

Ministère de l'Enseignement
Supérieur et de la Recherche

REPUBLIQUE DU MALI
UN PEUPLE-UNBUT-UNEFROI

Scientifique



UNIVERSITE DES SCIENCES DES TECHNIQUES ET TECHNOLOGIES
FACULTE DE MEDECINE DE PHARMACIE ET D'ODONTOSTOMATOLOGIE

Année universitaire 2011-2012

N°...../P

TITRE

Impact des polymorphismes de l'hémoglobine et du globule rouge sur la fréquence du Paludisme dans la commune rurale de Bancoumana (Mali)

Présentée et soutenue publiquement le 14/04/2012 devant la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie du Mali

Par Mr **François KAMATE** pour l'obtention du grade de Docteur en Pharmacie (Diplôme d'Etat)

JURY

Président : Professeur Amadou DIALLO

Membres : Professeur Souleymane DIALLO
Professeur Mounirou BABY

Co-directeur : Docteur Mahamadou DIAKITE

Directeur : Professeur Anatole TOUNKARA

DEDICACES

A l'Emmanuel, Dieu d'Amour, à Qui je dois toutes choses, Louanges et gloire !

Je dédie ce travail :

A mon père : Pobanou Alfred KAMATE

Tes conseils et ton souci permanent du travail bien fait ont forgé cet homme que je suis devenu. Ton affection ne nous a jamais fait défaut. Ce modeste travail est l'occasion pour moi de te signifier ma gratitude.

A ma mère : Sogoba DENA

Tu as été pour nous une mère exemplaire. Merci pour tout ce que tu nous as donné en commençant par la vie. Ton affection, tes conseils et ton dévouement pour la réussite de tes enfants n'ont jamais fait défaut. Ce travail est le fruit de ta bravoure. Je prie Dieu pour que tes souffrances endurées ne soient pas vaines et qu'il te prête longue vie et une santé de fer afin que tu puisses continuer à nous conseiller, à nous consoler comme tu l'as toujours fait. Maman que tes attentes puissent être comblées.
Amen !

REMERCIEMENTS

A mes frères et sœurs : retrouvez ici le fruit de vos conseils et je vous remercie infiniment pour le soutien moral et matériel. Que Dieu vous donne longue vie et guide vos pas.

A toutes mes belles sœurs, Recevez ici l'expression de toute ma reconnaissance et merci pour votre soutien indéfectible.

A tous les Professeurs enseignants de la faculté, pour la qualité de leurs enseignements.

Au personnel du Laboratoire d'Immunogénétique et hémoglobinopathies :

TRAORE Oumou, DIARRA Aïssata , KEÏTA Abdoul Salam, MARIKO Aliou, les docteurs DIAKITE Mahamadou, DOUMBIA Saïbou, TRAORE Karim, KONATE Drissa, DIAKITE Seidina, , DOUMBOUYA Mory, FAMANTA Aminata, DIAWARA Sory, SANOGO Ibrahima, COULIBALY Ismaïla, merci pour votre entière disponibilité, votre soutien, et votre sympathie. Ce travail est le vôtre. Je vous en suis sincèrement reconnaissant.

A mes amis et aînés :

BA Djibril dit Président, SANOGO Moussa dit Eléphant, OUEDRAOGO Sékou, COULIBALY Cheick dit Djaboulani, Les docteurs KONE Théodorine Z, SANOGO Lassana, DOUMBIA Souleymane, merci pour vos soutiens.

A la promotion Massa Sanogo

Au personnel de l'officine Notre Dame de Kalaban-Coro Kouloubléni-Est, au personnel de l'officine Sory BOCOUM, Kadiatou TRAORE dite Tatou.

Aux autorités, aux notabilités et aux guides locaux des villages de Kéniéroba, Fourda et Bozokin et à toute la population de ces trois villages.

A tout le personnel du MRTC/LMVR.

A tous les chauffeurs du MRTC / LMVR

A toutes et tous mes amis merci.

A mes frères et sœurs de PARISIN, de la communauté catholique du Point-G et leurs accompagnateurs, de l'AEMK, de l'AEP.

A toutes et à tous, vous qui de près ou de loin m'avez soutenu, les mots me manquent pour vous exprimer toute ma joie, ma reconnaissance et tout mon respect. Je vous dis un grand merci.

Hommages aux membres du jury

A notre maître et président du jury : Pr Amadou DIALLO

- Professeur honoraire de biologie animale à la faculté de médecine, de pharmacie et d'odontostomatologie ;

- Ancien recteur de l'Université de Bamako

Vous nous faites l'honneur d'accepter de juger ce travail malgré vos multiples occupations. Ceci est le témoignage de l'intérêt que vous avez toujours attaché à notre formation.

Nous avons toujours trouvé auprès de vous compréhension et aide. Nous apprécions hautement votre disponibilité permanente et votre ouverture d'esprit.

Tout en vous remerciant d'avoir bien voulu présider ce jury, nous vous prions de recevoir, cher professeur, nos sentiments les plus respectueux et dévoués.

A notre maître et membre du jury :

Pr Souleymane DIALLO

- **Maître de conférences en bactériologie à la FMPOS ;**
- **Chef du département médico-technique du CHU Gabriel TOURE ;**
- **Colonel, pharmacien biologiste des forces armées du Mali ;**
- **Directeur général du centre Charles MERIEUX de Bamako**

Vous nous avez accueillis dans votre service avec gentillesse et amabilité.

Nous avons été séduits par votre esprit de méthode, votre sens logique et votre rigueur scientifique.

Vous avez avec nous supporté le poids de ce travail de la plus grande disponibilité face à vos multiples sollicitations.

C'est pour nous un privilège d'être à vos côtés et de bénéficier de votre expérience dont notre travail s'est pleinement enrichi.

Veillez accepter cher professeur, l'expression de notre profonde gratitude.

A notre maître et membre du jury :

Pr Mounirou BABY

- Maître de conférences en hématologie ;
- Directeur général du Centre National de Transfusion Sanguine (CNTS)

Vous avoir comme membre du Jury constitue pour nous un grand honneur. Vos critiques et vos suggestions ont largement contribué à améliorer la qualité de ce travail.

Votre simplicité, votre disponibilité constante et votre dynamisme font de vous un maître admiré de tous.

Veillez, croire cher maître, à notre reconnaissance et notre profonde gratitude.

A notre maître et co-directeur de thèse :

Dr Mahamadou DIAKITE

- **Docteur en pharmacie ;**
- **PhD en génomique humaine ;**
- **Maitre assistant en immunologie-génétique ;**
- **Responsable du Laboratoire Immunogénétique et de Parasitologie du MRTC**

Vous avez guidé nos pas hésitant. Nous avons apprécié votre rigueur scientifique, votre passion pour le travail et votre simplicité.

Vos conseils de maître nous ont permis de garder de vous l'estime et l'image d'un maître généreux dont le souci majeur est de veiller à la bonne formation de son élève.

Nous souhaitons très sincèrement ne pas vous décevoir et de mériter votre confiance.

Veillez trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.

A notre maître et directeur de thèse :

Pr Anatole TOUNKARA

- **Professeur titulaire d'immunologie à la FMPOS ;**
- **Directeur du programme NIH/NIAID/UB de recherche et de formation sur le SIDA et de la tuberculose (SEREFO);**
- **Doyen de la faculté de médecine, de pharmacie et d'odontostomatologie.**

Nous avons trouvé auprès de vous une précieuse assistance pour l'élaboration de ce document.

Votre ardeur au travail et votre haute conscience professionnelle jointe à votre générosité et à votre modestie qui cache d'éminentes qualités humaines, vous avez pu gagné l'admiration de tous vos collaborateurs.

Pour avoir bien voulu diriger cette thèse et accepter de faire partie du jury.

Soyez assuré de notre sympathie et de notre sincère attachement.

Sigles et Abréviations

AAG : Adenine-Adenine-Guanine

ADN : Acide Désoxyribonucléique

BDL: Duffy binding likes (attachement semblable au Duffy)

CD4: Clone de Différenciation 4

CIDR: Cystein –Rich interdomain

CRF: Fichier standard de Rapport de Cas

CSCOM: Centre de Santé Communautaire

CTA: Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine

°C: degré Celsius

EDTA: Ethyle Diamine Tétra Acétique

GAG: Guanine-Adenine-Guanine

GTG: Guanine-Thymine-Guanine

GIS/GPS: Geographic Information System/Global Positioning System

G6PD: Glycose-6-Phosphate Déshydrogénase

GR: Globule Rouge

g: Gramme

Hb: Hémoglobine

HBB: Hemoglobin Beta gene

HBA1: Hemoglobin alpha gene-1

HBA2: Hemoglobin alpha gene-2

HbA: Hémoglobine Adulte

HbF: Hémoglobine Foetale

HD:Hôte Définitif

HT: Hôte Transitoire

HPLC: Chromatographie en phase Liquide de Haute Performance

ICAM-1: Inter-Cellular Adhesive Molecule-1

IL: Interleukine

Kb: Kilobase

KDa: KiloDalton

Km: Kilomètre

LMVR: Laboratory of Malaria and Vector Research

MRTC: Malaria Research and Training Center

MS: Microsoft

NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate réduit

NIAID: National Institute of Allergy and Infections Diseases

NIH: National Institutes of Health

OMS (WHO): Organisation Mondiale de la Santé

PCR-REA: *Polymerase Chain Reaction, Restriction Enzyme Analysis*

*Pf*ATPase: *Plasmodium falciparum* Adenine Triphosphatase

*Pf*EMP-1: *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein -1

Pf: *Plasmodium falciparum*

RN: Route Nationale

SOP: Standard Operating Procedures (Procédures Standard Opératoires ou normalisées)

SNPs: Single Nucleotide Polymorphism (mutation ponctuelle)

SP: Sulfadoxine-Pyriméthamine

TNF: *Tumor Necrosis Factor* (facteur nécrosant des tissues)

UNICEF: Fonds des Nations Unies pour l'Enfance et la Culture

µl: Microlitre

TABLE DES MATERES

1. Introduction.....	17
2. Objectifs	18
2.1. Objectif général	18
2.2. Objectifs spécifiques.....	18
3. Généralités sur le paludisme.....	19
3.1. Epidémiologie	19
3.1.1. Groupes à risque	19
3.1.2. Cycle de développement du parasite.....	20
3.2. Physiopathologie du paludisme	25
3.2.1. Accès palustre simple.....	25
3.2.2. Accès palustre grave et compliqué	26
3.3. Variants génétiques et protection contre le paludisme	30
3.3.1. Hémoglobine normale et hémoglobinopathies.....	30
3.3.2. Déficit en G6PD	41
3.3.3. Groupes sanguins ABO	42
3.4. Prévention et traitement du paludisme	43
3.5. Vaccins antipalustres.....	44
4. Matériel et Méthodes	45
4.1. Cadre d'étude	45
4.1.1. Situation géographique, climat et végétation	49
4.1.2. Infrastructures socio-sanitaires.....	50
4.1.3. Activités socio-économiques et culturelles	50
4.2. Type d'étude.....	51
4.3. Population d'étude et échantillonnage	52
4.4. Critères d'inclusion et de non inclusion.....	52
4.4.1. Critères d'inclusion	52
4.4.2. Critères de non inclusion	52
4.5. Méthodes de collecte des données	52

4.6. Variables déterminées et mesurées	53
4.7. Examens de laboratoire utilisés.....	53
4.8. Considérations éthiques et déontologiques	54
4.8.1. Risques et effets secondaires potentiels.	54
4.8.2. Compensation	55
4.8.3. Diffusion des résultats	55
4.9. Gestion et analyse des données	56
5. Résultats	57
5.1. Résultats globaux.....	57
5.2. Caractéristiques sociodémographiques.....	58
5.3. Résultats analytiques.....	59
6. Commentaires et Discussion	70
6.1. Au plan méthodologique	70
6.2. Distribution des variants d'hémoglobine dans notre population d'étude	71
6.3. Distribution du groupe sanguin ABO dans notre population d'étude	72
6.4. Distribution du déficit en G6PD dans notre population d'étude.....	73
6.5. Distribution de l'alpha-thalassémie dans notre population d'étude	73
6.6. Relation entre les polymorphismes de l'hémoglobine et du globule rouge et le nombre d'épisodes palustres.....	74
6.6.1. Type d'hémoglobine et nombre d'épisode	74
6.6.2. Relation entre l'alpha-thalassémie et le nombre d'épisodes palustres	75
6.6.3. Relation entre le déficit en G6PD et le nombre d'épisodes palustres	75
6.6.4. Relation entre le groupe sanguin ABO et le nombre d'épisodes palustres	76
6.6.5. Relation entre l'âge et le nombre d'épisodes palustres	76
6.7. Limites de notre étude	76
7. Conclusion et Recommandations	78
7.1. Conclusion.....	78
7.2. Recommandations.....	78

8. Références bibliographiques	81
9. Annexes.....	98
9.1. Description des techniques de laboratoire.....	98
9.1.1. Détermination du groupe sanguin ABO	98
9.1.2. Détermination du type d'Hémoglobine avec le D-10.....	100
9.1.3. Détection de la délétion 3.7-kb responsable de l'alpha-thalassémie par PCR	102
9.1.4. Détection de la mutation 202 A/G responsable du déficit en G6PD par PCR	104
9.1.5. La goutte épaisse	112
9.1.6. Technique de coloration de Giemsa : méthode courante	117

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Cycle de développement de Plasmodium falciparum cycle chez le moustique ; cycle chez l'homme.....	23
Figure 2: globules rouges normaux et globules rouges en faucille.....	31
Figure 3: Situation schématique des villages d'étude au Mali	47
Figure 4: Plan de masse des trois villages d'étude dans la commune rurale de Bancoumana (Source : Unité GIS MRTC/FMPOS)	48
Figure 5: Répartition de la population d'étude en fonction du nombre d'épisodes palustres.....	63
Figure 6 : Proportion du paludisme selon les classes d'âge.....	68
Figure 7: Photographie d'une bande d'ADN de la G6PD après digestion	111
Figure 8: Technique de la goutte épaisse et du frottis mince.....	115
Figure 9: Photo d'une lame parasitée au microscope	116

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I: Symptômes Cliniques du paludisme [21]	29
TABLEAU II: Résumé des caractéristiques principales des beta-thalassémies [7] ..	37
TABLEAU III: Résumé des caractéristiques principales des alpha-thalassémies [7]	40
TABLEAU IV: Répartition des sujets en fonction du lieu de résidence	58
TABLEAU V: Répartition des sujets selon le sexe.....	58
TABLEAU VI: Répartition des enfants inclus selon les classes d'âge	59
TABLEAU VII: Répartition de la population d'étude en fonction du type d'hémoglobine et de la résidence.....	59
TABLEAU VIII: Répartition de la population d'étude en fonction du génotype alpha-thalassémique et de la résidence.....	60
TABLEAU IX: Répartition de la population d'étude en fonction du déficit en G6PD et de la résidence.....	61
TABLEAU X: Répartition de la population d'étude en fonction du groupe sanguin ABO et de la résidence.....	62
TABLEAU XI: Proportion du paludisme en fonction du type d'hémoglobine.....	64
TABLEAU XII: Répartition de la population d'étude en fonction du type d'hémoglobine et du nombre moyen d'épisodes palustres.....	65
TABLEAU XIII: Proportion du paludisme en fonction du génotype α -thalassémique.	65
TABLEAU XIV: Répartition de la population d'étude en fonction du type d'alpha-thalassémie et du nombre moyen d'épisodes palustres.....	66
TABLEAU XV: Proportion du paludisme en fonction du génotype G6PD.....	66
TABLEAU XVI: Répartition de la population d'étude en fonction du type de déficit en G6PD et du nombre moyen d'épisodes palustres	67
TABLEAU XVII: Proportion du paludisme en fonction du groupe sanguin ABO	67
TABLEAU XVIII: Répartition de la population d'étude en fonction du groupe sanguin ABO et du nombre moyen d'épisodes palustres.....	68
TABLEAU XIX: Répartition de la population d'étude en fonction de la classe d'âge et du nombre moyen d'épisodes palustres	69

1. Introduction

Considéré comme problème de santé publique à cause de sa grande mortalité et morbidité infantile dans le monde surtout dans les zones intertropicales, le paludisme est la maladie parasitaire la plus répandue dans le monde. Il constitue un risque majeur pour plus de trois milliards d'êtres humains et est responsable de nombreux cas de décès dans le monde, notamment en Afrique où il affecte sévèrement les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes [1]. Selon la dernière statistique de l'OMS, 225 millions de cas de paludisme ont été enregistrés dont près de 781 000 décès [2]. En 2011, le paludisme était endémique dans 106 pays dont 45 situés en Afrique [2].

En Afrique subsaharienne, particulièrement dans les zones rurales pendant la saison de transmission de paludisme (l'hivernage), chaque enfant est susceptible de faire un épisode de paludisme [3]. Cependant, il a été observé que certains sujets font une résistance au paludisme (surtout aux formes graves) allant de la protection contre la mortalité palustre à l'absence d'infection par le *Plasmodium*. Cet état de résistance est essentiellement constitutif, lié à certains caractères génétiques. L'identification de ces caractères et les différents mécanismes par lesquels ils protègent contre le paludisme permettront sans doute d'améliorer la lutte contre le paludisme.

De nos jours, l'effet protecteur contre les formes graves du paludisme de certains traits génétiques a été établi par des études épidémiologiques et de laboratoire. Il a été prouvé que les hémoglobines C, S et l'alpha-thalassémie protègent contre le paludisme sévère à *P. falciparum* au Mali [4]. Il a été également prouvé que le déficit en G6PD lié au chromosome X protégerait les hommes hémizygotés et les femmes homozygotes, mais pas les femmes hétérozygotes contre le paludisme sévère à *P. falciparum* [5].

Notre étude se propose d'examiner l'impact des polymorphismes de l'hémoglobine (l'HbS, l'HbC, α -thalassémie) et du globule rouge (déficit en G6PD, groupe sanguin ABO) sur le paludisme. Nos hypothèses de travail sont les suivantes :

Hypothèse nulle : Les polymorphismes cités ci-dessus n'ont aucun impact sur la fréquence du paludisme.

Hypothèse alternative : Les polymorphismes cités ci-dessus diminueraient la fréquence du paludisme.

2. Objectifs

2.1. Objectif général

Evaluer l'impact des polymorphismes de l'Hb (HbS, HbC, Thalassémies) et du globule rouge (déficit en G6PD, groupe sanguin ABO) sur la fréquence du paludisme chez les enfants, dans les villages de Kéniéroba, Bozokin et Fourda dans la commune de Bancoumana.

2.2. Objectifs spécifiques

- Déterminer les caractéristiques sociodémographiques de la cohorte d'enfants ;
- Déterminer la prévalence des polymorphismes de l'Hémoglobine et du globule rouge chez les enfants dans les villages de Kéniéroba, Fourda et Bozokin ;
- Déterminer le nombre moyen d'épisode de paludisme en fonction des polymorphismes de l'Hémoglobine et du globule rouge dans la population d'étude de 2008 à 2010 ;
- Déterminer l'impact des polymorphismes de l'Hémoglobine et du globule rouge sur la fréquence du paludisme.

3. Généralités sur le paludisme

Le paludisme est une protozoose due à des hématozoaires du genre *Plasmodium* et transmis par un moustique femelle du genre *Anopheles*. Quatre espèces plasmodiales sont responsables de presque tous les cas humains de paludisme : *P. falciparum* ; *P. vivax* ; *P. ovale* et *P. malariae*. Une cinquième espèce, *P. knowlesi*, a été décrite comme infectant l'homme [6]. La grande mortalité palustre est associée à l'infection par *P. falciparum*

C'est en 1880 qu'Alphonse Laveran découvre l'hématozoaire du paludisme à partir de l'observation d'une goutte de sang provenant d'un patient infecté par *P. falciparum*, ce qui lui a valu le prix Nobel de médecine ou physiologie en 1907 [7]. De 1895 à 1897, la transmission de cette affection par la piqûre des moustiques du genre *Anopheles* a été soupçonnée par Ross et confirmée par Grassi en 1898 [7].

3.1. Epidémiologie

L'épidémiologie du paludisme peut varier considérablement même à l'échelle d'une région géographique relativement petite. Les principaux déterminants de l'épidémiologie du paludisme sont la densité, les habitudes de piqûres et la longévité des moustiques. Plus spécifiquement, la transmission du paludisme est directement proportionnelle à la densité des vecteurs, au carré du nombre de piqûres infectantes par jour et par moustique et à la probabilité qu'un moustique puisse survivre pendant 1 jour à la puissance 10 [8, 9]. Le cycle de transmission fait intervenir trois acteurs: le parasite, le vecteur et l'homme, tous trois en relation dynamique avec les facteurs environnementaux et les conditions socio-économiques. Ces différents facteurs conditionnent l'épidémiologie du paludisme dans une région donnée.

3.1.1. Groupes à risque

Les personnes à risque de paludisme sévère [2] sont :

- les enfants dans les régions hyper- ou holoendémiques en particulier ceux âgés de six mois à cinq ans ;
- les sujets de tout âge dans les régions hypo- ou mesoendémiques ;
- les voyageurs venant de régions où il n'existe pas de transmission de paludisme qui se rendent dans une région impaludée ;

- les personnes qui retournent dans des régions fortement endémiques après quelques années d'absence ; et
- les femmes enceintes (à risque pour toutes les complications).

3.1.2. Cycle de développement du parasite

Le parasite du paludisme a un cycle hétéroxène à deux hôtes puisqu'il comporte obligatoirement un passage alterné par un vertébré (hôte intermédiaire qui est l'homme) et un moustique (hôte définitif ; [7]).

3.1.2.1. Cycle Chez le moustique (Sporogonie ; [10])

Il s'agit du moustique de l'ordre des diptères, de la famille des *Culicidae*, de la sous famille des *Anophelinae*, du genre *Anopheles* qui est l'hôte définitif (HD) du cycle de développement du *Plasmodium*. Lors d'un repas sanguin sur un individu infecté, l'anophèle femelle ingère des formes sexuées du *Plasmodium*, les gamétocytes mâles (micro gamétocytes) et femelles (macro gamétocytes). Ceux-ci parviennent dans l'estomac du moustique et se transforment en gamètes. Le gamète mâle subit un processus d'exflagellation à la suite duquel les gamètes femelles sont fécondés. Il en résulte un zygote appelé ookinète ou œuf mobile. Celui-ci s'implante sous la paroi stomacale en formant l'oocyste.

Cette brève phase diploïde s'achève par une division méiotique suivie par plusieurs milliers de mitose qui conduit à la production de sporozoïtes. L'éclatement de l'oocyste libère ces éléments mobiles et haploïdes dans l'hémolymphe. Les sporozoïtes gagnent préférentiellement les glandes salivaires du moustique d'où ils pourront être injectés avec la salive lors d'une piqûre infectante. Chez le moustique, l'ensemble de ce cycle se déroule entre 8 à 30 jours, suivant la température extérieure et l'espèce en cause.

Plusieurs facteurs influencent le développement du parasite chez le moustique. La température vient en première position : en dessous de 18°C et au dessus de 35°C, le cycle sporogonique de *P. falciparum* est arrêté. A la température de 20°C, 24°C et 30°C, il est respectivement de 20, 11 et 9 jours. La densité des gamétocytes et leur pouvoir infectant,

l'âge des gamétocystes (3 à 5 jours après les premières ex flagellations semblent être l'optimum) et leur sexe ratio (une proportion relativement élevée de mâles est favorable à l'infection des moustiques), de même que le statut immunitaire et le type d'hémoglobine du porteur de gamétocytes, ont aussi une influence positive sur l'infection des vecteurs.

Ainsi, pour transmettre le paludisme, le moustique doit survivre plus de 7 jours. Les moustiques les plus efficaces dans la transmission du *Plasmodium* sont les moustiques du genre *Anopheles* (*A. gambiae* en Afrique) qui vivent plus longtemps, survivent en grande densité dans les climats tropicaux, se nourrissent volontiers, se reposent à l'intérieur des maisons et piquent les hommes de préférence à d'autres animaux. Le taux de base de reproduction (R_0), le nombre d'infections qu'une personne peut transmettre à une autre varie grandement dans le paludisme. R_0 dépend largement de la densité des gamétocytes chez les personnes infectées, de la densité de la population aussi bien que de la distribution des vecteurs et des parasites, de la longévité des moustiques, de l'habitude de piqûre des moustiques et d'autres facteurs écologiques. La taille de R_0 semble assez large et estimée à plus de 3 000 [11].

3.1.2.2. Cycle chez l'homme

3.1.2.2.1. Cycle exo-érythrocytaire [10]

Lorsqu'un moustique infecté pique un homme, il injecte le parasite avec sa salive sous la forme de sporozoïtes, éléments infectants, vermiformes de 4 à 5 μm de long, qui sont entraînés dans la circulation générale. Quelques minutes après la piqûre infectante, les sporozoïtes pénètrent dans les cellules hépatiques grâce à leur complexe apical. Le complexe apical consiste en une projection conique de la membrane cellulaire conçue pour se faufiler dans les tissus et entrer en contact avec la cellule-hôte par l'intermédiaire d'un groupe d'organelles uniques (2 rhoptries, un anneau polaire et un nombre de micronèmes et de granules denses). Rhoptries, micronèmes et granules denses (qui sont tous électron-opaque en microscopie électronique) contiennent différentes substances qui sont 'injectées' dans la cellule-hôte au cours de l'invasion au moyen d'un système de conduits qui lie ces organelles entre elles, ensuite, s'ouvrent au pôle apicale de la cellule [12].

Les substances relarguées jouent un rôle crucial en déstabilisant la membrane cellulaire, ce qui aboutit à la formation d'une poche d'invasion, qui va éventuellement envelopper le mérozoïte à l'intérieur d'une cavité membranaire, la vacuole parasitophore.

Le sporozoïte entre alors dans une phase de réplication, au sein de la vacuole parasitophore et de prolifération intracellulaire qui repousse en périphérie le noyau de la cellule et finit par constituer une masse multi nucléée appelée schizonte (schizonte hépatocytaire) qui conduit à la libération de plusieurs dizaines de milliers de mérozoïtes dans la circulation sanguine. Cette phase, cliniquement muette, peut durer entre 7 jours et quelques semaines, suivant les espèces plasmodiales. Cette multiplication aboutit à un éclatement des hépatocytes et à la mise en circulation de plusieurs milliers de mérozoïtes capables d'envahir par endocytose les globules rouges.

3.1.2.2.2. Cycle intra-érythrocytaire [13]

C'est la seule phase symptomatique du cycle d'intensité variable selon les individus. Les mérozoïtes libérés lors de la rupture de l'hépatocyte vont débiter le cycle sanguin asexué de prolifération de *P. falciparum* en infectant les érythrocytes. Le mérozoïte pénètre grâce à un processus parasitaire actif et se différencie au sein de la vacuole parasitophore en anneau (trophozoïte jeune), puis en trophozoïte mature, stade à partir duquel une intense phase répliative commence. Chaque mérozoïte se divise pour donner naissance à 8 à 34 nouveaux parasites (mérozoïtes), capables à leur tour d'envahir d'autres globules rouges. Puis la segmentation montre une forme caractéristique de rosace.

Ce cycle dure de 48 à 72 heures selon les espèces. L'ensemble de ce cycle dure 48 heures chez *P. falciparum*. Après un certain nombre de cycles, spontanément (programmation génétique ?) ou sous l'effet d'une pression médicamenteuse, quelques parasites se différencient en gamétocytes mâles et femelles dont le potentiel sexué est bloqué jusqu'à leur absorption par l'anophèle. A la suite d'une nouvelle piqûre par un anophèle, les gamétocytes mâles et femelles (au dimorphisme sexuel marqué) sont ingérés avec le repas sanguin.

Il est à noter que moins de 20% des piqûres de moustiques contenant des sporozoïtes dans leurs glandes salivaires sont responsables d'infections en zone endémique.

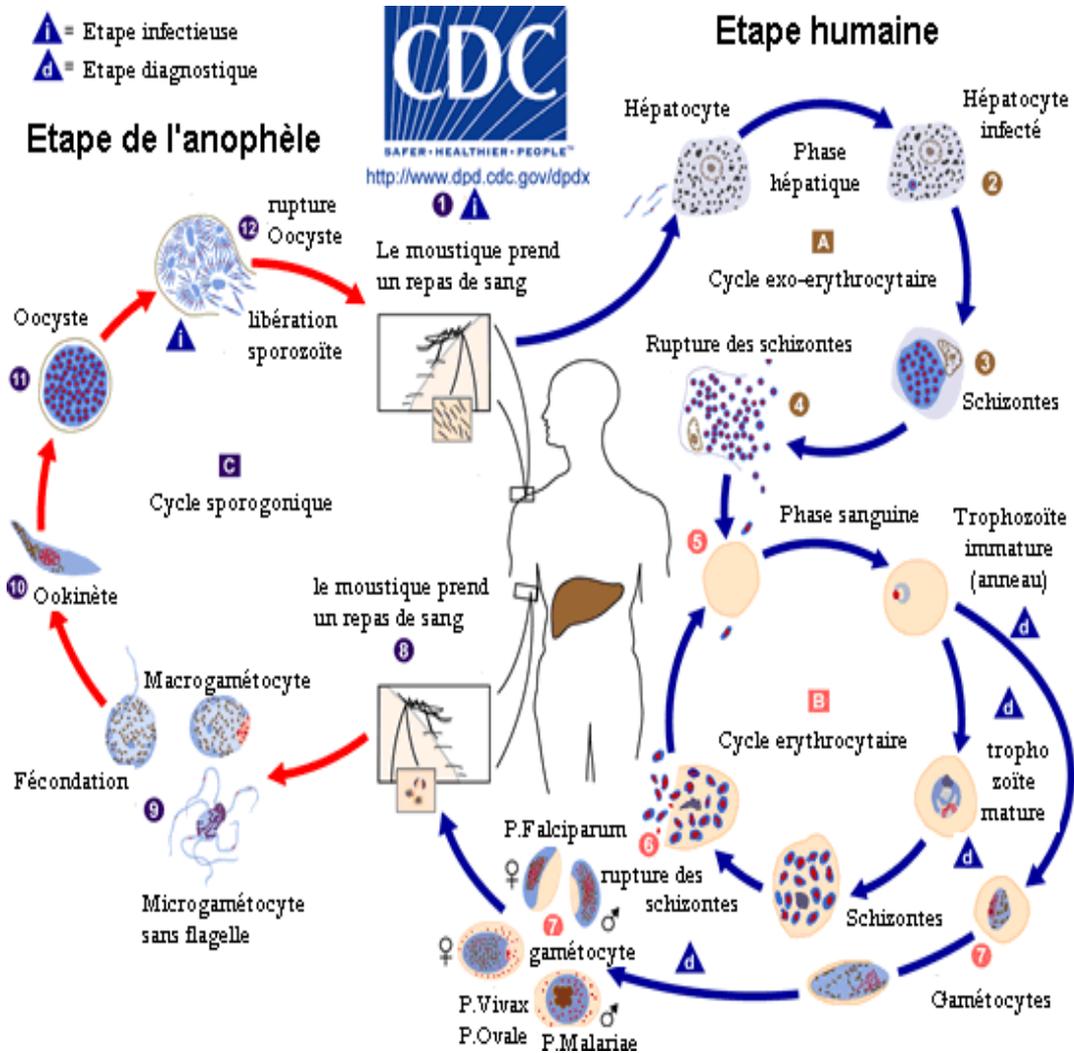


Figure 1: Cycle de développement de *Plasmodium falciparum* cycle chez le moustique ; cycle chez l'homme

Source: www.dpd.cdc.gov/dpdx, consultée le 23 avril 2011

3.1.2.3. Cycle dans la population

Dans le cycle de la transmission, la population joue le rôle de réservoir de gamétocytes. La situation palustre dans une communauté peut être décrite en termes d'**endémicité**, qui donne des indications sur l'importance de la transmission, sur la circulation du parasite dans la communauté et sur "l'intensité" de la maladie. Elle permet aussi de délimiter le problème palustre dans l'espace (zones à risques) et dans le temps (saisons de transmission). C'est dire que le **climat** et l'**altitude** sont les deux éléments environnementaux clés jouant un rôle majeur dans la transmission du paludisme.

L'indice de stabilité, déterminé par Macdonald [14], caractérise l'enracinement du paludisme et permet de distinguer :

- **les zones de paludisme stable** où la forte transmission entraîne une prémunition. Celle-ci n'empêche pas les habitants d'être parasités mais limite les manifestations pathologiques aux classes d'âge les plus jeunes alors que les adultes sont peu touchés.

- **les zones de paludisme instable** où le caractère épisodique de la transmission ne permet pas le développement de la prémunition; la maladie sévit alors sous forme d'épidémie touchant toutes les classes d'âges.

Au Mali, cinq modalités épidémiologiques de transmission du paludisme ont été décrits [15]:

- **La zone de transmission saisonnière longue de quatre à six mois au sud** qui correspond à la région soudano-guinéenne. Le paludisme y est holoendémique avec un indice plasmodique supérieur à 75% de juin à novembre.

- **La zone de transmission saisonnière courte à quatre mois** dans les régions de la savane nord soudano-sahélienne. Le paludisme y est hyper endémique avec un indice plasmodique variant entre **50 et 75%**.

- **La zone sub-saharienne** au Nord où la transmission est sporadique voire **épidémique**, l'indice plasmodique est inférieur à 50%.

- **La zone du delta intérieur du fleuve Niger et les zones de retenue d'eau et de riziculture** (barrages) où la transmission est bimodale voire plurimodale. En début de la saison de pluie, la période de décrue et de mise en eau des casiers rizicoles. Le paludisme est de type méso-endémique avec un indice plasmodique inférieur à 40%.

- **Le milieu urbain** en particulier celui de Bamako est impropre à l'impaludation (Pollution des gîtes, médicalisation etc.).

Le paludisme y est de type hypo endémique avec un indice plasmodique inférieur à 10%.

3.2. Physiopathologie du paludisme

Le paludisme et ses complications sont la résultante d'une cascade d'évènements physiopathologiques, influencés à la fois par le parasite et les facteurs liés à l'hôte (y compris l'immunité et les facteurs de susceptibilité génétiques). *P. falciparum* développe différents états physiologiques chez l'hôte infecté.

3.2.1. Accès palustre simple

Les symptômes du paludisme commencent à se développer à partir du stade intra érythrocytaire du cycle de développement du parasite. La fièvre est surtout due à une substance pyrogène (l'hémozoïne) déversée lors de l'éclatement des globules rouge parasités. En plus, plusieurs cytokines ont un effet pyrogène comme l'IL-1, l'IL-2, l'IL-6 et surtout le TNF- α [16]. La destruction des globules rouges conduit à l'anémie ainsi que d'autres mécanismes auto-immunitaires telles que :

- la fixation de l'antigène plasmodial soluble sur les membranes érythrocytaires,
- l'action de facteurs plasmatiques libérés par les parasites et fragilisant les parois érythrocytaires,
- l'activité opsonisante d'autres produits du métabolisme parasitaire favorisant la phagocytose des hématies par les monocytes.

Au cours de l'infection, le système monocyte macrophage débarrasse l'organisme non seulement des pigments malariques mais aussi des débris érythrocytaires, ce qui entraîne l'hépto-splénomégalie.

La parasitémie doit atteindre un seuil critique avant que la rupture des schizontes ne déclenche un accès clinique. Par conséquent, les premiers cycles érythrocytaires restent généralement asymptomatiques. Le seuil de parasitémie est néanmoins variable d'un sujet à l'autre. Un sujet naïf qui n'a jamais fait de paludisme, est susceptible de faire un accès clinique avec une parasitémie à peine détectable (0,001%) alors qu'un enfant d'âge scolaire (6- 9ans) en zone d'endémie restera le plus souvent asymptomatique, même à une parasitémie très élevée [17].

3.2.2. Accès palustre grave et compliqué

Le paludisme simple mal ou non traité peut se compliquer. La schizogonie profonde de *P. falciparum* est à l'origine des complications redoutables telles que le neuropaludisme. Celui-ci consiste en des thromboses capillaires responsables de lésions vasculaires et hémorragiques provoquant des altérations dégénératives des cellules nerveuses entourées d'infiltrats cellulaires. Plusieurs théories expliquent ces phénomènes:

- les obstacles mécaniques sur la circulation micro-capillaire et veineuse à cause d'une déformabilité diminuée des érythrocytes parasités et de la formation de "rosettes" constituées d'un globule rouge parasité auquel adhèrent, par un mécanisme non élucidé (les antigènes et les immunoglobulines exposés à sa surface joueraient un rôle), des érythrocytes normaux. Ces phénomènes entraînent une diminution du débit circulatoire et un coma métabolique réversibles [17].
- l'adhérence immunologique de globules rouges parasités à l'endothélium vasculaire post-capillaires entraînant des ralentissements circulatoires importants. Cette adhérence serait sous la dépendance de certaines protéines de surface des globules rouges parasités visibles au microscope électronique (protubérances ou "knobs"), des lymphocytes T CD4⁺, de certaines interleukines, en particulier le TNF et les récepteurs endothéliaux tels que la molécule d'adhésion intercellulaire de type I (ICAM-1) [17].

L'expression symptomatique consiste en une hémiplégie ou des convulsions (zones motrices), des troubles thermorégulateurs avec hyperpyrexie (hypothalamus), une altération progressive de la conscience si le cerveau entier est atteint. Le

neuropaludisme évolue rapidement sans traitement vers le coma puis le décès du malade [17].

. **L'anémie** qui est définie comme un bas niveau d'hémoglobine dans le sang, comme attestée par la réduction de la qualité et de la quantité d'hématies associées à une réduction de la capacité de transport d'oxygène. Nous avons utilisé la définition des différents degrés d'anémie en Afrique selon Newton et Krishna [17] :

- **absence d'anémie** : un taux d'hémoglobine ≥ 10 g/dl,
- **anémie modérée** : un taux d'hémoglobine compris entre 7 et 9,9 g/dl,
- **anémie sévère** : un taux d'hémoglobine < 7 g/dl.

Elle a de sérieuses conséquences négatives, incluant une augmentation de la mortalité chez les femmes enceintes et les enfants, une diminution de la capacité d'apprentissage et une diminution de la productivité chez toutes les personnes. Ses effets néfastes sur la productivité sanitaire, physique et intellectuelle affectent la qualité de la vie et se traduisent par une perte économique considérable pour la personne et pour la communauté ayant une forte prévalence d'anémie. L'anémie est l'un des problèmes majeurs de santé publique les plus répandus dans le monde. Dans les régions endémiques palustres d'Afrique, la prévalence de l'anémie varie entre 31% et 91% chez les enfants et entre 60% et 80% chez les femmes enceintes [18, 19].

L'anémie sévère est une des plus importantes complications du paludisme chez les enfants vivant en zone endémique, spécialement chez ceux infectés par *P. falciparum* [20-22], probablement en raison des hauts niveaux de parasitémie en relation avec cette espèce. En Afrique, le pic de mortalité pour anémie sévère survient à un plus jeune âge comparé au pic de la mortalité pour neuropaludisme (entre 6 mois et 2 ans pour l'anémie, 2 à 3 ans pour le neuropaludisme) [21].

Chez les enfants maliens de moins de deux ans, la prévalence de l'anémie est de 85,1% (15,4% d'anémie sévère, 56,0% d'anémie modérée et 13,7% d'anémie faible [23]. Chez les enfants de 2 à 5 ans, l'anémie globale est de 82,7%, l'anémie sévère 11,5%, l'anémie modérée 53,0% et l'anémie faible 18,2%[23].

Un taux d'hémoglobine inférieur à 5 g /dl (ou un taux d'hématocrite < 15%) associé à une parasitémie ($\geq 10\ 000$ formes asexuées / μ l) est un signe majeur de paludisme grave selon l'OMS [20-22]. En pratique, l'anémie palustre peut être définie comme une réduction du taux d'hémoglobine ou d'hématocrite en dessous de l'échelle normale pour l'âge, le sexe et l'état de grossesse dans une région endémique et en présence d'une parasitémie quelque soit la densité parasitaire. De nombreux enfants présentant une anémie sévère sans goutte épaisse positive répondent bien au traitement anti-palustre [21, 24]

TABLEAU I: Symptômes Cliniques du paludisme [21]

Symptômes	Proportions
Fièvre élevée ($\geq 39^{\circ}\text{C}$)	99-100
Céphalées	84
Frissons	81
Splénomégalie	69
Anémie	68
Transpiration	67
Nausées	39
Vomissements	39
Arthralgie	39
Diarrhées	18
Toux	16
Douleurs abdominales	16

3.3. Variants génétiques et protection contre le paludisme

Dans les zones d'endémie palustre, on observe que certains enfants font moins d'épisodes palustres pendant la saison de transmission ou rarement la forme sévère du paludisme. Dans les mêmes zones, on observe également l'existence de certaines anomalies érythrocytaires génétiques. Ce qui amène à rechercher la relation entre ces variants génétiques et la résistance au paludisme sévère.

3.3.1. Hémoglobine normale et hémoglobinopathies

Les érythrocytes sont essentiellement remplis d'hémoglobine et les parasites du paludisme ont développé un style de vie qui dépend largement de son environnement d'hémoglobine.

Les altérations de l'hémoglobine peuvent affecter la biochimie et la machinerie cellulaire du développement parasitaire. Elles pourront affecter l'habilité de la rate et d'autres mécanismes immunitaires à reconnaître les hématies parasitées en affectant leur morphologie, leurs propriétés mécaniques ou leurs structures de surface. L'importance biologique de ces dépendances est appuyée par la très grande pression que le paludisme a exercé sur la structure et la régulation de l'alpha globine (encodée par les gènes identiques HBA1 et HBA2) et la beta globine (encodée par le gène HBB) qui, ensemble, constituent la protéine tétramérique de l'hémoglobine chez l'adulte [25]. Des perturbations peuvent survenir dans la synthèse de l'hémoglobine dues à une mutation (le plus souvent ponctuelle) ou une suppression au niveau des gènes gouvernant la synthèse de telle ou telle chaîne. Ces perturbations aboutissent à des anomalies génétiques de l'hémoglobine appelées hémoglobinopathies. L'hémoglobinopathie peut être qualitative : HbS (drépanocytose), HbC, etc. ou quantitative : thalassémies.

3.3.1.1. Hémoglobine S (drépanocytose)

La drépanocytose ou anémie falciforme est une maladie génétique autosomique récessive. C'est une maladie rare sauf dans certaines régions notamment l'Afrique équatoriale, certaines régions de l'Inde et le pourtour méditerranéen. Au Mali la prévalence de la drépanocytose est de 12% [26]. Cette affection est un syndrome hémolytique dû à un défaut de synthèse de la chaîne bêta de l'hémoglobine.

Il s'agit d'une mutation ponctuelle au niveau de la position 6 du gène de la chaîne bêta globine, c'est-à-dire la séquence **GAG** est remplacée par la séquence **GTG** (SNP *rs334*) ce qui conduit au remplacement de l'acide glutamique par la valine conduisant au remplacement de l'HbA par l'HbS [27]. Par conséquent, dans la condition d'hypoxie, l'hémoglobine perd sa forme et sa fonctionnalité pour prendre la forme en faucille incapable de survivre dans cette condition, d'où l'hémolyse aboutissant à une anémie.

Les sujets homozygotes (Hb SS) ont la drépanocytose généralement fatale au jeune âge. Les sujets hétérozygotes (Hb AS) n'ont généralement pas d'anomalie clinique, Il a même été suggéré que cette forme pourrait conférer un avantage de protection contre certaines formes de paludisme [28]. La distribution géographique du paludisme et du gène drépanocytaire supporte cette suggestion [28], mais aussi les études épidémiologiques et cliniques réalisées dans les zones endémiques du paludisme confirment cette hypothèse [29].

En effet, les premières observations entre le trait drépanocytaire et le paludisme provenaient de la Rhodésie du Nord où Beet notait que le parasite du paludisme était moins fréquent dans le sang des sujets ayant le trait drépanocytaire [30].

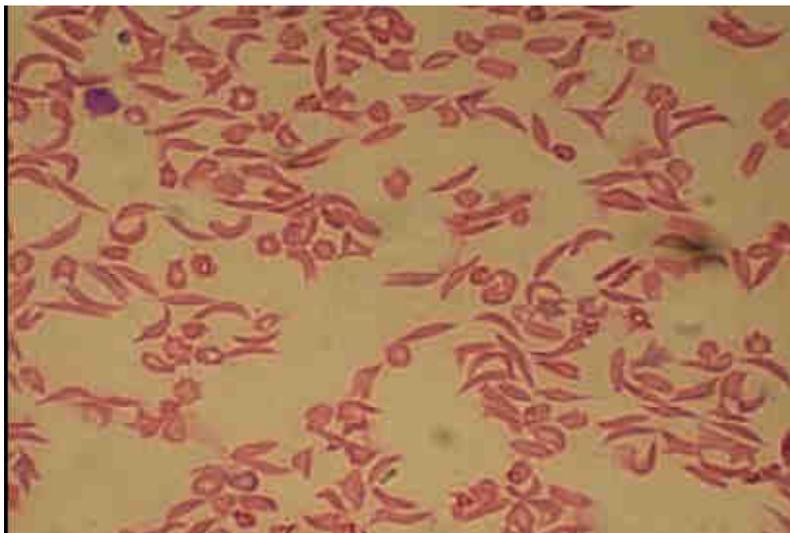


Figure 2: globules rouges normaux et globules rouges en faucille

Source : www.BioMed.fr, consulté le 22/04/2011

Le mécanisme par lequel le trait drépanocytaire protège contre le paludisme à *P. falciparum* n'est pas totalement élucidé, mais les principaux facteurs sont la falciformation accélérée facilitant l'élimination des cellules infectées de la circulation sanguine [31] et la mauvaise croissance parasitaire. Cette croissance est normale dans les hématies AS exposées à 17% d'oxygène mais les parasites meurent à 3% d'oxygène en quelques jours [32].

3.3.1.2. Hémoglobine C

L'hémoglobine C est retrouvée à travers l'Afrique de l'ouest surtout sur le plateau Voltaïque. Elle est asymptomatique chez les sujets hétérozygotes et ne comportant qu'une hémolyse extrêmement modérée souvent accompagnée d'une grosse rate chez les sujets homozygotes. C'est une affection génétique à transmission récessive, il s'agit d'une mutation ponctuelle au niveau de la position 6 de la chaîne β globine, c'est-à-dire, la séquence **GAG** est remplacée par **AAG** (SNP *rs33930165*) conduisant au remplacement de l'acide Glutamique par la Lysine. Par conséquent, l'HbA est remplacé par l'HbC [25].

La coïncidence de la distribution géographique de cette affection génétique érythrocytaire avec celle de l'endémie palustre passée ou présente suggère qu'elle est impliquée dans la protection contre le paludisme. En effet, l'HbC hétéro- et homozygote protègent tous contre le paludisme sévère ; mais il semble que cette protection soit élevée pour les sujets homozygotes [33]. Une étude menée sur 4348 sujets au Burkina Faso suggère une réduction de 29 à 93% de risque de paludisme clinique chez les sujets de type d'HbC hétérozygotes et homozygotes, respectivement [34].

Certaines études récentes ont démontré l'effet protecteur de cette hémoglobinopathie contre le paludisme grave, comme celle conduite au Mali chez les Dogon, qui a démontré que l'HbAC était associée approximativement à 80% de réduction du risque de paludisme grave [35]. Aucun cas de paludisme grave n'a été observé chez les 7 sujets homozygotes HbCC inclus dans cette étude.

Ce résultat montre que les sujets homozygotes sont plus protégés que les sujets hétérozygotes [35].

Le mécanisme de protection induite par l'HbC n'est pas élucidé mais une étude récente a démontré deux mécanismes :

- **la diminution de la séquestration des globules rouges parasités** dans la micro circulation sanguine reconnue comme facteur déterminant la survenue des formes graves de paludisme ;
- **une augmentation de la clairance splénique des globules rouges parasités.**

Le premier mécanisme semble être le mécanisme prépondérant. On expliquerait ainsi la protection conférée par l'HbC contre la plupart des formes graves du paludisme même chez les enfants de moins de cinq ans qui manquent encore d'immunité spécifique acquise antipaludique suffisante [36].

3.3.1.3. Thalassémies

Le terme grec "Thalassa", qui signifie "la mer" reflète la fréquence élevée des thalassémies dans les populations italienne et costale grecque. Présentement, le terme thalassémie est utilisé pour décrire un groupe de désordres de synthèse des chaînes de la globine. Alpha-thalassémie se réfère aux anomalies de synthèse de la chaîne alpha et la beta thalassémie reflète une synthèse défectueuse de la chaîne beta de la globine [37].

Les thalassémies incluent un groupe de désordres cliniques qui résultent d'une mauvaise production des chaînes alpha et beta de la globine, suite à une suppression ou autres perturbations des gènes de la globine sur les chromosomes 11 et 16. Il existe un large spectre de phénotypes cliniques, reflétant le nombre de variants génétiques qui existent et vu la grande complexité par le fait que l'alpha-globine est produite par deux gènes identiques, HBA1 et HBA2. Globalement, les thalassémies homozygotes sont des maladies graves ou mortelles alors que les hétérozygotes sont bien portants avec une anémie mineure. Une exception à cette règle arrive quand soit l'un des deux gènes HBA1 ou HBA2 est perturbé, mais pas les deux à la fois de telle manière qu'une certaine production de l'alpha-globine est possible. Ceci est connue comme alpha+- thalassémie et les alpha+-thalassémie homozygotes ont seulement des anémies modérées [38]. L'alpha-thalassémie et dans un degré mineur, la beta-thalassémie sont toutes deux protectrices contre l'infection palustre, bien que peu d'études supportent l'avantage sélectif des thalassémies comparée à d'autres polymorphismes du globule rouge.

Les thalassémies sont extrêmement fréquentes dans le bassin méditerranéen et marquées par une répartition géographique particulière. Elles déterminent le plus souvent l'anémie hypochrome, microcytaire, génétiquement déterminées sur le mode autosomal récessif. Des cas sporadiques peuvent s'observer dans toutes les ethnies. Les thalassémies sont la conséquence de mutations des gènes conduisant à un arrêt (α^0 ou β^0 - thalassémie) ou une réduction de synthèse (α^+ - ou β^+ -thalassémie) d'une chaîne de globine. L' α - thalassémie est répandue dans le bassin méditerranéen, en Afrique et dans le sud-est asiatique alors que la β -thalassémie est particulièrement fréquente dans le sud-est asiatique.

3.3.1.3.1. Beta-thalassémie

Dans la β -thalassémie hétérozygote, la diminution de synthèse de la chaîne β -globine entraîne une diminution de la quantité d'hémoglobine dans chaque hématie et explique la microcytose et l'hypochromie. La petite taille des hématies est compensée par l'augmentation de leur nombre. On observe alors une pseudo-polyglobulie sans anémie.

- **β^{wt}** représente l'allèle normal β -globine avec une production normale de chaîne.

- **β^+** dénote des mutations du gène β -globine qui diminue la production de la chaîne β -globine mais n'élimine pas entièrement sa production.

- **β^0** dénote des mutations du gène β -globine qui abolit complètement la production de la chaîne β -globine à partir de l'allèle affecté.

Les types d'hémoglobine retrouvés à l'électrophorèse dans la maladie de Cooley sont :

- HbA2, Hb adulte « mineure » ($\alpha_2\delta_2$) ;
- HbF, Hb foétale ($\alpha_2\gamma_2$).

Les individus hétérozygotes portent différentes mutations β^0 ou β^+ sur les deux allèles.

Beta (0) thalassémie – la β^0 -thalassémie réfère à plus de 40 mutations génétiques différentes du locus de la beta-globine lesquelles entraînent l'absence de la production de la beta-globine. Les patients homozygotes ou doubles hétérozygotes pour les gènes beta (0)-thalassémiques ne peuvent pas fabriquer les chaînes beta et ainsi, sont incapables de fabriquer l'hémoglobine A.

Beta (+)-thalassémie – la β^+ -thalassémie majeure est le terme appliqué aux patients qui n'ont soit aucune production effective (comme dans la beta (0) thalassémie) ou une production très limitée de la beta-globine. Ce sont des patients originellement décrits par Cooley (anémie de Cooley).

Commençant durant la première année de la vie, ces patients ont une anémie profonde et dépendante d'une transfusion sanguine tout au long de la vie, une hépato-splénomégalie et des déformations du squelette due à l'expansion de la moelle osseuse ; ils sont sujets à des infections et à des fractures et sans traitement approprié, meurent durant l'adolescence d'un syndrome hyperferritinémique.

Beta thalassémie mineure : la beta-thalassémie mineure, appelée aussi le trait de Beta-thalassémie, est le terme appliqué aux hétérozygotes qui ont hérités d'un seul gène conduisant à une production réduite de beta-globine. De tels patients sont asymptomatiques, peuvent avoir seulement une anémie mineure et sont généralement découverts quand l'hémogramme a été effectué pour autres raisons.

Beta-thalassémie intermédiaire : la Beta-thalassémie intermédiaire est le terme appliqué aux patients ayant une maladie de sévérité intermédiaire telle que ceux qui ont des composés hétérozygotes de deux variantes thalassémiques. De tels patients peuvent avoir des anomalies du squelette et de l'hépatosplénomégalie observée dans la thalassémie majeure. Cependant, leur concentration en hémoglobine va généralement de 5 à 10 mg/dl et ils ne nécessitent généralement des transfusions seulement que quand ils ont un événement intercurrent, telle qu'une infection, laquelle affaiblit l'érythropoïèse. Leurs symptômes cliniques peuvent ne pas être apparents jusqu'à bien après la première année de vie.

L'anémie dans la Beta-thalassémie est généralement causée par la présence de deux phénomènes inter-liés : la mort des globules rouges précurseurs à l'intérieur de la moelle osseuse (érythropoïèse inefficace, appelée aussi hémolyse intra médullaire) et la destruction élevée des globules rouges circulants (anémie hémolytique). Chacun de ces phénomènes peut être décrit séparément, bien qu'à la fois sont en fin de compte attribuable au déséquilibre de synthèse de la chaîne beta-globine.

Le potentiel de protection du trait de beta-thalassémie a été étudié dans le nord du Libéria [39, 40]. Il y avait une fréquence élevée de la thalassémie parallèlement à l'âge suggérant que les porteurs avaient un taux de survie élevé, bien que la prévalence de *P. falciparum* fût similaire chez les enfants normaux ou thalassémiques, ce dernier groupe avait une densité parasitaire faible. La croissance parasitaire diminuée et l'altération de la fonction des hématies parasitées peuvent expliquer le mécanisme de protection des sujets beta-thalassémiques [41].

TABLEAU II: Résumé des caractéristiques principales des beta-thalassémies [7]

Types	Génotypes	Phénotypes	Electrophorèse de l'hémoglobine
β -thalassémie mineure	Hétérozygote : β^+/β^{wt} , β^0/β^{wt}	Porteurs asymptotique, anémie modérée microcytique (Hb > 10 g/dL)	HbA2 élevée et HbF fréquente
β -thalassémie majeure	Composé hétérozygote : β^+/β^0 , β^+/β^+ (deux mutations β distinctes. Homozygote : β^0/β^0 , β^+/β^+ (deux mutations identiques)	Anémie sévère, dépendante de la transfusion (Hb < 7 g/dL)	HbA2 élevée, élévation prononcé d'HbF
β -thalassémie intermédiaire	Homozygote : β^+/β^+ composé hétérozygote : β^+/β^+ , β^+/β^0	Intermédiaire (Hb 7 – 10g/dL)	Variable

3.3.1.3.2. Alpha-thalassémie

Contrairement à la chaîne β dont la synthèse est déterminée par deux allèles β où on a deux cas de phénotypes (Homo et Hétérozygote), la synthèse de la chaîne α est déterminée par quatre allèles (deux sur chaque chromosome 16). Ainsi, nous avons quatre phénotypes cliniques :

- **α^+ -thalassémie hétérozygote** est caractérisée par une seule délétion c'est l' α -thalassémies 2 : asymptomatique (20 à 40% des noirs africains, et très répandue dans les régions méditerranéennes et en Asie) ;
- **α^+ -thalassémie homozygote** est caractérisée par 2 délétions en trans. Elle se présente sous la forme d'une thalassémie mineure, c'est l'alpha-thalassémie 1 : (2 à 4% des noirs africains) ;
- **α^0 -thalassémie hétérozygote** est caractérisée par 2 délétion en cis (3.7Kb) : elle se présente sous la forme d'une thalassémie mineure ;
- **α^0 -thalassémie homozygote** est caractérisée par 2 délétions en trans (3.7Kb).

Normal : sans délétion

Ces définitions sont utiles comme point de départ mais la classification des alpha-thalassémies peut être extrêmement complexe. Par exemple, deux formes générales de la maladie HbH ont été reconnue, la forme délétionnelle et la forme non-délétionnelle. Dans cette dernière, les patients héritent seulement un seul gène alpha-globine (par exemple, (α^-)). Dans la forme non-délétionnelle, le patient a hérité deux gènes alpha-globine d'un seul parent (par exemple, $(\alpha\alpha^*)^-$, ou * représente la chaîne alpha mutée). La maladie HbH tend à être plus sévère chez les patients avec la forme non délétionnelle, due, au moins, à l'interférence avec la transcription de la chaîne alpha du gène par l'anormale.

Un autre exemple de la complexité potentielle de ces désordres, les individus peuvent avoir des combinaisons des mutations de gène alpha et beta-globine de

diverse nature et sévérité (par exemple, les combinaisons ou variants d' α^0 à partir d'un parent et α^+ de l'autre avec une ou plusieurs anomalies de la chaîne beta).

L'alpha-thalassémie a suscité plusieurs études à partir de l'observation de sa distribution géographique qui est en parallèle avec celle de l'endémicité du paludisme, tendant à vérifier l'hypothèse qu'elle est impliquée dans la protection contre la forme sévère du paludisme. Bien que l'évidence de la génétique des populations soit patente, c'est récemment que l'évidence directe que les thalassémies protègent contre le paludisme a émergé et elles ne sont pas absolument toujours claires.

Ainsi, une étude menée en Papouasie (Nouvelle Guinée) où l' α^+ -thalassémie touche 90% de la population a démontré l'effet protecteur de l' α^+ -thalassémie à l'état homozygote [42]. D'autres études ont démontré que le risque relatif de paludisme sévère était significativement réduit à la fois chez les personnes hétérozygotes et homozygotes [43, 44] des résultats similaires ont été observés pour d'autres infections que le paludisme [42]. Une autre étude effectuée sur les enfants au Kenya a démontré que les personnes hétérozygotes et homozygotes étaient tous protecteurs contre le paludisme sévère [45]. Par contre, dans d'autres études, seules les personnes hétérozygotes étaient protégées [46].

Le mécanisme de protection des thalassémies n'est pas bien élucidé. Les études en cytométrie de flux *in-vitro* ont démontré que les érythrocytes ayant le phénotype α^+ -thalassémie présentaient une réduction de la croissance des parasites et une augmentation de leur adhésion aux anticorps. L'augmentation de la clairance des cellules infectées est une autre possibilité, mais il est difficile de la tester *in-vivo*. Cependant, d'autres explications plus complexes sont aussi possibles [47].

Il a été proposé que dans les thalassémies (c'est-à-dire l'alpha- et la bêta-thalassémies, HbE et Hb Constant Spring) la souffrance oxydante est un facteur prééminent dans les érythrocytes parasités thalassémiques et contribue à la protection contre le paludisme sévère [48]. Les hématies infectées sont sous un challenge substantiel oxydant [49],

un effet qui peut augmenter la libération d'anion super-oxydes par les cellules T-effectrices après adhésion aux hématies infectées [50]. De plus, la membrane des hématies thalassémiques subit un dommage oxydatif initié par l'adhésion des excès de chaînes globines, principalement les formes hémichromes. La combinaison de la souffrance intra-thalassémique intrinsèque et l'effet de l'infection palustre produit une hématie ayant une viabilité faible. Ces changements permettent la destruction préférentielle et l'élimination des hématies thalassémiques infectées.

TABLEAU III: Résumé des caractéristiques principales des alpha-thalassémies [7]

Types	Default génétique	Phénotype	Electrophorèse de l'Hb
Porteur silencieux d' α -thalassémie (α^+ -thalassémie)	Suppression d'un seul gène α ($-\alpha/\alpha$)	Asymptomatique ; aucune anomalie hémolytique	Normale
α^0 -thalassémie mineure (α^+ -thalassémie)	Suppression de deux gènes α en trans ($-\alpha/-\alpha$)	Asymptomatique : érythrocytes, microcytose, hypochromie mineure à modérée	Normale
Maladie HbH	Suppression de trois gènes α	Anémie microcytique, anémie sévère épisodique	Hb Bart (γ_4) Hb(H)
Hémoglobine Bart (Hydrops fetalis*)	Suppression de quatre gènes α	Hydrops fetalis	HbH, Hb Bart

*une condition dans laquelle le fœtus ou le nouveau-né accumule des fluides, entraînant des bras et des jambes ballonnés et des difficultés respiratoires.

3.3.2. Déficit en G6PD

Le glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) est une enzyme présente dans le cytoplasme de toutes les cellules de l'organisme. Il est impliqué dans la première étape de la voie métabolique des pentoses phosphates, produisant ainsi le NADPH (coenzyme nécessaire à la réduction du glutathion oxydé). Pour le globule rouge qui manque de noyau, de mitochondrie et d'autres organites, l'enzyme G6PD est particulièrement importante. La protéine G6PD a un poids moléculaire de 59 kDa et chaque unité est composée de 515 acides aminés [51]. Le gène de la G6PD chez l'homme est situé dans la région télomérique du bras long du chromosome X sur la partie q28 [52, 53]. Ce gène se compose de 13 exons et atteint approximativement 18 kb [54].

L'enzyme de référence est dénommée G6PD (B⁺) dont l'activité enzymatique est de 100% avec une fréquence de 60-80% dans la population. Le variant (A⁺) a une fréquence de 15-40% avec une activité enzymatique de 80%. Elle diffère de la forme B⁺ par un nucléotide en position 376 de la séquence nucléotidique (l'adénine est remplacée par la guanine). Cette mutation n'a pas de conséquence clinique et ne confère pas de résistance au paludisme [55]. Le variant (A⁻) rencontré dans la population noire notamment en Afrique sub-saharienne, atteint typiquement des fréquences de près de 25% dans les populations vivant en zones d'endémie palustre. Ce variant a une activité enzymatique de 12% [56] et a été décrit comme un facteur de réduction du risque de paludisme grave pour les femmes G6PD hétérozygotes et les hommes G6PD Hémizygotés [57].

L'allèle (A⁻) diffère de (A⁺) par un nucléotide en position 202 (la guanine est remplacée par l'adénine) [58] et la conséquence de cette mutation se traduit:

- sur le plan du métabolisme cellulaire, par une accumulation des ions peroxydes (H₂O₂) entraînant la mort des cellules,
- sur le plan clinique, par une anémie hémolytique,
- sur le plan biochimique, par un déficit de l'activité enzymatique de la G6PD.

Ce déficit en G6PD est plus marqué chez les hommes que chez les femmes qui ont deux chromosomes X par conséquent deux copies de G6PD. Chez l'homme où il y a un seul chromosome X, un gène défectueux de G6PD est suffisant pour causer le déficit en G6PD. Le déficit en G6PD est retrouvé dans les régions tropicales et subtropicales du monde. Les plus grandes fréquences du déficit en G6PD ont été observées chez les populations Juive et Kurde 62% [59]. Ce déficit est retrouvé chez 5-30% de la population africaine, au Moyen-Orient et en Asie du Sud-est. Il est, par contre, rare dans la population blanche d'origine nord-européenne et au Japon où il n'est observé que parmi 0,1% des personnes [57].

3.3.3. Groupes sanguins ABO

L'expression des antigènes glucidiques du système du groupe sanguin ABO à la surface des globules rouges a été décrite pour la première fois par Karl Landsteiner en 1900 [60] et représentait une étape importante pour le développement d'une transfusion sanguine sans risque [61]. Plus tard, en 1941, Hartmann démontrait que l'expression des antigènes ABO n'était pas confinée aux hématies, lesquelles conduisaient au nom plus précis d'antigènes du groupe histo-sanguin [62]. La base moléculaire du système de groupe sanguin ABO a été élucidée en 1990 [63]. Le système a été décrit pour la première fois avec trois antigènes, six génotypes et quatre phénotypes, mais est démontré maintenant comme étant hautement polymorphique [61, 64]. Le système ABO est défini selon :

- la présence ou non d'antigènes A ou B à la surface des globules rouges. Ainsi, les globules rouges du groupe sanguin A possèdent l'antigène A, ceux du groupe B l'antigène B, ceux du groupe AB les antigènes A et B alors que ceux du groupe O ne contiennent ni l'antigène A ni l'antigène B.

- La présence ou non d'anticorps anti-A ou anti-B dans le sérum. La présence d'un antigène dans un organisme implique l'absence de son anticorps spécifique dans cet organisme (sous peine de formation d'un complexe anticorps-antigène).

La recherche des antigènes définit l'épreuve de Beth-Vincent alors que celle des anticorps définit l'épreuve de Simonin-Michon et sont obligatoires et doivent être concordantes pour établir un groupe sanguin ABO. Une exception, toutefois, chez le nouveau-né de moins de six mois dont les anticorps ne sont pas bien développés, et chez lequel ne sont donnés que des résultats non définitifs.

Beaucoup d'études de ces dernières années ont exploré la relation entre le paludisme et le groupe sanguin AB [65-73] ou la préférence de repas des anophèles vecteurs [74]. Les études effectuées sur la relation entre le groupe sanguin ABO et le paludisme ont suggéré que le groupe O peut avoir un avantage de survie dans le cas du paludisme sévère. Le mécanisme par lequel le groupe O a un avantage sur le groupe A par rapport au paludisme met en avant l'hypothèse de la cytoadhérence et le phénomène de rosetting [75-77].

3.4. Prévention et traitement du paludisme

La prévention du paludisme consiste en différentes mesures qui peuvent protéger soit contre l'infection, soit contre le développement de la maladie chez les personnes infectées. Les mesures qui protègent contre l'infection visent le vecteur de la maladie, à savoir l'anophèle. Celles-ci peuvent être des mesures de protection personnelle (individuelles ou familiales): vêtements de protection, insectifuges, traitement intradomiciliaire des habitations en utilisant des insecticides à effet rémanent, ou des mesures de protection de la collectivité ou population: gestion environnementale en vue de limiter la transmission. Ainsi, la chimioprophylaxie doit être limitée aux seules femmes enceintes en zone endémique et aux voyageurs venant d'une zone impaludée. Pour le traitement, l'utilisation des Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine CTA est recommandée par l'OMS depuis 2004. En cas de paludisme grave, le traitement se fera par les sels de quinine en perfusion intraveineuse ou par les dérivés de l'artémisinine.

Les options thérapeutiques actuellement recommandées par l'OMS sont les suivantes :

- **artéméther-luméfantrine** (Coartem[®], dans tous les pays du monde),
- **artésunate plus amodiaquine** (ASAQ[®], dans les zones où le taux de succès thérapeutique de l'amodiaquine en monothérapie est supérieur à 80%),

- **artésunate plus sulfadoxine-pyriméthamine** (Artecon[®], dans les zones où le taux de succès thérapeutique de la SP en monothérapie est supérieur à 80%).

Au Mali, l'association sulfadoxine-pyriméthamine (SP) est actuellement préconisée pour le traitement intermittent préventif chez les femmes enceintes.

- **artésunate plus méfloquine** (données de toxicité insuffisantes pour recommander son utilisation en Afrique) qui est contre-indiquée en cas d'épilepsie.

L'association amodiaquine plus sulfadoxine-pyriméthamine est une option intérimaire réservée aux pays qui, pour quelque raison que ce soit, sont dans l'impossibilité d'adopter les CTA immédiatement et dans les zones où l'amodiaquine et la SP restent très efficaces.

3.5. Vaccins antipalustres

Depuis l'avènement de la biologie moléculaire et les techniques de génie génétique, plusieurs scientifiques se sont intéressés à la recherche du vaccin pouvant immuniser l'homme contre l'infection palustre [78, 79]. Cette volonté est rendue difficile par la complexité du génome parasitaire et la mauvaise compréhension du mécanisme naturelle de l'immunité antiparasitaire protectrice [80, 81]. En matière de paludisme, le vaccin peut être de trois types [82-85].

- **les vaccins anti-sporozoïtes** sont conçus pour prévenir l'infection. Ces vaccins sont conçus pour stopper le cycle de vie du parasite à partir de la progression des sporozoïtes ou des stades hépatiques.

- **les vaccins contre les stades sanguins asexués** visent à atténuer les manifestations graves et compliquées de la maladie. Ces vaccins pourraient permettre de réduire la morbidité et la mortalité du paludisme.

- **les vaccins qui agissent en bloquant la transmission** conçus pour arrêter le développement du parasite chez le moustique et pour réduire ainsi ou arrêter la transmission de la maladie.

Ainsi, des candidats vaccinaux ont été proposés à travers des études immunogénétiques sur le génome humain et parasitaire. Le plus connu et le plus

avancé est le RTS,S/AS02A, développé par les laboratoires « *GlaxoSmithKline Biologicals* » et le « *Walter Reed Army Institute of Research* » des États-Unis d'Amérique.

4. Matériel et Méthodes

4.1. Cadre d'étude

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche sur la résistance innée et acquise du paludisme au Mali. Ce projet est une collaboration entre le centre de recherche et de formation sur le paludisme ou « *Malaria Research and Training Center* » (MRTC) de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie (FMPOS) et le Laboratoire de Recherche sur le Paludisme et les Vecteurs de l'Institut National d'Allergie et de Maladies Infectieuses des Instituts Nationaux de Santé des États-Unis d'Amérique (LMVR/NIAID/NIH). Elle s'est déroulée dans les villages de Kéniéroba, Bozokin et Fourda dans la commune rurale de Bancoumana, arrondissement de Siby, cercle de Kati, région de Koulikoro, Mali (figure 3 et 4).

- Village de Kéniéroba

Situé à 70 Km au sud-ouest de Bamako sur la route de Kangaba. Refondé il y a plus de cent ans après son premier déclin par Mare Famissa KEITA, qui fut réunir ses frères dispersés, dans la terre de leur ancêtre Kéniéroba. Il compte 2079 habitants (recensement MRTC/FMPOS, en 2008) composé essentiellement de Malinké, de Peulh et de Bambara.

- Village de Fourda

C'est un hameau de pêche situé à 3Km au sud-ouest de Kéniéroba. Il fut fondé par les frères SOGORE dans le but de faire la pêche. Il s'agit de Kalifa ; de Sinimba, de Fodé, de Mamady et de Drissa. Fourda compte 269 habitants (recensement MRTC/FMPOS, en 2008) dont la majorité est Somono (Malinké) en plus de quelques Bambaras et Peuhls.

Kéniéroba et Fourda partagent une même école fondamentale, une medersa et un centre communautaire de santé où est basée notre équipe de recherche.

- Village de Bozokin

C'est un hameau de pêche du village de Bancoumana situé à 7 Km au sud-est. Il a été fondé par Soungalo TRAORE. Il est essentiellement habité de Bozo (Konta) convertis en Konaté par le langage mandingue. Il compte 247 habitants (recensement MRTC/FMPOS, en 2008). Les Malinkés constituent le groupe ethnique majoritaire, suivi par les Peuhl et les Dogon. Le village utilise le centre de santé communautaire et l'école fondamentale de Bancoumana.

Ces trois villages se situent dans une zone climatique soudano-guinéenne (figure 3 et figure 4). Deux grandes saisons se succèdent dans cette zone : la saison des pluies de juin à octobre et la saison sèche de novembre à mai avec une courte saison de transition que les communautés rurales désignent sous l'appellation vernaculaire de *fôbônda*. Elle est représentée par un adoucissement voire un rafraîchissement des températures par l'arrivée des côtes atlantiques de l'harmattan. Elle s'étale de novembre à janvier.

L'habitat est de type traditionnel. Il est constitué de cases rondes et rectangulaires, en terre battue, aux toitures en chaumes coniques. Quelques maisons ont des toits en tôle. Ces différents types de maisons encourageant le repos des moustiques, favorisent une densité et une agressivité anophélienne élevées. L'environnement physique des villages est propice à la transmission du paludisme. Les villages sont situés dans une grande plaine qui s'étend jusqu'au fleuve Niger. La plaine présente de nombreuses retenues d'eau pendant la saison des pluies. C'est une plaine de riziculture. Les retenues d'eau avec des crevasses naturelles du sol peuvent être des gîtes larvaires potentiels. Pendant la saison des pluies, il existe des cultures intra domiciliaires et une prolifération d'herbes sauvages dans le village, contribuant ainsi à augmenter l'agressivité des moustiques.

La température la plus élevée se situe à 40°C au mois de mai et la plus basse est voisine de 18°C au mois de décembre- janvier. La température moyenne annuelle est autour de 23°C.

D'une manière générale le climat y est assez agréable et la végétation est luxuriante.

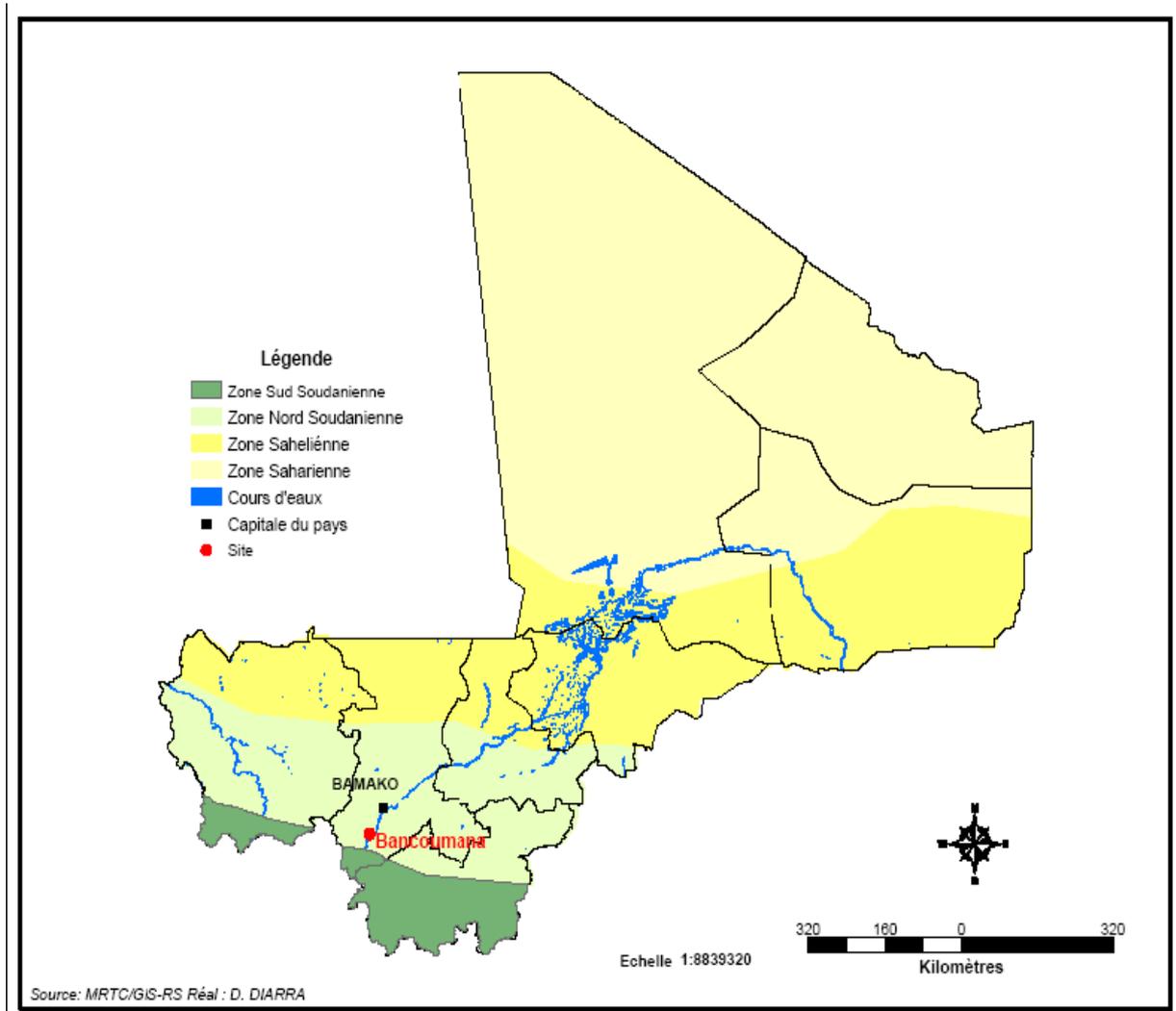


Figure 3: Situation schématique des villages d'étude au Mali

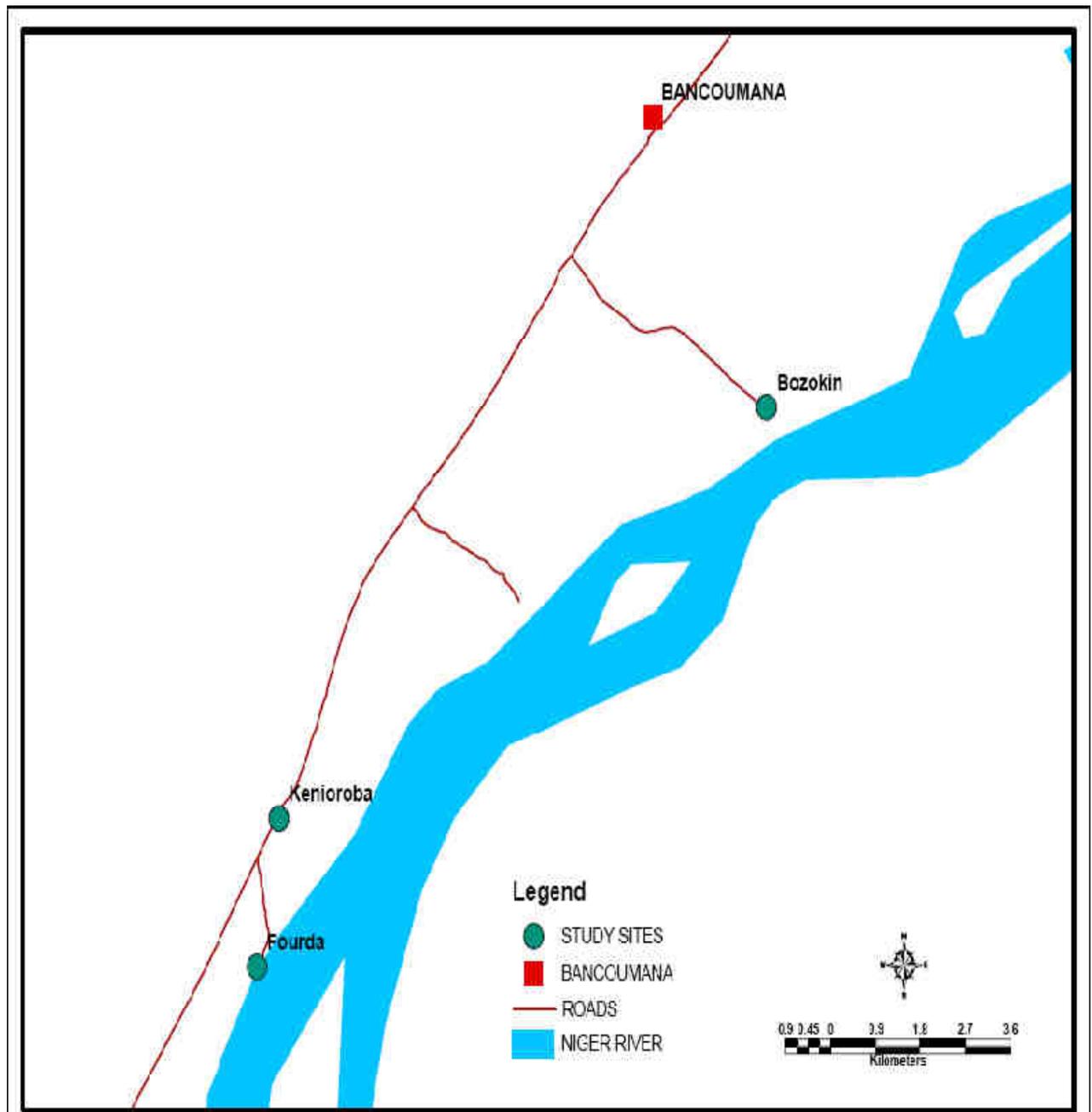


Figure 4: Plan de masse des trois villages d'étude dans la commune rurale de Bancoumana (Source : Unité GIS MRTC/FMPOS)

4.1.1. Situation géographique, climat et végétation

Située à 60 Km de Bamako (la capitale Malienne) en zone soudano-guinéenne, la commune rurale de Bancoumana est facilement accessible par la route nationale 15 (RN 15) Bamako –Kangaba. Elle est limitée au Nord par la commune rurale de Siby, au nord-est par la commune rurale du Mandé, au Sud et au Sud-ouest par la commune rurale de Minindian, au Sud-est par les communes rurales de Niagadina et Kourouba (toutes situées sur la rive droite du fleuve Niger).

La principale formation végétale est une savane arborée (25% du terroir) avec quelques galeries forestières le long du fleuve Niger. On y distingue :

- (i) une strate arborée avec les espèces telles que *Bombax costatum* (kapokier), *Vitellaria paradoxa* C.F. Gaertn. (Karité), *Parkia biglobosa* Jacq. (Néré), *Tamarindus indica* L. (tamarinier), *Mangifera indica* L. (manguier);
- (ii) une strate arbustive composée de *Combretum micranthum* G. Don (*kinkéliba*); *Guiera senegalensis* JF.Gmel (*kundiè* en bambara), *Cassia sieberiana* DC (case de sieber, sindja (Pular));
- (iii) une strate herbacée ou savane de graminées dont *Cymbopogon giganteus* (*Tièkala*), *Pennisetum pedicellatum* Trin et *Andropogon sp* ; et
- (iv) une galerie forestière caractéristique de la savane guinéenne se forme le long du fleuve Niger.

Le réseau hydrographique est dominé par le fleuve Niger.

La couverture végétale originale rencontrée sous un climat soudano-guinéen marque la transition entre la savane arborée et la forêt claire guinéenne. Ce type de végétation existe encore à l'état délictuel au niveau des bois sacrés et le long du fleuve Niger. Les feux de brousse, l'exploitation du bois de chauffage, les défrichements nécessaires aux cultures ont profondément dégradé cette végétation, devenant propice à l'implantation des moustiques.

La faune entomologique est constituée d'invertébrés et d'arthropodes. *Anopheles gambiae* s1 et *A.funestus* abondent dans les villages où ils assurent la transmission du paludisme et de la filariose de Bancroft surtout en saison des pluies.

Les simulies transmettent l'onchocercose durant l'hivernage tandis que les glossines (mouche tsé-tsé) transmettent la maladie du sommeil. *Anopheles gambiae* est le vecteur majeur du paludisme rencontré dans la zone d'étude.

4.1.2. Infrastructures socio-sanitaires

La commune dispose :

- dans le domaine de l'éducation :

- Dix écoles publiques dont 4 seconds cycles
- Trois écoles communautaires
- Sept medersas communautaires
- Dix Huit centres d'alphabétisation.

- dans le domaine de la santé :

- Quatre dispensaires (Kéniéroba, Djiguidala, Ouoronina et Niamé)
- Cinq maternités
- Huit dépôts pharmaceutiques
- Un CSCOM à Bancoumana
- Une pharmacie (officine privée)

4.1.3. Activités socio-économiques et culturelles

Les activités socio-économiques dominantes dans la commune rurale de Bancoumana sont marquées par l'agriculture, l'élevage, la pêche, l'artisanat, le commerce et la cueillette.

L'agriculture constitue la principale activité économique des populations. La plaine de Bancoumana est propice aux cultures vivrières et industrielles. Aux abords du village, dans les retenues d'eau (deux digues), la culture du riz (*Oryza sativa* L., *O. glaberrima* S.) est très développée. Celle du sorgho (*Sorghum vulgare* J.), du mil (*Pennisetum typhoides* Stapf. & Hubb), du maïs (*Zea mays* L.), du haricot (*Vigna unguiculata* L.), du papayer (*Carica papaya* L.), de l'orange (*Citrus sinensis* L.) et du citron (*Citrus limonum* RISSO.) a lieu surtout dans les alentours des concessions ou dans des jardins.

La culture du dah (*Hibiscus sabdariffa* L.), du coton (*Gossypium barbadense* L.), de l'arachide (*Arachis hypogae* L.), de la courge (*Cucurbita pepo* L.), du melon (*Cucurmis melo* L.), de concombre (*Cucumis sativus* L.) de l'oignon (*Allium cepa* L.), de la patate douce (*Ipomoea batatas* L.), de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.), du piment (*Pimenta officinalis* Lindl.), de la poivre de guinée (*Capsicum annum* L.), du tabac (*Nicotiana tabaccum* L.), du sésame (*Sesamum indicum* L.), de la tomate (*Solanum lycopersicum* L.), de la banane (*Musa paradisiaca* L.) ainsi que d'autres produits maraîchers constituent d'importantes ressources de revenu pour la population. La taille des exploitations est très variable et dépend de la capacité de travail potentielle de la famille ainsi que du patrimoine foncier.

L'élevage des ovins, des caprins et des bovins y est pratiqué comme une activité économique secondaire. On y retrouve aussi quelques équidés (ânes et chevaux) utilisés comme animaux de trait. La plupart des villageois thésaurisent leurs revenus dans l'élevage et dans les cultures industrielles. La pêche est également pratiquée par les ethnies Bozo et Somono principalement dans les villages de Fourda et de Bozokin. L'artisanat local est peu développé (cordonnerie, forgerie, maçonnerie, poterie).

En dehors de la commercialisation des produits agricoles ; le commerce des produits de consommation courante y est pratiquée. Une foire hebdomadaire a lieu à Kéniéroba chaque jeudi favorisant ainsi le phénomène d'automédication par la circulation facile des médicaments.

L'islam représente la religion la plus dominante avec 95% de sujets qui s'en déclarent. Cependant, les religions traditionnelles y sont également.

4.2. Type d'étude

Il s'agit d'une étude épidémiologique de cohorte. Le suivi a été effectué durant deux saisons de transmission de juin 2008 à janvier 2009 et de juin 2009 à janvier 2010.

4.3. Population d'étude et échantillonnage

La population d'étude était constituée par l'ensemble des sujets âgés de 6 mois à 17 ans résidants dans les villages de Kéniéroba, Bozokin et Fourda dont le consentement libre et éclairé des parents ou tuteurs a été obtenu. Nous avons fait un échantillonnage exhaustif de l'ensemble des enfants vivants et consentant dans les trois villages.

4.4. Critères d'inclusion et de non inclusion

4.4.1. Critères d'inclusion

Tous les sujets répondant aux critères suivants étaient inclus dans l'étude :

- résider dans l'un des trois villages : Kéniéroba, Fourda ou Bozokin
- accepter volontairement de participer à l'étude comme attesté par le consentement libre et éclairé obtenu des parents ou des tuteurs de l'enfant, et avoir la volonté d'amener l'enfant au dispensaire s'il développe la fièvre ou autre symptômes du paludisme,
- être âgé de 6 mois à 17 ans.

4.4.2. Critères de non inclusion

N'ont pas été inclus dans l'étude tous les sujets ne répondant pas aux critères d'inclusion entre autres :

- résider hors des villages de Kéniéroba, Bozokin ou Fourba
- être âgé de moins de 6 mois ou de plus de 17ans,
- refuser volontairement de participer à l'étude,
- toute condition qui selon l'opinion de l'investigateur pourrait rendre le patient incapable de suivre le protocole (par exemple, maladie psychiatrique)
- toute condition qui selon l'opinion de l'investigateur pourrait être un facteur confondant dans l'analyse des données ou poser un risque d'exposition inutile au personnel de l'étude (par exemple, un sujet connu séropositif au VIH ou connu malade du SIDA)

4.5. Méthodes de collecte des données

Les données ont été enregistrées sur des fichiers standards de rapport de cas (CRF). Elles ont été saisies sur Microsoft Excel 2007.

4.6. Variables déterminées et mesurées

- **les Variables sociodémographiques suivantes ont été déterminées :**
L'âge, le sexe, et la résidence
- **les Variables biologiques suivantes ont été mesurées :** il s'agissait du type d'hémoglobine, de l'alpha-thalassémie, du groupe sanguin ABO et du déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD).

4.7. Examens de laboratoire utilisés

Chaque enfant inclus a fait l'objet d'un prélèvement sanguin capillaire (de 250µl au bout du doigt) sur confettis et dans des cryotubes sans anticoagulant. Sur ces prélèvements, nous avons effectué les analyses suivantes (décrites en détails en annexe) portant sur :

- la détermination du type d'hémoglobine par l'appareil D-10 de Bio-Rad dont le principe est basé sur la chromatographie liquide de haute performance (cf. annexe, [86]), a été effectuée sur les gouttes de sang recueillies dans les cryotubes ;
- la détection de la suppression de 3,7kb d'alpha-thalassémie a été faite en utilisant la réaction de polymérisation en chaîne nichée (nested-PCR) afin d'identifier les enfants alpha+ thalassémie hétérozygotes (-α/α) et alpha+thalassémie homozygotes (-α/-α ; cf. annexe ; [87]). Elle a été effectuée sur les confettis;
- le déficit en G6PD a été identifié en utilisant l'analyse du polymorphisme de restriction basé sur la longueur des fragments sur les produits d'ADN amplifiés par PCR [5]. Sa détection a été effectuée sur les confettis;
- le groupe sanguin ABO a été déterminé par le test d'agglutination en utilisant des kits commerciaux à base d'anticorps monoclonaux (*Linear Chemicals*) ; cf. annexe ; [88].
- La goutte épaisse et le frottis mince colorés au Giemsa.

- La détermination du groupe sanguin ABO, la goutte épaisse, le frottis mince et l'examen clinique ont été faits au centre de santé de Kéniéroba. Tous les autres paramètres ont été déterminés au laboratoire Immunogénétique/Hémoglobinopathie et parasitologie du MRTC à Bamako.

4.8. Considérations éthiques et déontologiques

Le protocole de recherche a été soumis à l'approbation du comité d'éthique institutionnel de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie de l'Université de Bamako ainsi qu'aux Instituts Nationaux de Santé des Etats-Unis d'Amérique. Nous avons également travaillé selon les bonnes pratiques de recherche clinique sur l'homme et selon les bonnes pratiques de laboratoire telles qu'énoncés dans les conventions internationales (déclaration d'Helsinki, Conférence internationale d'harmonisation des bonnes pratiques de recherche biomédicale).

Sur le terrain, la communauté (autorités administratives, coutumières et les associations féminines et de jeunes) a été informée de tous les aspects de l'étude. Une restitution des résultats est prévue à la clôture de l'étude.

4.8.1. Risques et effets secondaires potentiels.

4.8.1.1. Effets secondaires des prélèvements sanguins

Le protocole soumis aux comités d'éthique a été rigoureusement appliqué par un personnel médical et paramédical qualifié et professionnel. L'équipe de recherche a respecté les lignes directrices concernant les bonnes pratiques en matière de recherche biomédicale (bonnes pratiques cliniques et bonnes pratiques de laboratoire). Afin de prévenir toute contamination induite par les instruments souillés de sang, chaque prélèvement sanguin a été effectué à l'aide d'un matériel stérile à usage unique, le port de gants à usage unique et nous avons nettoyé le doigt de l'enfant avec de l'alcool à 70% avant de faire le prélèvement sanguin. Chaque fois qu'un gant était souillé, il était remplacé immédiatement.

4.8.1.2. Rapport risques-bénéfices

Le rapport entre le risque et le bénéfice a favorisé la participation dans cette étude. Le risque relatif a été l'inconfort occasionné par le prélèvement capillaire et la perte de temps lors des différents rendez-vous.

Le grand bénéfice a été le traitement médical gratuit, le suivi clinique durant l'étude et la proximité d'un service médical permanent dont la population ne bénéficiait pas auparavant. En plus, le besoin de développer de nouvelles stratégies pour diagnostiquer et/ou retarder la chimiorésistance est une urgence au Mali et en Afrique sub-saharienne. Tout le matériel utilisé pour le traitement et les prélèvements (seringues, vaccino-styles, gants, lames, etc.) ont été mis à l'abri des enfants et incinéré à Bancoumana évitant ainsi tout usage du matériel souillé par les enfants.

4.8.2. Compensation

Les modalités de compensation ont été discutées avec les villageois. Il leur a été notifié qu'un volontaire du protocole ne pourra pas recevoir directement de l'argent liquide pour sa participation libre et éclairée au protocole. Un autre aspect du bénéfice a été la prise en charge par le projet de tous les cas de paludisme simple et compliqué. Les autres pathologies des volontaires de l'étude ont été également prises en charge par le projet. Le centre de santé de Kéniéroba a reçu une compensation pour les pertes de recettes occasionnées par la prise en charge des enfants du protocole.

4.8.3. Diffusion des résultats

A la fin de chaque saison de transmission du paludisme, nous avons présenté l'état de l'étude aux villageois et aux bailleurs (notamment les Instituts Nationaux de Santé des USA, NIH) et au comité d'éthique de la FMPOS. A la fin de l'étude, un rapport sera présenté aux NIH par les investigateurs. Suite à la validation par les investigateurs de l'ensemble des résultats de cette étude, les éléments clés des résultats seront documentés et remis aux dirigeants de la communauté de Kéniéroba et de Bancoumana et au Programme National de Lutte contre le Paludisme du Mali.

Les résultats de cette étude seront présentés au cours des réunions scientifiques nationales et internationales, et seront publiés dans des revues scientifiques. Cependant, l'équipe de recherche garantit la confidentialité des informations recueillies sur les volontaires qui ne seront pas accessibles en dehors des investigateurs de l'étude.

4.9. Gestion et analyse des données

Les données ont été collectées sur le terrain dans les trois villages au moyen d'un questionnaire individuel standardisé, élaboré conformément aux objectifs de l'étude. Les dossiers individuels ont été classés dans des chemises individuelles en plastique et gardés dans une cantine métallique sous la responsabilité du chef d'équipe. Les fiches individuelles d'enquête, les lames porte-objets, les confettis portaient le même numéro pour chaque enfant malade à travers lequel il a été identifié. Nous avons enregistré chaque cas de paludisme prouvé par l'examen clinique et une goutte épaisse positive. Les lames préparées ont été rangées par ordre dans des boîtes d'arrangement. Les confettis ont été placés dans des enveloppes individuelles portant également le même numéro que les lames et gardés dans une cantine métallique.

Les fiches d'enquête individuelle et les différents prélèvements sanguins ont été systématiquement vérifiés sur le terrain à la fin de la journée et complétés au besoin, rangées par ordre dans des chemises cartonnées et stockées dans une cantine métallique.

Les données ont été saisies doublement, nettoyées sur micro-ordinateur à l'aide du logiciel Microsoft Excel et analysées avec le logiciel SPSS version 12.0 et EPI-INFO version 6. Les graphiques ont été réalisés sur MS Excel 2007, MS Word 2007. Le test de Chi carré et l'analyse de variance avec un seuil de signification fixé à 5% ont été utilisés pour vérifier les hypothèses de recherche ainsi que le lien entre les variables croisées. Nous avons utilisé le test de probabilité exacte de Fisher lorsque les conditions d'application du Chi carré normal n'ont pas été remplies c'est-à-dire une valeur attendue inférieure à 5.

5. Résultats

5.1. Résultats globaux

Au total, 1474 enfants âgés de 6 mois à 17 ans ont été inclus dont 42,9% avaient moins de 6 ans. Le sexe ratio était de 0,99 en faveur du sexe féminin. La population d'étude était similaire à Bozokin et à Fourda (176 pour chaque village) alors qu'elle était constituée de 1122 enfants provenant de Kéniéroba.

La proportion de l'hémoglobine S était plus élevée (14,4%) comparée à celle de l'hémoglobine C (6,6%). La prévalence globale du paludisme était de 67%. Elle était de 60,8% chez les sujets AS et 69,1% chez les sujets AC. L'épisode palustre moyen était respectivement de 1,67 et 1,91 pour l'HbAS et l'HBAC.

La proportion globale d'alpha-thalassémie était de 28,6% dont 26,2% à l'état hétérozygote et 2,4% à l'état homozygote. Une proportion de 71,4% des homozygotes avaient fait le paludisme avec une moyenne de 2,03 épisodes palustres. Par contre, 68,4% des sujets hétérozygotes d'alpha-thalassémiques avaient fait le paludisme avec un nombre moyen de 2,16 épisodes.

Le déficit en G6PD a été retrouvé chez 15% des enfants dont 0,9% et 9,2% de filles homo- et hétérozygotes. Les garçons Hémizygotés représentaient 4,9%. Les 69,9% des filles G6PD hétérozygotes avaient fait le paludisme avec en moyenne 2,35 épisodes palustres tandis que 53,8% des filles homozygotes avaient fait le paludisme. De même, 62,5% des garçons Hémizygotés avaient fait le paludisme et avec un nombre moyen de 1,9 épisode palustre.

Parmi nos enfants d'étude, 40,1% étaient du groupe sanguin O et 7,8% du groupe sanguin AB. Dans le groupe sanguin O, 67,5% des sujets avaient fait le paludisme tandis que 66,1% des sujets AB avaient fait le paludisme. Les épisodes palustres moyens étaient respectivement 2,01 et 1,94.

5.2. Caractéristiques sociodémographiques

TABLEAU IV: Répartition des sujets en fonction du lieu de résidence

Village	Effectif	Proportion en %
Bozokin	176	11,9
Fourda	176	11,9
Kéniéroba	1122	76,2
TOTAL	1474	100

La majorité des sujets participant à notre étude résidait à Kéniéroba (76,2%). Par contre, Fourda et Bozokin avaient les mêmes proportions (11,9%).

TABLEAU V: Répartition des sujets selon le sexe

Sexe	village			Total n (%)
	Bozokin n (%)	Fourda n (%)	Kéniéroba n (%)	
Féminin	82 (46,6)	77 (43,8)	580(51,7)	739 (50,1)
Masculin	94 (53,4)	99 (56,2)	542 (48,3)	735 (49,9)
Total n (%)	176 (100)	176 (100)	1122 (100)	1474 (100)

Dans l'ensemble, il n'y a pas de différence entre le sexe masculin et féminin avec un sexe ratio de 1,005 en faveur du sexe féminin.

TABLEAU VI: Répartition des enfants inclus selon les classes d'âge

Classe d'âge	Effectif	Proportion en %
0-5 ans	633	42,9
6-10 ans	400	27,1
11-17 ans	441	30,0
Total	1474	100

Les enfants âgés de 6 mois à 5 ans étaient majoritaires avec 42,9% tandis que les 6-10 ans étaient minoritaires avec 27,1%.

5.3. Résultats analytiques

Les personnes porteuses des hémoglobines CC, SC, SS et ceux dont le type de polymorphisme n'avaient pas été déterminé n'ont pas été pris en compte pendant l'analyse à cause de leurs proportions trop faibles.

TABLEAU VII: Répartition de la population d'étude en fonction du type d'hémoglobine et de la résidence.

village	Type d'hémoglobine			Total n (%)
	AA n (%)	AC n (%)	AS n (%)	
BOZOKIN	145 (82,4)	4 (2,3)	27 (15,3)	176 (100)
FOURDA	153 (86,9)	6 (3,4)	17 (9,7)	176 (100)
KENIEROBA	867 (77,3)	87 (7,7)	168 (15,0)	1122 (100)
TOTAL	1165 (79,0)	97 (6,6)	212 (14,4)	1474 (100)

L'hémoglobine S et l'hémoglobine C ont été retrouvées dans la population d'étude avec 14,4% et 6,6% des sujets, respectivement. La fréquence de l' HbAS était plus élevée que celle de HbAC quel que soit la résidence (p=0,03).

TABLEAU VIII: Répartition de la population d'étude en fonction du génotype alpha-thalassémique et de la résidence.

Village	Génotype alpha-thalassémique			Total n (%)
	Normal n (%)	Hétérozygote n (%)	Homozygote n (%)	
Bozokin	123 (69,9)	43 (24,4)	10 (5,7)	176 (100)
Fourda	116 (65,9)	57 (32,4)	3 (1,7)	176 (100)
Kéniéroba	814 (72,5)	286 (25,5)	22 (2,0)	1122 (100)
TOTAL	1053 (71,4)	386 (26,2)	35 (2,4)	1474 (100)

La délétion 3.7 responsable de l'alpha-thalassémie a été détectée chez 28,6% des participants à l'étude dont 2,4% à l'état homozygote et 26,2% à l'état hétérozygote. Alpha-thalassémie hétérozygote était plus fréquente à Fourda (32,4%) alors qu'elle était presque similaire dans les deux autres villages.

La répartition de la délétion 3.7 était uniforme dans deux villages (Fourda et Kéniéroba). Cependant, l'état homozygote était plus prévalent à Bozokin que dans les deux autres villages ($p = 0,04$).

TABLEAU IX: Répartition de la population d'étude en fonction du déficit en G6PD et de la résidence.

Déficit en G6PD	village						Total
	BOZOKIN		FOURDA		KENIEROBA		
	filles n(%)	garçon n(%)	filles n(%)	garçon n(%)	filles n(%)	garçon n(%)	
normal	61 (74,4)	70 (74,5)	61 (79,2)	83 (83,8)	468 (80,7)	510 (94,1)	1253
hétérozygote	18 (22,0)	-	14 (18,2)	-	104 (17,9)	-	136
homozygote	3 (3,7)	-	2 (2,6)	-	8 (1,4)	-	13
hémizyote	-	24 (25,5)	-	16 (16,2)	-	32 (5,9)	72
Total	82 (100)	94 (100)	77 (100)	99 (100)	580 (100)	542 (100)	1474

La fréquence globale du déficit en G6PD dans la population d'étude était de 14,9% dont les garçons Hémizyotes représentaient 9,8%. Les filles hétérozygotes et homozygotes représentaient 18,4% et 1,8%, respectivement.

Les formes hétérozygote et homozygote étaient plus prévalentes à Bozokin avec respectivement 22,0% et 3,7%. De même, la forte proportion des Hémizyotes a été observée à Bozokin (25,5%) et la faible proportion à Kéniéroba (5,9%, $p = 10^{-6}$).

TABLEAU X: Répartition de la population d'étude en fonction du groupe sanguin ABO et de la résidence.

Village	Groupe sanguin ABO				TOTAL n
	A n (%)	AB n (%)	B n (%)	O n (%)	
Bozokin	41 (23,3)	7 (4,0)	47 (26,7)	81 (46,0)	176 (100)
Fourda	66 (37,7)	20 (11,4)	31 (17,6)	59 (33,5)	176 (100)
Kéniéroba	336 (29,9)	88 (7,8)	247 (22,0)	451 (40,2)	1122 (100)
TOTAL	443 (30,1)	115 (7,8)	325 (22,0)	591 (40,1)	1474 (100)

La majorité des enfants était du groupe sanguin O (40,1%), suivie du groupe A (30,1%), du groupe B (22,0%) et du groupe AB (7,8%). La forte proportion du groupe sanguin O a été observée à Bozokin (46,0%) et la plus faible à Fourda (33,5%). Par contre, les groupes sanguins A (37,7%) et AB (11,4%) prédominaient à Fourda.

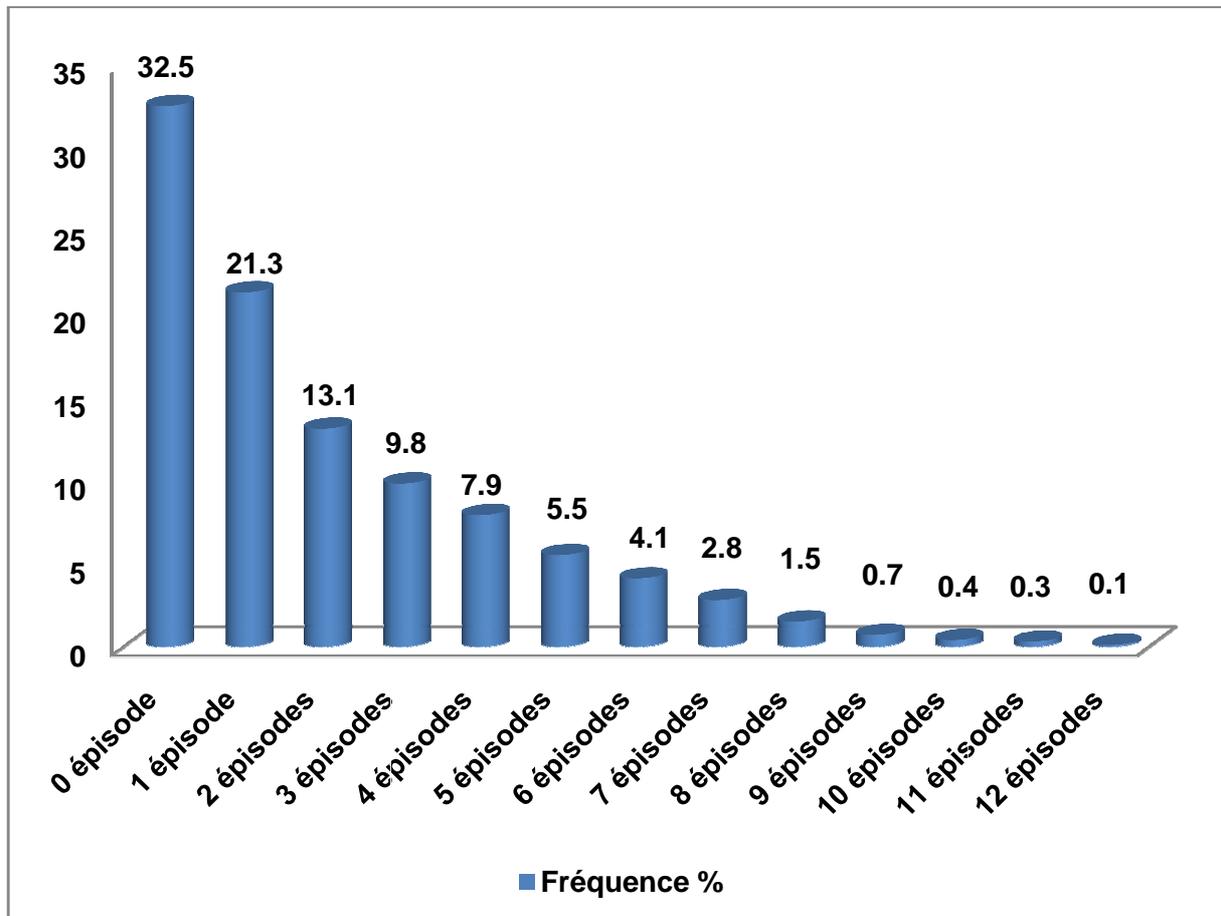


Figure 5: Répartition de la population d'étude en fonction du nombre d'épisodes palustres

En deux ans, le nombre maximum d'épisodes palustres par enfant était de 12. Plus de 23% des enfants ont fait au moins 4 épisodes palustres et près d'un tiers des sujets n'avait fait aucun épisode de paludisme en 2 ans. Le nombre moyen d'épisodes palustres était de 2,07 épisodes.

TABLEAU XI: Proportion du paludisme en fonction du type d'hémoglobine

Paludisme	Type d'hémoglobine		
	AA n (%)	AC n (%)	AS n (%)
Non	366 (31,4)	30 (30,9)	83 (39,2)
Oui	799 (68,6)	67 (69,1)	129 (60,8)
Total n (%)	1165 (100)	97 (100)	212 (100)

Quelque soit le type d'hémoglobine, plus de 60% des sujets avait fait un épisode palustre. La proportion de personnes avec hémoglobinopathies et ayant fait un épisode palustre était de 69,1% dans le groupe AC contre 60,8% dans le groupe AS. Il n'y avait pas de différence statistique significative entre les porteurs d'Hb AA et AC ($p = 0,9$), ou entre les porteurs d'HbAC et d'HbAS ($p = 0,2$). Par contre, une différence statistiquement significative existait entre les porteurs d'HbAA et d'HbAS ($p = 0,03$).

TABLEAU XII: Répartition de la population d'étude en fonction du type d'hémoglobine et du nombre moyen d'épisodes palustres

Type d'hémoglobine	Nombre moyen d'épisodes palustres	écart-type
AA	2,16	2,36
AC	1,91	2,18
AS	1,67	1,93
Total	2,07	2,30

Les sujets porteurs d'HbAS avaient fait moins d'épisodes palustres que les sujets HbAA et HbAC (P= 0,01).

TABLEAU XIII: Proportion du paludisme en fonction du génotype α -thalassémique.

Paludisme	Alpha-thalassémie		
	Normal n (%)	Hétérozygote n (%)	Homozygote n (%)
Non	347 (33)	122 (31,6)	10 (28,6)
Oui	706 (67)	264 (68,4)	25 (71,4)
Total n (%)	1053 (100)	386 (100)	35 (100)

La proportion d'épisodes palustres chez les personnes alpha-thalassémiques hétérozygotes et homozygotes était respectivement de 68,4% et de 71,4% ($p = 0,8$).

TABLEAU XIV: Répartition de la population d'étude en fonction du type d'alpha-thalassémie et du nombre moyen d'épisodes palustres

Alpha-thalassémie	Nombre moyen d'épisodes palustres	écart-type
normal	2,04	2,28
Hétérozygote	2,16	2,37
Homozygote	2,03	2,16
Total	2,07	2,30

Quelque soit le génotype Alpha-thalassémique, le nombre moyen d'épisodes palustres ne variait pas significativement ($p = 0,7$).

TABLEAU XV: Proportion du paludisme en fonction du génotype G6PD

Paludisme	G6PD			
	sujet Normal n (%)	Fille hétérozygote n (%)	Fille homozygote n (%)	Garçon Hémizygote n (%)
Non	405 (32,3)	41 (30,1)	6 (46,2)	27 (37,5)
Oui	848 (67,7)	95 (69,9)	7 (53,8)	45 (62,5)
Total n (%)	1253 (100)	136 (100)	13 (100)	72 (100)

Il n'existait pas de différence dans la proportion de paludisme observée parmi les filles homozygotes (53,8%), les filles hétérozygotes (69,9%) ou les garçons hémizygotes (62,5%, $p = 0,7$).

TABLEAU XVI: Répartition de la population d'étude en fonction du type de déficit en G6PD et du nombre moyen d'épisodes palustres

Déficit en G6PD	Nombre moyen d'épisodes palustres	écart-type
Normal	2,05	2,26
hétérozygote	2,35	2,53
homo-Hémizygotés	1,9	2,46
Total	2,07	2,30

En 2 ans, il n'y avait pas de variation statistique significative dans la moyenne des épisodes palustres en fonction du déficit en G6PD ($p = 0,28$).

TABLEAU XVII: Proportion du paludisme en fonction du groupe sanguin ABO

Paludisme	Groupe sanguin ABO			
	A n (%)	AB n (%)	B n (%)	O n (%)
Non	153 (34,5)	39 (33,9)	97 (29,8)	190 (32,5)
Oui	290 (65,5)	76 (66,1)	228 (70,2)	401 (67,5)
Total n (%)	443 (100)	115(100)	325 (100)	591 (100)

La fréquence du paludisme dans le groupe sanguin O était de 67,5% et il n'existait pas de variation statistiquement significative entre les différents groupes sanguins ABO ($p = 0,5$).

TABLEAU XVIII: Répartition de la population d'étude en fonction du groupe sanguin ABO et du nombre moyen d'épisodes palustres

Groupe sanguin ABO	Nombre moyen d'épisodes palustres	écart-type
A	2,15	2,42
AB	1,94	2,34
B	2,13	2,34
O	2,01	2,17
Total	2,07	2,30

Le nombre moyen d'épisodes palustres ne variait pas dans le groupe sanguin ABO ($p = 0,66$).

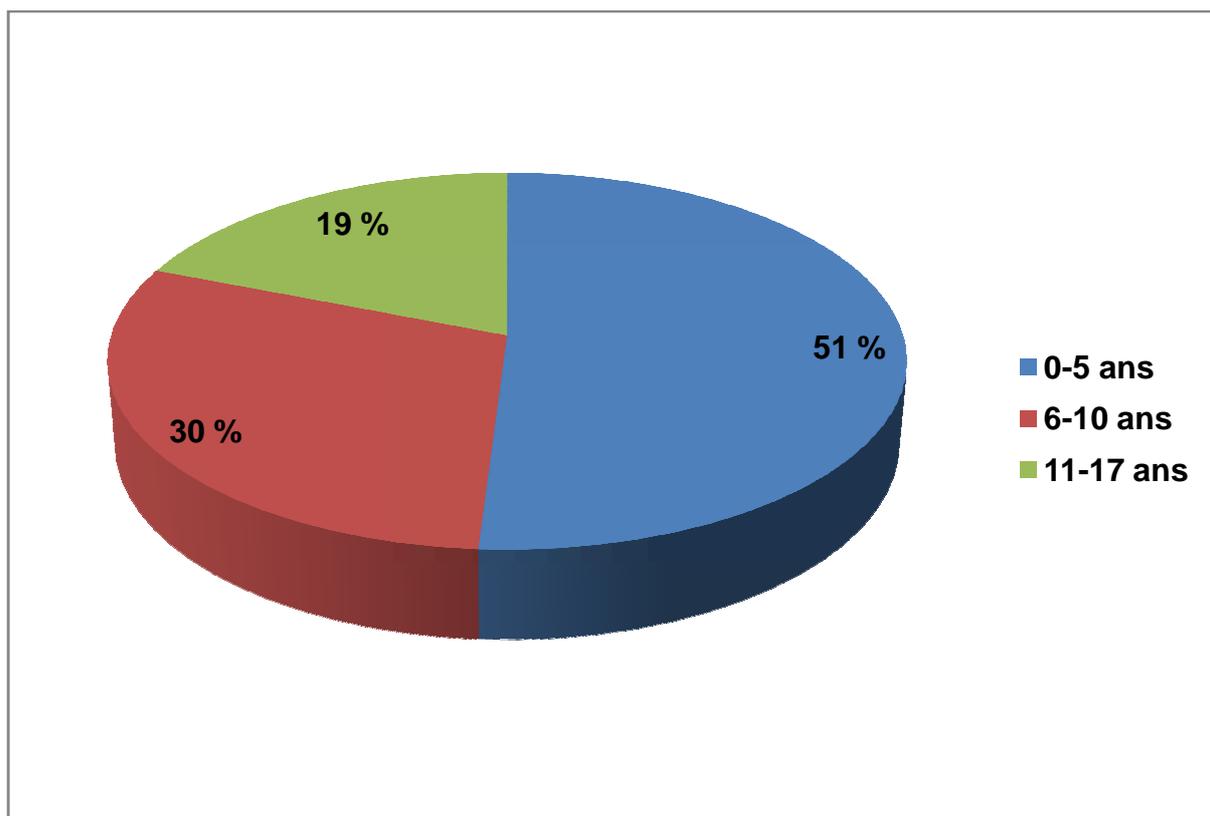


Figure 6 : Proportion du paludisme selon les classes d'âge

Plus de la moitié des enfants âgés de 0 à 5 ans avaient fait au moins un épisode de paludisme.

TABLEAU XIX: Répartition de la population d'étude en fonction de la classe d'âge et du nombre moyen d'épisodes palustres

Classe d'âge	Nombre moyen d'épisodes palustres	écart-type
0-5 ans	2,77	2,48
6-10 ans	2,30	2,25
>10 ans	0,86	1,43
Total	2,07	2,30

Pendant les 2 ans, la moyenne des épisodes de paludisme était plus élevée chez les enfants de 0-5 ans comparée aux autres groupes d'âge ($p = 10^{-6}$).

6. Commentaires et Discussion

6.1. Au plan méthodologique

Ce travail rentre dans le cadre d'une étude quinquennale portant sur la résistance innée et acquise du paludisme à *P. falciparum* au Mali. Notre objectif était de déterminer la distribution des polymorphismes du globule rouge et de l'hémoglobine et de mesurer leur impact sur le nombre d'épisodes palustres chez les enfants vivant dans les villages de Kéniéroba, Bozokin et Fourda dans la commune rurale de Bancoumana. Nous avons déterminé les paramètres sociodémographiques (sexe, âge et résidence) et mesuré les paramètres biologiques (groupe sanguin ABO par les tests d'agglutinations, génotype de G6PD et génotype de l' α -thalassémie par les PCR et le phénotype hémoglobinique par la HPLC) chez l'ensemble des enfants. L'étude a concerné les enfants âgés de 6 mois à 17 ans dont les parents ou tuteurs ont donné leur consentement libre et éclairé. Au total, 1474 enfants ont été inclus en fin 2010. La majorité des enfants avait moins de 5 ans (42,9%).

Nous avons choisi ce site du fait de sa situation géographique. Il se trouve dans une zone d'endémie palustre et sa proximité avec Bamako nous facilitait l'acheminement des échantillons au laboratoire. Ces villages sont accessibles en toute saison. Notre équipe de recherche possède de solides relations avec les villageois depuis 1993. Ils possèdent une riche expérience dans la participation à des études de recherche biomédicale, facilitant ainsi leur adhésion au projet de recherche.

Néanmoins, nous avons rencontré quelques difficultés qui sont entre autres la négligence des parents, qui amènent tardivement les enfants au centre de santé en dehors des heures habituelles de travail. Dès que la santé de l'enfant s'améliore, les parents négligent les visites programmées avec l'équipe de travail. Pour surmonter ces difficultés, nous travaillons avec des guides locaux et nous avons continué à les sensibiliser sur la nécessité de respecter les dates des visites programmées. L'automédication surtout avec les médicaments contrefaits est un phénomène non négligeable à cause des foires hebdomadaires attirant beaucoup de marchands et la proximité avec la république de Guinée-Conakry. Nous avons régulièrement tenu des réunions avec l'ensemble des chefs de familles pour les informer des dangers non seulement de l'automédication mais aussi de l'utilisation des médicaments

contrefaits. Ces médicaments aggravent les maladies et amplifient la résistance des parasites aux antipaludiques actuellement efficaces telle que les Combinaisons Thérapeutiques a base d'Artémisinine (CTA).

Ces difficultés ont été surmontées grâce à la sensibilisation, à la présence d'une équipe clinique permanente à Kéniéroba et la disponibilité du traitement gratuit pour toutes les affections aiguës.

6.2. Distribution des variants d'hémoglobine dans notre population d'étude

Au cours de l'analyse, nous n'avons pas pris en compte les sujets SS, CC et SC à cause de leur faible proportion. Dans notre étude, nous avons trouvé 14,4% de sujets AS et 6,6% de sujets AC (Tableau VIII). Dans la même zone, Doumbia en 2010 avait trouvé des proportions similaires (13,80% d'HbAS et 5,03% d'HbAC) [89]. En 1992, Baby avait trouvé 14,75% d'HbAC et 3,05% d'HbAS dans la population des Dogon de Bandiagara qui sont supposés être originaires du Mandé [90]. Diallo et coll. (1994) avaient trouvé chez les dogons au Mali 15,8% d'HbAC et une faible fréquence de 3,05% d'HbAS [91]. Ces différences de proportions avec notre étude s'expliquent par le fait que notre population d'étude était essentiellement constituée de Malinké. On pense que l'HbC semble remplacée l'HbS chez les Dogons à cause de sa faible conséquence clinique comparée à la population originelle Malinké [92-94]. La différence environnementale et la pression exercée par les maladies infectieuses semblent jouer un rôle dans la sélection des variants génétiques conférant une résistance à ces maladies infectieuses. Plusieurs études ont démontré que différents polymorphismes de la beta-globine sont retrouvés chez différentes populations [25, 95, 96].

Différentes populations ont développé indépendamment une réponse évolutive au paludisme et ceci est constaté à la fois au niveau global et au niveau local [25, 97]. HbS allèle est fréquente en Afrique et rare en Asie du sud-est et l'inverse est aussi vrai pour l'allèle HbE [98]. Cependant, une image plus complexe émerge au niveau local, par exemple, les Dogon du Mali qui ont une fréquence faible de HbS allèle que le reste des groupes ethniques en Afrique de l'ouest ont une fréquence élevée d'allèle HbC [35, 99]. La mutation HbS est survenue indépendamment dans plusieurs régions [100].

Un autre niveau de complexité est qu'à l'intérieur de l'Afrique, l'allèle HbS est retrouvé dans différents haplotypes (Sénégal, Bénin, bantou, Cameroun, Arabo-indien), un phénomène qui a été interprété par le fait que la même mutation est arrivée indépendamment dans quatre différentes populations africaines, bien que ceci pourrait avoir plusieurs autres explications [93, 101, 102]. Ce qui est remarquable est la grande variété de variants d'érythrocyte, qui sont la conséquence de la force sélective évolutive exercée par le paludisme.

L'hémoglobine (Hb) C est retrouvée à travers l'Afrique de l'ouest même si elle semble être moins répandue que l'HbS. L'HbS est retrouvée dans une large partie d'Afrique sub-saharienne aussi bien qu'au Moyen-Orient et en Europe. Elle a la particularité d'être l'une des premières variantes génétiques humaines à être associée avec une défection moléculaire spécifique [103].

6.3. Distribution du groupe sanguin ABO dans notre population d'étude

Le groupe sanguin O était le plus prévalent (40,1%) à l'opposé du groupe sanguin AB (7,8%). Ce résultat semble s'expliquer par la sélection naturelle du groupe sanguin ABO au Mali [104] et en Afrique qui montre une fréquence élevée du groupe O par rapport aux autres groupes sanguins [105]. Selon une étude menée au CNTS en 2004 sur 136 donneurs, la fréquence du groupe O et du groupe AB était respectivement de 48,5% et de 9,6% [106]. D'autres études menées en Afrique notamment celle faite en Côte d'Ivoire en 2007 chez les Nouveau-nés ont rapporté, respectivement, une fréquence de 62% et 2,5% pour les groupes O et AB [107]. En Guinée Conakry, en étudiant la prévalence du groupe sanguin ABO et rhésus, la fréquence du groupe O était de 48,8% et celle du groupe AB de 4,7% [108]. Une prévalence élevée du groupe O et faible du groupe AB a été observée à travers l'Afrique au sud du Sahara où *P. falciparum* est responsable de la majorité des cas de paludisme [25]. Dans l'hémisphère occidental, la distribution des groupes sanguins A et O généralement se superpose à la distribution du paludisme [109].

En Asie, la prévalence du groupe O est élevée parmi les populations qui vivent très proche de l'équateur. Par exemple, à Beijing (Pékin), en Chine la prévalence du groupe O est de 29% et celle du groupe A est de 27% [109]. Mais, à Canton, en Chine tropicale, le groupe O a une prévalence de 46% et celle du groupe A est de 23%. Le groupe O est le plus fréquent groupe sanguin en Turquie et en Iran [109]. A

l'opposé, le groupe A est le groupe sanguin prédominant dans les régions tempérées du globe où le paludisme n'a pas été endémique.

En fait, le groupe A est retrouvé en fréquence élevée en Scandinavie, et les régions subarctique d'Europe et d'Amérique du nord. Ainsi, si la survie au paludisme est associée au groupe O et la mortalité au groupe A, alors que la distribution mondiale du groupe sanguin ABO est consistante avec la pression de sélection exercée par le paludisme sur le génome humain.

6.4. Distribution du déficit en G6PD dans notre population d'étude

Nous avons observé le phénotype normal de G6PD chez 85,1% de nos enfants. Par contre, les filles G6PD hétéro- et homozygotes représentaient respectivement 18,1% et 1,8% contre 9,8% de garçons hémizygotés. En 2005, Traoré avait trouvé à Bandiagara, au Mali, 12,1% de garçons hémizygotés, 20,7% de filles déficitaires dans un échantillon de 458 sujets [110]. Le déficit en G6PD est le plus fréquent des enzymopathies chez l'homme affectant plus de 400 millions de personnes dans le monde [111]. Ce désordre est causé par de multitudes de variants alléliques structurels du gène du G6PD. Il est retrouvé principalement dans les régions tropicales et subtropicales à travers le monde avec des taux généralement élevés de 5-30%, retrouvés en Afrique, en Asie, au Moyen-Orient, dans le pourtour méditerranéen et en Papouasie Nouvelle-Guinée [112]. Mondialement, la fréquence varie entre 62% chez les juifs kurdes à 0,1% au Japon et en Europe du Nord [1].

6.5. Distribution de l'alpha-thalassémie dans notre population d'étude

Il ressort de notre étude que la prévalence globale d' α -thalassémie était de 28,6% dont 26,2% hétérozygotes et 2,4% d'homozygotes. Labie et coll. avaient trouvé chez les immigrés West-africains en France, une prévalence de l' α -thalassémie de 3,1% à partir d'une population de 540 sujets [113]. En 2006, Tania et coll. avaient trouvé en Guinée Bissau, une prévalence de 13,8% d' α -thalassémie hétérozygote et 1,5% d'homozygote [114]. L'argument irréfutable provient d'une étude sur la génétique des populations en Malaisie qui a démontré que la fréquence élevée de l'alpha+ thalassémie varie à la fois en fonction de l'altitude et de la latitude, de manière à être parfaitement corrélée avec l'endémicité palustre. Cette hypothèse a été confirmée par des analyses haplotypiques démontrant la possibilité que cela soit arrivé suite à un effet fondateur [115-117].

Environ 60 ans après l'hypothèse d'Haldane, la base moléculaire par laquelle les gènes résistants confèrent la protection contre le paludisme reste l'objet d'un intérêt majeur et une piste potentielle pour de nouvelles stratégies thérapeutiques contre cette maladie.

6.6. Relation entre les polymorphismes de l'hémoglobine et du globule rouge et le nombre d'épisodes palustres

Au cours des 2 années d'étude, le nombre maximum d'épisodes palustres par enfant était de 12. Plus de 15% des enfants ont fait au moins 4 épisodes palustres et près de 1/3 des sujets n'avait fait aucun épisode de paludisme. Le nombre moyen d'épisodes palustres était de 2,07 épisodes avec 2,29885 comme écart-type.

6.6.1. Type d'hémoglobine et nombre d'épisode

La proportion d'enfants n'ayant pas fait d'épisode palustre était composée de 31,4% d'HbAA, 30,9% d'HbAC et 39,2% d'HbAS (Tableau XII). Il existait une différence statistiquement significative entre le nombre moyen d'épisodes palustres par enfant porteur d'HbAA, d'HbAC d'HbAS, qui est respectivement de 2,16 ; 1,91 et 1,61 épisodes ($p=0,01$). Ceci s'expliquerait par le fait que les sujets AS peuvent mettre assez de temps avant de faire leur 1^{er} épisode palustre [118]. Ces résultats nous démontrent que l'HbAC et l'HbAS ne protègent pas contre l'infection palustre mais influent sur la présentation clinique de la maladie.

Les premières observations entre le trait drépanocytaire et le paludisme provenaient de la Rhodésie du Nord (actuelle Zambie) où Beet notait que les parasites du paludisme étaient moins fréquents dans le sang des sujets ayant le trait drépanocytaire [30]. Allison attirait l'attention sur cette association en concluant que les personnes ayant le trait drépanocytaire développaient un paludisme moins fréquent et moins sévère que ceux n'ayant pas ce trait [103]. Allison observa le premier dès 1949 qu'il y'avait une fréquence élevée du trait drépanocytaire (au moins 20%) dans les populations vivant près des régions côtières kenyanes et autour du lac Victoria à l'opposé d'une faible fréquence de l'hémoglobine S sur les hautes terres où le paludisme était inexistant.

6.6.2. Relation entre l'alpha-thalassémie et le nombre d'épisodes palustres

La proportion des enfants n'ayant pas fait d'épisodes palustres était composée de 33% des sujets normaux, 31,6% des sujets hétérozygotes et 28,6% des sujets homozygotes pour l'α-thalassémie (tableau XIV). L'épisode moyen ne variait pas statistiquement selon le génotype alpha-thalassémique (2,04, 2,16 et 2,03 épisodes respectivement pour les sujets normaux, hétéro-homozygotes, $P = 0,38$). Ce résultat s'expliquerait par le fait que la réduction de l'adhésion des globules rouges parasités les uns aux autres n'empêcherait pas le paludisme clinique. Des expériences *in-vitro* ont suggéré une réduction de la capacité de *P. falciparum* à envahir ou à soutenir la croissance dans les érythrocytes anormaux [48]. Il a également été émis l'hypothèse que l'α-thalassémie et le groupe sanguin O peuvent protéger via la réduction de l'adhésion des globules rouges parasités les uns aux autres [104, 119-122].

Il n'y avait aucune différence statistiquement significative dans le taux d'acquisition des anticorps par les enfants présentant différentes formes d'α-thalassémie [123]. Une étude chez les enfants kenyans démontrait que les hétérozygotes et les homozygotes étaient tous deux protecteurs contre le paludisme sévère [45] alors que dans une autre étude au Ghana, seuls les enfants hétérozygotes étaient protégés [33]. Une étude de cohorte menée en Gambie n'a démontré aucune évidence que les hétérozygotes d'α-thalassémie étaient protégés contre les épisodes cliniques palustres [124]. Veenemans en 2011 sur la base d'une étude de cohorte en Tanzanie avait trouvé que l'effet de l'alpha-thalassémie sur l'épisodes palustres est âge dépendante [125].

6.6.3. Relation entre le déficit en G6PD et le nombre d'épisodes palustres

Nous avons trouvé que 46,2% des filles homozygotes, 37,5% des garçons hémizygotés, 30,1% des filles hétérozygotes et 32,3% des enfants normaux n'avaient fait aucun cas de paludisme pendant les 2 ans (Tableau XVI). Il n'existait pas de différence statistiquement significative ($p = 0,38$). Quelque soit le type du déficit en G6PD, le nombre moyen d'épisodes palustres ne variait pas ($p = 0,28$). Cependant, Bienzel et coll. dans une étude à base hospitalière ont démontré que le taux d'infection chez les enfants étaient plus élevés chez les garçons G6PD hémizygotés et chez les filles G6PD homozygotes [126].

Sur la base des études en milieu hospitalier, le déficit en G6PD n'influçait pas la fréquence des épisodes palustres lors des études conduites par Martin et coll. [66] au Nigéria et par Kruatrachue et Coll. [127] en Thaïlande.

6.6.4. Relation entre le groupe sanguin ABO et le nombre d'épisodes palustres

Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les différents groupes sanguins en terme de proportion de sujet n'ayant pas fait d'épisodes palustres (34,5% pour le groupe sanguin A, 33,9% pour le groupe sanguin AB, 29,8% pour le groupe sanguin B et 32,5% pour le groupe sanguin O, (Tableau 18), $p = 0,46$). Le nombre moyen d'épisodes palustres était comparable quelque soit le groupe sanguin ($p = 0,66$) (Tableau XIX). Ce résultat est similaire à l'étude menée en Papouasie Nouvelle Guinée où il n'y avait aucune différence statistiquement significative entre les groupes sanguins du système ABO selon la densité parasitaire ($p = 0,05$) ou l'acquisition d'anticorps spécifiques anti-VSA ($p = 0,30$) [123]. Ces résultats nous montrent que le groupe sanguin ABO n'influence pas le nombre des épisodes palustres.

6.6.5. Relation entre l'âge et le nombre d'épisodes palustres

Au cours de notre étude, plus de la moitié des enfants âgés de plus de 10 ans n'avait pas fait d'épisodes palustres. Chez les enfants de moins de 5 ans, la prévalence du paludisme était de 51%. Le nombre moyen d'épisodes palustres était statistiquement différent entre les groupes d'âge de 2,77 chez les enfants de 6 mois à 5 ans, de 2,30 chez les enfants de 6-10 ans et de 0,86 chez les enfants âgés de plus de 10 ans ($p = 10^{-6}$). Ceci s'expliquerait par le fait que l'âge est le marqueur surrogatoire de l'immunité acquise (prémunition) en zone d'endémie palustre.

6.7. Limites de notre étude

Notre travail s'est intéressé uniquement à l'impact des variants génétiques connus sur le paludisme. Nous n'avons pas étudié leurs mécanismes de protection contre l'accès palustre. Le projet de recherche se propose d'étudier ces mécanismes et le degré de protection contre l'accès palustre simple. En outre, ce projet étudiera l'impact de ces polymorphismes génétiques sur l'acquisition de l'immunité contre le paludisme. Nous n'avons pas aussi étudié le phénomène d'épistasie observé entre les différents variants génétiques comme observé entre le trait drépanocytaire et l'alpha-thalassémie au Kenya [128].

Le fait de posséder en même temps deux variants génétiques différents entraîne la suppression de leurs rôles protecteurs contre le paludisme. Nous n'avons pas aussi étudié d'autres facteurs génétiques de protection contre l'accès palustre en dehors des gènes classiques de résistance connus.

7. Conclusion et Recommandations

7.1. Conclusion

Au terme de ce travail, il ressort que les polymorphismes génétiques de l'hémoglobine et du globule rouge étudiés sont très fréquents dans notre zone d'étude.

Les différents polymorphismes étudiés n'empêchent pas l'infection palustre. Par contre, nous avons observé que l'HbS et l'âge ont un effet réducteur sur la fréquence des épisodes palustres.

7.2. Recommandations

Au terme de cette étude et au vu de nos résultats, nous pouvons formuler les recommandations suivantes:

- **Aux autorités sanitaires et administratives :**

- d'assurer la disponibilité des moustiquaires imprégnées et des CTA aux populations ;

- **Aux chercheurs:**

- de continuer ce type d'étude dans les autres localités du pays

- **Aux populations participantes aux études :**

- d'utiliser régulièrement et correctement les moustiquaires imprégnées ;

- d'amener les enfants aux centres de santé à la moindre suspicion de maladie, de respecter les dates de visites programmées avec les chercheurs;

- d'éviter l'automédication et

- d'observer les mesures d'hygiène pour une réduction des maladies liées au manque d'hygiène.

Fiche signalétique

Nom: KAMATE

Prénom: François

Nationalité: Malienne

Date de soutenance : 14/04/ 2012

Ville de soutenance: Bamako

Titre : Impact des polymorphismes de l'hémoglobine et du globule rouge sur la prévalence du paludisme

Lieu de dépôt: Bibliothèque de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie.

- **Secteur d'intérêt**: Hématologie, Parasitologie, Santé publique, Immunologie

Résumé: Au cours de la saison de transmission 2008 et 2009, nous avons entrepris une étude de cohorte dans les villages de Bozokin, de Fourda et de Kéniéroba situés tous dans la commune rurale de Bancoumana, à 70 Km au sud-ouest de Bamako. Au total, 1474 enfants âgés de 6 mois à 17 ans ont été inclus dans l'étude. Nous avons déterminé la prévalence des polymorphismes du globule rouge (déficit en G6PD, α -thalassémie, groupe sanguin ABO) et de l'hémoglobine (HbS, HbC) en utilisant des techniques moléculaires, les tests d'agglutination et la HPLC. Nous avons enregistré tous les épisodes palustres survenus au cours des 2 années de l'étude.

Les prévalences de l'HbAS et l'HbAC étaient respectivement de 14,4% et de 6,6% dans notre étude tandis que celle de l'alpha-thalassémie était de 28,6%. La proportion des alpha-thalassémies hétérozygote et homozygote était respectivement de 26,2% et 2,4%. La prévalence globale du déficit en G6PD était de 14,9% dont 18,4% de filles hétérozygotes, 1,8% de filles homozygote et 9,8% de garçons Hémizygotés. Globalement sur le plan clinique, il y'avait 33% des enfants qui n'avaient pas fait d'épisodes palustres au cours de notre étude. Pour les polymorphismes du globule rouge (GR) et de l'hémoglobine, le nombre moyen d'épisode était similaire à l'exception de l'HbAS mais variait significativement avec l'âge. Au vu de nos résultats, nous pouvons affirmer que seule l'HbAS diminuait le nombre moyen d'épisodes palustres.

La comparaison des effets protecteurs de l'HbS et de l'âge sur le développement du paludisme peut donner des indices importants sur le mécanisme de protection par le trait drépanocytaire. Les 5 polymorphismes étudiés de l'Hb et du GR sont facilement détectés par des méthodes de laboratoire simples et doivent être identifiés et analysés comme covariables dans les études à la fois sur le paludisme grave et sur les vaccins au Mali et ailleurs en Afrique.

Mots clés : Polymorphisme, globule rouge, hémoglobine, paludisme, Mali

Thesis title: Impact of hemoglobin and red blood cell polymorphisms of on the incidence of malaria in the rural district of Bancoumana (Mali)

Summary

During the transmission season in 2008 and 2009, we undertook a cohort study in the villages of Bozokin, Fourda, and Kéniéroba, all located in the rural district of Bancoumana, 70 km southwest of Bamako. A total of 1474 children aged 6 months to 17 years were included in the study. We determined the prevalence of red blood cells polymorphisms (G6PD deficiency, α -thalassemia, and ABO blood group) and hemoglobin (HbS, HbC) using molecular techniques, agglutination tests and HPLC. We recorded all malaria episodes occurred during the two years of the study.

The prevalence of HbAS and HbAC were respectively 14.4% and 6.6% in our study populations while that of alpha-thalassemia was 28.6%. The proportions of alpha-thalassemia heterozygous and homozygous were respectively 26.2% and 2.4%. The overall prevalence of G6PD deficiency was 14.9% including 18.4% of heterozygous females, 1.8% homozygous females, and 9.8% hemizygous males. On overall, there were 33% of children had experienced any episodes of malaria in our study. For red blood cell polymorphisms (RBC) and hemoglobin, the average number of episodes was similar with the exception of HbAS but varied significantly with age. Only HbAS decreased the average number of malaria episodes.

Comparison of protective effects of HbS and age on the development of malaria disease can give important clues on the mechanism of protection conferred by the sickle cell trait. The five polymorphisms of Hb and RBC studied here are easily detected by simple laboratory methods and must be identified and analyzed as covariates in studies on both severe malaria and vaccines trials in Mali and elsewhere in Africa.

Keywords: Polymorphism, red cell, hemoglobin, malaria, Mali

8. Références bibliographiques

1. WHO, *WHO Expert Committee on Malaria*. World Health Organ Tech Rep Ser, 892, i-v, 1-74., 2000.
2. WHO, *World Malaria Report 2010*, 2010, World Health Organisation.
3. Greenwood, B., *Progress in malaria control in endemic areas*. Travel medicine and infectious disease, 2008. 6(4): p. 173-6.
4. Fairhurst, R.M., et al., *Abnormal display of PfEMP-1 on erythrocytes carrying haemoglobin C may protect against malaria*. Nature, 2005. 435(7045): p. 1117-21.
5. Guindo, A., et al., *X-linked G6PD deficiency protects hemizygous males but not heterozygous females against severe malaria*. PLoS medicine, 2007. 4(3): p. e66.
6. Singh, B., et al., *A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings*. Lancet, 2004. 363(9414): p. 1017-24.
7. DIAKITE, M., *Paludisme uptodate, 2nd edition* Vol. 2e edition, Bamako, Mali, MRTC/FMPOS. 2010.
8. WHO, *World Malaria Report 2008*, 2008, World Health Organisation: Genève
9. Bruce-Chwatt, L.J., *Malaria and its control: present situation and future prospects*. Annual review of public health, 1987. 8: p. 75-110.

10. White, G.B., *Malaria prevention by vector control: effectiveness of insecticidal methods.* *Parassitologia*, 1999. 41(1-3): p. 385-7.
11. Smith, D.L., et al., *Revisiting the basic reproductive number for malaria and its implications for malaria control.* *PLoS biology*, 2007. 5(3): p. e42.
12. Bannister, L.H. and G.H. Mitchell, *The malaria merozoite, forty years on.* *Parasitology*, 2009. 136(12): p. 1435-44.
13. Greenwood, B., *Can malaria be eliminated?* *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2009. 103 Suppl 1: p. S2-5.
14. Macdonald, G., *The epidemiology and control of malaria.* Oxford University Press, 1957.
15. DOUMBO, O., *Epidémiologie du paludisme au Mali, étude de la chimiorésistance, essai de stratégie de contrôle basé sur l'utilisation de rideaux imprégnés de perméthrine associé au traitement systématique des accès fébriles.*, in *Parasitologie, Pathologie, Ecologie*1992, Montpellier II, France.
16. Kwiatkowski, D., *Cytokines and anti-disease immunity to malaria.* *Research in immunology*, 1991. 142(8): p. 707-12.
17. Newton, C.R. and S. Krishna, *Severe falciparum malaria in children: current understanding of pathophysiology and supportive treatment.* *Pharmacol Ther*, 1998. 79(1): p. 1-53.
18. Menendez, C., A.F. Fleming, and P.L. Alonso, *Malaria-related anaemia.* *Parasitology today*, 2000. 16(11): p. 469-76.

19. Schellenberg, D., et al., *The silent burden of anaemia in Tanzanian children: a community-based study*. Bulletin of the World Health Organization, 2003. 81(8): p. 581-90.
20. WHO, *Severe and complicated malaria*. World Health Organization, Division of Control of Tropical Diseases. Trans R Soc Trop Med Hyg, 84 Suppl 2, 1-65, 1990.
21. WHO, *Severe falciparum malaria*. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. Trans R Soc Trop Med Hyg, 94 Suppl 1, S1-90 2000.
22. WHO, *Africa malaria report 2003*.
23. WHO/UNICEF/UNU, *Macro International demographic and health surveys*. 2001.
24. Menendez, C., et al., *Randomised placebo-controlled trial of iron supplementation and malaria chemoprophylaxis for prevention of severe anaemia and malaria in Tanzanian infants*. Lancet, 1997. 350(9081): p. 844-50.
25. Kwiatkowski, D.P., *How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria*. American journal of human genetics, 2005. 77(2): p. 171-92.
26. Diallo, D.A., *Epidémiologie de la drépanocytose au Mali*, in *Symposium sur la drépanocytose* 1993, AMLUD/BEUFORD: BAMAKO (MALI).

27. Williams, A.W. and J.P. Mackey, *Rapid Determination of the Sickle Cell Trait by the Use of a Reducing Agent*. Journal of clinical pathology, 1949. 2(2): p. 141-2.
28. Lehmann, H. and A.B. Raper, *Distribution of the sickle-cell trait in Uganda, and its ethnological significance*. Nature, 1949. 164(4168): p. 494.
29. Beet, E.A., *Observations on haemoglobin values in African children*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1949. 43(3): p. 317-28.
30. Beet, E.A., *The genetics of the sickle-cell trait in a Bantu tribe*. Annals of eugenics, 1949. 14(4): p. 279-84.
31. Luzzatto, L., E.S. Nwachuku-Jarrett, and S. Reddy, *Increased sickling of parasitised erythrocytes as mechanism of resistance against malaria in the sickle-cell trait*. Lancet, 1970. 1(7642): p. 319-21.
32. Friedman, M.J., *Erythrocytic mechanism of sickle cell resistance to malaria*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1978. 75(4): p. 1994-7.
33. Mockenhaupt, F.P., et al., *Hemoglobin C and resistance to severe malaria in Ghanaian children*. The Journal of infectious diseases, 2004. 190(5): p. 1006-9.
34. Modiano, D., et al., *Haemoglobin C protects against clinical Plasmodium falciparum malaria*. Nature, 2001. 414(6861): p. 305-8.

35. Agarwal, A., et al., *Hemoglobin C associated with protection from severe malaria in the Dogon of Mali, a West African population with a low prevalence of hemoglobin S.* Blood, 2000. 96(7): p. 2358-63.
36. Diakite, S.A.S., *Les mecanismes de protection de l'hemoglobine C contre les formes graves du paludisme a P. falciparum: resultas d'etudes preliminaires in-vitro.* These de Pharmacie, Universite de Bamako, Mali 2005.
37. Luo, H.Y., et al., *Patients with thalassemia in the United States.* Blood, 2005. 105(12): p. 4896-7.
38. Weatherall, D.J. and J.B. Clegg, *Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem.* Bulletin of the World Health Organization, 2001. 79(8): p. 704-12.
39. Willcox, M., A. Bjorkman, and J. Brohult, *Falciparum malaria and beta-thalassaemia trait in northern Liberia.* Annals of tropical medicine and parasitology, 1983. 77(4): p. 335-47.
40. Willcox, M., et al., *A case-control study in northern Liberia of Plasmodium falciparum malaria in haemoglobin S and beta-thalassaemia traits.* Annals of tropical medicine and parasitology, 1983. 77(3): p. 239-46.
41. Pattanapanyasat, K., et al., *Impairment of Plasmodium falciparum growth in thalassemic red blood cells: further evidence by using biotin labeling and flow cytometry.* Blood, 1999. 93(9): p. 3116-9.

42. Allen, S.J., et al., *Augmenting cardiac contractility hastens myocardial edema resolution after cardiopulmonary bypass and cardioplegic arrest.* Anesthesia and analgesia, 1997. 85(5): p. 987-92.
43. Cramer, J.P., et al., *iNOS promoter variants and severe malaria in Ghanaian children.* Tropical medicine & international health : TM & IH, 2004. 9(10): p. 1074-80.
44. Williams, T.N., et al., *Sickle cell trait and the risk of Plasmodium falciparum malaria and other childhood diseases.* J Infect Dis, 2005. 192(1): p. 178-86.
45. Williams, T.N., et al., *An immune basis for malaria protection by the sickle cell trait.* PLoS medicine, 2005. 2(5): p. e128.
46. Veenemans, J., et al., *Alpha+ -thalassemia protects against anemia associated with asymptomatic malaria: evidence from community-based surveys in Tanzania and Kenya.* The Journal of infectious diseases, 2008. 198(3): p. 401-8.
47. Williams, T.N., D.J. Weatherall, and C.I. Newbold, *The membrane characteristics of Plasmodium falciparum-infected and -uninfected heterozygous alpha(0)thalassaemic erythrocytes.* Br J Haematol, 2002. 118(2): p. 663-70.
48. Polley, S.D., et al., *High levels of serum antibodies to merozoite surface protein 2 of Plasmodium falciparum are associated with reduced risk of clinical malaria in coastal Kenya.* Vaccine, 2006. 24(19): p. 4233-46.

49. Atamna, H. and H. Ginsburg, *The malaria parasite supplies glutathione to its host cell--investigation of glutathione transport and metabolism in human erythrocytes infected with Plasmodium falciparum*. European journal of biochemistry / FEBS, 1997. 250(3): p. 670-9.
50. Allison, A.C. and E.M. Eugui, *A radical interpretation of immunity to malaria parasites*. Lancet, 1982. 2(8313): p. 1431-3.
51. Persico, M.G., et al., *Isolation of human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) cDNA clones: primary structure of the protein and unusual 5' non-coding region*. Nucleic acids research, 1986. 14(6): p. 2511-22.
52. Pai, G.S., et al., *Localization of loci for hypoxanthine phosphoribosyltransferase and glucose-6-phosphate dehydrogenase and biochemical evidence of nonrandom X chromosome expression from studies of a human X-autosome translocation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1980. 77(5): p. 2810-3.
53. Keats, B., *Genetic mapping: X chromosome*. Human genetics, 1983. 64(1): p. 28-32.
54. Chen, E.Y., et al., *Sequence of human glucose-6-phosphate dehydrogenase cloned in plasmids and a yeast artificial chromosome*. Genomics, 1991. 10(3): p. 792-800.
55. Ruwende, C., et al., *Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria*. Nature, 1995. 376(6537): p. 246-9.

56. LUZZATTO, L.M., A. , *Human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. The metabolic basis of inherited disease.* B. A. Scriver CR, Sly WS, Valle D New York, McGraw-Hill, 1989.
57. Ruwende, C. and A. Hill, *Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria.* Journal of molecular medicine, 1998. 76(8): p. 581-8.
58. Hirono, A. and E. Beutler, *Alternative splicing of human glucose-6-phosphate dehydrogenase messenger RNA in different tissues.* The Journal of clinical investigation, 1989. 83(1): p. 343-6.
59. Oppenheim, A., et al., *G6PD Mediterranean accounts for the high prevalence of G6PD deficiency in Kurdish Jews.* Human genetics, 1993. 91(3): p. 293-4.
60. Landsteiner, K., *Individual Differences in Human Blood.* Science, 1931. 73(1894): p. 403-9.
61. Owen, R., *Karl Landsteiner and the first human marker locus.* Genetics, 2000. 155(3): p. 995-8.
62. Hartmann, O., *[Compatibility tests in blood transfusion].* Nordisk medicin, 1956. 55(19): p. 662-3.
63. Yamamoto, F., et al., *[Coexistence of multiple metastatic brain tumors from thyroid carcinoma and cerebral aneurysms].* No shinkei geka. Neurological surgery, 1990. 18(4): p. 361-5.

64. Chester, M.A. and M.L. Olsson, *The ABO blood group gene: a locus of considerable genetic diversity*. *Transfusion medicine reviews*, 2001. 15(3): p. 177-200.
65. Facer, C.A. and J. Brown, *ABO blood groups and falciparum malaria*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1979. 73(5): p. 599-600.
66. Martin, S.K., et al., *Frequency of blood group antigens in Nigerian children with falciparum malaria*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1979. 73(2): p. 216-8.
67. Singh, T., *Malaria and ABO blood groups*. *Indian pediatrics*, 1985. 22(11): p. 857-8.
68. Pant, C.S., et al., *An epidemiological study of G-6-PD deficiency, sickle cell haemoglobin, and ABO blood groups in relation to malaria incidence in Muslim and Christian communities of Kheda, Gujarat, (India)*. *The Journal of communicable diseases*, 1992. 24(4): p. 199-205.
69. Fischer, P.R. and P. Boone, *Short report: severe malaria associated with blood group*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 1998. 58(1): p. 122-3.
70. Lell, B., et al., *The role of red blood cell polymorphisms in resistance and susceptibility to malaria*. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 1999. 28(4): p. 794-9.

71. Beiguelman, B., et al., *The association of genetic markers and malaria infection in the Brazilian Western Amazonian region*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2003. 98(4): p. 455-60.
72. Pathirana, S.L., et al., *ABO-blood-group types and protection against severe, Plasmodium falciparum malaria*. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 2005. 99(2): p. 119-24.
73. Loscertales, M.P. and B.J. Brabin, *ABO phenotypes and malaria related outcomes in mothers and babies in The Gambia: a role for histo-blood groups in placental malaria?* *Malar J*, 2006. 5: p. 72.
74. Wood, C.S., *Preferential feeding of Anopheles gambiae mosquitoes on human subjects of blood group O: A relationship between the ABO polymorphism and malaria vectors*. *Human biology*, 1974. 46(3): p. 385-404.
75. Ho, M., et al., *Visualization of Plasmodium falciparum-endothelium interactions in human microvasculature: mimicry of leukocyte recruitment*. *The Journal of experimental medicine*, 2000. 192(8): p. 1205-11.
76. Fernandez, V., et al., *Multiple adhesive phenotypes linked to rosetting binding of erythrocytes in Plasmodium falciparum malaria*. *Infection and immunity*, 1998. 66(6): p. 2969-75.
77. Chotivanich, K.T., et al., *Rosetting characteristics of uninfected erythrocytes from healthy individuals and malaria patients*. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 1998. 92(1): p. 45-56.

78. Abdulla, S., et al., *Safety and immunogenicity of RTS,S/AS02D malaria vaccine in infants*. The New England journal of medicine, 2008. 359(24): p. 2533-44.
79. Sagara, I., et al., *A randomized and controlled Phase 1 study of the safety and immunogenicity of the AMA1-C1/Alhydrogel + CPG 7909 vaccine for Plasmodium falciparum malaria in semi-immune Malian adults*. Vaccine, 2009. 27(52): p. 7292-8.
80. Hanson, L.A. and S.A. Silfverdal, *Vaccination immunology*. Scandinavian journal of infectious diseases, 2008. 40(9): p. 696-701.
81. Vanderberg, J.P., *Reflections on early malaria vaccine studies, the first successful human malaria vaccination, and beyond*. Vaccine, 2009. 27(1): p. 2-9.
82. Miller, L.H. and S.L. Hoffman, *Research toward vaccines against malaria*. Nature medicine, 1998. 4(5 Suppl): p. 520-4.
83. Carvalho, L.J., C.T. Daniel-Ribeiro, and H. Goto, *Malaria vaccine: candidate antigens, mechanisms, constraints and prospects*. Scand J Immunol, 2002. 56(4): p. 327-43.
84. Greenwood, B., *Malaria vaccines. Evaluation and implementation*. Acta Trop, 2005. 95(3): p. 298-304.
85. Hill, A.V., *Pre-erythrocytic malaria vaccines: towards greater efficacy*. Nat Rev Immunol, 2006. 6(1): p. 21-32.

86. Higgins, T., G.A. Naughton, and D. Burgess, *Effects of wearing compression garments on physiological and performance measures in a simulated game-specific circuit for netball*. Journal of science and medicine in sport / Sports Medicine Australia, 2009. 12(1): p. 223-6.
87. Williams, T.N., et al., *Both heterozygous and homozygous alpha+ thalasseмии protect against severe and fatal Plasmodium falciparum malaria on the coast of Kenya*. Blood, 2005. 106(1): p. 368-71.
88. Fry, A.E., et al., *Common variation in the ABO glycosyltransferase is associated with susceptibility to severe Plasmodium falciparum malaria*. Hum Mol Genet, 2008. 17(4): p. 567-76.
89. DOUMBIA, M., *Prévalence des polymorphismes du paludisme et du connus comme protecteurs contre le paludisme dans la commune rurale de bancoumana (MALI), These de Pharmacie, Universite de Bamako, Mali in* 2010.
90. Baby, M., *Approche pluridisciplinaire des hémoglobinopathies chez les dogons de l'arrondissement de Sangha (MALI), These de Pharmacie, Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie, Bamako, Mali, 1992.*
91. Diallo, D., et al., *Haemoglobinopathies C and S in the Dogons*. Nouvelle revue française d'hématologie, 1994. 35(6): p. 551-4.
92. Verra, F., et al., *Haemoglobin C and S role in acquired immunity against Plasmodium falciparum malaria*. PLoS One, 2007. 2(10): p. e978.

93. Modiano, D., et al., *Haemoglobin S and haemoglobin C: 'quick but costly' versus 'slow but gratis' genetic adaptations to Plasmodium falciparum malaria.* Human molecular genetics, 2008. 17(6): p. 789-99.
94. Gouagna, L.C., et al., *Genetic variation in human HBB is associated with Plasmodium falciparum transmission.* Nat Genet. 42(4): p. 328-31.
95. Jallow, M., et al., *Genome-wide and fine-resolution association analysis of malaria in West Africa.* Nat Genet, 2009. 41(6): p. 657-65.
96. Verra, F., V.D. Mangano, and D. Modiano, *Genetics of susceptibility to Plasmodium falciparum: from classical malaria resistance genes towards genome-wide association studies.* Parasite Immunol, 2009. 31(5): p. 234-53.
97. Roberts, D.J. and T.N. Williams, *Haemoglobinopathies and resistance to malaria.* Redox report : communications in free radical research, 2003. 8(5): p. 304-10.
98. Richer, J. and A.E. Chudley, *The hemoglobinopathies and malaria.* Clinical genetics, 2005. 68(4): p. 332-6.
99. Dufrenot, M. and J.P. Legait, *[Distribution of hemoglobin S and C genes in Upper Volta, Mali and Niger].* Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales, 1970. 63(5): p. 606-14.
100. Daar, S., et al., *Genetic epidemiology of HbS in Oman: multicentric origin for the betaS gene.* American journal of hematology, 2000. 64(1): p. 39-46.

101. Mouele, R., et al., *Sickle-cell disease in Brazzaville, Congo: genetical, hematological, biochemical and clinical aspects*. *Acta haematologica*, 1999. 101(4): p. 178-84.
102. Hanchard, N., et al., *Classical sickle beta-globin haplotypes exhibit a high degree of long-range haplotype similarity in African and Afro-Caribbean populations*. *BMC genetics*, 2007. 8: p. 52.
103. Allison, A.C., *Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection*. *British medical journal*, 1954. 1(4857): p. 290-4.
104. Rowe, J.A., et al., *Blood group O protects against severe Plasmodium falciparum malaria through the mechanism of reduced rosetting*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007. 104(44): p. 17471-6.
105. Fry, A.E., et al., *Common variation in the ABO glycosyltransferase is associated with susceptibility to severe Plasmodium falciparum malaria*. *Human molecular genetics*, 2008. 17(4): p. 567-76.
106. DIAWARA, A., *Le déficit en G6PD chez les donneurs de sang du CNTS de Bamako, These de Medecine, Universite de Bamako, N°55, 2004.*
107. Folquet Amorissani, M., et al., *[Anemia in the premature newborn]*. *Le Mali medical*, 2007. 22(2): p. 1-5.
108. Loua, A., et al., *[Frequency of blood groups ABO and rhesus D in the Guinean population]*. *Transfusion clinique et biologique : journal de la Societe francaise de transfusion sanguine*, 2007. 14(5): p. 435-9.

109. Mourant, A.E., D. Tills, and K. Domaniewska-Sobczak, *Sunshine and the geographical distribution of the alleles of the Gc system of plasma proteins.* Human genetics, 1976. 33(3): p. 307-14.
110. TRAORE, K., *Déficite en G6PD erythrocytaire et paludisme dans une population âgé de 3mois à 20ans dans la ville de Badiangara (MALI), These de Pharmacie, Universite de Bamako, 2005.*
111. Beutler, E., *Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency.* The New England journal of medicine, 1991. 324(3): p. 169-74.
112. Luzzatto, L., *Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency: from genotype to phenotype.* Haematologica, 2006. 91(10): p. 1303-6.
113. Labie, D., et al., *[Hemoglobinopathies in West-African immigrant workers in France (author's transl)].* La semaine des hopitaux : organe fonde par l'Association d'enseignement medical des hopitaux de Paris, 1978. 54(43-44): p. 1343-6.
114. Masmias, T.N., et al., *Inherited hemoglobin disorders in Guinea-Bissau, West Africa: a population study.* Hemoglobin, 2006. 30(3): p. 355-64.
115. Haldane, J.B., *The association of characters as a result of inbreeding and linkage.* Annals of eugenics, 1949. 15(1): p. 15-23.
116. Haldane, J.B., *The relation between density regulation and natural selection.* Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society, 1956. 145(920): p. 306-8.

117. Esposito, F., et al., *Waiting for the vaccine: sporozoite vaccine research entails important progress in malaria epidemiology*. *Parassitologia*, 1991. 33(1): p. 85-91.
118. Crompton, P.D., et al., *Sickle cell trait is associated with a delayed onset of malaria: implications for time-to-event analysis in clinical studies of malaria*. *J Infect Dis*, 2008. 198(9): p. 1265-75.
119. May, J., et al., *Hemoglobin variants and disease manifestations in severe falciparum malaria*. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 2007. 297(20): p. 2220-6.
120. Stoute, J.A., *Complement-regulatory proteins in severe malaria: too little or too much of a good thing?* *Trends in parasitology*, 2005. 21(5): p. 218-23.
121. Rowe, A., et al., *Plasmodium falciparum rosetting is associated with malaria severity in Kenya*. *Infection and immunity*, 1995. 63(6): p. 2323-6.
122. Udomsangpetch, R., et al., *Alteration in cytoadherence and rosetting of Plasmodium falciparum-infected thalassemic red blood cells*. *Blood*, 1993. 82(12): p. 3752-9.
123. Fowkes, F.J., et al., *Host erythrocyte polymorphisms and exposure to Plasmodium falciparum in Papua New Guinea*. *Malaria journal*, 2008. 7: p. 1.
124. Allen, S.J., et al., *A prospective study of the influence of alpha thalassaemia on morbidity from malaria and immune responses to defined Plasmodium falciparum antigens in Gambian children*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1993. 87(3): p. 282-5.

125. Veenemans, J., et al., *Effect of alpha(+)-thalassaemia on episodes of fever due to malaria and other causes: a community-based cohort study in Tanzania.* Malar J. 10: p. 280.
126. Bienzle, U., et al., *Glucose-6-phosphate dehydrogenase and malaria. Greater resistance of females heterozygous for enzyme deficiency and of males with non-deficient variant.* Lancet, 1972. 1(7742): p. 107-10.
127. Kruatrachue, M., et al., *Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase and malaria in Thailand.* Lancet, 1962. 2(7267): p. 1183-6.
128. Williams, T.N., et al., *Negative epistasis between the malaria-protective effects of alpha+-thalassemia and the sickle cell trait.* Nat Genet, 2005. 37(11): p. 1253-7.

9. Annexes

9.1. Description des techniques de laboratoire

9.1.1. Détermination du groupe sanguin ABO

Nous avons déterminés le groupe sanguin par l'épreuve de Beth VINCENT et celle de SIMONIN

Principe de l'épreuve de Beth VINCENT

Cette méthode consiste a recherché les antigènes A, B ou D à la surface des globules rouges, par un test d'agglutination utilisant les sérums Anti-A, anti-B et anti-D.

Matériel et réactifs

- lame porte objet
- cure-dent
- coton
- alcool 70°
- lancette
- crayon de papier
- Sérums tests, (anticorps) :
anti-A (couleur bleu), anti-B (couleur jaune), anti-D (incolore)

Mode opératoire

- marquer à l'aide de crayon de papier le numéro d'identification du sujet sur trois lames porte objet en les marquant A, B et D
- cibler un doigt
- nettoyer le doigt avec un tampon d'alcool à 70°
- piquer en un coup sec le bout du doigt par une lancette et nettoyer la première goutte de sang avec le coton sec;
- presser le bout du doigt pour avoir d'autres gouttes et déposer une goutte (de 10µl) de sang sur chacune des trois lames porte objets.
- ajouter :- une goutte (10µl) du sérum anti-A sur la goutte de la lame A
- une goutte (10µl) du sérum anti-B sur la goutte de la lame B
- une goutte (10µl) du sérum anti-D sur la goutte de la lame D ;
- turturer les trois gouttes avec trois cure-dents différents.

Résultat

Observer l'agglutination avec les sérums tests :

- sérum anti-A + le sang = agglutination (présence de l'antigène A)
- sérum anti-B + le sang = agglutination (présence de l'antigène B)
- sérum anti-D + le sang = agglutination (présence de l'antigène D) pour le rhésus.

L'absence d'agglutination signifie l'absence d'antigène correspondant.

Ce qui nous permet de déterminer les phénotypes : A +, B+, AB+ , O+, A-, B -, AB-, O- .

Principe de SIMOIN

Cette méthode consiste à rechercher les anticorps anti-A, anti-B et les anticorps irréguliers dans le sérum, par un test d'agglutination utilisant les hématies test A, B, et O.

Matériel et réactifs

- lame porte objet
- cure-dent
- coton
- alcool 70°
- tube de prélèvement
- crayon de papier
- hématies tests (groupe A, groupe B, groupe O)

Mode opératoire

- marquer à l'aide de crayon de papier le numéro d'identification du sujet sur trois lames porte objet en les marquant A, B et O
- faire un prélèvement veineux sur tube sec
- centrifuger l'échantillon pour obtenir le sérum
- ajouter une goutte (10µl) du globule rouge A sur la goutte du sérum de la lame A
- une goutte (10µl) du globule rouge B sur la goutte du sérum de la lame B
- une goutte (10µl) du globule rouge O sur la goutte du sérum de la lame O ;
- triturer les trois gouttes avec trois cure-dents différents.

Résultat

Observer l'agglutination avec les sérums tests :

- globule rouge A+ serum = agglutination (présence de l'anticorps A)
- globule rouge B+ serum = agglutination (présence de l'anticorps B)
- globule rouge O+ serum = agglutination (présence d'anticorps irréguliers).

L'absence d'agglutination signifie l'absence d'anticorps correspondant.

Ce qui nous permet de déterminer les phénotypes : A , B, AB , O.

9.1.2. Détermination du type d'Hémoglobine avec le D-10

Principe de la procédure du D-10

Le D-10 Dual Program repose sur le principe de la séparation des analytes par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) par échange d'ions. Les échantillons sont automatiquement dilués dans le système D-10 puis injectés dans la cartouche analytique. Le système D-10 envoie un gradient programmé de tampon de force ionique croissante (il existe 2 solutions de réactif de force ionique différentes, l'une hyper concentrée en ion et l'autre peu concentrée en ion. La machine mélange de façon automatique au fil du temps ces solutions pour obtenir une solution finale de concentration croissante) dans la cartouche ; les molécules d'hémoglobine sont alors séparées en fonction de leur interaction ionique avec le matériau contenu dans la cartouche. Les molécules d'hémoglobine séparées traversent ensuite la cellule à circulation du photomètre filtre où sont mesurés les changements d'absorbance à 415 nm.

Le logiciel D-10 intègre les données brutes recueillies lors de chaque analyse. Un étalonnage à deux niveaux est employé pour déterminer les concentrations des différents types d'Hb recherchés. Un compte-rendu d'analyse et un chromatogramme sont générés pour chaque échantillon. La surface de l'A1c est calculée à l'aide d'un algorithme gaussien exponentiellement modifié (EMG) qui permet d'exclure la surface des pics dus à l'A1c labile et à l'hémoglobine carbamylée de la surface du pic A1c.

Prélèvement et manipulation des échantillons

Type d'échantillon

On utilise le Sang total.

Précautions relatives au prélèvement des échantillons

Comme toute substance d'origine humaine les échantillons de sang doivent être manipulés en appliquant les procédures de biosécurité d'usage.

Les échantillons de sang total doivent être recueillis dans un tube sous vide contenant de l'EDTA, mais nous avons utilisé sans problème des cryo-tubes sans anticoagulant.

Conservation des échantillons

Les échantillons de sang total peuvent être conservés jusqu'à 4 jours entre 2 et 8 °C, et à -4°C si l'échantillon ne peut être traité avant une semaine.

Préparation des échantillons

Porter les tubes d'échantillons à température ambiante (entre 15 et 30 °C) avant l'essai. Les échantillons sont stables à température ambiante pendant 1 jour. Aucune préparation particulière des échantillons n'est nécessaire. Il n'est pas nécessaire d'agiter les tubes avant le chargement. Les tubes d'échantillons sont placés dans le portoir à échantillons du D-10 puis mis dans le système D-10.

S'assurer que les codes-barres sur les échantillons sont tournés vers l'arrière de l'appareil. Utiliser des adaptateurs spéciaux pour les tubes de 12, 13 et 14 mm de diamètre. Retirer tous les adaptateurs pour les tubes de 16 mm de diamètre. Les tubes dont la hauteur est comprise entre 75 mm et 100 mm peuvent être utilisés. Si l'échantillon se trouve dans un tube de taille ou de type anormal ou si le tube contient moins de 2,0 mL d'échantillon, une prédilution est nécessaire. Pour prédiluer, pipeter 1,5 mL de solution de lavage/dilution dans un microtube de 1,5 mL étiqueté puis ajouter 5 µL de l'échantillon de sang total. Boucher le tube et bien mélanger. Utiliser un adaptateur pour les microtubes de 1,5 mL.

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

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

Matériel et réactifs:

• Matériel

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

• Réactifs

- Le Tris-HCl, pH 8.5
- KCl
- Betaine (Sigma)
- dNTP (ATP, GTP, TTP, CTP)
- Taq polymerase
- Les Amorces:
 - $\alpha 2/3.7F = 5\text{'-CCCCTCGCCA AGTCCACC C-3'}$
 - $\alpha 2R = 5\text{'-AGACCAGGAAGGGCCGGTG-3'}$
 - $3.7/20.5R = 5\text{'- AAAGCACTCTAGGGTCCAG CG-3'}$
 - $A3.7F = 5\text{'-CTTTCCCTACCCAGAGCCAGGTT -3'}$
 - $3.7R1 = 5\text{'-CCACTTTCCCTCCTCCATCCC-3'}$
 - $\alpha 2R1 = 5\text{'-AGGAG GGCCCGTTGGGAGGC-3'}$

Procédure

Première amplification :

Il s'agit d'une PCR multiplex visant à amplifier en même temps dans la même réaction, le fragment d'ADN portant la délétion 3.7 et le fragment d'ADN normal sans délétion. Ces deux fragments ont en commun une amorce ($\alpha 2/3.7F$) la seconde amorce étant spécifique pour chaque fragment ($\alpha 2R$ pour le fragment normal et $3.7/20.5R$ pour le fragment délétère). Il consiste à amplifier approximativement 5ng d'ADN (2.5 µl d'ADN extrait avec le Qiagen) dans un volume réactionnel de 25 µl dont la composition est la suivante:

- 20 mmol/L de Tris-HCl pH 8,5

- 50 mmol/L KCl
- 1,5 mmol/L MgCl₂
- 1 mol/L de Betaine
- 0,3µmol/l de chaque amorce (α 2/3.7F, α 2R et 3.7/20.5R)
- 0,2mmol/L de chaque dNTP

- 1,25 unité de platinum Taq polymerase (Invitrogen)

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 spécifique pour le fragment normal (A3.7F et α 2R1) sont utilisé alors que dans le tube de PCR N°2 sont introduites les amorces spécifiques pour les gènes délétères (A3.7F et 3.7R1).

Dans chaque tube de PCR 1µl d'une dilution au 1 /20 est utilisé dans un volume réactionnel de 25 µl 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

Suivit de 35 cycle 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 Final 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'ethidium (~ 3µg/100ml) dans TBE 0,5X. La migration se fait à 200 volts pendant 30 minutes et 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 scénarios sont possibles :

- ✓ 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

- ✓ Le sujet est α -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

- ✓ Le sujet est α -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

9.1.4. Détection de la mutation 202 A/G responsable du déficit en G6PD par PCR

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

Principe

Le principe de l'extraction de l'ADN par le Kit QIAGEN est basé sur la libération, la cristallisation, le lavage et enfin la récupération de l'ADN.

Matériel et composition du Kit QIAamp® (QIAGEN)

Matériel :

- Ciseaux
- Gants stériles
- Pipettes de 20 μ l, 200 μ l, 1000 μ l
- Embouts de 20 μ l, 200 μ l, 1000 μ l
- Agitateur
- Chronomètre
- Congélateur
- Box de conservation
- Marqueur indélébile
- Plaque chauffante
- Racks pour les tubes
- Centrifugeuse
- Mouchoir
- Thermomètre
- Tube Eppendorf de 1,5ml

- Tube de 2ml
- Colonne Qiagen munie de filtre
- Confettis.

Réactifs :

- Kit QIAGEN
- Ethanol absolu (96-100%)

Composition du Kit QIAamp® (QIAGEN)

- Buffer ATL
- Buffer AL
- Buffer AW1
- Buffer AW2
- Buffer AE
- Protéinase K

Prélèvement

On recueille quelques gouttes de sang sur le confetti et laisse sécher à l'air libre à l'abri des poussières et du soleil.

Procédure

- Découper les spots de confettis imbibés de sang à l'aide de ciseaux et les introduire dans les tubes Eppendorf de 1,5 ml
- Ajouter 180 µl de Buffer ATL et incubé à 85°C pendant 10 minutes,
- Centrifuger brièvement et ajouter 20 µl de protéinase K, mélangé à l'aide d'un Vortex
- Incuber les tubes et leur contenu à 56°C pendant une heure
- Centrifuger brièvement les tubes pour faire descendre le liquide suspendu à leur paroi,
- Ajouter 200 µl de Buffer AL dans chaque tube et les agiter à l'aide d'un vortex
- Incuber les tubes à 70°C pendant 10 minutes,
- Centrifuger les tubes et ajouter 200 µl d'éthanol absolu (96-100%) dans chaque tube,
- Agiter les tubes à l'aide d'un vortex puis centrifuger brièvement les tubes
- Transférer doucement tout le contenu des tubes dans une colonne Qiagen munie de filtre

- Fermer la colonne et la centrifuger à 8000 tours par minute pendant une minute.
- Jeter le tube contenant le filtrat et placer la colonne sur un autre tube de 2 ml
- Mettre 500 µl de Buffer AW1 dilué avec de l'éthanol (19 ml de Buffer AW1 plus 25 ml de l'éthanol) dans la colonne,
- Centrifuger à 8000 tours par minute pendant une minute,
- Jeter le tube contenant le filtrat et placer la colonne sur un autre tube de 2 ml
- Mettre 500 µl de Buffer AW2 dilué avec de l'éthanol (13 ml de Buffer AW2 plus 30 ml de l'éthanol) dans la colonne,
- Centrifuger à 14000 tours par minute pendant 3 minutes.
- Jeter le tube contenant le filtrat et placer la colonne sur un tube eppendorf 1,5 ml.
- Mettre 160 µl de Buffer AE dans la colonne et incubé à la température ambiante de la salle pendant une minute,
- Centrifuger à 8000 tours par minute pendant une minute,
- Jeter la colonne et garder le filtrat contenu dans le tube eppendorf 1.5 ml à + 4°C (Ce filtrat contient l'ADN extrait et purifié)

9.1.4.1. Amplification de l'exon 4 du gène de la G6PD par PCR

Principe

Le principe consiste à faire le diagnostic de la mutation ponctuelle au niveau du gène de la G 6PD par une PCR nichée. Au cours de cette technique, le produit issu d'une première PCR est de nouveau amplifié à l'aide d'un second couple d'amorce qui s'hybride à une partie interne (nichée) de la séquence amplifiée.

En mélangeant le couple d'amorce avec l'ADN de l'homme dans des conditions d'hybridation, elles se positionnent en face de leurs séquences complémentaires respectives. Puis en faisant agir une ADN polymérase (Taq polymérase), chaque amorce est allongée dans le sens 5'=>3' d'une séquence exactement complémentaire du brin recopié.

Matériel et réactifs :

Matériel :

- Gants stériles
- Tubes de 0,2ml, 1,5ml,
- Pipettes de 2µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl
- Embouts de 2 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl

- Marqueur indélébile
- Chambre à PCR
- Racks pour les tubes
- Thermocycler
- Réfrigérateur

Réactifs :

Les amorces de la première amplification

-A2 : GTCTTCTGGGTCAGGGAT

-B2 : GGAGAAAGCTCTCTCTCC

Les amorces de la deuxième amplification

-NA4: CCTGTTCCCTCTGCCACA

-NB4: GGGGGTCTCAAGAAGTAC

-Platinum super Mix

Procédure de la PCR :

Il s'agit d'une PCR en deux temps où le produit de la première réaction est amplifié dans un deuxième temps.

- ✓ Déterminer le nombre N d'échantillon à traiter.
- ✓ Prendre un tube Eppendorf 1,5 ml.
- ✓ Mettre (N+1) x 22,5 µl de Platinum supermix.
- ✓ Ajouter (N+1) x 0,1 µl de chacun des amorces **A2** et **B2** pour la première amplification ou **NA4** et **NB4** pour la deuxième amplification.
- ✓ Bien mélanger.
- ✓ Distribuer ce mélange dans les tubes PCR 0,2 ml déjà identifié en raison de 22,7 µl de mélange par tube PCR.

- ✓ Mettre dans chacun des tubes PCR 2,5 µl d'ADN de l'échantillon correspondant pour la première amplification (1µl du produit de la première amplification de l'échantillon pour la deuxième amplification).

- ✓ Placer les tubes PCR dans la machine de PCR et mettre en marche le programme A

(Dénaturation initial 95°C pendant 3 min, 45 cycles de : 95°C pendant 30 secondes, 60°C pendant 45 seconde, 72°C pendant 1 min. Extension final 72 °c pendant 5 min) pour la première amplification et le programme B Dénaturation initial 95°C pendant 3 min, 35 cycles de : 95°C pendant 30 secondes, 60°C pendant 45 seconde, 72°C pendant 1 min. Extension final 72 °c pendant 5 min) pour la deuxième amplification.

Programme de la première amplification :

- Dénaturation initiale à 95°C pendant 2 minutes
- Puis 45 cycles de :
- Dénaturation à 95°C pendant 30 secondes
- Hybridation à 60°C pendant 45 secondes
- Extension à 72°C pendant 1 minute
- Extension finale à 74°C pendant 5 minutes
- Conservation à + 4°C pendant un temps indéterminé

Programme de la deuxième amplification :

- Dénaturation initiale à 94°C pendant 2 minutes
- Puis 45 cycles de :
- Dénaturation à 95°C pendant 30 secondes
- Hybridation à 60°C pendant 1 minute
- Extension à 72°C pendant 45 secondes
- Extension finale à 74°C pendant 5 minutes
- Conservation à + 4°C pendant un temps indéterminé

9.1.4.2. Recherche de la mutation 202 G A par digestion enzymatique

Matériel et Réactifs :

Matériel :

- Tube Eppendorf
- Tubes PCR
- Bain marie
- Pipettes de 2µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl
- Embouts de 2 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl

Réactifs :

- Eau pour biologie moléculaire
- Solution de BSA 10X
- Solution de buffer K 10K
- Enzyme Hsp92II

Procédure de la digestion enzymatique

- Déterminer le nombre N d'échantillon à traiter,
- Mettre Nx13 µl d'eau pour Biologie moléculaire dans un tube eppendorf 1,5 ml,
- Ajouter Nx3 µl de la solution buffer K 10X,
- Ajouter Nx3 µl de la solution de BSA 10X,
- Ajouter Nx1 µl de l'enzyme Hsp92II,
- Bien mélanger et distribuer 20 µl de ce mélange sur chacun des produits de la deuxième amplification dans les tubes PCR,
- Incuber l'ensemble à 37°C pendant au moins 2 heures.

Révélation et interprétation

On utilise un gel d'agarose 1,5% au bromure d'éthidium (**3ml/100ml**)

❖ Préparation du gel

Matériel :

- Balance
- Erlenmeyer
- Moule
- Micro onde
- Tube 100 ml
- Pipettes de 10 µl,
- Embouts de 10 µl
- Peignes pour gel

Réactifs :

- Agarose ultra pure GIBCO BRL
- Solution de Bromure d'Ethidium (Sodium)
- TBE 0,5X

Procédure :

- Peser 1,5 g de poudre d'agarose et le mettre dans une fiole,
- Ajouter 100 ml de solution de TBE 0,5X,
- Bouillir dans le micro onde pendant 3 minutes,
- Laisser le refroidir un peu puis ajouter 3 µl de bromure d'Ethidium,
- Couler le gel dans une moule mise en place à cet effet,
- Laisser le gel se refroidir et prendre en masse.

❖ **La migration :**

Matériel :

- Bac de migration
- Appareil photo UV
- Film polaroid
- Parafilm
- Générateur
- Source de lumière UV

Réactifs :

- TBE 0,5X
- Dye (buffer de chargement)
- Marqueur de poids moléculaire

Procédure :

- Placer le gel préparé dans le bac à migration contenant la solution de TBE 0.5X (la solution de TBE doit submerger le gel)
- Mélanger 10 µl du produit de la digestion avec 3 µl du buffer de chargement (dye)
- Mettre ces mélanges dans les puits du gel
- Faire la migration pendant 25 minutes à 500 mA sous un voltage constant de 200 V
- Voir les bandes d'ADN à la lumière UV
- Faire la photo du gel à l'aide d'un camera polaroid.
- Numéroté les bandes.

Interprétation de la photographie

Après digestion, les allèles mutés sont coupés en deux bandes de petite taille (environ 100 à 200 bp) alors que les allèles normaux ont une taille plus grande d'environ 300 bp.

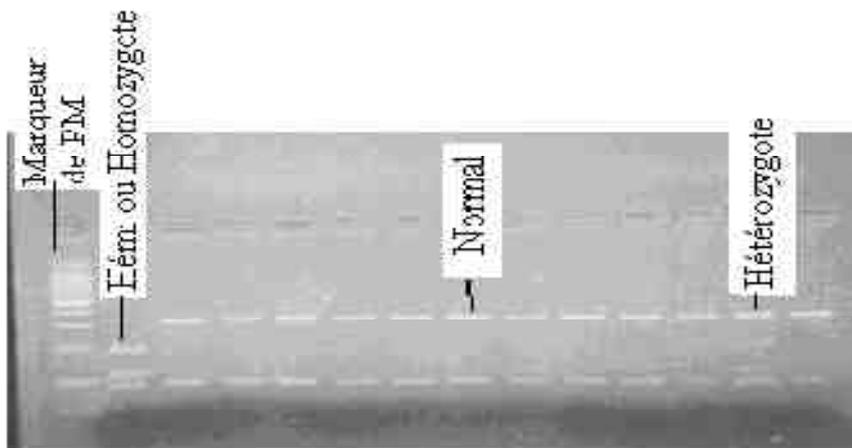


Figure 7: Photographie d'une bande d'ADN de la G6PD après digestion

9.1.5. La goutte épaisse

La **goutte** épaisse est une technique de concentration des hématies en vue de la recherche de parasites du **paludisme** dans le sang. Elle a été mise au point par **Ronald Ross en 1903** sur les constatations suivantes : les parasites adhèrent au stroma de l'hématie et un frottis épais de sang est opacifié par l'hémoglobine et non pas les stromas. Or il est aisé de chasser l'hémoglobine tout en conservant les stromas.

La disparition de la morphologie des hématies, des granulations de Schuffner ou des taches de Maurer et les modifications de formes des parasites font que le diagnostic d'espèce plasmodiale est plus difficile que sur un frottis mince : « il est nécessaire que le technicien se familiarise lui-même avec l'aspect des parasites dans ce type de préparation », c'est une méthode simple et excellente de concentration des parasites sanguins, du moins pour des laborantins qui la pratiquent rarement. Aussi conseillons-nous aux techniciens qui n'ont pas l'occasion de la pratiquer couramment de lui préférer le frottis mince, ou, au minimum, de toujours lui adjoindre un frottis mince.

Le sang recueilli sur anticoagulant donne souvent de mauvaises gouttes épaisses :

- **mauvaise adhérence** : la goutte épaisse se décolle à la coloration. Il faut laisser sécher la préparation pendant un temps prolongé ou la sécher à 37°C pendant 1-2 heures, ou par un autre procédé.
- **Mauvaise déshémoglobinisation** : il reste une grande partie du stroma des hématies qui se colore et qui gêne ainsi la lecture.
- **Défibriner** : pour cela, avec la pointe d'un vaccinostyle (ou mieux le coin d'une autre lame), posé au milieu de la goutte, on tourne régulièrement tout en étalant de façon homogène le sang, en grattant un peu la surface de verre pour favoriser l'adhérence, pendant une à deux minutes. On s'arrête avant que le sang ne commence à sécher afin d'obtenir un disque d'épaisseur uniforme de 1 à 1,5 cm de diamètre (selon la grosseur de la goutte de sang initiale).
- **Laisser sécher à plat à l'abri de la poussière et des mouches** (sous un couvercle de boîte de pétri par exemple) 24 heures environ ou à l'étuve à 37°C, une heure au moins. L'épaisseur d'une goutte épaisse est satisfaisante quand on peut juste lire un texte imprimé au travers.

- Ne pas fixer, ni à la chaleur, ni à l'alcool la goutte épaisse !

Matériel

- 2 lames porte-objet propres et bien dégraissées
- Vaccinostyle stérile (ne pas utiliser d'aiguilles hypodermiques ni de vaccinostyles simplement trempés dans l'alcool)
- Alcool 70°
- Colorant de Giemsa pur
- Coton hydrophile sec
- Eau tamponnée, pH= 7,2
- Boîte à lames ou couvercle pour protéger les frottis pendant le séchage
- Chiffon de coton propre et ne peluchant pas
- Crayon noir à mine grasse ou marqueur indélébile
- Stylo à bille
- Registre ou formulaire de notification

Lieu du prélèvement

A l'extrémité d'un doigt gauche (en général 3^e doigt après le pouce), sur la face latérale du doigt sain.

Au lobe de l'oreille, après l'avoir réchauffé entre les doigts.

Au talon ou au gros orteil chez le nourrisson, après l'avoir réchauffé.

Éviter le pouce et l'index dans les cas lors du prélèvement.

Technique

Après avoir noté les renseignements relatifs au patient sur le formulaire ou le registre approprié, ainsi que l'identité du patient sur la lame, réaliser les frottis sanguins comme suit :

1. En tenant la main gauche du malade la paume tournée vers le haut, choisir le troisième doigt après le pouce (le gros orteil peut être utilisé chez les nourrissons. Le pouce ne doit jamais être utilisé chez les adultes ou les enfants).
2. Avec un tampon de coton légèrement imbibé d'alcool, nettoyer le doigt en appuyant fermement pour enlever la saleté et la graisse du bout du doigt.
3. Avec le chiffon de coton propre, essuyer le doigt en appuyant fermement pour stimuler la circulation du sang.

4. Avec un vaccinostyle stérile, piquer le bout du doigt d'un seul geste.
5. Essuyer la première goutte de sang avec du coton sec. S'assurer qu'il ne reste pas de fibres de coton sur le doigt, qui pourraient se mélanger au sang.
6. En procédant rapidement et en tenant les lames propres uniquement par les bords, recueillir le sang comme suit :
7. Appuyer doucement sur le doigt et recueillir une petite goutte de sang au milieu de la lame (cf. figure 12).
8. Essuyer le sang restant sur le bout du doigt avec un tampon de coton.
9. Tenir la lame supérieure par les bords.
10. Placer le coin de l'autre lame au centre de la goutte de sang.
11. Étendre légèrement la surface de la goutte par des mouvements spiralés appuyés de la lame (cf. figure 12).
12. Assurer cette défibrination mécanique pendant quelques secondes et étendre la goutte sur environ 1 cm de diamètre.
13. Laisser la préparation à plat, à l'abri de la poussière, de la chaleur et des mouches pendant deux heures en zone sahélienne.

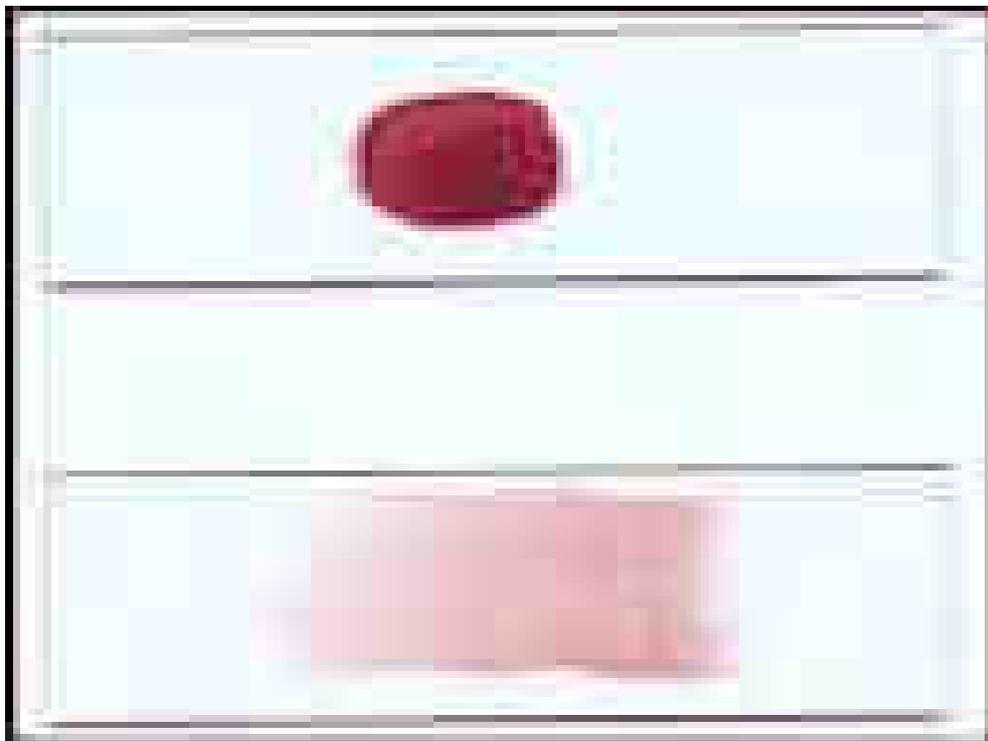
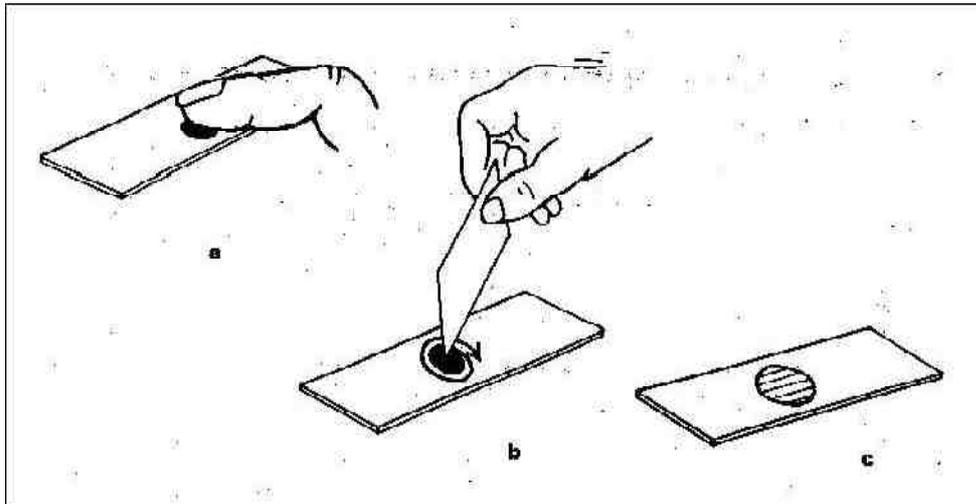


Figure 8: Technique de la goutte épaisse et du frottis mince

Source : rph.wa.gov.au, consulté le 18/04/12

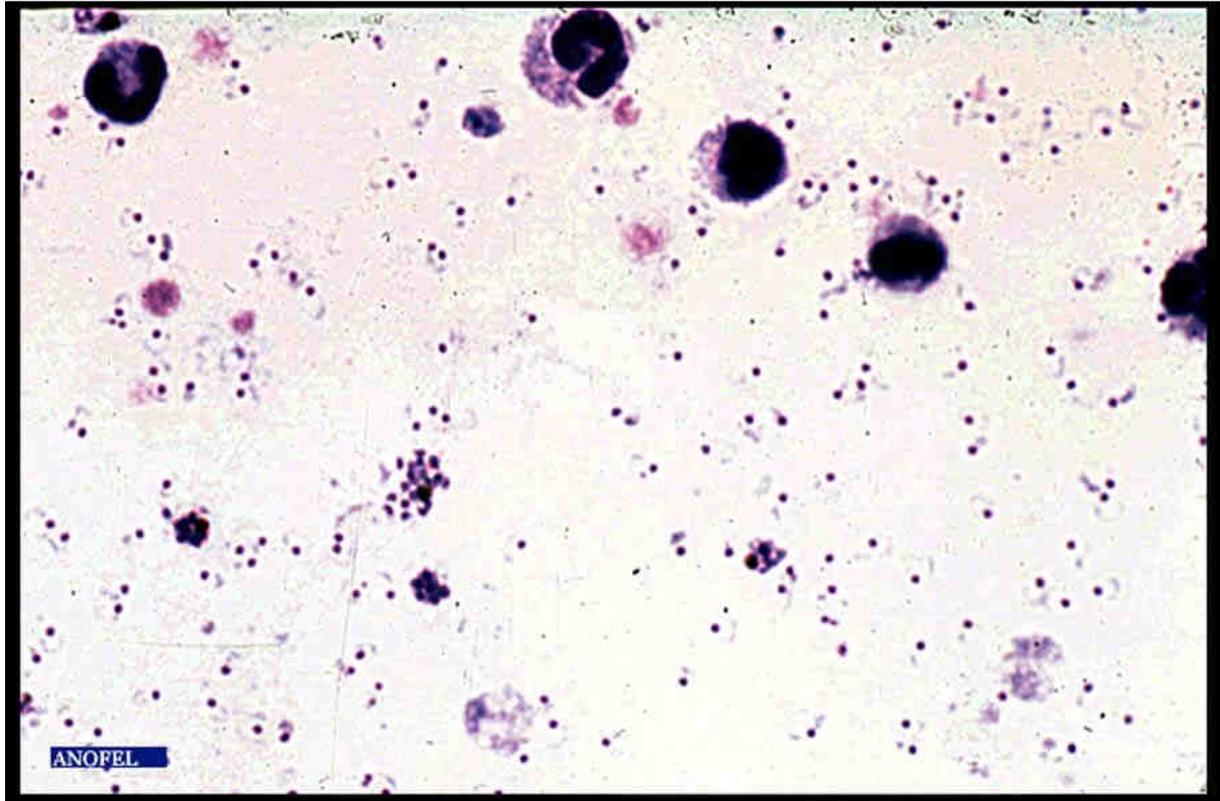


Figure 9: Photo d'une lame parasitée au microscope

Source : umvf.univ-nantes.fr, consulté le 18/04/12

Avantages de la goutte épaisse

Un frottis moyen correspond à un volume de sang d'environ 1 μ l, alors qu'une goutte épaisse correspond à un volume de 3 à 5 μ l. Cela aboutit à une concentration des parasites : il y a de 10 à 20 fois (15 en moyenne) plus de parasites par champ microscopique. La réalisation est rapide et ne nécessite pas une longue formation.

Inconvénients de la goutte épaisse

La morphologie des *Plasmodium* est modifiée et les hématies, dont la morphologie est très utile au diagnostic d'espèce sont hémolysées. Les taches de Maurer, les ponctuations de Ziemann ne sont pas visibles. Les granulations de Schuffner le sont inconstamment. Les artéfacts sont fréquents. Le diagnostic d'espèce de *Plasmodium* est donc plus difficile que sur frottis mince, et à plus forte raison pour des microscopistes dont ce n'est pas le travail quotidien.

Lorsque l'on colore les lames de plusieurs malades dans un même bac il y a un risque de contamination des gouttes épaisses négatives à partir de celles fortement parasitées.

La numération qui doit être quotidienne jusqu'à disparition complète de la parasitémie permet donc de vérifier l'efficacité du traitement, surtout dans les formes sévères et éventuellement de préciser le type de résistance aux antipaludéens.

Sous traitement, la morphologie des *Plasmodium* s'altère, en particulier avec la chloroquine.

Causes d'erreur

Différents éléments peuvent prêter à confusion avec des *Plasmodium* :

- les plaquettes, c'est la cause la plus fréquente. Il peut s'agir d'une plaquette posée sur une hématie, et qui est confondue avec un trophozoïte, ou bien un amas de plaquettes pris pour un corps en rosace.
- Les réticulocytes peuvent être confondus avec des hématies contenant des granulations de Schuffner.
- Les corps de Jolly dans les hématies en cas d'anémie
- Les algues microscopiques provenant de l'eau ayant servi à la coloration, surtout l'eau du robinet.

Évaluation d'une goutte épaisse correctement réalisée

- a) La goutte de sang doit être étalée au milieu de la lame sans toucher les bordures latérales de la lame.
- b) L'étalement doit être uniformément reparti sur la lame, sans zone de densité élevée.
- c) On doit pouvoir lire un texte normal à travers la goutte épaisse. Si la goutte est trop épaisse, elle risque de se détacher au moment de la coloration de la lame (1d).

9.1.6. Technique de coloration de Giemsa : méthode courante

La coloration de Giemsa est une méthode de coloration classique qui donne des résultats fiables, employée pour la coloration en routine des étalements sanguins confectionnés pour le diagnostic du paludisme. Toutefois, la qualité de ce colorant, en solution prête à l'emploi ou en poudre, varie avec l'origine du produit, et il est conseillé de se le procurer chez un fabricant connu. Il sera quand même nécessaire de vérifier la qualité du colorant en essayant chacun des lots après préparation, avant de colorer en routine un grand nombre de frottis.

Le colorant sera soumis à des essais pour déterminer la dilution optimale et le temps de coloration.

Toujours maintenir la bouteille bien fermée dans un endroit frais, à l'abri de la lumière solaire directe. Les bouteilles en verre blanc peuvent être recouvertes d'une enveloppe de papier noir épais pour les protéger de la lumière.

Formule

Giemsa en poudre 3,8g

Méthanol 250 ml

Glycérol 250 ml

La coloration des parasites du paludisme par le Giemsa nécessite un tampon phosphate ajusté très exactement à pH 7,2. Une fois le pH ajusté à 7,2 ; conserver dans un flacon bouché à l'émeri, de préférence en verre brun, dans un endroit frais, à l'abri de la lumière solaire directe.

On peut utiliser l'eau distillée ou désionisée ; à défaut d'eau distillée ou désionisée on peut employer de l'eau de pluie filtrée, de l'eau minérale ou même de l'eau du robinet. Actuellement, il existe des comprimés tampon (1 comprimé par litre d'eau) dans le commerce.

La solution se conserve quelques semaines mais il faut l'examiner périodiquement pour vérifier que des micro-organismes (bactéries, champignons) ne s'y développent pas : pour cela, agiter la solution ; si elle est trouble, la jeter.

➤ Frottis mince et goutte épaisse sur la même lame

Cette association est utile dans les études épidémiologiques. Pour une coloration optimale, les frottis minces doivent être faits sur des lames séparées et colorées avec des concentrations différentes et des temps de coloration différents. Il est souvent impossible de procéder ainsi, et les frottis minces et épais sont en général faits sur la même lame. Dans ce cas, il est primordial d'obtenir une bonne coloration du frottis épais. On obtient les meilleurs résultats lorsque les frottis sanguins ont séché toute une nuit.

Méthode pour 20 lames ou plus

- ✓ Fixer le frottis mince en le tapotant doucement avec un tampon de coton imbibé de méthanol, ou en le trempant dans un récipient de méthanol pendant quelques secondes.

Si le temps de fixation est trop long, il peut être difficile de mettre en évidence les granulations de Schüffner et les taches de Maurer. Pour que la déshémoglobination soit possible, le frottis épais ne doit pas être fixé ; il faut donc éviter de le mettre en contact avec du méthanol ou de la vapeur de méthanol.

- ✓ Mettre les lames dos à dos dans une cuve pour coloration.
- ✓ Préparer une solution de Giemsa à 3% dans de l'eau distillée ou désionisée tamponnée à pH 7,2 en quantité suffisante pour remplir le nombre de cuves utilisées. Bien mélanger le colorant.
- ✓ Verser doucement le colorant dans la cuve jusqu'à ce que les lames soient entièrement recouvertes
- ✓ Laisser colorer pendant 30-45 minutes, à l'abri de la lumière solaire et de la poussière.
- ✓ Verser doucement de l'eau propre dans la cuve pour évacuer l'écume irisée qui se trouve à la surface du colorant. On peut aussi immerger doucement la cuve entière dans un récipient rempli d'eau propre.
- ✓ Vider doucement le reste du colorant et rincer à nouveau dans de l'eau propre pendant quelques secondes. Vider l'eau.
- ✓ Enlever les lames une par une et les déposer dans un râtelier à lames pour les faire égoutter et sécher, la face portant le frottis vers le bas, en s'assurant que le frottis ne touche pas le râtelier.
- Evaluation d'une goutte épaisse correctement colorée

Aspect macroscopique :

Disque coloré en bleu au centre ou la goutte épaisse est plus épaisse et en rose à la périphérie.

Aspect microscopique :

Fond incolore ou rose pâle constitué par le stroma des hématies. Sur ce fond clair se détachent les éléments de 5 à 10 µm, violet bleu, qui sont les noyaux des leucocytes. Si ces noyaux n'ont pas été lysés par un séjour trop prolongé dans l'eau, on peut très bien reconnaître à quelles cellules ils appartiennent. En plus :

- a) Le fond doit être propre, exempt de débris, avec une couleur gris tacheté provenant des érythrocytes lysés.
- b) Les noyaux des leucocytes sont d'un beau violet foncé.

c) Les parasites du paludisme sont bien définis, avec une chromatine rouge foncé et un cytoplasme d'un bleu violet pâle. Dans les infections à *Plasmodium vivax* et à *P. ovale*, on peut voir un semis de granulations de Schüffner dans le fantôme de l'érythrocyte hôte, en particulier sur les bords du frottis.

Méthodes de numération des parasites du paludisme dans les gouttes épaisses

➤ Parasites par μl (= mm^3)

On trouvera ci-dessous une méthode pratique de précision suffisante. Elle consiste à dénombrer les parasites par μl de sang dans un frottis épais, par rapport à un nombre prédéterminé de leucocytes. On prend comme norme une moyenne de 7 500 leucocytes par μl . Malgré l'imprécision due aux variations du nombre de leucocytes parmi des personnes en bonne santé et aux variations encore plus grandes observées chez les malades, cette valeur permet des comparaisons valables. Avant de commencer à compter, on examinera l'équivalent de 0,25 μl de sang (environ 100 champs, avec un oculaire 7 X (ou 10X) et un objectif à immersion dans l'huile 100X) dans le frottis épais pour déterminer l'espèce de parasite et les stades présents. Ensuite, on appliquera la méthode suivante qui convient pour les frottis positifs :

- ✓ Un compteur manuel à 4 chiffres nécessaire pour dénombrer séparément les parasites et les leucocytes.
- ✓ Si, après avoir compté 300 leucocytes, on a identifié 10 parasites ou plus, noter les résultats sur le formulaire de notification, en indiquant le nombre de parasites par 300 leucocytes.
- ✓ Si, après avoir compté 300 leucocytes, on a identifié neuf parasites ou moins, continuer de compter jusqu'à 500 leucocytes et noter le nombre de parasites par 500 leucocytes.
- ✓ Dans chaque cas, le nombre de parasites par rapport au nombre de leucocytes peut être converti en nombre de parasites par μl par la simple formule mathématique suivante :

Nombre de parasites X 7 500

----- = parasites par μ l

Nombre de leucocytes

En d'autres termes, si 300 leucocytes sont comptés, le nombre de parasites est à multiplier par 25 et si 500 leucocytes sont comptés, le nombre de parasites est à multiplier par 15.

- ✓ Il est d'usage courant de compter toutes les espèces présentes, en comptant ensemble les formes sexuées. Il arrive qu'on compte séparément les gamétocytes de *Plasmodium falciparum* mais, dans ce cas, ils doivent rester inclus dans la numération parasitaire générale. Il est rarement possible de séparer les gamétocytes de *Plasmodium vivax* ou de *P. malariae* des formes asexuées avec une précision suffisante pour qu'une numération gamétocytaire soit justifiée.

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et 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 consentirais à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des 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!

