National Center for Infectious Diseases, Division of Parasitic Diseases [Department of Health and Human Service US]

3- Manifestations cliniques du paludisme [33]

• La primo-infestation

- Phase d'incubation:

Entre une et plusieurs semaines après la piqûre infectante, elle correspond à la schizogonie hépatique et aux premiers cycles érythrocytaires; pas de signes clinique

- Phase d'invasion:

Cette phase est caractérisée par le syndrome pseudo-grippal avec fièvre continue au début accompagnée de myalgies, céphalées, courbatures. Chez l'enfant on observe des troubles digestifs: nausées, vomissements, diarrhée, douleurs abdominales et hépatomégalie.

- Phase d'état:

Elle Correspond aux schizogonies érythrocytaires, la fièvre est intermittente en principe rythmée par l'éclatement des schizontes mûrs et le déversement du pigment palustre pyrogène dans le sang. On distingue deux types de fièvre:

- Fièvre tierce: accès les 1er, 3ème, 5ème jour etc... soit un rythme de 48 heures
- Fièvre quarte: accès les 1er, 4ème, 7ème jour etc.... soit le rythme de 72 heures.

Chaque accès palustre est caractérisé par la succession de "frisson puis chaleur puis sueur", l'ensemble dure de 10 à 12 heures et est suivi d'une apyrexie. En principe une dizaine d'accès palustre se suivent pour constituer une crise de paludisme. Quand un sujet fait de nouveaux accès après guérison des précédents, il peut s'agir :

- soit de ré-infection (nouvelle piqûre d'anophèle infectée)

- soit de recrudescence (augmentation de la parasitémie jusqu'à un niveau décelable cliniquement chez un sujet après traitement incomplet ou inefficace, ou chez un sujet semi-immun)
- soit de rechute (poussée de parasitémie à partir d'hypnozoïtes hépatiques dans le cas de *P. vivax* et de *P. ovale*)

4- Critère de gravité du paludisme, OMS 2000 [36]

Les formes graves de paludisme à *P. falciparum* sont définies par la présence dans le sang de trophozoïtes de *P. falciparum* associée à au moins un des critères suivants :

- **Paludisme cérébral ou neuropaludisme** : score de Glasgow inférieur ou égal à 9 ou score de Blantyre inférieur ou égal à 2
- **Trouble de conscience** : score de Glasgow compris entre 9 et 15 ou score de Blantyre compris entre 2 et 5
- **Convulsions répétées** : fréquence supérieure à une fois par 24 heures.
- **Prostration**
- **Syndrome de détresse respiratoire**
- **Ictère**
- **Acidose métabolique** : taux de bicarbonates plasmatiques inférieur à 15 mmol/L
- **Anémie grave** : taux d'hémoglobine inférieur à 5g/dl ou hématocrite inférieur à 15%
- **Hyperparasitemie** : parasitémie supérieure ou égal à 4% chez les sujets non-immuns et 20% chez les sujets immuns.
- **Hémoglobinurie macroscopique**
- Insuffisance rénale:

- diurèse inférieure à 40ml/24h ou créatinémie supérieure à 265mmol chez l'adulte
- diurèse <12ml/Kg/24h ou Créatinémie trop élevée pour l'âge de l'enfant
- **Collapsus circulatoire** : tension artérielle systolique inférieure à 60mmHg avant 5 ans ou inférieure à 8mmHg après 5 ans.
- **Saignement anormal**
- Œdème pulmonaire.

5- Physiopathologie du paludisme grave [18]

Les concepts physiopathologiques du paludisme grave font intervenir trois types de modifications physiopathologiques :

- la séquestration des hématies parasitées,
- l'activation du système immunitaire à médiation cellulaire et la libération des cytokines pro-inflammatoires.

a- La séquestration :

Elle aboutit à une obstruction des micros capillaires par les globules rouges. Pour l'expliquer ; trois mécanismes ont été identifiés : l'auto-agglutination, le « rosetting » et la cytoadhérence.

- Le phénomène de l'auto- agglutination :

L'auto-agglutination des hématies parasitées a été observée sur de nombreuses souches de *P. falciparum* étudiées en culture au laboratoire. Il s'agit d'un regroupement des érythrocytes infectés entre eux pour former des micros agrégats susceptibles d'obstruer les capillaires profonds. Ce phénomène a été observé chez les patients porteurs de fortes parasitemies en dehors de tout phénotype d'adhésion.

- Le phénomène de « rosetting »

Les hématies parasitées ont la faculté d'attirer au tour d'elles des hématies saines pour les infester en formant des rosettes : c'est le phénomène de rosetting. Il y a donc formation d'un agrégat par une hématie parasitée à laquelle adhèrent des hématies normales. Ce phénomène a été bien étudié *in vitro*. Il varie d'une souche plasmodiale à l'autre. Il a été montré que seul le niveau élevé des rosettes et l'absence d'anticorps anti rosette sont corrélés positivement au neuropaludisme. La formation de rosettes constitue un mode de protection pour le parasite contre le système phagocytaire de la rate et exerce un effet délétère pour l'hôte par blocage du flux sanguin.

- Le phénomène de cytoadhérence :

La cytoadhérence des hématies parasitées à l'endothélium vasculaire ou aux cellules trophoblastiques placentaires est le mécanisme qui a été le mieux étudié ces dernières années. Ce phénomène permet au Plasmodium de se développer plus facilement grâce à un environnement gazeux favorable et d'échapper à la clearance splénique. Les hématies parasitées expriment à leur surface des protubérances (knobs) qui semblent jouer un rôle important dans leur adhésion aux cellules endothéliales. Il s'agit de protubérances protéiniques auxquelles sont incorporés des antigènes plasmodiques. Parmi ces antigènes plasmodiques on peut citer : la PfEMP-1 et 2 (*Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 et 2), la PfHRP-1 (*Plasmodium falciparum* Histidin Rich Protein) ou KAHRP (Knob-Associated Histidin-Rich Protein), RESA (Ring Erythrocyte Surface Antigen) et EDM (Electron-Dense- Material). Parmi ces protéines parasitaires associées aux knobs, PfEMP-1 est le ligand parasite le mieux caractérisé. PfEMP-1 interagit avec des récepteurs spécifiques au niveau des cellules endothéliales vasculaires et du syncytiotrophoblaste. Comme l'ICAM-1 (Inter Cellular

Adhésion Molécule-1), le CD36, le VCAM-1 (Vascular Cell Adhesing Molecular-1 et 2), le CD31 ou PCAM-1, le CSA (Chondroitin Sulfate A), la selectin [10] etc... L'adhésion des hématies parasitées à ces récepteurs entraîne leur séquestration à l'intérieur de la micro circulation.

La séquestration permet aux hématies parasitées d'échapper à la clearance splénique et contribue à la gravité du paludisme (critères de gravité du paludisme OMS 2000). Elle entraîne aussi une obstruction des micros vaisseaux surtout au niveau cérébral, ce qui est cité comme principale cause du neuropaludisme. La séquestration entraînerait aussi une dilatation des micros vaisseaux par libération du monoxyde d'azote (NO) : Ceci est responsable d'œdème cérébral et pulmonaire.

b- Mécanisme immunologique :

Le système à médiation cellulaire impliquant les lymphocytes CD4 et les macrophages joue un rôle très important dans la pathogénie du neuropaludisme. Les antigènes plasmodiaux facilitent le recrutement des macrophages et la libération de nombreuses cytokines pro-inflammatoires par ces derniers (Interféron gamma, TNF alpha, IL-1, IL-6, etc.) Parmi les médiateurs macrophagiques, le TNF α est un acteur important.

Expérimentalement l'injection de TNF α chez les souris reproduit la plupart des manifestations cliniques et biologiques du paludisme grave. On pense aussi que la libération du TNF α stimulerait l'expression des récepteurs des knobs au niveau endothélial, donc la séquestration.

Il faut rappeler que les fièvres observées au cours des accès palustres seraient dues à la libération dans le sang de l'hémozoïne (substance pyrogène résultant de la dégradation de l'hémoglobine par le plasmodium)

après éclatement des schizontes. Cette fièvre peut également être due aux cytokines pro-inflammatoire comme ; $TNF\alpha$, IL-1, IL-6.

6- Diagnostic biologique du paludisme :

Plusieurs méthodes sont utilisées :

a- La microscopie:

Elle est basée sur l'observation au microscope en immersion à l'objectif 100 des différents stades du parasite (gamétocyte, trophozoïte, schizonte) dans le sang après coloration au Giemsa et séchage. Deux techniques sont utilisées :

- La goutte épaisse (GE) :

C'est la technique de diagnostic de référence du paludisme. Il s'agit d'une technique de concentration des parasites sur lame à partir d'une goutte de sang capillaire suivie de coloration au Giemsa et de l'observation au microscope.

- Le frottis mince (FM) :

C'est la technique de référence pour le diagnostic d'espèce, car elle permet non seulement de voir les parasites mais aussi d'apprécier la forme des GR parasités.

- Les tests de diagnostic rapide :

Ce sont des tests basés sur les réactions anticorps-antigènes suivies de la révélation du complexe Ag-Ac avec un chromogène. On a: OptiMAL-IT (PfLDH) et Parasight F (PfHRP II).

-La PCR (Polymerase Chain Reaction) :

C'est une technique de biologie moléculaire basée sur la sélection puis l'amplification d'un gène spécifique du parasite à partir d'amorces spécifiques de ce gène. Elle a l'avantage de pouvoir détecter une souche

spécifique du parasite par des amorces spécifiques de gène ou après digestion du produit de PCR avec des enzymes de restriction spécifiques.

B- La thalassémie :

Définition:

C'est une hémoglobinopathie quantitative (touchant la chaîne beta ou alpha de la globine). Maladie héréditaire autosomale génétique la plus fréquente au monde (300.000.000 porteurs). Les plus fréquents sont l'alpha thalassémie et la beta thalassémie.

- **La beta thalassémie :**

Chromosome supérieur à 200 anomalies (mutations) différentes :

-Absence totale de production beta ou

-perte de capacité de production de beta homozygote ou hétérozygote.

Il existe trois sortes de beta thalassémie :

Beta thalassémie majeur, beta thalassémie intermédiaire et beta thalassémie mineur.

- **Alpha thalassémie :**

Les alpha-thalassémies se caractérisent par un déficit de chaîne de globine-alpha dans l'hémoglobine. Elles affectent donc la synthèse des 3 types d'hémoglobine : HbA, HbA2 et HbF, puisque toutes contiennent la chaîne alpha. Lorsque le déficit de synthèse de la chaîne alpha est important, on assiste à la formation de quantités importantes d'hémoglobines anormales composé que de chaînes dont la synthèse n'est pas entravée : l'HbH et l'Hb bart 's.

Epidémiologie des alpha- thalassémies :

Les alpha-thalassémies sont des affections génétiques à distribution raciale localisée.

Sa distribution géographique coïncide largement avec celle des zones d'endémie palustre ou ayant connu dans le passé des endémies palustres,

d'où l'hypothèse d'une part que les alpha-thalassémies procureraient une protection contre le paludisme aux personnes qui en sont porteuses.



Figure3 : Répartition géographique de l'alpha et de la Beta thalassémie dans le monde [38].

Source : www.scielosp.org/scieloorg/php/articleXML.php

Manifestation cliniques des alpha-thalassémies :

En fonction de la sévérité de l'affection, on distingue 4 classes d'alpha-thalassémie :

Classe 1 et 2 : Les alpha-thalassémies de classe 1 et 2 sont cliniquement latentes, mais peuvent interférer avec le phénotype d'autres hémoglobinopathies. Ainsi, on peut observer chez ces patients, une anémie hémolytique modérée et chronique.

Classe 3 : C'est le prototype d'une anémie hémolytique chronique périphérique avec tous les avatars potentiels que génère cette situation :

- Exacerbation de l'anémie et risque transfusionnel
- Splénomégalie aiguë et chronique
- Accidents post splénectomie, infectieux et thrombotiques
- Carences diverses
- Pathologies hépatobiliaires secondaires (hépatites virales chroniques post transfusionnelles, calculs biliaires)
- Développement d'une hémossidérose
- Retard de croissance

Cela étant, dans de bonnes conditions de prise en charge, l'état général de ces patients est satisfaisant.

Classe 4 : Elle provoque un décès fœtal ou néonatal dans un tableau d'anasarque. La morbidité maternelle potentielle est importante à prendre en compte.

Il faut retenir que : L'alpha-thalassémie mineur correspond aux classes 1 et 2 alors que l'alpha-thalassémie majeure correspond aux classes 3 et 4.

Méthodes de diagnostic biologiques : [16]

Le diagnostic repose sur la mise en évidence des chaînes beta et gamma que le défaut de synthèse des chaînes alpha laissent inapariées ;

Pendant la vie fœtale et à la naissance :

Pendant la vie fœtale et à la naissance, les chaînes gamma associées en tétramères (Hb bart's), relativement stables, sont aisées à quantifier ; Cette fraction d'Hb de pH beaucoup plus acide que l'HbA ou F, est quantifiable par CLHP. La présence d'Hb bart's est pathognomonique d'une alpha thalassémie mais sa concentration dépend de celle de l'HbF. Les deux disparaissent le plus simultanément entre 6 mois et 1 an de vie.

Aux classes 1 à 4 des alpha-thalassémies correspondent les intervalles de concentration d'Hb bart's suivant :

- 0 à 2% (sensibilité environ 5%)
- 2 à 12% (sensibilité à 100%)
- 12 à 40% (sensibilité à 100%)
- 80 à 100% plus Hb portland (HbA et F très faibles ou nulles)

Simultanément, les VGM et TCMH diminuent. Seules les classes 3 et 4 sont anémiques.

Après la disparition de l'HbF :

Après la disparition de l'HbF, remplacée par l'HbA, l'Hb bart's n'est que très partiellement remplacée par l'HbH, faite de tétramères beta. En effet, l'HbH, est très instable, très protéolysable et précipite sous forme de corps de heinz de petite taille accolé à la face cytoplasmique de la membrane ; Ils sont souvent absents spontanément avant la splénectomie et inégalement repartis entre les hématies. Dans les classes 1 et 2 les hématies avec corps de HEINZ dites « hématies en balle de golf » sont présentes dans une

proportion de 10^{-3} à 10^{-4} . La sensibilité de cette approche diagnostique est médiocre. La spécificité est également modeste.

La signature de la classe 3 est la présence quantifiable en HPLC d'HbH, dès le seuil de détection, soit 0,2%. Ceci est conforté par l'existence d'une anémie hémolytique hypochrome dont la sévérité à une intensité proportionnelle au taux d'HbH (sauf interaction avec une carence en fer).

Le problème diagnostique porte sur les classes 1 et 2 extrêmement fréquentes :

- Absence de critère de diagnostic positif simple.
- Deux méthodes lourdes peuvent être mise en œuvre :
 - a. Mesure du rapport de synthèse des chaînes ;

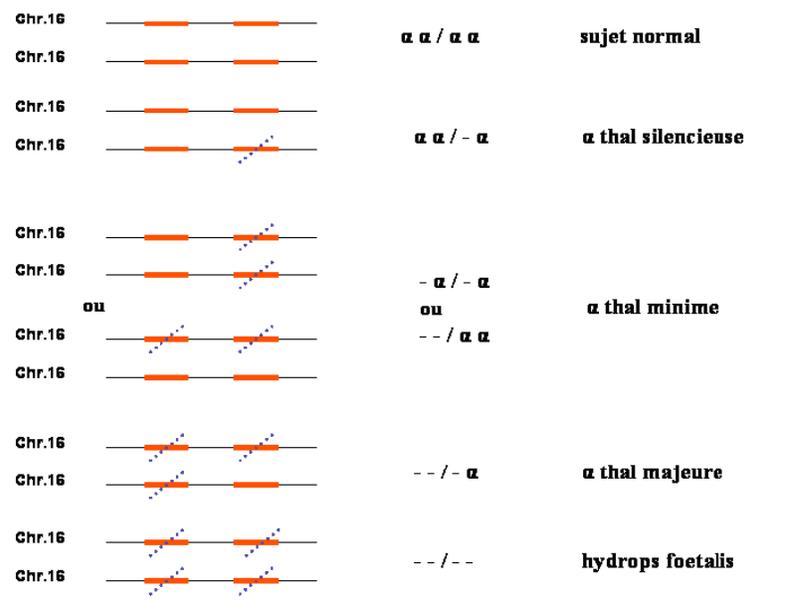
Identification du défaut moléculaire dans le génome alpha globine :

- b. Recherche les délétions en cause de l'alpha thalassémie à l'aide d'outils de biologie moléculaire. Deux délétions sont généralement recherchées : la délétion 3.7 Kb et la délétion 4.2 Kb. On peut utiliser la PCR à amorce spécifique ou le séquençage.

Aspect génétique des alpha-thalassémies [17]

L'alpha-thalassémie résulte d'un défaut de synthèse des chaînes alpha de la globine constituant l'hémoglobine. Les chaînes alpha de la globine ont la particularité d'être codées par deux gènes différents tous situés sur le chromosome 16. Ainsi l'homme ayant deux chromosomes 16, possède alors quatre gènes d'alpha globine. Sur le plan moléculaire, l'alpha-thalassémie résulte de l'absence d'expression des gènes de l'alpha globine qui elle-même est le plus souvent consécutive à une délétion chromosomique au niveau de ces gènes.

L'homme possédant quatre gènes d'alpha globine, quatre situations peuvent se présenter :



C- Alpha thalassémie et le paludisme :

La fréquence élevée de l'alpha thalassémie dans certaines zones d'endémie palustre suggère qu'elle conférerait une protection en faveur des individus qui en sont atteints.

Plus précisément, les thalassémies concernent les populations des pays riverains de la Méditerranée (Iran, Extrême-Orient), l'Afrique subsaharienne, l'Inde, tout le Sud-est asiatique ainsi que le sud de la Chine et toutes les régions où le paludisme sévit.

Il ya plus de 50 ans, Haldane a suggéré que certaines formes de thalassémie conféreraient une protection contre le Paludisme [14]. La coïncidence de la distribution géographique de ces affections génétiques érythrocytaires avec celle d'endémie palustre passée ou présente est en faveur de cette hypothèse. Par ailleurs la présence concomitante de la forte fréquence de l'alpha thalassémie et du paludisme à *P. falciparum* dans des pays ci-dessus suggère que le gène de l'alpha thalassémie a été sélectionné pour son effet de protection contre le paludisme [14]. Cependant, certaines études avaient rapporté qu'il y avait une protection que l'alpha thalassémie pourrait conférer au paludisme grave. Par contre d'autres auteurs n'ont pas pu démontrer plus loin la protection que l'alpha thalassémie pourrait conférer au paludisme grave [3, 27]. Dans une étude cas témoin menée en nouvelle guinée le risque du paludisme grave était réduit de 60% et 34% chez les enfants homozygotes et hétérozygotes thalassémiques [3]. Plusieurs lignes d'évidence dont le mécanisme cellulaire confirme que cette hémoglobinopathie fournit plus de 90% de protection contre la mort due au paludisme grave [27]. Par contre dans une étude réalisée en Afrique subsaharienne l'alpha thalassémie affecte plus de 50% de la population mais sa protection contre le paludisme grave n'a pas pu être démontré [28, 29,30].

IV- Méthodologie:

1-Site d'étude

Notre étude s'est déroulée dans les locaux du Centre de Santé de Référence (CSRef) de Kangaba chef lieu de cercle et de la case de santé de Kela, un village situé à 6 Km de Kangaba, tous deux situés dans la région de Koulikoro. Ces deux sites d'étude ont été identifiés sur la base d'enquêtes anthropologiques et paludométriques faites pendant plusieurs saisons. Ils sont situés à 95 km au sud-ouest de Bamako la capitale du Mali et sont tous accessibles par la route (moins de 2 heures de route à partir du Point G). Kangaba compte environ 6500 habitants tandis que Kela compte environ 1600 habitants. La population est majoritairement constituée de Malinké (76,9%).

Le paludisme y sévit sous forme hyper endémique avec une période de forte transmission couvrant la saison des pluies allant de juin à novembre.

2-Période d'étude :

Notre étude a couvert les périodes de forte transmission de Juin 2005 à Décembre 2007

3- Type d'étude :

Il s'agissait d'une étude prospective avec une composante cas- témoins non appariés.

Les cas étaient des sujets atteints de paludisme grave, selon la définition de l'OMS 2000

Les témoins correspondaient aux sujets avec paludisme simple.

4- Population d'étude :

Cette étude a concerné des sujets de tout sexe âgés de 0 à 5 ans résidants de la ville de Kangaba et du village de Kela.

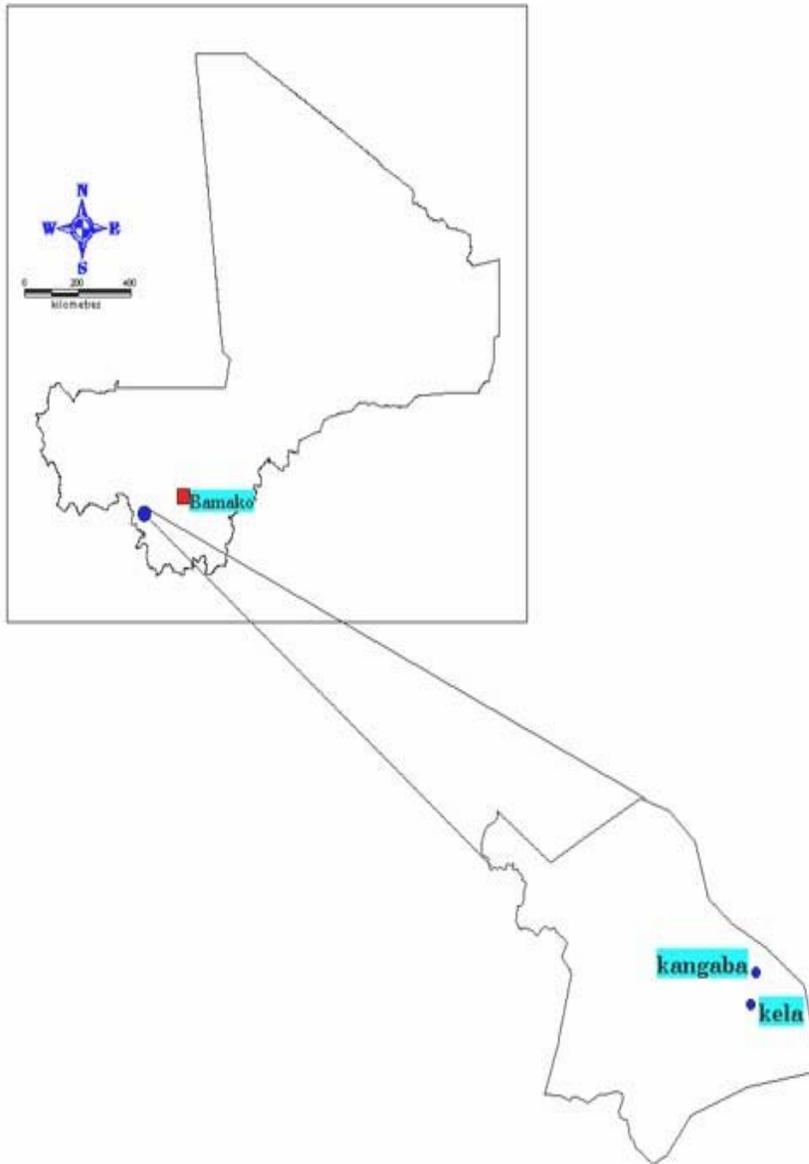


Figure 3 : CARTE DU MALI (Site d'étude)

Source : GIS/RS MRTC/FMPOS –Bamako (Mali) Janv. 2003

5- Critères d'inclusion :

- Sujets âgés de 0 à 5 ans, consultant au CSRéf de Kangaba ou à la case de santé de Kela pour des symptômes de paludisme et chez lesquels une goutte épaisse positive à *P. falciparum* a été obtenue.
- Avoir un consentement signé d'un parent ou d'un tuteur adulte de l'enfant après explication du protocole en langue malinké.

6-Critères de non-inclusion :

- Avoir une pathologie grave aiguë ou chronique responsable de fièvre (Pneumonie bactérienne, kwashiorkor...)
- Avoir une goutte épaisse négative à la recherche de *P. falciparum*.
- Refuser d'adhérer à l'étude.

7- Définition des cas :

◆ Paludisme simple :

Une fièvre (température axillaire $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$), frissons, céphalées, myalgies, douleurs abdominales, vomissements et avec une goutte épaisse positive à *P. falciparum* sans signes de gravité.

◆ Paludisme grave :

- Parasitémie $> 500000\text{tf}/\mu\text{l}$ ou toute autre parasitémie avec l'un des Critères si dessous:
 - Coma (score de Glasgow ≤ 9 ou score de Blantyre ≤ 2) ;
 - Convulsions répétées (plus d'une par 24 heures)
 - Syndrome de détresse respiratoire ;
 - Ictère ;
 - Acidose métabolique (taux de bicarbonates plasmatiques inférieur à 15 mmol/L) ;
 - Anémie grave (taux d'hémoglobine $\leq 5\text{g}/\text{dl}$ ou hématocrite $\leq 15\%$);
 - Hémoglobinurie macroscopique;

- Insuffisance rénale (diurèse $<12\text{ml/kg/24h}$ ou créatinémie trop élevée pour l'âge de l'enfant) ;
 - Collapsus circulatoire (tension artérielle systolique inférieure à 60mmHg) ;
 - Saignement anormal ;
 - Hypoglycémie (glycémie $< 2,2\text{ mmol/l}$ ou 40mg/dl) ;
 - Œdème pulmonaire (radiologique).
- ◆ L'anémie = taux d'Hb $<12\text{ g/dl}$ en dehors de l'anémie sévère palustre

8-Paramètres mesurés

8-1- Paramètres sociodémographiques

Age, sexe, ethnie, lieu de résidence habituelle.

8-2- Paramètres biologiques

Parasitémie, Taux d'hémoglobine Glycémie

Techniques d'analyses biologiques :

A- Technique de détermination de la parasitémie: goutte épaisse

1 Principe

La goutte épaisse est une technique de concentration des hématies en vue de la recherche du parasite dans le sang.

Matériels consommables pour la goutte épaisse :

- Tabouret
- Coton hydrophile
- Alcool à 70°
- Gants en polyvinyle
- Lames porte-objet
- Vaccinostyles
- Boîte de collection de l'OMS

- Crayon de papier
- Paires de ciseaux
- Scotch
- Giemsa pur
- Comprimé tampon (Buffer Tablet pH=7,2)
- Papier hygiénique
- Râtelier
- Bac de coloration
- Microscope optique biloculaire
- Huile d'immersion
- Compteur manuel, calculatrice
- Poubelle.
- Eprouvette graduée
- Source d'électricité

2- Mode opératoire

3- Prélèvement

Prélever une goutte de sang capillaire, par une piqûre au doigt après désinfection à l'alcool à 70°.

Essuyer la première goutte de sang puis déposer la seconde au milieu d'une lame. A l'aide du coin d'une deuxième lame, étaler la goutte sur 1 cm de diamètre en tournant pendant quelques secondes.

Laisser sécher.

La goutte épaisse doit être transparente.

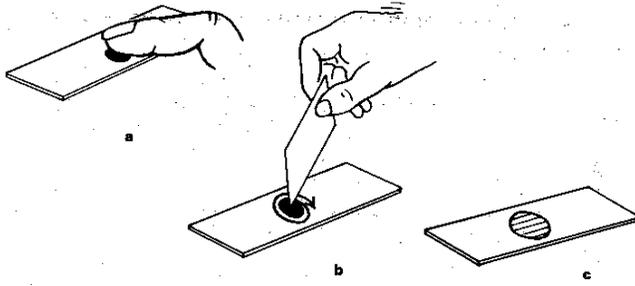


Figure 4 : Schéma de confection de la goutte épaisse

Coloration :

La coloration des lames se faisait sur place au Giemsa dilué à 3% (c'est à dire 3 ml de Giemsa pur pour 97ml d'eau distillée tamponnée). L'eau tamponnée était préparée en dissolvant 1 comprimé tampon dans 1 litre d'eau distillée.

Les lames étaient immergées dans un bac de coloration contenant la solution de Giemsa à 3% pendant 45 minutes. Après 45 minutes les lames étaient rincées à l'eau de robinet, puis séchées sur le râtelier à l'air ambiant.

Les gouttes épaisses séchées étaient immédiatement examinées et les résultats portés sur le registre de parasitologie puis sur les fiches cliniques de suivi.

Lecture :

La lecture a été faite au microscope optique sur place à l'objectif 100 en immersion. A l'aide d'un compteur manuel, les parasites et les leucocytes étaient comptés. Ce comptage débutait dès l'observation d'un parasite dans

le champ qui était visionné et finissait quand le nombre de leucocytes comptés atteignait 300. La charge parasitaire était exprimée en rapportant le nombre de parasites pour les 300 leucocytes à 7500 leucocytes. Nous avons considéré 7500 leucocytes comme étant la moyenne du nombre des leucocytes par mm^3 de sang.

Mode de calcul de la parasitémie :

Soit P la parasitémie par mm^3 de sang, X le nombre de parasites comptés et Y le nombre de leucocytes correspondant à X.

La parasitémie P est déterminée par la formule suivante :

$$P = (X / Y) \times 7500 \text{ parasites par } \text{mm}^3 \text{ de sang.}$$

Hématocrite :

Il correspond au volume occupé par les globules rouges dans un volume de sang prélevé sur anticoagulant. Nous avons déterminé le pourcentage de l'hématocrite par la micro-méthode.

Matériel et consommable

- Microtubule hépariné
- Un vaccino-stylet.
- Coton hydrophile
- Tampon d'alcool à 70°C
- Gants en polyvinyle
- Abaque
- Cire
- Centrifugeuse électrique
- Crayon de papier

Micro-méthode

Principe :

Le sang est placé dans un tube capillaire et centrifugé à grande vitesse(5000 tours par mn).

On lit le résultat rendu en fraction de volume érythrocytaire grâce à la réglotte prévue à cet effet.

Mode opératoire :

Désinfecter le doigt avec le coton imbibé d'alcool, l'essuyer avec du coton sec pour sécher, et piquer d'un coup sec puis presser le doigt. Appliquer l'extrémité du microtubule contre la goutte de sang. Le sang pénètre dans le tube par capillarité, le laisser se remplir environ au trois quart.

Boucher avec la cire molle, l'autre extrémité du tube capillaire, sur environ 2 mm.

Identifier les prélèvements sur chaque tube capillaire.

La lecture était effectuée en se référant sur l'abaque pour cela, déposer les différents tubes capillaires dans une des rainures du plateau de la centrifugeuse.

L'extrémité bouchée doit être sur le pourtour extérieur du plateau.

Centrifuger à grande vitesse (12000 tours /minute pendant 5 minutes).

Valeurs normales (pourcentage)

Hommes : 40 – 50%

Femmes : 37 – 43%

Enfants (5 ans) : 38 – 44%

Nourrissons (3 mois) : 35 – 58%.

B- Extraction de l'ADN humain par le Kit QIAamp® (QIAGEN)

Les spots de confettis imbibés de sang étaient découpés à l'aide de ciseaux et introduit dans les tubes Eppendorf de 1,5 ml (Robbins Scientifi Sunnyvale, CA) ;

1- La lyse des hématies ; ajouter

- 180 µl de Buffer ATL, incubé à 85°C pendant 10 minutes, centrifuger
- 20 µl de protéinase K, mélanger à l'aide d'un agitateur, incubé à 56°C pendant 1 heure ensuite centrifuger brièvement pour faire descendre le liquide sur la paroi du tube.
- 200 µl de Buffer AL, agiter à l'aide d'un agitateur et incubé à 70°C pendant 10 minutes, centrifuger.

2- Extraction proprement dite, ajouter :

- 200 µl d'éthanol (96 -100%), agiter et centrifuger brièvement ; l'ADN se présente sous forme de cristaux. Appliquer tout le contenu dans le tube QIAGEN (2 ml) avec filtre, fermer le tube QIAGEN avec filtre, centrifugé à 8000 tours par minute pendant une minute. Placer le filtre QIAGEN dans un autre tube de 2 ml (fourni) et jeter le tube contenant le filtrat.
- 500 µl de Buffer AW1 dilué avec de l'éthanol (19 ml de Buffer AW1 plus 25 ml de l'éthanol), centrifuger à 8000 tours par minute pendant une minute

ensuite éliminer le tube contenant le filtrat. Placer le tube QIAGEN dans un autre tube de 2 ml

- 500 µl de Buffer AW2 dilué avec de l'éthanol (13 ml de Buffer AW2 plus 30 ml de l'éthanol), centrifuger à 1400 tours par minute pendant 3 minutes. Eliminer le tube contenant le filtrat et placer le tube QIAGEN dans un autre tube de 1,5 ml.

-150 µl de Buffer AE incubera à la température ambiante de la salle pendant une minute, centrifuger à 8000 tours par minute et on a de l'ADN qui doit être conservé à + 4°C.

C- Détection de la délétion 3.7-kb responsable de l'alpha- thalassémie par PCR

Il s'agit d'une nested PCR (PCR nichée) où le produit de la première PCR est utilisé comme substrat dans une deuxième PCR.

Matériels et réactif :

Matériels :

- Termocycler (Machine à PCR)
- Micropipette (1000 µl, 200 µl et 10 µl)
- Embout pour micropipette (1000 µl, 200 µl et 10 µl)
- Tube PCR 0.2ml

Réactifs :

- Le Tris-HCl, pH 8,5
- KCl
- Bétaine (Sigma)
- dNTP (ATP, GTP, TTP, CTP)
- Tag polymérase
- Les Amorces:
- $\alpha_2/3.7F = 5'-CCCCTCGCCA AGTCCACC C-3'$

- $\alpha_2R = 5'-AGACCAGGAAGGGCCGGTG-3'$
- $3.7/20.5R = 5'-AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG-3'$
- $A3.7F = 5'-CTTTCCTACCCAGAGCCAGGTT-3'$
- $3.7R1 = 5'-CCACTTTCCTCCTCCATCCC-3'$
- $\alpha_2R1 = 5'-AGGAGGGCCCGTTGGGAGGC-3'$

Procédure :

Première amplification :

Il s'agit d'une PCR multiplex visant à amplifier en même temps dans le même tube (α_2R pour le fragment normal et $3.7/20.5R$ pour le fragment délétère). Il consiste à amplifier approximativement 5ng d'ADN (2.5 ml d'ADN extrait avec le Qiagen) dans un volume réaction de 25 ml dont la composition est la suivante:

- 20 mmol/l de Tris-HCl pH 8.5
- 50 mmol/l KCl
- 1.5 mmol/l $MgCl_2$
- 1 mol/ de Betaine
- 0.3mmol/l de chaque amorce ($\alpha_2/3.7F$, α_2R et $3.7/20.5R$) réaction, le fragment d'ADN portant la délétion 3.7 et le fragment d'ADN normal ne portant pas de délétion. Ces deux fragments ont en commun une amorce ($\alpha_2/3.7F$) la seconde amorce étant spécifique pour chaque fragment
- 0.2mmol/L de chaque dNTP
- 1,25 unité de platinum Taq polymerase (Inv. itrogen)

Deuxième amplification :

Chaque produit de première amplification est amplifié deux fois dans deux tubes de PCR différents. Dans le tube de PCR N°1, les amorces spécifiques pour le fragment normal (A3.7F et μ l₂R1) sont utilisées alors que dans le tube de PCR N°2 sont introduites les amorces spécifiques pour les gènes délétère (A3.7F et 3.7R1)

Dans chaque tube de PCR 1ml d'une dilution au 1 :20 est utilisé dans un volume réactionnel de 25 μ l de même composition que dans la première amplification.

Le programme utilisé pour l'amplification est le suivant :

Il est le même pour la première et la deuxième amplification.

- Dénaturation initiale : 95°C pendant 5 minutes

Suivie de 35 cycles de :

- Dénaturation : 97°C pendant 45 secondes
- Renaturation : 60°C pendant 1 minute et 15 secondes
- Extension : 72°C pendant 2 minutes et 30 secondes

Une extension finale à 72°C pendant 5 minutes

Migration du produit de PCR :

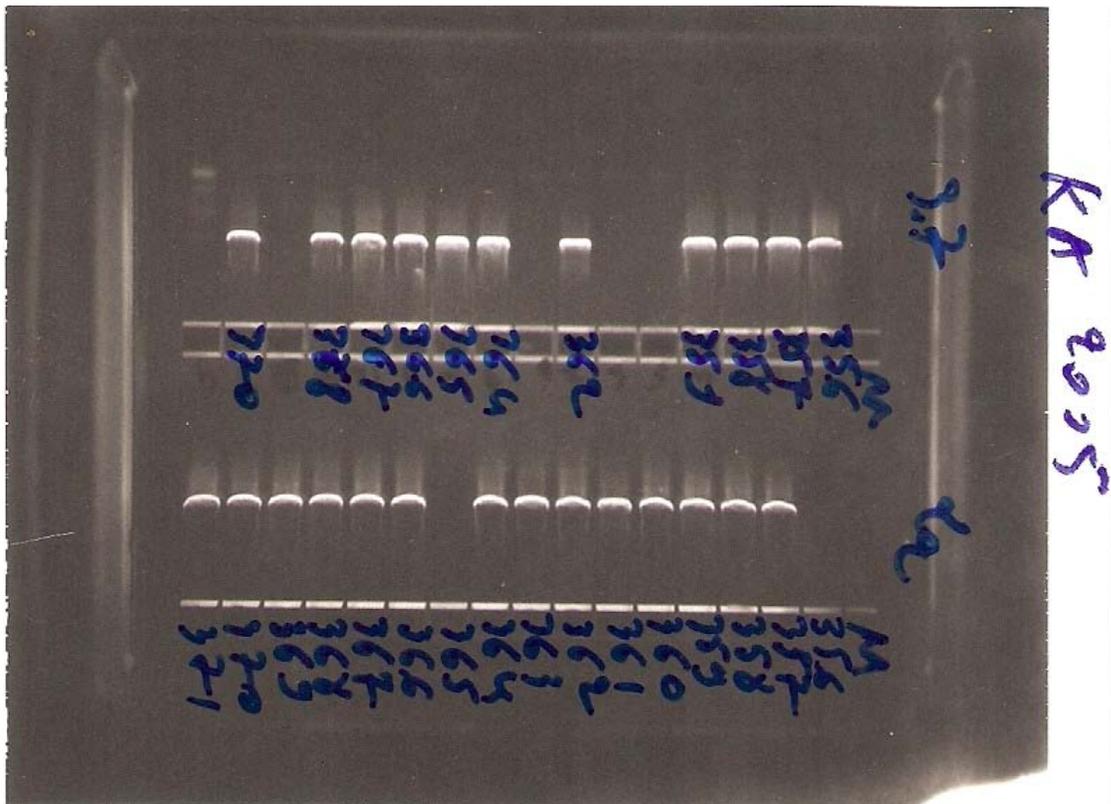
On utilise un gel d'agarose à 2% auquel est incorporé du bromure d'éthidium (~ 3mg/100ml) dans TBE 0.5X. La migration se fait à 200 volts pendant 30 minutes.

La révélation est faite à la lumière UV.

Interprétation :

Présence d'une bande de 2 kb dans le tube N° 1 signifie que le sujet possède le gène Normal. Présence d'une bande de 1.8 kb dans le tube N° 2 signifie que le sujet possède le gène délétère. Trois scenarios sont possibles :

- 1- Le sujet est Normal : On observe la présence d'une bande de 2 kb dans le tube N° 1 et l'absence de bande dans le tube N° 2
- 2- Le sujet est a-thalassémique hétérozygote : On observe la présence d'une bande de 2 kb dans le tube N° 1 et aussi la présence d'une bande de 1.8kb dans le tube N° 2
- 3- Le sujet est a-thalassémique homozygote : On observe la présence d'une bande de 1.8 kb dans le tube N° 2 et l'absence de bande dans le tube N° 1



RESULTATS

1-Résultats descriptifs :

1-1 Caractères sociodémographiques :

Tableau I : répartition des sujets en fonction du sexe dans la population d'étude.

Sexe	Effectif	Fréquence (%)
Masculin	709	48,2
Féminin	761	51,8
Total	1470	100

Le sexe féminin était prédominant avec un ratio de 1,07

Tableau II : Répartition des sujets par âge en fonction du sexe.

Age / sexe	Féminin (%)	Masculin (%)	Total (%)
0 – 2 ans	163 (23)	219 (28,8)	382 (25,98)
3 – 5 ans	546 (77)	542 (71,2)	1088 (74,02)
Total	709 (100)	761 (100)	1470 (100)

Dans notre population d'étude nous avons observé que la tranche d'âge 3 – 5 ans était prédominante avec un effectif de 1088 soit 74,02%.

Tableau III : répartition des sujets en fonction des formes graves de paludisme

Formes cliniques	effectifs	Fréquence (%)
Paludisme grave	229	15,6
Paludisme simple	1241	84,4
Total	1470	100

Sur un total de 1470 cas de paludisme, il a été observé 229 cas de paludisme grave soit 15,6%.

Tableau IV : Répartition des cas de paludisme graves observé en fonction des critères de gravité.

Critères de gravité	effectifs	Fréquence (%)
Hyperparasitémie >100000	135	90,8
Prostration	85	5,8
Convulsion	40	2,7
Anémie sévère	26	1,8
Ictère	16	1,1
Détresse Respiratoire	15	1
Coma	11	0,7
Etat de choc	2	0,1
Hypoglycémie	2	0,1
Hémoglobinurie	1	0,1

Les signes de gravité les plus fréquents ont été l'hyperparasitémie (90,8%), la prostration (5,8%) suivi de la convulsion (2,7%) et l'anémie sévère (1,8%)

Tableau V : distribution de l'anémie dans la population d'étude.

Anémie	effectifs	Fréquence %
Anémie +	1001	68,1
Anémie -	469	31,9
Total	1470	100

La fréquence de l'anémie observée dans notre population d'étude était de 68,1%.

Tableau VI: répartition du type de l'alpha thalassémie dans la population d'étude.

Type thalassémie	d'alpha Effectifs	Fréquence %
Hétérozygotes	468	31,8
homozygote	63	4,3
Normal	939	63,9
Total	1470	100

Il ressort de ce tableau que la fréquence de l'alpha-thalassémie était de 36,1% dans la population d'étude. Lorsqu'on s'intéresse à la répartition des cas d'alpha-thalassémie en fonction des différents génotypes, on notait 31,8% hétérozygotie et 4,3% d'homozygotie.

2- Résultats analytiques :

Tableau VII: Distribution de l'alpha thalassémie en fonction des formes cliniques de paludisme.

Formes cliniques	Paludisme grave	Paludisme simple	Total
Hétérozygotes	70 (14,96)	398 (85,04)	468 (100)
Homozygotes	9 (14,29)	54 (85,71)	63 (100)
Normal	150 (15,97)	789 (84,03)	939 (100)
Total	229 (15,6)	1241(84,4)	1470 (100)

Le paludisme grave a été observé chez 14,29% des sujets homozygotes pour l'alpha thalassémie contre 15,97% des sujets normaux. La différence n'était pas significative. (P=0,86 Khi2=0,03)

Tableau VIII : Distribution de l'anémie en fonction de l'existence ou non de l'alpha thalassémie.

alpha thalassémie	Anémie (%)		Total
	(+)	(-)	
Hétérozygote	333 (71,2)	135 (28,8)	468 (100)
Homozygote	48 (76,2)	15 (23,8)	63 (100)
Normal	620 (66,1)	319 (33,9%)	939 (100)
Total	1001	1241	1470

Aucune association n'a été observée entre l'anémie et l'alpha thalassémie aussi bien à l'état hétérozygote ($p=0,06$; $\chi^2=3,52$) qu'à l'état homozygote ($p=0,13$; $\chi^2=2,31$).

(+) : positif

(-) : négatif

Tableau IX : Distribution des critères de gravité selon le type de d'alpha thalassémie.

Apha-Thalassémie	Normal	Hétérozygotes Effectif	Homozygotes Effectif	Total
Prostration	60	22 (40) P=0,2	3 (50) P=0,4	85
Convulsion	29	10 (18,2) P=0,4	1 (16,7) P=0,4	40
Anémie sévère	18	8 (14,5) P=1	0 (0,0) P=0,3	26
Ictère	10	6 (10,9) P=0,9	0 (0,0) P=0,5	16
Détresse resp.	10	5 (9,1) P=0,6	0 (0,0) P=0,5	15
Coma	8	2 (3,6) P=0,3	1 (16,7) P=0,4	11
Hypoglycémie	0	1 (1,8) P=0,3	1 (16,7) P=0,06	2
Hémoglobinurie	1	1 (1,8) P=0,5	0 (0,0) P=0,9	2
Etat de choc	1	0 (0,0) P=0,7	0 (0,0) P=0,9	1

Aucune différence statistiquement significative n'a été observée même lorsqu'on détermine isolément les différentes critères.

COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS

Ce travail s'inscrivait dans le cadre d'une étude multidisciplinaire visant à déterminer les facteurs génétiques de protection contre les formes graves du paludisme dans la population d'étude. Il testait l'hypothèse selon laquelle l'alpha thalassémie protégerait contre les formes graves et compliquées du paludisme.

Le dépistage moléculaire de l'alpha thalassémie a été effectué grâce à la PCR. La mise au point de cette technique a été réalisée à Bamako au laboratoire de polymorphismes du globule rouge et paludisme de la FMPOS.

Cette étude avait concerné tous les sujets qui s'étaient présentés avec une symptomatologie clinique évocatrice de paludisme au CSRef de Kangaba et à la case de santé de Kela durant les saisons de transmission 2005 à 2007 et pour lesquels un consentement éclairé écrit a été obtenu. Notre étude était une étude cas-témoins non appariée. Les cas étaient constitués par les sujets souffrant de paludisme grave et les témoins ceux souffrant de paludisme simple. Ainsi, sur un total de 1470 patients inclus dans l'étude, 229 (15.57%) souffraient de paludisme grave et 1241(84,4%) de paludisme simple ou non compliqué.

Cette fréquence de 15,57% de cas grave de paludisme observée au cours de notre étude était inférieure à celle obtenue par Sall (53.4%) lors d'une étude réalisée au service de pédiatrie du CHU Gabriel Touré [32]. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que le service de pédiatrie du CHU Gabriel Touré, est un service spécialisé dans la prise en charge des cas compliqués

de paludisme chez les enfants et reçoit la majorité des cas compliqués du district de Bamako.

La fréquence globale de l'alpha thalassémie dans la population impaludée était 36,1% dont 31,8% d'hétérozygotie et 4,3% d'homozygotie. Cette fréquence est similaire à celles observées par ALLEN et al et WILLIAMS et al.[37] qui ont rapporté respectivement 36,7% et 31,9% comme fréquence globale de l'alpha thalassémie aux USA et au Ghana. [3, 37].

Le paludisme grave a été observé chez 14,96% et 15,97% respectivement chez les sujets hétérozygotes et homozygotes pour l'alpha thalassémie.

Afin de vérifier s'il existait une quelconque relation entre les différents génotypes de l'alpha-thalassémie et le paludisme, nous avons comparé la proportion des cas graves de paludisme entre les sujets normaux et hétérozygotes d'une part et entre les sujets normaux et les sujets homozygotes d'autre part. Les résultats de ces comparaisons ne montraient aucune protection des hétérozygotes et homozygotes contre les formes graves de paludisme à *P. falciparum* [p=0,68 et 0,86]. Contrairement à notre étude en effet, des travaux antérieurs descriptifs avaient rapporté un rôle protecteur des alpha-thalassémies contre les formes graves et compliquées de paludisme [25]. Ces résultats contradictoires seraient attribués à la différence de méthodologie entre ces études. Notre étude a porté sur une population homogène (malinké) et a consisté en une étude cas-témoins pendant les saisons de forte transmission de paludisme. Par ailleurs, l'évidence de l'interaction entre le trait drépanocytaire et l'alpha-thalassémie à été rapporté au cours d'une étude menée au Kenya. En effet, cette étude a montré que le trait drépanocytaire et l'alpha-thalassémie pris isolément conféraient une protection contre les formes graves de paludisme, mais en

association chez un même individu ne protégeaient plus contre le paludisme grave [37].

L'anémie est une pathologie couramment observée chez les enfants en zone sub-saharienne. Cette prévalence élevée de l'anémie a été rattachée à l'abondance de l'infection par le plasmodium et d'autres facteurs en particulier génétiques d'où son caractère multifactoriel. A cet effet, certaines hémoglobinopathies ont été longtemps associées à l'anémie (drépanocytose). Afin de déterminer si l'alpha-thalassémie est un facteur important dans la survenue de l'anémie au cours du paludisme à *P. falciparum*, nous avons comparé la fréquence de l'anémie chez les sujets alpha-thalassémiques et les sujets normaux. Ainsi elle était de 71% chez les sujets hétérozygotes, 76.2% chez les sujets homozygotes et 66% chez les sujets normaux. Globalement, la prévalence de l'anémie dans la population d'étude était de 68%. Ce taux est supérieur à ceux obtenus par Sall 23.8% [32] et par Coulibaly 60.7% [9].

Les tests statistiques visant à rechercher une association entre l'alpha thalassémie hétérozygote, homozygote et l'anémie n'ont trouvé aucune différence statistiquement significative ($p=$ respectivement 0,06 ; $\chi^2=3,52$) et ($p=0,13$; $\chi^2=2,31$). Ce qui laisse penser que l'alpha thalassémie quelque soit sa forme n'était pas associé à la survenue de l'anémie dans cette population d'étude.

CONCLUSION :

Au terme de cette étude cas témoins réalisé à Kangaba et Kela, et portant sur les enfants de 0 à 5 ans, nous avons exploré la relation entre le portage du gène de l'alpha thalassémie et le paludisme d'une part et d'autre part le portage du gène de l'alpha thalassémie et la survenue de l'anémie au cours du paludisme. Les résultats obtenus nous ont permis de conclure que le portage du gène de l'alpha thalassémie ne conférait aucune protection contre le paludisme grave dans notre population d'étude. Aussi aucune différence dans la survenue de l'anémie n'a été observée entre les sujets porteurs du gène de l'alpha thalassémie et ceux ne le portant pas. Globalement nous assurons que le portage de l'alpha thalassémie ne modifiait pas l'intensité du paludisme et de l'anémie chez les enfants de 0 à 5 ans à Kangaba et Kela.

RECOMMANDATIONS :

Au terme de notre étude nous formulons les recommandations suivantes :

Aux chercheurs :

- Elargir cette étude dans d'autres régions du Mali.

Aux agents de santé :

- Proposer aux patients le dépistage de l'alpha thalassémie.

Aux autorités :

- Rendre disponible le dépistage de l'alpha thalassémie au niveau des différentes structures sanitaires du district.
- Former le personnel de santé sur la conduite à tenir devant un sujet porteur du gène de l'alpha thalassémie.

Les références bibliographiques:

1. ADOO, Michael.

Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality. *Lancet* 2002: 359.

2. Agarwal A., Guindo A., Sissoko Y., Taylor J G., Coulibaly D., Koné A., Kayentao K., Djimde A., Plowe CV., Doumbo O., Wellem TE., and Diallo D. Hemoglobin C associated with protection. *Blood*, 2000, 96, (7): 2358-63.

3. Allen SJ, O'Donnell A, Alexander ND...

Alpha thalassemia protects children against disease caused by other infections as well as malaria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94:14736-14741.

4. Allen SJ, Rowe P, Allsopp CE....

A prospective study of the influence of alpha thalassemia on morbidity from malaria and immune responses to defined *Plasmodium falciparum* antigens in Gambian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1993; 87:282-285.

5. Allison C and Clyde DF.

Malaria in African children with deficient erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Br.Med.* 1961 J. 1.1346-1349.

6. BEH.

Pays endémiques 2004. Adresse électronique : www.travelsante.com

7. Cappadoro M, Giribaldi G, O'Brien E, Turrini F, Mannu F, Ulliers D, Simula G, Luzzatto L, Arese P.

Early Phagocytosis of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD)-deficient erythrocytes parasitized by plasmodium falciparum may explain malaria protection in G6PD deficiency. 1998 Oct. 1; 92(7): 2527-34.

8. CAPPADORO MARINA ; MOTAIS R.

Deficit en glucose 6 phosphates deshydrogenase du globule rouge et mécanismes de protection contre le paludisme à *P. falciparum*

9. Diarra J. P.

Etude Clinique de la mortalité et de morbidité dues au paludisme dans le service de pédiatrie dans l'hôpital régional Ségou.

Thèse Med. Bko, 2006. 104p; 335

10. Lekana Douki, J B : Traore, B : Costa, F T : Fusai, T : Pouvelle, B : Sterkers, Y : Scherf, A : Gysin, J.

Sequestration of Plasmodium falciparum-infected erythrocyte to chondroitin sulfate A, a receptor for maternal malaria; monoclonal antibodies against the native parasite ligand reveal pan-reactive epitopes in placental isolates.

Blood. 2002, 100 : 1478-83.

11. Doumbo O ., Ouattara N. I., ... Traoré S.F ., Quilici M ., (1989)

Approche éco géographique du paludisme en milieu urbain : ville de Bamako. Ecologies 1989; Human. 8: 3-15.

12. FLEMING, STOREY, MOLINEAUX, L., Iroko, E. A. & Attai, E. D. E.

Abnormal Haemoglobins in the Sudan savanna of Nigeria. 1. Prevalence of haemoglobins and relationships between sickle cell trait. Malaria and survival. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 73: 161-172 (1979).

13. HAIDARA S A

Place du paludisme dans les syndromes fébriles en Médecine interne de l'Hôpital du Point G. Thèse, Méd., 1989; Num. 19 ENMP. Bamako, Mali.

14. Haldane JBS.

The rate of mutation of human gene. Hereditas 1949; 35(suppl 1):267-272.

15. Hill, AV ; Allsopp, CE ; Kwiatkowski, D ; Anstey, NM ; Twumasi , P...

Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. Nature. 1991; 352:595-600.

16. [http://www.orpha.net/consor/cgi_Exp.php? Ing=Fr et Expert=846](http://www.orpha.net/consor/cgi_Exp.php?Ing=Fr&Expert=846)

17. <http://Fmc.med.Univtours.Fr/pages/Hemato/Dc2/Thalassemie.pdf>

18. J.-E. Touze, P. Paule, T Fusai.

Concepts physiopathologique du Paludisme grave dans Paludisme grave de Jean-marie Saissy. Arnette 2001.

19. Kalidi I.

Contribution à l'étude des types hémoglobiniques au Mali. Thèse Med, Bamako, 1978, N° 20..2.

20. KOITA O

Contribution à l'étude épidémiologique du paludisme le long de la route trans-saharienne au Mali. These, Pharm., 1988; ENMP 88-p-26 vol1.

21. Lell B May J, Schmidt-Ott RJ....

The role of red blood cell polymorphisms in resistance and susceptibility to malaria. Clin infect Dis. 1999; 28:794-799.

22. LUZZATO L.

Genetics of red cells susceptibility to malaria. Blood 1979; 54: 961-976.

23. Luzzatto L, Metha A.

Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. In seriver C.R., Beaudet AL, Shy WS, Valle D., Eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. London: Mc Graw-Hill, Inc. p. 3364-3398. 1995

24. Mockenhaupt FP, Bienzle U, May J....

Plasmodium falciparum infection: influence on hemoglobin levels in alpha-thalassemia and microcytosis. *J Infect Dis*. 1999; 180:925-928.

25. Mockenhaupt, S Ehrhardt, J Burkhardt, SY Bosomtwe

Manifestation and outcome of severe malaria in children in northern Ghana. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71

26. Mochenhaupt FP, Mandelkow J, Till H, Ehrhardt S, Eggelte TA, Bienzle U. Reduced prevalence of plasmodium infection and of concomitant anemia in pregnant women with heterozygous G6PD deficiency. *Trop Med Int Heath*. 2003.

27. Modiano D, Luoni G, Sirima BS, Simpore J, Verra F...

Haemoglobin C and S protects against clinical *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2001;414(6861):305–308.

28. Modiano D, Luoni G, Sirima BS, Simpore J, Verra F, Konate A, Rastrelli E, Olivieri A, Calissano C, Paganotti GM, D'Urbano L, Sanou I, Sawadogo A, Modiano G, Coluzzi M.

Haemoglobin C protects against clinical *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2001; 414(6861):305-8.

29. OMS 2005

Cinquante-huitième assemblée mondiale de la santé. Paludisme. Rapport du secrétariat, 14 Avril 2005.

30. Rihet P, Flori L, Tall F, Traore AS, Fumoux F.

Hemoglobin C is associated with reduced Plasmodium falciparum parasitemia and low risk of mild malaria attack. Hum Mol Genet. 2004, 13, 1-6.

31. Ruwende C, Khoo SC, Snow RW, Yates SN, Kwiatkowski D, Gupta S, Warn P, Allsopp CE, Gilbert SC, Peschu N.

Natural selection of hemi and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria. Nature, 20 July 1995. Vol 376. (6537):246-9.

32. Sall A. H.

Incidence et Mortalité de prise en charge du paludisme grave et compliqué dans le service pédiatrique du CHU Gabriel Touré.

Thèse Med. Bko, 2006 90-p-155.

33. Thérèse Duriez, Lucien Dujardin, Daniel Afchain

Cours de parasitologie, Laboratoire de Parasitologie Faculté de Pharmacie, 2002 ISBN 2-03-512102-7.

34. THOMAS N WILLIAMS

Human red blood cell polymorphisms and malaria.

[Current Opinion in Microbiology](#), Volume 9, Issue 4, August 2006, Pages 388-394.

35. Traverse P.M.De., Jaeger G., Coquelet M.L....

Contribution à l'étude de la répartition des hémoglobinoses chez les africains et les malgaches. Sem Hosp ; Paris, 1969, 45 (22); 1540-46

36. WHO.

World malaria situation in 1994. Wkly Epidemiol Rec 1997, 72:269-74

37. Williams TN, Maitland K, Bennett S....

High incidence of malaria in alpha-thalassemic children. Nature. 1996;
383:522-525.

38. www.scielosp.org/scieloorg/php/articleXML.php.

FICHE SIGNALITIQUE

Nom: DOUMBIA

Prénom: Mariam Soumaïla

Nationalité: Malienne

Titre: L'impact de l'alpha thalassémie sur le Paludisme chez les enfants de 0 à 5 ans dans le village de Kangaba et Kela

Pays d'origine: Mali

Ville de Soutenance: Bamako

Lieu de Dépôt: Bibliothèque de la Faculté de Médecine de Pharmacie et D'odonto-Stomatologie

Secteur d'intérêt : Hématologie, Parasitologie

Résumé:

Dans le but de définir la relation entre le portage de l'alpha-thalassémie et le paludisme grave à *P. falciparum*, nous avons conduit de 2005 à 2007 une étude cas-témoins dans le cercle de Kangaba. Les résultats obtenus au cours de cette étude montrèrent que le portage de l'alpha-thalassémie était à une fréquence de 36.1% dans la population d'étude. De même ce portage d'alpha-thalassémie ne conférait aucune protection contre les formes graves ou compliquées de paludisme à *P. falciparum* dans une population homogène malinké. La fréquence de l'anémie observée dans notre population d'étude était de 68%. Ce taux était

beaucoup plus élevé chez les sujets homozygote et hétérozygote pour l'alpha-thalassémie comparés aux sujets normaux. Cette différence n'était pas statistiquement significative ($P=0,06$ et $0,13$). Ceci a permis de dire que le portage de l'alpha-thalassémie n'était pas associé à la survenue de l'anémie au cours de l'infection palustre à *P. Falciparum*.

SERMENT DE GALIEN



Je jure, en présence des Maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer dans l'intérêt de la Santé Publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Je le jure !