

**Ministère des Enseignements Secondaire,
Supérieur et de la Recherche Scientifique**

République du Mali

Un Peuple

Un But

Une foi



UNIVERSITE DE BAMAKO

**Faculté de Médecine de Pharmacie et
d'Odonto-Stomatologie**



Année Universitaire 2007/2008

Thèse N°...../2008

TITRE :

**MECANISMES DE PROTECTION DU DEFICIT EN G6PD(A) CONTRE
LES FORMES GRAVES DE PALUDISME A *P. FALCIPARUM* :
RESULTATS D'ETUDES PRELIMINAIRES *IN VITRO*.**

THESE

Présentée et soutenue publiquement le.... /.../.....à.....heures
Devant la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie
De l'Université de Bamako

**Par Mr Anou Moïse SOMBORO
Pour obtenir le grade de
Docteur en Pharmacie (Diplôme d'Etat)**

Jury :

Président : Professeur Moussa HARAMA

Membre : Docteur Alassane DICKO

Co-directeur : Docteur Aldiouma GUINDO

Directeur : Professeur Dapa A. DIALLO

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

ANNEE UNIVERSITAIRE 2007-2008

ADMINISTRATION

DOYEN:

Anatole TOUNKARA

Professeur

1^{er} ASSESSEUR:

Drissa DIALLO

MAITRE DE CONFERENCES AGREGÉ

2^{ème} ASSESSEUR:

Sékou SIDIBE

MAITRE DE CONFERENCES

SECRETAIRE PRINCIPAL:

Yénimégué Albert DEMBELE

Professeur

AGENT COMPTABLE:

Mme COULIBALY Fatoumata TALL

CONTROLEUR DES FINANCES

PROFESSEURS HONORAIRES

Mr Alou BA

Ophthalmologie

Mr Bocar SALL

Orthopédie – Traumatologie - Secourisme

Mr Yaya FOFANA

Hématologie

Mr Mamadou L. TRAORE

Chirurgie Générale

Mr Balla COULIBALY

Pédiatrie

Mr Mamadou DEMBELE

Chirurgie Générale

Mr Mamadou KOUMARE

Pharmacognosie

Mr Ali Nouhoum DIALLO

Médecine interne

Mr Aly GUINDO

Gastro-entérologie

Mr Mamadou M KEITA

Pédiatrie

Mr Siné BAYO

Anatomie-Pathologie-Histoembryologie

Mr Sidi Yaya SIMAGA

Santé Publique

Mr Abdoulaye Ag RHALY

Médecine interne

Mr Boulkassoum HAÏDARA

Législation

Mr Boubacar Sidiki CISSE

Toxicologie

Mr Massa SANOGO

Chimie Analytique

LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT PAR D.E.R. & PAR GRADE

▪ **D.E.R. CHIRURGIE ET SPECIALITES CHIRURGICALES**

1. PROFESSEURS

Mr Abdel Karim KOUMARE

Chirurgie Générale

Mr Sambou SOUMARE

Chirurgie Générale

Mr Abdou Alassane TOURE

Orthopédie - Traumatologie

Mr Kalilou OUATTARA

Urologie

Mr Amadou DOLO

Gynéco Obstétrique

Mr Alhousseini Ag MOHAMED

ORL

Mme SY Assitan SOW

Gynéco-Obstétrique

Mr Salif DIAKITE

Gynéco-Obstétrique

Mr Abdoulaye DIALLO

Anesthésie-Réanimation

Mr Djibril Sangaré

Chirurgie Générale, Chef de D.E.R

Mr Abdel Karim Traoré Dit Diop

Chirurgie Générale

2. MAÎTRES DE CONFERENCES

Mr Abdoulaye DIALLO	Ophthalmologie
Mr Gangaly DIALLO	Chirurgie Viscérale
Mr Mamadou TRAORE	Gynéco-Obstétrique
Mr Filifing SISSOKO	Chirurgie Générale
Mr Sekou SIDIBE	Orthopédie-Traumatologie
Mr Abdoulaye DIALLO	Anesthésie-Réanimation
Mr Tieman COULIBALY	Orthopédie-Traumatologie
Mme TRAORE J THOMAS	Ophthalmologie
Mr Mamadou L. DIOMBANA	Stomatologie
Mme DIALLO Fatimata S. DIABATE	Gynéco-Obstétrique
Mr Nouhoum ONGOÏBA	Anatomie & Chirurgie Générale
Mr Sadio YENA	Chirurgie Générale
Mr Youssouf COULIBALY	Anesthésie-Réanimation

3. MAÎTRES ASSISTANTS

Mr Issa DIARRA	Gynéco-Obstétrique
Mr Samba Karim TIMBO	ORL
Mme TOGOLA Fanta KONIPO	ORL
Mr Zimogo Zié SANOGO	Chirurgie Générale
Mr Zanafon OUATTARA	Urologie
Mr Adama SANGARE	Orthopédie- Traumatologie
Mr Sanoussi BAMANI	Ophthalmologie
Mr Doulaye SACKO	Ophthalmologie
Mr Ibrahim ALWATA	Orthopédie - Traumatologie
Mr Lamine TRAORE	Ophthalmologie
Mr Mady MAKALOU	Orthopédie/ Traumatologie
Mr Aly TEMBELY	Urologie
Mr Niani MOUNKORO	Gynécologie/ Obstétrique
Mme Djénéba DOUMBIA	Anesthésie / Réanimation
Mr Tiémoko D. COULIBALY	Odontologie
Mr Souleymane TOGORA	Odontologie
Mr Mohamed KEITA	ORL
Mr Bouraïma MAIGA	Gynécologie/ Obstétrique
Mr Youssouf SOW	Chirurgie Générale
Mr Djibo Mahamane DIANGO	Anesthésie-réanimation
Mr Moustapha TOURE	Gynécologie

▪ D.E.R. DE SCIENCES FONDAMENTALES

1. PROFESSEURS

Mr Daouda DIALLO	Chimie Générale & Minérale
Mr Amadou DIALLO	Biologie
Mr Moussa HARAMA	Chimie Organique
Mr Ogobara DOUMBO	Parasitologie-Mycologie
Mr Yénimégué Albert DEMBELE	Chimie Organique
Mr Anatole TOUNKARA	Immunologie - Chef de D.E.R.
Mr Bakary M. CISSE	Biochimie
Mr Abdourahamane S. MAÏGA	Parasitologie
Mr Adama DIARRA	Physiologie
Mr Mamadou Koné	Physiologie

2. MAÎTRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Amadou TOURE	Histoembryologie
-----------------	------------------

Mr Flabou BOUGOUDOGO	Bactériologie – Virologie
Mr Amagana DOLO	Parasitologie
Mr Mahamadou CISSE	Biologie
Mr Sékou F. M. TRAORE	Entomologie médicale
Mr Abdoulaye DABO	Malacologie – Biologie Animale
Mr Ibrahim I. MAÏGA	Bactériologie – Virologie

3. MAÎTRES ASSISTANTS

Mr Moussa Issa DIARRA	Biophysique
Mr Kaourou DOUCOURE	Biologie
Mr Bouréma KOURIBA	Immunologie
Mr Souleymane DIALLO	Bactériologie/ Virologie
Mr Cheick Bougadari TRAORE	Anatomie pathologie
Mr Lassana DOUMBIA	Chimie Organique
Mr Mounirou Baby	Hématologie
Mr Mahamadou A Théra	Parasitologie
Mr Gimogo DOLO	Entomologie Moléculaire Médicale
Mr Mouctar DIALLO	Biologie Parasitologie
Mr Abdoulaye TOURE	Entomologie-Moléculaire Médicale
Mr Boubacar Traoré	Parasitologie Mycologie

4. ASSISTANTS

Mr Mangara M. BAGAYOKO	Entomologie-Moléculaire Médicale
Mr Djbril SANGARE	Entomologie-Moléculaire Médicale
Mr Bocary Y Sacko	Biochimie
Mr Mamadou Ba	Biologie/ Parasitologie entomologie médicale
Mr Moussa FANE	Parasitologie Entomologie

▪ D.E.R. DE MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES

1. PROFESSEURS

Mr Mamadou K. TOURE	Cardiologie
Mr Mahamane MAÏGA	Néphrologie
Mr Baba KOUMARE	Psychiatrie- Chef de D.E.R.
Mr Moussa TRAORE	Neurologie
Mr Issa TRAORE	Radiologie
Mr Hamar A. TRAORE	Médecine Interne
Mr Dapa Aly DIALLO	Hématologie
Mr Moussa Y. MAÏGA	Gastro-entérologie-Hépatologie
Mr Somita KEITA	Dermato-Léprologie
Mr Boubacar DIALLO	Cardiologie
Mr Toumani SIDIBE	Pédiatrie

2. MAÎTRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Bah KEITA	Pneumo-Phtisiologie
Mr Abdel Kader TRAORE	Médecine Interne
Mr Siaka SIDIBE	Radiologie
Mr Mamadou DEMBELE	Médecine Interne
Mr Mamady KANE	Radiologie
Mr Saharé FONGORO	Néphrologie
Mr Bakoroba COULIBALY	Psychiatrie
Mr Bou DIAKITE	Psychiatrie
Mr Bougouzié SANOGO	Gastro-entérologie
Mme SIDIBE Assa TRAORE	Endocrinologie

Mr Adama D KEITA	Radiologie
3. MAITRES ASSISTANTS	
Mme TRAORE Mariam SYLLA	Pédiatrie
Mr Adama D. KEITA	Radiologie
Mme Habibatou DIAWARA	Dermatologie
Mr Daouda K Minta	Maladies Infectieuses
Mr Kassoum SANOGO	Cardiologie
Mr Seydou DIAKITE	Cardiologie
Mr Arouna TOGORA	Psychiatrie
Mme Diarra Assétou SOUCKO	Médecine interne
Mr Boubacar TOGO	Pédiatrie
Mr Mahamadou TOURE	Radiologie
Mr Idrissa A. CISSE	Dermatologie
Mr Mamadou B. DIARRA	Cardiologie
Mr Anselme KONATE	Hépto-gastro-entérologie
Mr Moussa T. DIARRA	Hépto-gastro-entérologie
Mr Souleymane DIALLO	Pneumologie
Mr Souleymane COULIBALY	Psychologie
Mr Sounkalo DAO	Maladies infectieuses
Mr Cheick Oumar Guinto	Neurologie

▪ **D.E.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

1. PROFESSEURS

Mr Gaoussou KANOUTE	Chimie Analytique Chef de D.E.R
Mr Ousmane DOUMBIA	Pharmacie Chimique
Mr Elimane MARIKO	Pharmacologie

2. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Drissa DIALLO	Matières médicales
Mr Alou KEITA	Galénique
Mr Benoît Yaranga KOUMARE	Chimie analytique
Mr Ababacar I. MAÏGA	Toxicologie

3. MAÎTRES ASSISTANTS

Mr Yaya KANE	Galénique
Mne Rokia SANOGO	Pharmacognosie
Mr Saibou MAIGA	Législation
Mr Ousmane KOITA	Parasitologie Moléculaire
Mr Yaya COULIBALY	Législation

▪ **D.E.R. SANTE PUBLIQUE**

1. PROFESSEUR

Mr Sanoussi KONATE	Santé Publique, Chef de D.E.R
--------------------	--------------------------------------

2. MAÎTRE DE CONFERENCES

Mr Moussa A. MAÏGA	Santé Publique
--------------------	----------------

3. MAÎTRES ASSISTANTS

Mr Bocar G. TOURE	Santé Publique
Mr Adama DIAWARA	Santé Publique
Mr Hamadoun Aly SANGHO	Santé Publique
Mr Massambou SACKO	Santé Publique

Mr Alassane A. DICKO	Santé Publique
Mr Mamadou Souncalo Traoré	Santé Publique
Mr Samba DIOP	Anthropologie Médicale
Mr Seydou DOUMBIA	Epidémiologie
Mr Akory AG IKNANE	Santé Publique

4. ASSISTANTS

Mr Oumar THIERO	Biostatistique
Mr Seydou Diarra	Anthropologie Médicale

▪ CHARGES DE COURS & ENSEIGNANTS VACATAIRES

Mr N'Golo DIARRA	Botanique
Mr Bouba DIARRA	Bactériologie
Mr Salikou SANOGO	Physique
Mr Boubacar KANTE	Galénique
Mr Souleymane GUINDO	Gestion
Mme DEMBELE Sira DIARRA	Mathématiques
Mr Modibo DIARRA	Nutrition
Mme MAÏGA Fatoumata SOKONA	Hygiène du Milieu
Mr Mahamadou TRAORE	Génétique
Mr Yaya COULIBALY	Législation
Mr Lassine SIDIBE	Chimie-Organique

▪ ENSEIGNANTS EN MISSION

Pr. Doudou BA	Bromatologie
Pr. Babacar FAYE	Pharmacodynamie
Pr. Eric PICHARD	Pathologie Infectieuse
Pr. Mounirou CISS	Hydrologie
Pr. Amadou Papa DIOP	Biochimie
Pr. Lamine GAYE	Physiologie

Je rends grâce au père tout puissant, au fils jésus christ et à l'esprit saint pour m'avoir donné la durée de vie, le courage et la mentalité nécessaire à la réalisation de ce travail. J'implore ton pardon Sainte Trinité pour toutes mes fautes commises et formule ici les vœux d'avoir longue vie, et guides mes pas tout au long de cette vie. Amen !

DEDICACES

Je dédie ce travail :

A mon père Jean-Marie SOMBORO : Ce travail est le tien, aussi modeste qu'il soit, il fut couronné par de longues années de labeur munies d'embûches. Tout cela grâce à ton investigation pour l'éducation, l'instruction, et la réussite de tes enfants. Tu nous as appris l'honnêteté, la persévérance, le courage et l'amour du prochain dans la vie et la rigueur au travail. Je ne saurai jamais littéralement traduire en mots tous les biens que je pense de toi Papa. Que le Seigneur t'accorde longue vie.

A ma Mère Elisabeth TOLOFOUDIE : Sur tes genoux j'y suis toujours, infatigable, j'ai trouvé auprès de toi amour, tendresse et compréhension, toujours soucieuse de notre bien être et de notre réussite, tu es restée à nos cotés avec tes conseils pendant les moments difficiles. Reçois ici maman, la profonde gratitude de ton cher Benjamin. Puisse Dieu t'accorder longue vie.

A mes frères et sœurs : Ebe Grégoire, Assa Geneviève, Yatendou Marie-Ange, Erè Jean, Erèsini Pascal, Antendou David, Enè Emmanuel. Cette thèse est un travail collectif auquel vous avez contribué. Le soutien fraternel dont j'ai bénéficié de votre part a été d'un appui inestimable pour la réalisation de ce travail. Puisse le Seigneur renforcer la solidarité au sein de la famille.

A Koundia Isaïe ARAMA et son épouse Monique SANGALA : Pour m'avoir supporté durant ce temps d'étude. Vos conseils, soutien morale et matériel n'ont jamais fait défaut. Merci et soyez assurés de ma sincère gratitude.

A la famille Louis SOMBORO et Laurent SOMBRO à Djikoroni para.

A la famille Albert SOMBORO à Ségou.

A la famille Casimir SOMBORO à Djikoroni para.

A la famille Moussa SOMBORO à Niamakoro.

A la famille Georges Anou SOMBORO à Kalaban.

REMERCIEMENT

Je remercie tous ceux et celles qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.

Je pense notamment :

A mes frères aînés : Dr Charles ARAMA, Dr Martin SOMBORO, Dr Bokary SOMBORO, Dr Honoré Anou SOMBORO, Dr Georges URO-OGON, Dr Pierre SODIO, Dr Jacques SOMBORO, Dr Dominique ARAMA, Dr Merepen Agnès GUINDO.

A mon ami Boureima GUINDO : Ce travail est aussi le tien. Présent à tout instant courtois et attentif tu m'as soutenu jusqu'aujourd'hui ; Que Dieu préserve toujours notre amitié.

Aux membres du groupe Q : Cheminons ensemble.

A mes camarades : Charles DARA, Paul BANOU, Luther SAGARA, Arnaud P. SURGOU, Karim GUINDO, Seydou ARAMA, Seydou CAMARA, Youssouf TIMBINE, Lazar BANOU, Lassana Nouhoum DIALLO, François d'assise DAOU, Domo TEMBELI, Assa Laurence SOMBORO, Fanta MAIGA, Edith KARAKODJO, Esther

COULIBALY, Claudine BELLO, Noëlie et Juliette MOUNKORO, Janette CISSE, Amité Roseline DACKOOU, Banzani Grégoire DACKOOU.

A mes cadets : Moïse ARAMA, Jules SANGALA, Jean-Paul SOMBORO, Seydou ARAMA Hamadi ARAMA, Moïse SANGALA, Blaise DJOUNDO, Ankobo Georges TOGO, Noël SOMBORO, Léon TOLOFOUDJE.

A Cecilia Patricia, Jacqueline ARAMA, Agnès DJOUNDO, Rachel DACKOOU.

A la sœur Rosalie SOMBORO.

A la famille RA.SE.RE de la FMPOS.

A la Jeunesse Ginna Dogon de la FMPOS.

A la communauté catholique du Point G.

A mes collègues du service : Sanoussy M. KONE, Siaka Issa DEMBELE, Lassana TRAORE, Kader DEMBELE.

A toute la population de Kangaba, Kela.

A tous les membres de l'équipe du projet KKMP : Dr Abdoulaye Katilé, Dr Karim TRAORE, Dr Blaise DACKOOU, Dr Seidina A S DIAKITE, Mr Issa DIALLO, Dr Sadou.

A mes aînés et collègues du MRTC/DEAP FMPOS : Dr Mamadou Coulibaly, Dr Souleymane DAMA, Dr Réunion SAYE, Antoine DARA, Mohamed Ag BARAIKA, Abdoulaye TAPILY, Moussa DIAKITE.

A tout le personnel du laboratoire d'hématologie et du DEAP/MRTC (FMPOS).

A nos partenaires du NIH (NIAID/US) Notamment, Pr Thomas Wellems, Dr Rick Fairhurst, Tatiana LOPERA.

A toute la promotion Ousmane DOUMBIA de 2001-2005 de la section Pharmacie de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'odontostomatologie

de l'Université de Bamako : Pour tout le temps passé ensemble, nous avons été plus des camarades de classe. Préservons ce qu'il y'a de précieux. Bon vent à nous tous.

A toute la promotion 1997 de l'école privée catholique de Bandiagara.

A tout le personnel de la F.M.P.O.S : Merci pour la qualité de l'enseignant et pour l'excellente formation que vous vous efforcez à nous donner malgré toutes les contraintes.

A tous les membres de l'association des jeunes Tomon (YUGO WèLè).

A tous les membres de l'association des étudiants ressortissant de la région de Mopti et sympathisants (AERMOS).

A tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à l'élaboration de ce travail, sachez que je ne vous oublierai pas et que je vous serai éternellement reconnaissant.

A notre Maître et Président du jury

Professeur Moussa HARAMA

- **Professeur titulaire de chimie organique,**
- **Professeur de chimie analytique qualitative,**
- **Responsable du laboratoire de chimie à la FMPOS**

En acceptant de présider ce jury de thèse, vous nous témoignez une fois de plus de votre grand engagement pour notre formation; nous en sommes très honorés.

Votre amour pour le travail bien fait et vos qualités humaines ont fait de vous un homme de science apprécié de tous.

Veillez cher Maître, recevoir ici l'expression de nos sincères remerciements.

A notre Maitre et Juge

Dr Alassane DICKO

- **Maitre assistant en Santé Publique à la Faculté de Médecine de Pharmacie et Odonto-Stomatologie (FMPOS) ;**
- **Chercheur au MRTC/DEAP/FMPOS ;**
- **Responsable de l'unité épidémiologique du DEAP.**

C'est un grand honneur pour nous de vous avoir comme membre de jury de ce travail. Nous avons été particulièrement impressionnés par la sympathie avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail.

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

A notre maître et Co-directeur de thèse

Dr Aldiouma GUINDO

- **Pharmacien PhD ;**
- **Assistant de recherche au MRTC ;**
- **Chef de l'unité des polymorphismes des globules rouges et paludisme ;**
- **Secrétaire général de la SOMAHO (Société Malienne d'Hématologie et Oncologie).**

C'est un grand honneur que vous nous avez fait en nous confiant ce travail. Les mots nous manquent pour exprimer tout le bien que nous pensons de vous. Tout au long de ce travail vous avez forcé notre admiration tant par vos talents scientifiques que par vos multiples qualités humaines.

Recevez ici cher maître l'expression de nos salutations les plus respectueuses et de nos sincères remerciements. Soyez rassuré cher maître, de notre infaillible disponibilité.

A notre maître et Directeur de thèse

Professeur Dapa Ali DIALLO

- **Professeur titulaire d'hématologie à la faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie ;**
- **Chef de service d'hémato-oncologie médicale du CHU du Point G**
- **Chef du Laboratoire d'hématologie de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie ;**
- **Président de la SOMAHO (Société Malienne d'Hématologie et Oncologie) ;**
- **Président du comité scientifique et technique de l'AMLUD (Association Malienne de Lutte contre la Drépanocytose).**

Nous vous remercions de la confiance que vous nous avez faite, en nous acceptant comme élève. Tout au long de ce travail, nous avons été impressionnés par votre amour pour le travail bien fait, vos qualités humaines et scientifiques.

Veillez accepter ici cher maître, l'expression de notre profonde gratitude et de nos sincères remerciements.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN = Acide Désoxyribonucléique
AE = Agent d'éluion
AL = Agent de lyse
ATL = Agent de lyse des tissus
AW1 = Wash buffer 1 (solution tampon)
AW2 = Wash buffer 2 (solution tampon)
Bp = Base paire
BSA = Bovine Sérum Albumine
CD31 = Cluster de différenciation 31
CD36 = Cluster de différenciation 36
CO₂ = Dioxyde de carbone
Ca²⁺ = ion calcium
CM = Completed Medium
CSA = Chondroïtin Sulfate A
dl = Décilitre
EDM = Electron Dense Material
EDTA = Ethylène Diamine Tétracétique
EGM = Endothélial Growth Medium
EBM-2 = Endothelial Basal Medium-2
FMPOS = Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontologie
g = Gramme
G6PD = Glucose 6 Phosphate Déshydrogénase
GE = Goutte Epaisse
GE+ = Goutte Epaisse positive
GR = Globule Rouge
GRP = Globule Rouge Parasité
GSH = Glutathion réduit
GSSG = Glutathion oxydé

H = heure

Hb = Hémoglobine

HEPES = N-2 HydroxyEthyl Piperazine N'-2 Sulfonic acid

HMVECs = Human Microvascular Endothelial Cells

Ht = Hématocrite

Hémi = Hémizygote

Homo = Homozygote

Hétéro = Hétérozygote

ICAM-1 = Inter Cellular Adhesion Molecule-1

IgG = Immunoglobuline G

IL = Interleukine

Kb = Kilo base

Kd = Kilodalton

Kg = kilogramme

Km = Kilomètre

KKMP = KANGABA KELA MALARIA PROJECT

l = Litre

MIC = Milieu Incomplet de Culture

ml = Millilitre

mmol = Millimol

mmHg = Millimètre de mercure

mg = Milligramme

ml = Millilitre

mm³ = Millimètre cube

min = minute

MACS = Sélection Magnétique colonne

MRTC = Malaria Research and Training Center (Centre de Recherche et de Formation sur le Paludisme)

NIH = National institutes of Health

NADPH = Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit

NADP = Nicotinamide Adénine Dinucleotide Phosphate

NO = Monoxyde d'azote

OMS = Organisation Mondiale de la Santé

PBS = Phosphate buffer Saline

PCR = Polymérase Chain Réaction

Pf = *Plasmodium falciparum*

PfEMP-1 = *Plasmodium Falciparum* Erythrocyte Membrane Protein-1

PfHRP-1 = *Plasmodium falciparum* Histidin Rich Protein

pH = Potentiel d'hydrogène

Rpm = rotation par minute

RPMI = Rousvel Palve Mémoral Institue

RESA = Ring Erythrocyte Surface Antigen

SD= standard de différenciation

TBE = Tris Borate EDTA

Tf/μl = Trophozoïte par microlitre

TMB = 3,3,5,5 TetraMethyl Benzidine

TNF = Tumor Necrosis Factor

TNS = Trypsin Neutralisation Solution

UV = Ultra Violet

μl = Microlitre

μm = Micrometer

VCAM-1 = Vascular Cell Adhesion Molecular-1

SOMMAIRE	PAGES
I-INTRODUCTION -----	1
II- OBJECTIFS -----	3
1- OBJECTIF GENERAL -----	3
2- OBJECTIFS SPECIFIQUES -----	3
III- GENERALITES -----	4
1- PALUDISME -----	4
2- G6PD -----	12
IV- METHODOLOGIE -----	22
1- Cadre d'étude -----	22
2- Tests biologiques effectués -----	22
3- Plan schématique de l'expérimentation au laboratoire -----	24
4- Origines des prélèvements testés -----	24
5- Considérations éthiques -----	25
V- RESULTATS -----	26
VI- COMMENTAIRES ET DISCUSSION -----	36
VII- CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS -----	39
VIII- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -----	40
IX- ANNEXES -----	45
Description des techniques -----	45
1- Goutte épaisse -----	45
2- Extraction de l'ADN humain par le Kit QIAamp (QIAGEN) -----	47
3- Génotypage de G6PD par la technique de PCR-REA -----	49
4- Phénotypage de l'Hémoglobine -----	53
5- Culture de <i>P. falciparum</i> -----	53
6- Culture in vitro des HMVECs -----	57

7- Sélection des GR contenant les formes matures de *P. falciparum*----59

8- Test de cytoadhérence-----60

FICHE SIGNALETIQUE

SERMENT DE GALIEN

I- INTRODUCTION

Le déficit en Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) est l'enzymopathie érythrocytaire la plus connue chez l'homme [1]. Elle affecte plus de 400 millions d'individus dans le monde [1, 2]. Plusieurs variants ont été décrits [2, 3, 4]. Le variant (A-) associé à un déficit enzymatique d'environ 80% est retrouvé principalement dans les zones d'endémie palustre [5]. La plus grande manifestation clinique associée à ce variant (A-) est l'anémie hémolytique.

Malgré ce désavantage clinique pour les individus déficitaires en G6PD ; particulièrement les hémizygotés et homozygotés ; les fréquences de ce variant restent élevées dans les pays d'endémie palustre [6]. En Afrique, la coexistence de l'anémie, du paludisme et des autres maladies infectieuses laisserait croire que le déficit en G6PD serait fatal si les individus portant le gène ne possédaient pas un avantage considérable leur permettant de compenser le coût du déficit en G6PD. Des études environnementales ont démontré une similarité dans la distribution du déficit en G6PD et les basses altitudes connues comme étant des zones d'intense transmission de paludisme [7, 8, 9, 10]. Ruwende et al. en 1995 à travers deux études réalisées en Gambie et au Kenya ont démontré que le déficit en G6PD était associé à une réduction de 46 à 58% du risque de développer le paludisme grave [11]. Par ailleurs, il a été démontré que la densité parasitaire était plus faible chez les sujets déficitaires comparés aux sujets normaux [12, 13]. Le gène qui code pour la G6PD est porté par le chromosome X [14]. Il apparaît donc que l'expression du gène varie selon que l'on soit homme ou femme. Ainsi Luzzatto en utilisant le sang des sujets hétérozygotés démontrait que l'infestation était 2 à 80 fois supérieure pour les hématies normales comparées aux hématies déficitaires en G6PD [15]. Pour expliquer ces résultats, l'auteur stipulait que ces hématies déficitaires étaient préférentiellement retirées de la circulation sanguine par le système histiophagocytaire de la rate. Très récemment, Cappadoro rapportait une phagocytose précoce des parasites au stade ring chez les sujets déficitaires en G6PD [16].

Toutes ces études présentent des problèmes méthodologiques : caractérisation du déficit en G6PD ; diversité des variants de G6PD etc.... Pour répondre aux insuffisances des études précédentes, et possédant l'outil moléculaire, nous nous proposons de déterminer les mécanismes de protection des sujets déficitaires en G6PD(A) contre les formes graves de paludisme en tenant compte de la différence de l'activité enzymatique entre l'hémizygote, l'homozygote et l'hétérozygote.

II-HYPOTHESE DE TRAVAIL

1- Le déficit en G6PD(A) réduit l'évolution du *P. falciparum* dans les globules rouges.

2- Le déficit en G6PD(A) réduit la cytoadhérence des globules rouges parasités aux cellules endothéliales.

OBJECTIFS DE TRAVAIL

1- Objectif général :

- ✓ Explorer les mécanismes par lesquels le déficit en G6PD(A) protège contre le paludisme grave.

2- Objectifs spécifiques :

- ✓ Décrire l'évolution *in vitro* du *P. falciparum* dans les globules rouges déficients et non déficients en G6PD(A) ;
- ✓ Décrire l'adhésion aux cellules endothéliales des globules rouges parasités de sujets déficients et non déficients en G6PD(A).

II-GENERALITES

1- LE PALUDISME

1.1- Définition du paludisme

Le paludisme est l'ensemble des manifestations cliniques causées par la présence dans le sang d'un protozoaire de genre plasmodium. C'est une hemosporozoose fébrile et hémolysante. Quatre espèces de plasmodium parasitent l'homme : *Plasmodium falciparum* ; *Plasmodium malariae* ; *Plasmodium vivax* ; *Plasmodium ovale*. Le cycle évolutif de ces parasites fait intervenir deux hôtes : l'homme (hôte intermédiaire) et l'anophèle femelle (hôte définitif) qui sert de vecteur pour la transmission de cette maladie.

1.2- Classification des parasites du paludisme

Les parasites responsables du paludisme appartiennent

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

1.3- Cycle évolutif de *P. falciparum* [17]

1.3.1- Chez l'homme :

L'homme est contaminé par la piqûre infestante de l'anophèle femelle. Les formes infectantes du parasite (sporozoïtes) contenues dans la salive sont injectées dans le tissu sous-cutané. A travers le sang elles atteignent le foie où chaque sporozoïte pénètre dans un hépatocyte. Ces sporozoïtes se reproduisent de façon asexuée :

c'est la schizogonie hépatique ou extra-érythrocytaire. Cette schizogonie aboutit à un trophozoïte endocytosomique qui grossit et dont le noyau se divise plusieurs fois. L'hépatocyte parasité éclate et les mérozoïtes libérés pénètrent dans les capillaires le jouxtant. Ainsi les mérozoïtes vont pénétrer dans les hématies.

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

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

Après un certain nombre de cycles, certains mérozoïtes vont se distinguer en commençant le cycle sexué du parasite. Les uns vont devenir des gamétocytes mâles, les autres deviendront des gamétocytes femelles.

1.3.2- Chez l'anophèle

Au cours d'un repas sanguin, l'anophèle ingère des hématies parasitées, seuls les gamétocytes évolueront.

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

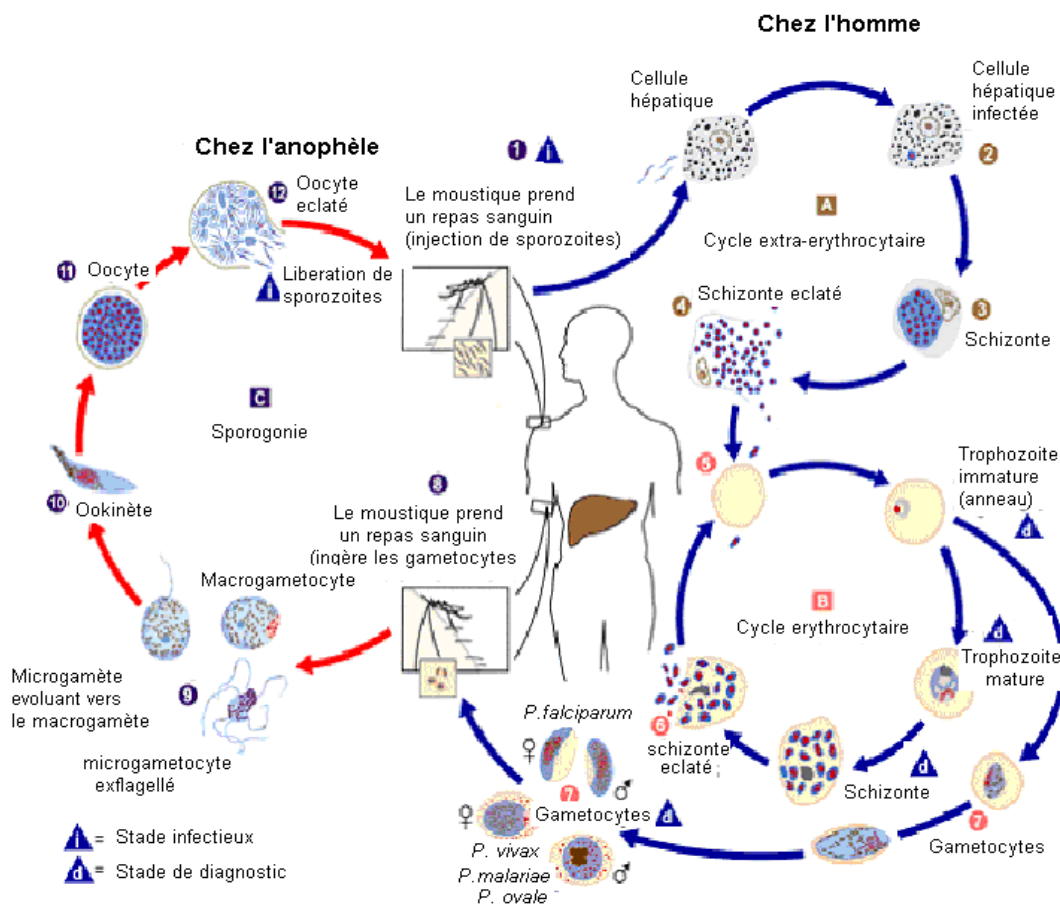
La fécondation de chaque gamète femelle par un gamète mâle donne autant de zygotes appelés ookinètes (de oo = œuf et kino = mobile) d'aspect vermiforme. Les ookinètes sont déformables (aspect amoéboïde) et se fixent aux cellules de la paroi stomacale de l'anophèle si l'espèce d'anophèle convient au parasite. Les ookinètes s'insinuent entre les cellules de la paroi stomacale du moustique et vont se localiser à la face externe de l'estomac, ils deviennent alors des oocystes.

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

A l'intérieur de l'oocyste vont se former des sporocystes qui donneront plusieurs centaines de sporozoïtes.

A maturité, les oocystes éclatent et les sporozoïtes sont libérés dans l'hémolymphe, en 24 heures environ, la majorité d'entre eux va se concentrer dans les glandes salivaires. Lors de la piqûre d'un humain, l'anophèle injectera de plusieurs dizaines à plusieurs centaines de sporozoïtes, et le cycle évolutif des parasites se poursuivra chez l'homme.

Figure 1 : cycle de développement du plasmodium



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

1.4 - Manifestations cliniques du paludisme [17]

1.4.1- La primo-infestation

✓ **Phase d'incubation :**

Elle dure entre une à plusieurs semaines après la piqûre infestante, elle correspond à la schizogonie hépatique et aux premiers cycles érythrocytaires. Aucun signe clinique n'est observé au cours de cette phase.

✓ **Phase d'invasion:**

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

✓ **Phase d'état:**

Elle Correspond à la schizogonie érythrocytaire caractérisée par la fièvre intermittente. Cette fièvre est en principe rythmée par l'éclatement des schizontes mûrs et s'accompagne d'un déversement de pigments palustre pyrogènes dans le sang. On distingue deux types de fièvre :

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

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

- soit de ré-infection (nouvelle piqûre d'anophèle infectée) ;
- soit de recrudescence (augmentation de la parasitémie jusqu'à un niveau décelable cliniquement chez un sujet après traitement incomplet ou inefficace, ou chez un sujet semi-immun) ;

- soit de rechute (poussée de parasitémie à partir d'hypnozoïtes hépatiques dans le cas de *P. vivax* et de *P. ovale*).

1.5- Critères de gravité du paludisme [16]

Selon l'OMS, les formes graves de paludisme à *P. falciparum* sont définies par la présence dans le sang de trophozoïtes de *P. falciparum* associée à au moins un des critères suivants :

- ✓ Paludisme cérébral ou neuropaludisme : lorsque le score de Glasgow est inférieur ou égal à 9 ou celui de Blantyre est inférieur ou égal à 2 ;
- ✓ Trouble de conscience: avec score de Glasgow compris entre 9 et 15 ou score de Blantyre compris entre 2 et 5 ;
- ✓ Convulsions répétées : fréquence supérieure à une fois par 24 heures ;
- ✓ Prostration ;
- ✓ Syndrome de détresse respiratoire ;
- ✓ Ictère ;
- ✓ Acidose métabolique : taux des bicarbonates plasmatiques inférieur à 15 mmol/l ;
- ✓ Anémie grave: taux d'hémoglobine inférieur à 5g/dl ou hématocrite inférieur à 15% ;
- ✓ Hyperparasitémie : parasitémie supérieure ou égale à 4% chez les sujets non-immuns et 20% chez les sujets Immuns ;
- ✓ Hémoglobinurie macroscopique ;
- ✓ Insuffisance rénale : diurèse inférieure à 40ml/24h ou créatinémie supérieure à 265~~0~~ol/l chez l'adulte diurèse <12ml/Kg/24h ou Créatinémie trop élevée pour l'âge de l'enfant ;
- ✓ Collapsus circulatoire : tension artérielle systolique inférieure à 60 mmHg avant 5 ans ou inférieure à 80 mmHg après 5 ans ;
- ✓ Saignement anormal ;
- ✓ Hypoglycémie (glycémie < 2,2 mmol/l ou 40mg/dl) ;
- ✓ Œdème pulmonaire (radiologique).

1.6- Physiopathologie du paludisme grave [18]

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

- La séquestration des hématies parasitées ;
- L'activation du système immunitaire à médiation cellulaire ;
- La libération des cytokines macrophagiques.

1.6.1- La séquestration:

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

a- Le phénomène de l'auto- agglutination :

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

b- Le phénomène de « rosetting »

Les hématies parasitées ont la faculté d'attirer au tour d'elles des hématies saines en formant des rosettes : c'est le phénomène de rosetting. Il y a donc formation d'un agrégat par une hématie parasitée autour de laquelle adhèrent des hématies saines. Ce phénomène a été bien étudié in vitro [19]. Il varie d'une souche plasmodiale à l'autre. Il a été montré que seul le niveau élevé des rosettes et l'absence d'anticorps anti rosette sont corrélés positivement au neuropaludisme [20]. La formation de rosettes constitue un mode de protection pour le parasite contre le système phagocytaire de la rate et exercent un effet délétère pour l'hôte par blocage du flux sanguin.

c- Le phénomène de cytoadhérence :

La cytoadhérence des hématies parasitées à l'endothélium vasculaire ou aux cellules trophoblastiques placentaires est le mécanisme qui a été le mieux étudié ces dernières années. Ce phénomène permet au Plasmodium de se développer plus facilement grâce à un environnement gazeux favorable et d'échapper à la clairance splénique. Les hématies parasitées expriment à leur surface des protubérances (knobs) qui semblent jouer un important rôle dans leur adhésion aux cellules endothéliales. Il s'agit des protubérances protéiniques dans lesquelles sont incorporés des antigènes ou ligands plasmodiques. Parmi ces antigènes plasmodiques on peut citer : la PfEMP-1 et 2 (*Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 et 2) ; la PfHRP-1 (*Plasmodium falciparum* Histidin Rich Protein) ou KAHRP (Knob-Associated Histidin Rich Protein), RESA (Ring Erythrocyte Surface Antigen) et EDM (Electron-Dense-Material). De tous ces ligands la PfEMP-1 est le mieux connu, il interagit avec des récepteurs spécifiques au niveau des cellules endothéliales vasculaires et du syncytiotrophoblaste comme l'ICAM-1 (Inter Cellular Adhesion Molecule-1), le CD36, le VCAM-1 (Vascular Cell Adhesing Molecular-1 et 2), le CD31, le CSA (Chondroitin Sulfate A), la selectin [1] etc...

L'adhésion des hématies parasitées à ces récepteurs entraîne leur séquestration à l'intérieur de la micro circulation. La séquestration permet aux hématies parasitées d'échapper à la clairance splénique et contribue à la gravité du paludisme (critères de gravité du paludisme OMS 2000). Elle entraîne aussi une obstruction des micro-vaisseaux surtout au niveau cérébral, ce qui est cité comme principale cause du neuropaludisme. La séquestration entraînerait aussi une dilatation des micro-vaisseaux par libération du monoxyde d'azote (NO): ce qui est responsable d'œdème cérébral et pulmonaire. La séquestration de façon générale aboutit au recrutement des macrophages puis à l'inflammation.

1.6.2- Mécanismes immunologiques :

Le système à médiation cellulaire impliquant les lymphocytes CD4 et les macrophages joue un rôle très important dans la pathogénie du neuropaludisme. Les antigènes plasmodiaux facilitent le recrutement des macrophages et la

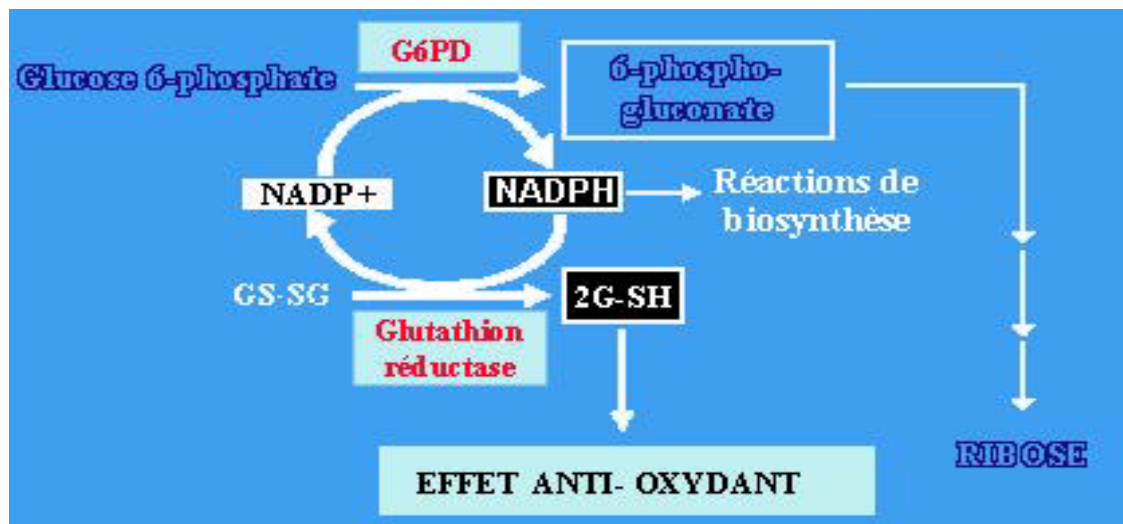
libération de nombreuses cytokines pro-inflammatoires par ces derniers (Interféron gamma, TNF alpha, IL-1, IL-6). Parmi les médiateurs macrophagiques, le TNF α est un acteur important. Expérimentalement l'injection de TNF α chez les souris reproduit la plupart des manifestations cliniques et biologiques du paludisme grave. On pense aussi que la libération du TNF α régulerait l'expression des récepteurs des knobs au niveau endothélial, donc la séquestration. Il faut rappeler que les fièvres observées au cours des accès palustres seraient dues à la libération dans le sang de l'hémozoïne (substance pyrogène résultant de la dégradation de l'hémoglobine par le plasmodium) après éclatement des schizontes. Cette fièvre peut également être due aux cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α , l'IL-1, l'IL-6.

2 - G6PD (GLUCOSE-6-PHOSPHATE DESHYDROGENASE)

2-1-Définition

La G6PD est une protéine qui a un poids moléculaire de 59Kd, composée de 515 acides aminés [21]. C'est une enzyme cytoplasmique présente dans toutes les cellules. Elle catalyse la première réaction de la voie des pentoses phosphates. Cette voie du catabolisme glucidique produit du ribose 5 phosphate (qui servira ultérieurement à la synthèse des nucléotides) et du NADPH, coenzyme qui est le principal donneur d'hydrogène dans de nombreuses réactions de biosynthèse. La NADPH est aussi indispensable pour que se réalise la destruction du peroxyde d'hydrogène hautement toxique pour la cellule [22, 23]. La réduction de l'activité enzymatique de la G6PD est appelée déficit en G6PD. Ce déficit est associé à certains variants génétiques de la G6PD.

FIGURE 2 : Voie métabolique des pentoses phosphates [24]

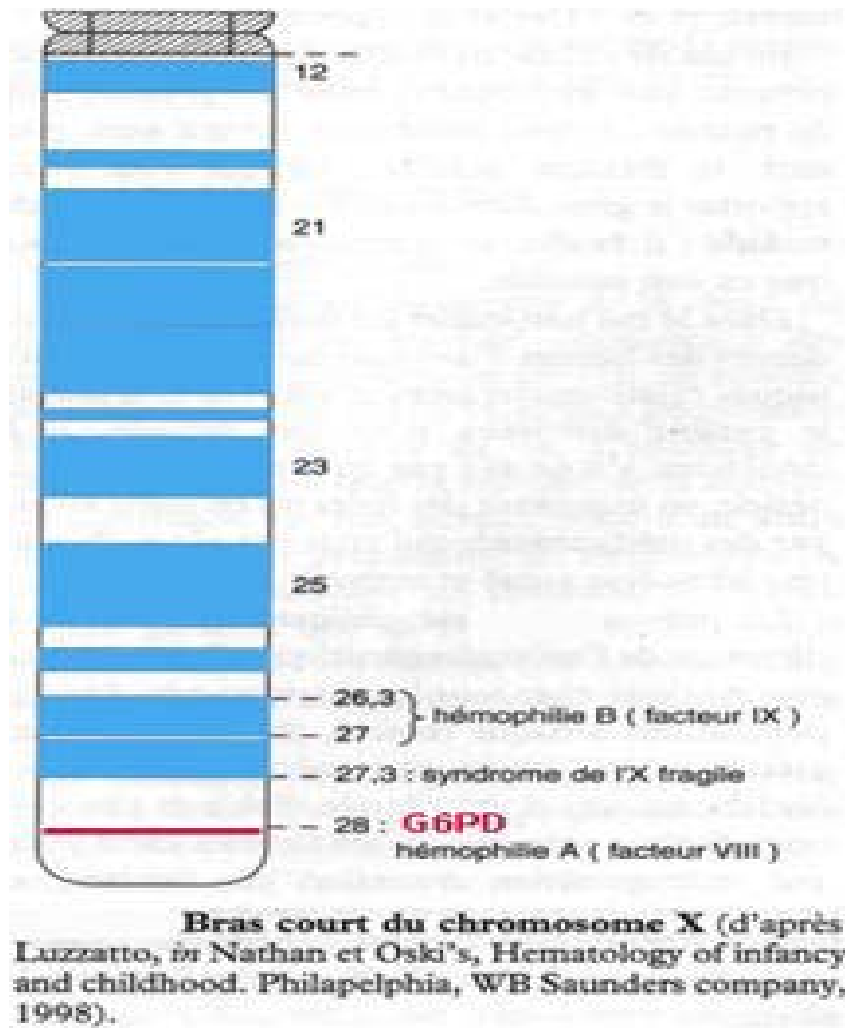


Source : www.gs-im3.fr/G6PD/G6PDGenet.html - 9k- En cache - Pages similaires

2-2-Aspects génétiques

Le gène codant pour la G6PD est localisé sur la région télomérique du bras court du chromosome X en position q28 près du gène codant pour le facteur VIII [14, 25, 26]. Ce gène de la G6PD s'étend sur plus de 20 kilobases. Il comporte 13 exons, dont le premier n'est pas traduit. La région du gène qui code pour la G6PD comporte donc 12 exons et 11 introns [27].

FIGURE 3 : position du gène de la G6PD au locus Xq28 [14]



2-2-1 -Différents types de variant [2,3, 4]

Il existe plusieurs variants de G6PD caractérisés tous par des mutations spécifiques. Aux différents variants de G6PD sont associés différents niveaux d'activité enzymatique et parmi ces différents variants on peut citer :

- **Le variant (B)** : dénommé G6PDB+, ce variant est constitué de 515 acides aminés avec un poids moléculaire de 59 Kd ; dont l'activité enzymatique est de 100%, sa fréquence est de 60-80% dans la population caucasienne.
- **Le variant (A+)** : il a une fréquence de 15-40% avec une activité enzymatique de 80% et diffère de (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 [11].

•**Le variant (A-)** : rencontré dans la population noire notamment en Afrique subsaharienne, 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% [5] et a été décrit comme un facteur de réduction du risque de paludisme grave pour les hétérozygotes femelles et les Hémizygotés masculins pour la G6PD [27]. L'allèle (A-) diffère de (A+) par un nucléotide en position 202 (la guanine est remplacée par l'adénine) [4].

•**Le variant (M)** : c'est la forme la plus souvent observée dans les populations du pourtour de la Méditerranée (Italie, Sicile, Sardaigne, Grèce, Moyen-Orient, Caucase). Il diffère du variant (B+) par la mutation de la thymine par la cytosine à la position 563 sur la chaîne des nucléotides, ce qui amène à la substitution de phénylalanine par la sérine en position 188. Cliniquement, on observe la fréquence de la jaunisse néonatale, la possibilité d'hémolyse chronique mais aussi la possibilité d'hémolyse aiguë en cas d'agressions extérieures.

G6PD B+ :

...190 AAC ACC TTC ATC **GTG** GGC TAT210...364AAC AGC CAC ATG **AAT**
GCC

G6PD A+ :

...190 AAC ACC TTC ATC **GTG** GGC TAT210...364AAC AGC CAC ATG **GAT**
GCC

G6PD A- :

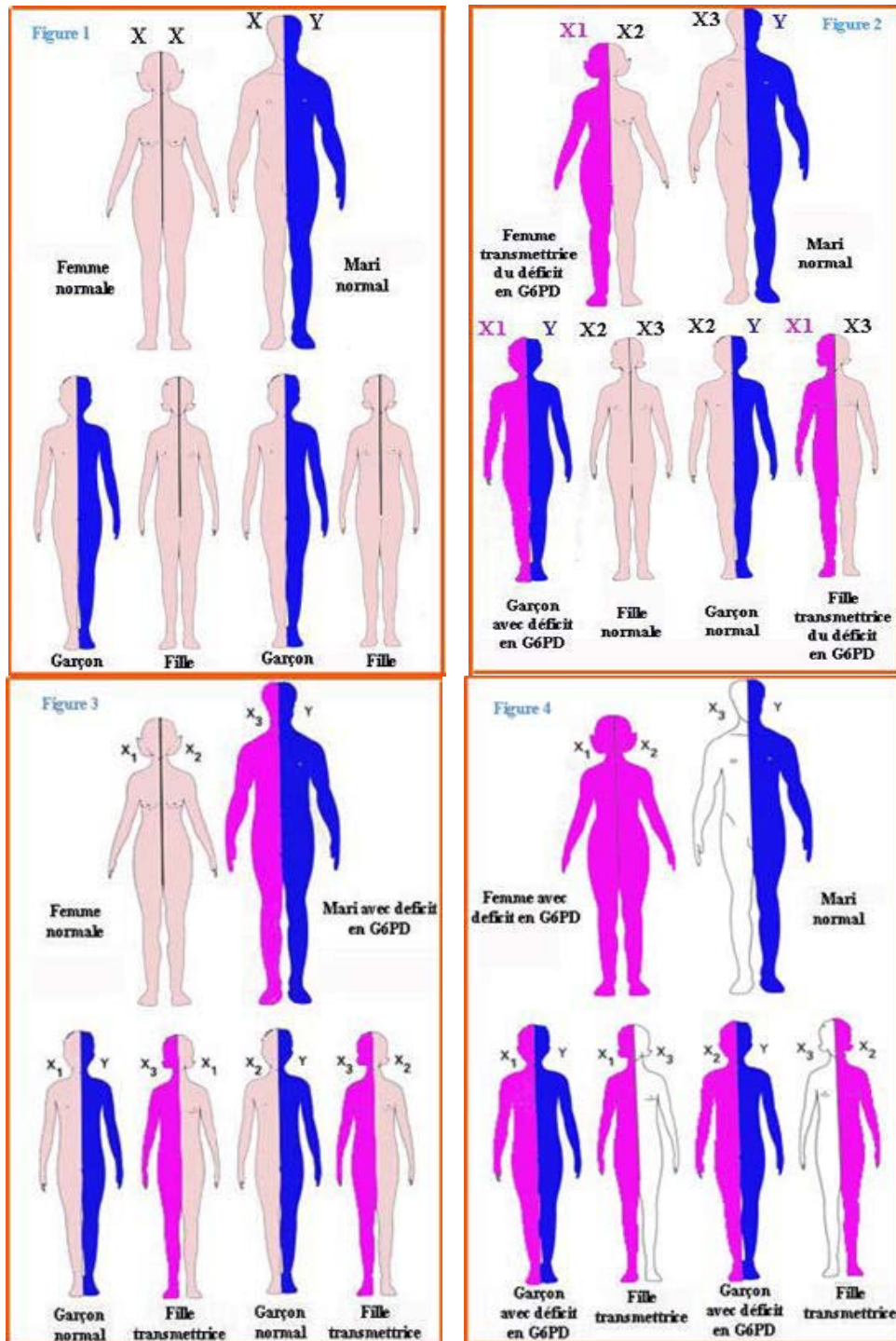
...190 AAC ACC TTC ATC **ATG** GGC TAT210...364AAC AGC CAC ATG **GAT**
GCC

2-2-2 – Mode de transmission d'un allèle délétère de la G6PD

La localisation du gène de la G6PD sur le chromosome X amène à classer la population en 3 classes: Homozygotes, Hémizygotés, Hétérozygotes. Les hommes qui n'ont qu'un seul chromosome X sont hémizygotés tandis que les femmes sont soit homozygotes, ou hétérozygotes.

La transmission du déficit en G6PD est héréditaire et se fait selon les lois de la génétique.

FIGURE 4 : mode de transmission de l'allèle délétère de la G6PD [24]



Source : www.gs-im3.fr/G6PD/G6PDGenet.html - 9k -En cache - Pages similaires

La transmission du déficit en G6PD est héréditaire. Le déficit est lié à une anomalie du gène de la G6PD situé sur le chromosome X et se transmet selon les

lois de la génétique. Une mère (XX) transmet un X à chacun de ses enfants et un père (XY) transmet un X à chacune de ses filles, et un Y à chacun de ses garçons. Lorsque les deux parents sont normaux, (car tous les X sont normaux, c'est-à-dire non porteurs du déficit en G6PD), ils ne peuvent transmettre un déficit qu'ils n'ont pas à leurs enfants.

Pour une mère "transmettrice" du déficit en G6PD c'est-à-dire possédant un X anormal, et un X normal (hétérozygote) et un père normal (son seul X est normal): il y a un risque sur deux (50%) que chacune de leur fille soit également transmettrice, et un risque sur deux (50%) que leurs garçons naissent avec ce déficit (hémizygote).

Si le père a un déficit en G6PD, c'est à dire son seul X est anormal (hémizygote) et que la mère est normale (ses 2 X sont normaux) ; tous leurs garçons seront normaux et toutes leurs filles seront transmettrices.

Les femmes à la fois transmettrices et atteintes du déficit (homozygote) sont rares, et forment les 50% des filles issues d'un couple où le père est atteint et la mère transmettrice. Si la femme homozygote épouse un homme normal tous leurs garçons auront le déficit et toutes leurs filles seront transmettrices.

2-3- Physiopathologie du déficit en G6PD [28, 29]

La G6PD participe aux défenses de la cellule contre les agressions oxydatives. L'hémolyse est observée sur fond du déficit en G6PD par l'impossibilité des GR à faire face aux agressions oxydantes de toutes natures. Dans le cas de l'hémolyse aiguë médicamenteuse, les produits responsables sont pour la plupart inactifs directement. Ils seraient métabolisés dans l'organisme en dérivés réagissant avec l'oxyhémoglobine pour former du peroxyde d'hydrogène. Celui-ci oxyderait le glutathion réduit qui ne peut être régénéré en raison du défaut de production de la NADPH. L'effondrement du glutathion réduit et l'accumulation des peroxydes et des radicaux libres aboutiraient à la dénaturation oxydative de l'hémoglobine avec formation du corps de Heinz qui, se fixant sur la membrane empêche la déformabilité cellulaire puis entraîne l'hémolyse.

2-4- Manifestations cliniques

L'intensité des manifestations cliniques dépend de la variante enzymatique et des facteurs déclenchant. La plus grande manifestation clinique associée au déficit en G6PD est l'anémie hémolytique [29].

2-4-1-Hémolyse aiguë du sujet noir type sensibilité à la primaquine.

Elle se rencontre essentiellement chez les mâles et correspond à un déficit partiel en G6PD de 75-85%. Elle est déclenchée par divers médicaments proportionnellement à la dose. L'hémolyse évolue en trois phases successives.

- **Phase aiguë** : l'hémolyse apparaît vers la 48^{ème} heure après le début de l'administration médicamenteuse. Le nombre de globules rouges chute de 30 à 50%, des corps de Heinz apparaissent correspondant à l'hémoglobine précipitée et tous les signes de l'hyper hémolyse sont réunis. L'accès cède vers le 8^{ème} ou 12^{ème} jour même si l'on poursuit l'administration de la drogue. Pendant cette phase, seules les hématies vieilles sont en effet détruites.
- **Phase de récupération** : elle fait suite à la première, elle s'étend entre le 10^{ème} et 30^{ème} jour. L'anémie due à la destruction des globules rouges se corrige lentement et le taux de globules rouges redevient normal vers la 4^{ème} ou la 5^{ème} semaine.
- **Phase d'équilibre** : il n'y a plus d'anémie, mais l'hémolyse persiste comme en témoigne le raccourcissement modéré de la durée de vie des hématies. A cette phase une nouvelle poussée d'hémolyse peut être provoquée seulement par l'augmentation de la dose de la primaquine.

Si l'on arrête la prescription médicamenteuse et qu'on la reprenne après quelques jours, aucune nouvelle poussée hémolytique n'apparaît ; par contre la reprise du traitement après 3 ou 4 mois déclenche une nouvelle récurrence puisque la population érythrocytaire comprend à nouveau une part importante d'hématies vieilles.

2-4-2- L'anémie hémolytique aiguë du sujet blanc (favisme)

Chez ces sujets le déficit est complet avec une activité résiduelle de la G6PD compris généralement entre 2-15%.

Les crises hémolytiques ressemblent dans leurs plus grandes lignes à celle de l'hémolyse aiguë du sujet noir mais la gravité de l'hémolyse est beaucoup plus marquée que dans la sensibilité à la primaquine du sujet noir. Les crises sont susceptibles d'être provoquées par des médicaments plus nombreux et pour des doses très faibles de ceux-ci.

Elles peuvent aussi succéder à :

- ❖ des infections virales : exemple infection virale mononucléose infectieuse ;
- ❖ des infections microbiennes : exemple fièvre typhoïde, pneumonie ;
- ❖ une acidocétose diabétique.

L'accès s'accompagne de :

- ✓ Fièvre ;
- ✓ Hémoglobinurie ;
- ✓ Diminution du nombre de globule rouge avec une chute de deux à trois millions de GR en quelques heures ;
- ✓ Anurie dans certains cas, nécessitant l'épuration extra rénale ; son pronostic peut être grave. Habituellement l'accès hémolytique qui sera compensé par des transfusions suffisantes cesse en quelques heures ou quelques jours et guérit. Il n'y a pas de signe d'hyperhémolyse entre les accès mais la durée de vie des hématies est modérément diminuée.

2-4-3- L'anémie hémolytique chronique

Cet aspect est beaucoup plus rare que les deux précédents. Il réalise une anémie hémolytique non sphérocytaire à début précoce souvent néonatale. Il n'y a pas de déformation globulaire. La résistance globulaire aux solutions hypotoniques répond selon le type I de Dacie. La durée de vie des hématies est très diminuée. L'évolution chronique est émaillée de poussée hémolytique aiguë déclenchée par des médicaments ou par des infections souvent très graves, habituellement curables. A la longue une certaine stabilisation est possible. Les complications

habituelles aux hémolyses chroniques sont rapportées : lithiase biliaire, ulcère de jambe, hémosidérose, la splénectomie est inefficace.

2-4 4- L'ictère hémolytique néonatal

Il est particulièrement observé dans les zones où le déficit en G6PD est fréquent. Exemple : Grèce et Italie.

L'aspect clinique est celui d'une anémie hémolytique aiguë néo-natale sans autre particularité que l'absence d'incompatibilité Rh ou ABO et fœto-maternelle. L'exsanguino-transfusion est souvent nécessaire.

2-4-5- La forme latente

Elle est sans manifestation clinique ni hématologique. Elle est fréquente, souvent dépistée fortuitement ou au cours d'une enquête anthropologique, elle pose le problème du mécanisme même de l'hémolyse au cours du déficit en G6PD car bien souvent les sujets qui en sont porteurs ont été soumis aux causes déclenchantes sans que celles-ci se soient produites.

2-5-Facteurs déclenchants

Les hémizygotés de sexe masculin et les femmes homozygotes pour ce déficit ont parfois une anémie hémolytique chronique (en dehors d'une exposition chimique ou autre). Cependant il existe certains facteurs de risques qui sont les suivants:

- Certaines infections virales ou bactériennes (Salmonellose, Streptococcie, Rickettsiose...) présentent un risque chez les sujets déficients.
- L'ingestion de fèves ou " Favisme " peut être responsable de crise aiguë d'hémolyse, d'évolution grave, en particulier dans les populations originaires des pays du pourtour Méditerranéen.
- L'acidocétose diabétique serait capable de provoquer la destruction des hématies déficitaires en G6PD.
- Certaines substances toxiques de l'environnement peuvent favoriser l'hémolyse.
- Un surdosage de médicaments (phénacétine, acide ascorbique) peut induire des accidents hémolytiques.

- La prise de médicaments par voie externe et/ou par voie générale constitue des agents agresseurs déclenchant une crise hémolytique chez des sujets prédisposés [22, 30].

2-6- Exploration du déficit en G6PD

Plusieurs méthodes ont été décrites. Le dépistage du déficit peut être fait par :

2-6-1- Diagnostic biochimique :

- ✓ Méthode spectrophotométrique en suivant à l'UV l'augmentation de la densité optique qui accompagne la production du NADPH à partir du NADP lors de la réaction enzymatique. Ce dosage constitue la méthode de référence.
- ✓ Le test de stabilité du glutathion réduit (GSH) : il se pratique en faisant incuber le sang avec l'acetylphenylhydrazine. Dans le sang du sujet normal, le taux du glutathion réduit s'abaisse peu, alors que l'on observe une chute importante dans le sang des sujets présentant le déficit enzymatique. Ce test mesure le taux de formation de glutathion réduit dans les globules rouges.
- ✓ Test de réduction du NADP aboutissant à une décoloration qui est retardée chez les sujets déficients en G6PD.
- ✓ Le « Fluorescent spot test » ou spot test de Beutler retenu par l'International Comité of Standardization in Hematology ; dérive du dosage de référence ; il permet de dépister sans ambiguïté les hémizygotés et les homozygotés pour le déficit en G6PD.

Ce spot test consiste à incuber un hémolysat en présence de glucose-6- phosphate et de NADP puis à en déposer une goutte sur un papier filtre. La production de NADPH est attestée par l'apparition d'une tâche fluorescente lorsque le papier est examiné à la lumière ultra-violette.

Les tests sus cités fournissent tous des résultats satisfaisants chez les sujets de sexe masculin à distance des accidents hémolytiques aigus. Immédiatement après hémolyse, en effet la population érythrocytaire est faite d'hématies jeunes riche en G6PD, alors que les hématies vieilles à activité enzymatique faible ont

disparu. Chez les femmes les résultats sont moins nets et faussement négatifs [29].

2-6-2- Diagnostic hématologique

La recherche des corps de Heinz qui sont des précipités d'hémoglobine dénaturée. La mise en évidence des corps de Heinz dans les globules rouges se fait au microscope après coloration par des colorants comme le bleu de crystal violet. Les corps de Heinz ne sont pas spécifiques du déficit en G6PD, on peut les retrouver dans les hémoglobinopathies à hémoglobine instable et dans les déficits en glutathion réduit.

2-6-3 -Test de biologie moléculaire par l'étude de l'ADN

Il décèle la ou les mutations génétiques sur l'ADN, montre le génotype de l'individu et permet de reconnaître la variante en cause. Ce test reste coûteux et est pratiqué seulement dans les laboratoires spécialisés.

2-7- Prévention et traitement du déficit en G6PD

Le traitement est essentiellement prophylactique et consiste à éviter les drogues et aliments potentiellement hémolysants. Une liste de médicaments est remise au sujet déficitaire qu'il devra présenter au médecin ou pharmacien chaque fois qu'une prescription médicamenteuse est nécessaire.

- ✓ Il est important de faire le dépistage du déficit dès la naissance.
- ✓ En cas de crise hémolytique : rechercher et arrêter l'exposition aux facteurs déclenchant le plus rapidement que possible.
- ✓ Faire une exsanguino-transfusion immédiate en cas d'ictère nucléaire.

III-METHODOLOGIE

1-Cadre d'étude :

Type d'étude :

Il s'agissait d'une étude expérimentale *in vitro*, qui s'inscrivait dans le cadre de l'exploration *in vitro* des mécanismes par lesquels le déficit en G6PD(A) protège contre les formes graves de paludisme à *P. falciparum*.

L'expérience comportait deux volets :

- L'évaluation de l'évolution *in vitro* de *P. falciparum* dans les globules rouges déficients en G6PD(A) aux 2 premiers cycles de développement ;
- L'exploration du phénomène d'adhésion des globules rouges déficients en G6PD(A) parasités aux cellules endothéliales.

L'étude a portée sur 63 expériences de culture *in vitro*.

Lieu d'étude :

L'étude s'est déroulée dans le laboratoire de polymorphisme des globules rouges et paludisme MRTC/FMPOS.

Période d'étude :

Notre étude a couvert les périodes de transmission du paludisme des années 2006 et 2007.

2-Tests biologiques effectués

➤ Goutte épaisse

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

➤ Génotypage G6PD

Le principe consiste à faire le diagnostic de la mutation ponctuelle au niveau du gène de la G6PD par une PCR (Polymérase Chain Réaction).

➤ **Phénotypage Hb**

Il a été réalisé par la méthode de chromatographie en phase liquide haute performance. **(D-10 Bio-Rad)**. Cette méthode est très efficace et rapide, Elle permet de déterminer les différents types d'hémoglobine et leur proportion dans un échantillon de sang.

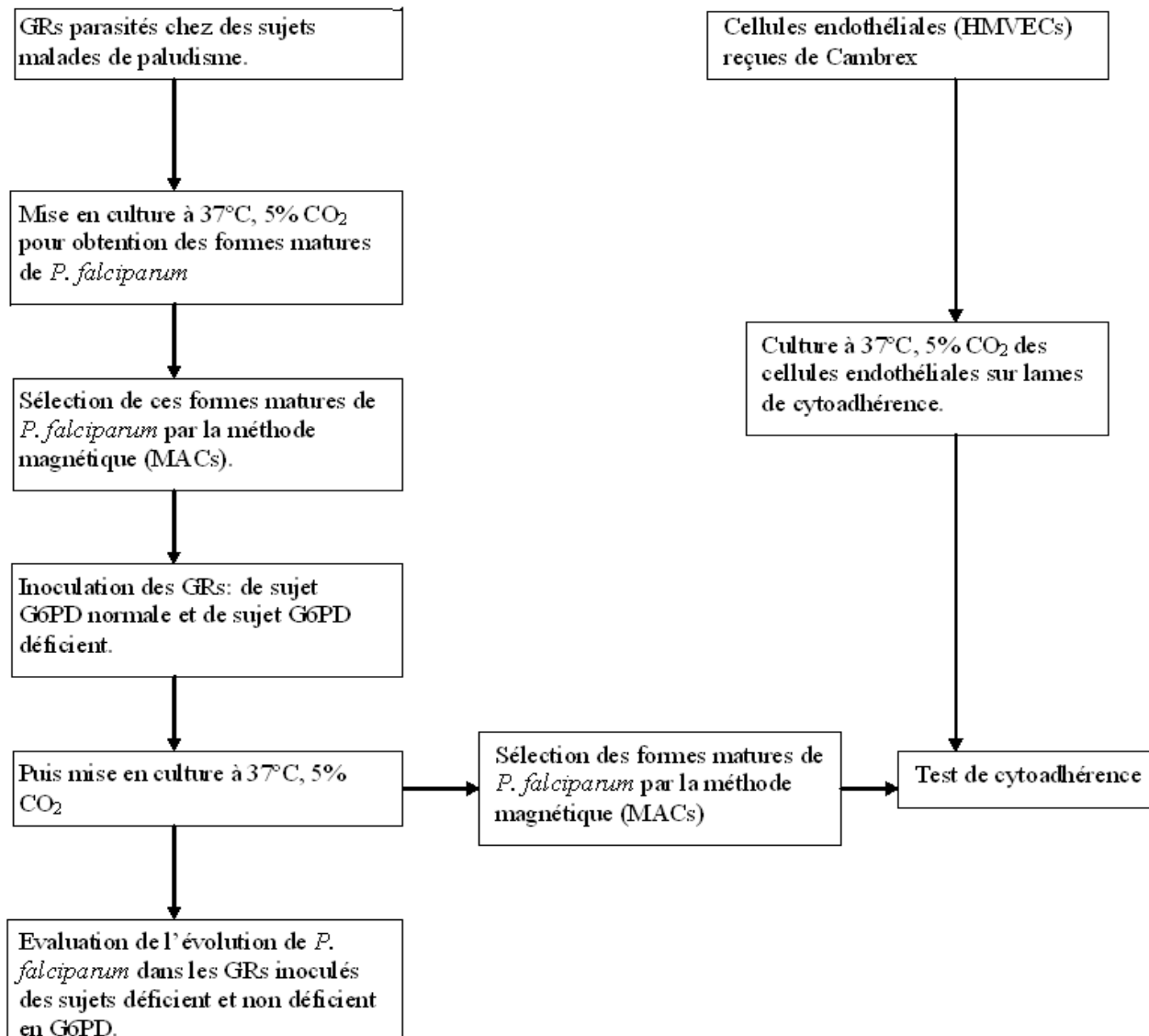
➤ **Culture parasitaire**

Il s'agit d'un bouillon de culture. Les GRP issus de sang de patient ayant une GE positive sont lavés et résuspendus dans un milieu de culture et incubés à 37°C sous une atmosphère de 5% CO₂ afin d'obtenir des formes matures de *P. falciparum*.

➤ **Test de cytoadhérence**

Il consiste à évaluer la capacité de fixation des GRP sur les cellules endothéliales des micro-vasculaires humaines exprimant les récepteurs de PfEMP-1 sur leur surface.

2- Plan schématique de l'expérimentation au laboratoire



4- Origine des prélèvements testés

- Les échantillons de sang parasité provenaient de Kangaba et de Kela. La collection de ces échantillons consistait à prélever au maximum 5 ml de sang chez les enfants impaludés dont le profil hémoglobinique était déjà déterminé. Les prélèvements ainsi effectués étaient transportés au laboratoire de polymorphisme des globules rouges et paludisme pour être mis en culture.
- Nous avons procédé au prélèvement de sang chez des sujets volontaires au laboratoire de polymorphisme des globules rouges et paludisme MRTC/FMPOS. Le déficit en G6PD avait été dépisté auparavant chez ces sujets.

5- Considérations éthiques :

L'adhésion à l'étude était libre et volontaire après l'obtention d'un consentement écrit du volontaire ou d'un assentiment des parents ou tuteurs pour les mineurs.

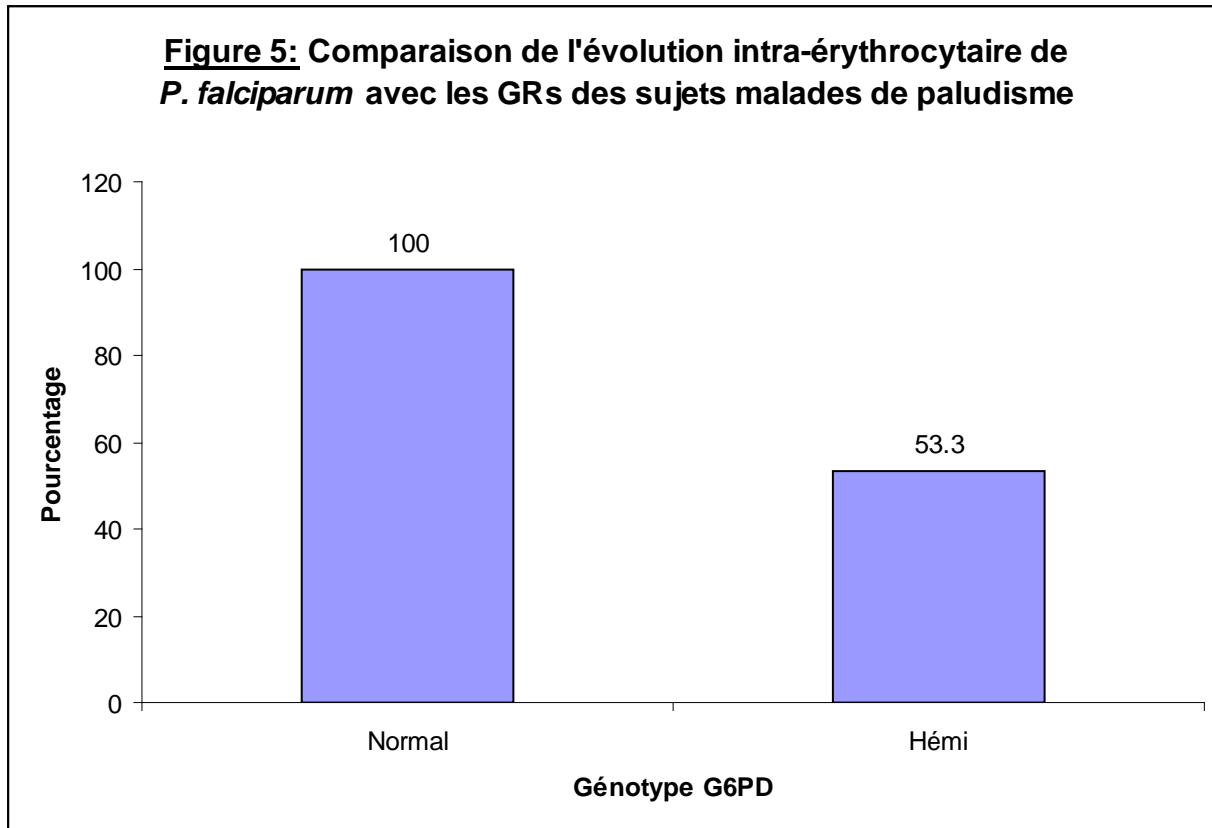
Toutes les précautions étaient prises pour éviter la contamination au cours des prélèvements et des manipulations (standard OMS, port de gants stériles, utilisation des vaccinostyles individuels et stériles, tubes stériles).

IV-RESULTATS

Tableau I : Evolution intra-érythrocytaire de *P. falciparum* avec les GR reçus des sujets malades de paludisme

Génotype G6PD	Nombre	Taux moyen	Taux relatif moyen	SD
Normal	5	94.9%	(100%)	10.99
Hémi	4	50.6%	(53.3%)	11.35

Afin d'évaluer le développement intra-érythrocytaire de *P. falciparum*, nous avons conduit des expériences de culture à partir du sang des sujets infectés par *P. falciparum* de la ville de Kangaba et de Kela. Ainsi 5 expériences ont été effectuées à partir du sang des sujets sans déficit en G6PD et 4 de sujets déficitaires de cette enzyme de sexe masculin (hémizygotes). Après 48 heures de culture, nous avons observé une évolution de la croissance de *P. falciparum* de 94.9% chez le sujet sans déficit en G6PD contre 50.6% chez le sujet déficient en G6PD.

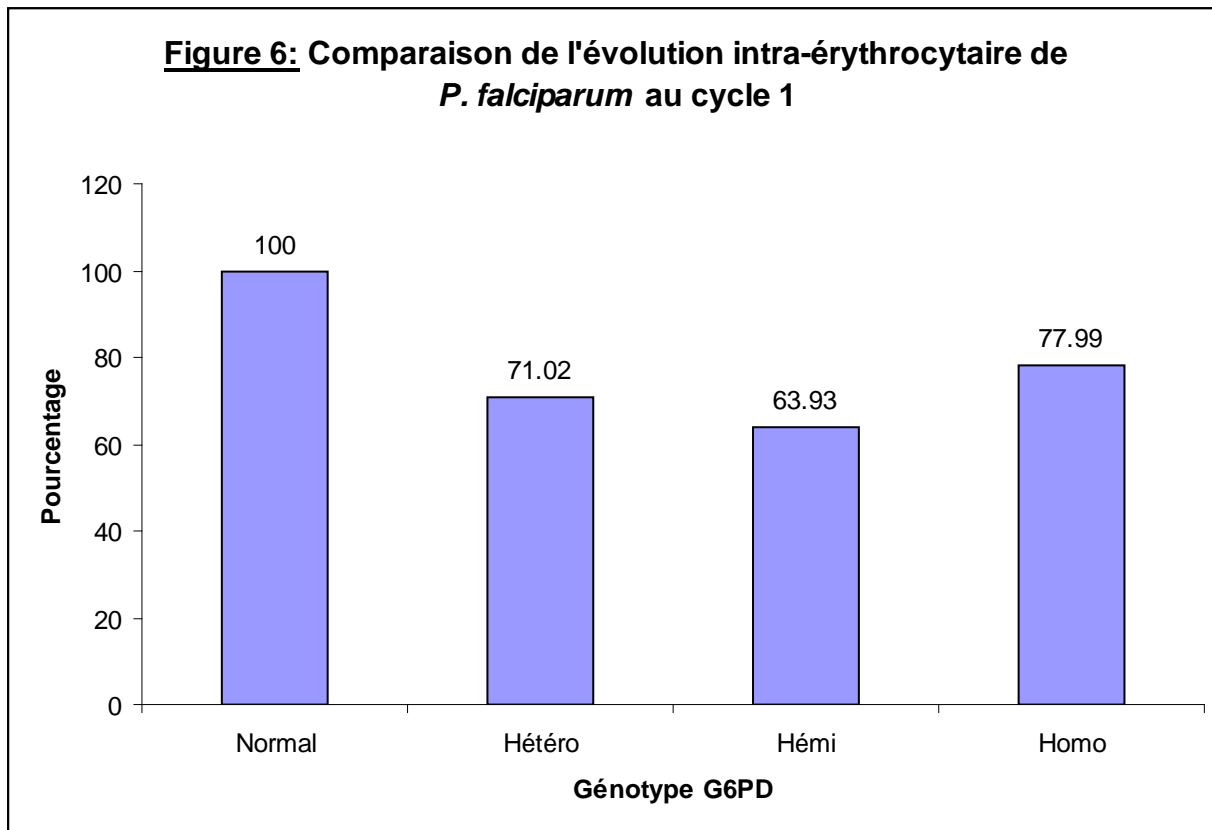


Une réduction de maturation avec les échantillons de sujets déficitaires de sexe masculin d'environ 47% a été observée comparativement aux échantillons de sujets non déficitaires en G6PD.

Tableau II : Evolution intra-érythrocytaire de *P. falciparum* au cycle 1 en fonction des génotypes de G6PD.

Normal		Hétéro		Hémi		Homo	
Ring	Troph	Ring	Troph	Ring	Troph	Ring	Troph
1.1 (100%)	0.5 (45.45%)	0.5 (100%)	0.1 (20%)	0.6 (100%)	0.2 (33.33%)		
0.3 (100%)	0.3 (100%)	0.3 (100%)	0.2 (66.67%)	0.4 (100%)	0.2 (50%)	0.4 (100%)	0.3 (75%)
2.4 (100%)	2.4 (100%)	2 (100%)	1.7 (85%)	1.9 (100%)	1.4 (73.68%)	1.8 (100%)	1.3 (72.22%)
		2.3 (100%)	1.4 (60.87)	2.3 (100%)	1.2 (52.17%)	1.8 (100%)	0.8 (44.44%)
100%	81.8%	100%	58.1%	100%	52.3%	100%	63.8%

Pour évaluer le taux de croissance de *P. falciparum* en fonction des différents génotypes de G6PD(A) érythrocytaires, nous avons mené des expériences de culture *in vitro* de *P. falciparum* dans les globules rouges de sujets normaux, hétérozygotes, hémizygotes et homozygotes. Les globules rouges de ces différents sujets ont été inoculés *in vitro* avec le même isolat de parasite. Au terme du premier cycle de développement des parasites du paludisme dans la culture, nous avons constaté en moyenne qu'avec les GR des sujets normaux, 81.8% des parasites au stade ring ont évolué pour atteindre le stade de trophozoïte, contre 58.1%, 52.3%, 63.8% respectivement avec les GR des sujets hétérozygotes, hémizygotes et homozygotes.



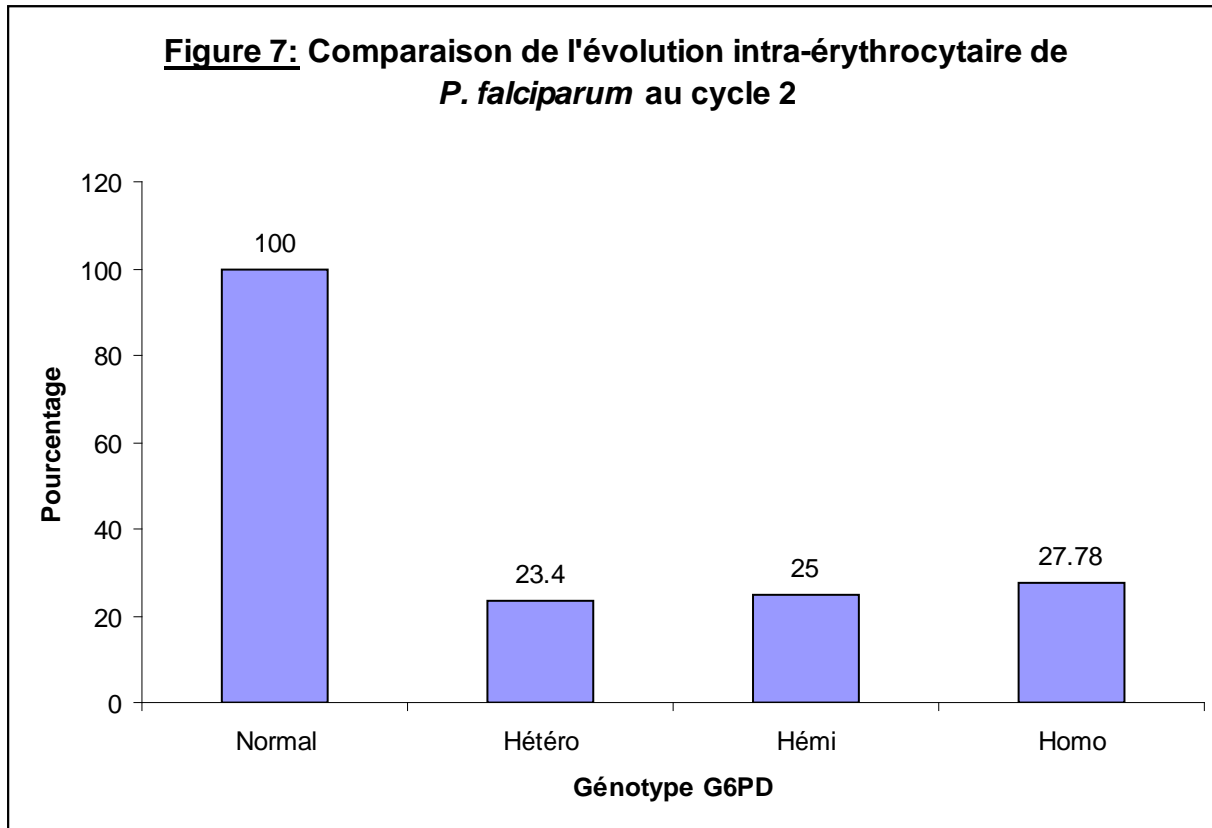
En considérant le taux de maturation de *p. falciparum* au sein des GR des sujets normaux comme 100% au premier cycle de développement, nous constatons une réduction de la maturation de *p. falciparum* de 28.98% chez les sujets hétérozygotes, 36.07% chez les hémizygotes, 22.01% chez les homozygotes.

Tableau III : Evolution intra-érythrocytaire de *P. falciparum* au cycle 2 en fonction des génotypes de G6PD

Normal		Hétéro		Hémi		Homo	
Ring	Troph	Ring	Troph	Ring	Troph	Ring	Troph
2 (100%)	1.7 (85%)	0.1 (100)	0 (0%)	0.4 (100%)	0 (0%)		
1 (100%)	0.4 (40%)	0.3 (100%)	0 (0%)	0.4 (100%)	0 (0%)	0.9 (100%)	0.1 (11.11%)
2 (100%)	0.5 (25%)	2 (100%)	0.3 (15%)	1 (100%)	0 (0%)	0.3 (100%)	0 (0%)
		2.2% (100%)	0.7 (31.8%)	1 (100%)	0.5 (50%)	1.2 (100%)	0.5 (41.67%)
100%	50%	100%	11.7%	100%	12.5%	100%	13.89%

Au deuxième cycle de développement des parasites de notre expérience, nous avons fait les observations suivantes :

Avec les GR de sujets normaux seulement 50% des parasites au stade ring ont évolué pour atteindre le stade de trophozoïte, contre 11.7% chez les sujets hétérozygotes, 12.5% chez les sujets hémizygotes, 13.89% chez les sujets homozygotes.



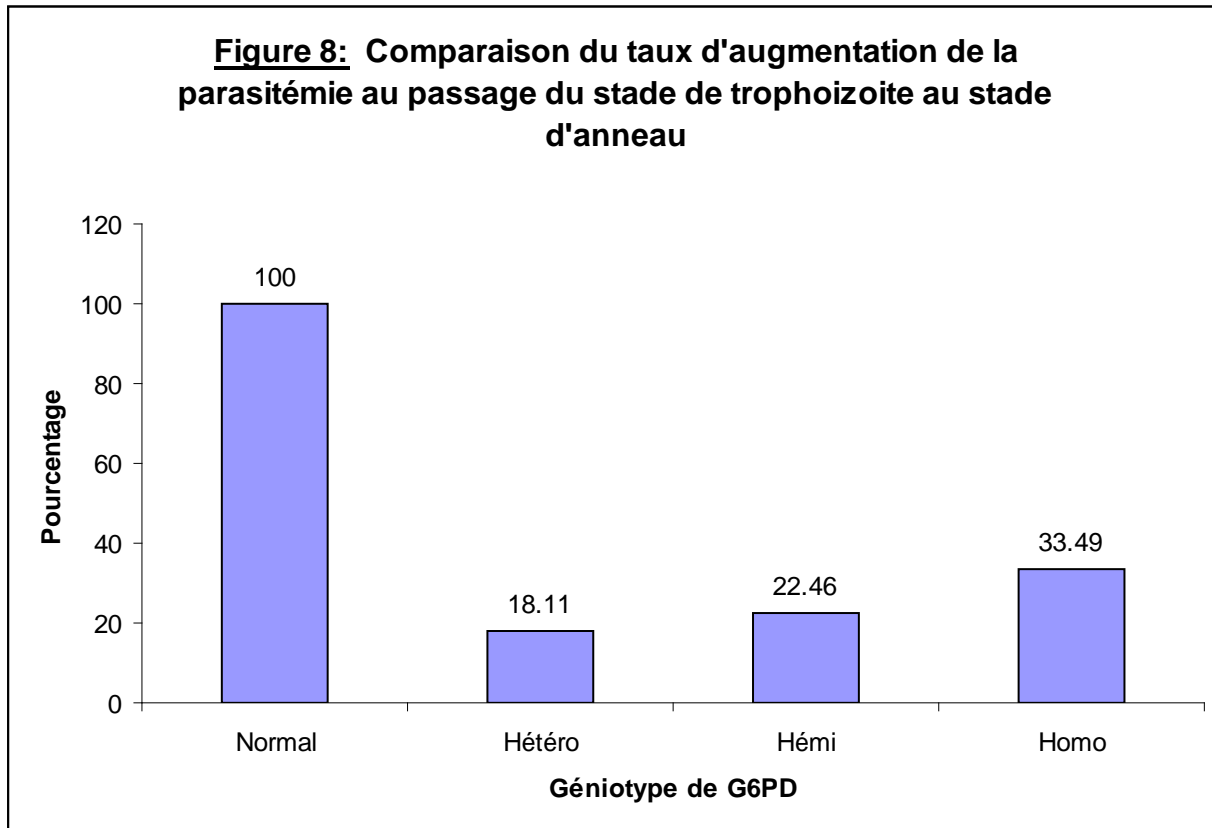
En considérant le taux de maturation de *P. falciparum* au sein des GR des sujets normaux comme 100% au deuxième cycle de développement, nous constatons une réduction de la maturation de *P. falciparum* de 76.6% chez les sujets hétérozygotes, 75% chez les hémizygotés, et 72.22% chez les homozygotes.

Tableau IV : Evaluation du taux d'augmentation de *P. falciparum* au passage du state de trophozoïte au stade d'anneau en fonction des génotypes de G6PD (Devenir des trophozoïtes)

	Normal			Hétéro			Hémi			Homo		
	T	R	%	T	R	%	T	R	%	T	R	%
	0.5	2	300%	0.1	0.1	0%	0.2	0.4	100%			
	0.3	1	233.3%	0.2	0.3	50%	0.2	0.4	100%	0.3	0.9	200%
	2.4	2	-16.66%	1.7	2	17.64%	1.4	1	-28.57%	1.3	0.3	-76.92%
				1.4	2.2	57.14%	1.2	1	-16.66%	0.8	1.2	50%
Mo	172.21%			31.19%			38.69%			57.69%		

T= Trophozoïte, R= Ring, Mo= Moyenne

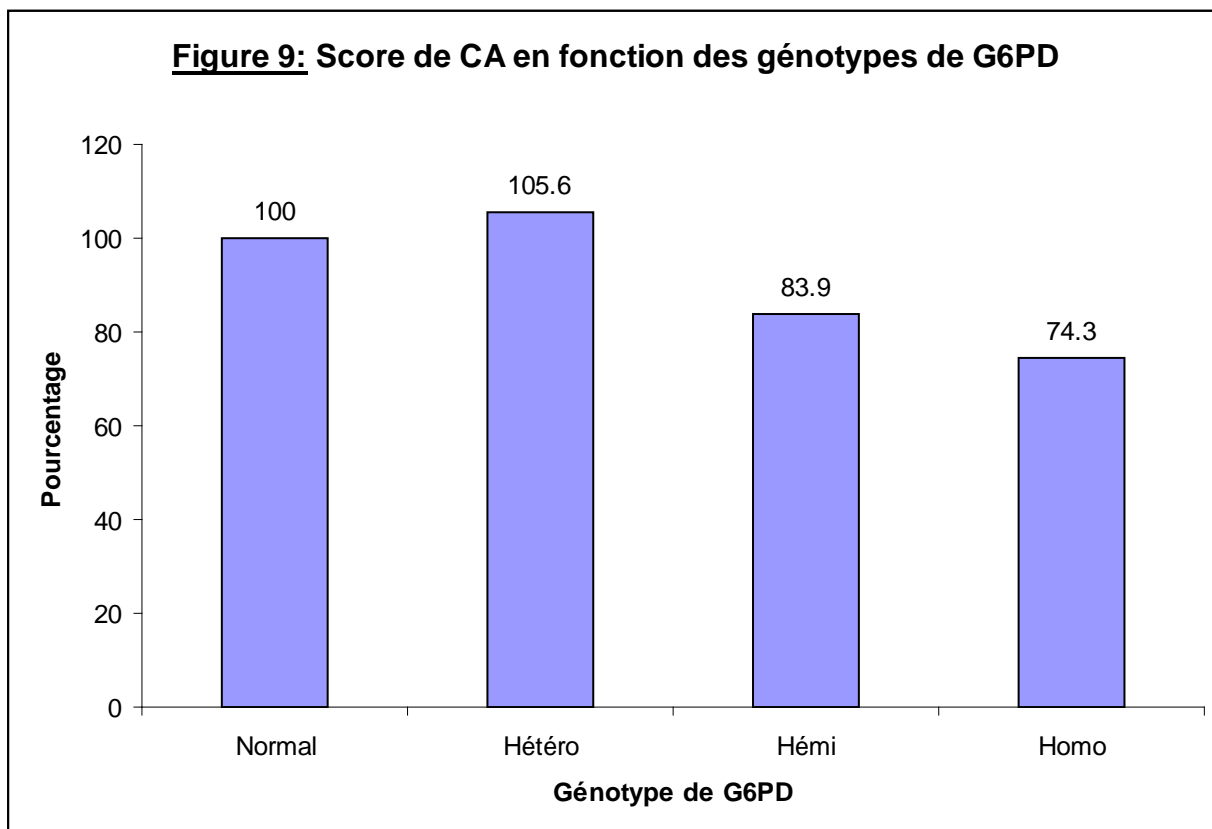
Pour étudier le devenir des trophozoïtes, nous avons évalué le pourcentage d'augmentation de la parasitémie en fonction des différents génotypes de G6PD au passage du stade de trophozoïte au stade de ring. Pour cela nous avons fait le rapport de la différence de la parasitémie au stade de ring et la parasitémie au stade de trophozoïte sur la parasitémie de départ. Ainsi 172.21% du taux d'augmentation de la parasitémie a été observé dans les GR des sujets normaux lors de ce passage du stade de Trophozoïte au stade de ring, contre 31.19% dans les GR des sujets hétérozygotes, 38.69% dans les GR des sujets hémizygotes et 57.69% dans les GR des sujets homozygotes.



En considérant le taux d'augmentation de la parasitemie observé dans les GR des sujets normaux à la G6PD comme 100%, on constate une réduction de ce taux de 81.89% chez les sujets hétérozygotes, 77.54% chez les sujets hémizygotes et 66.51% chez les sujets homozygotes.

Tableau V : Score de cytoadhérence en fonction des génotypes de G6PD

Génotype G6PD	Nombre	score Relatif CA	SD
Normal	17	100	-
Hétéro	4	105.6	57.4
Hémi	17	83.9	56.1
Homo	2	74.3	36.32



La cytoadhérence est l'accolement des hématies parasitées sur la paroi endothéliale se traduisant par une obstruction des vaisseaux et aussi le déclenchement des réactions inflammatoires, toute chose qui contribuerait à la

sévérité clinique du paludisme. Afin de vérifier si l'ensemble des ces phénomènes s'opèrent chez le sujet déficitaire ou non déficitaire en G6PD à un degré identique, nous avons mené une série d'expérience portant sur 17 sujets non déficitaire en G6PD, 4 sujets hétérozygotes, 17 sujets hémizygotés et 2 sujets homozygotes. Les résultats de ces expériences ont permis de mettre en évidence que les phénomènes de cytoadhérence s'opèrent à des degrés divers selon le statut en G6PD. Ainsi il a été observé une réduction d'adhésion de 17 à 25% chez les sujets hémizygotés et homozygotes, aucune réduction n'a été observée chez les sujets normaux et hétérozygotes.

V- COMMENTAIRES ET DISCUSSION

Notre étude s'inscrivait dans le cadre de l'exploration *in vitro* des mécanismes par lesquels le déficit en G6PD(A) protège contre les formes graves de paludisme à *P. falciparum*. Ainsi nous avons effectué une série d'études expérimentales comportant deux volets :

- L'évaluation de l'évolution *in vitro* de *P. falciparum* dans les globules rouges déficients en G6PD(A) aux 2 premiers cycles de développement ;
- L'exploration du phénomène d'adhésion des globules rouges déficients en G6PD(A) parasités aux cellules endothéliales.

Ces travaux ont portés sur :

- ✚ 9 expériences de culture pour la comparaison directe de l'évolution de *P. falciparum* dans les globules rouges des enfants malades de paludisme prélevés sur terrain dont 5 normaux et 4 hémizygotes.
- ✚ 14 expériences de culture pour l'évaluation de l'évolution intra-érythrocytaire de *P. falciparum* dont 3 sur les globules rouges normaux, 4 sur les globules rouges hémizygotes, 4 sur les globules rouges hétérozygotes et 3 sur les globules rouges homozygotes.
- ✚ 40 expériences de cytoadhérence pour déterminer les scores relatifs de la cytoadhérence.

Pour évaluer l'évolution intra-érythrocytaire de *P. falciparum*, nous avons utilisé des globules rouges parasités prélevés chez les enfants normaux et déficitaires en G6PD(A) malades de paludisme. Ces globules rouges étaient cultivés pour étudier l'évolution des parasites du paludisme en leur sein. Ainsi, nous avons constaté que seulement 50.6% des parasites présents dans les globules rouges déficients en G6PD(A) évoluaient pour donner des trophozoïtes en 48 heures de culture contre 94.9% chez les globules rouges de sujet normal, soit une réduction de 46.7% de la croissance de *P. falciparum* chez les globules rouges déficients en G6PD(A) comparés aux globules rouges normaux. Ces réductions de croissance avaient été rapportées par Friedman et al. en 1979 et Roth et Al. en 1983 qui ont trouvés une diminution de la multiplication de *P. falciparum* dans les érythrocytes déficients en G6PD(A) [31, 32]. La réduction de la parasitémie n'ayant jusque là,

été rapportée par aucune étude épidémiologique, nous avons donc suggéré que cette inhibition de croissance serait due à la grande susceptibilité des globules rouges déficients en G6PD(A) aux conditions de culture. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons inoculé des globules rouges frais prélevés chez des sujets normaux et déficitaires en G6PD(A) avec des souches de terrain de *P. falciparum*. Cette fois ci, nous avons fait une culture continue pour étudier l'évolution des parasites en fonction du degré de dégradation des globules rouges. Ces travaux nous ont permis de faire les constats suivants :

- Tout d'abord au premier cycle de développement du parasite, nous avons observé que 81.8%, 58.1%, 52.3%, 63.8% des parasites évoluaient en trophozoïtes respectivement dans les globules rouges des sujets normaux, hétérozygotes, hémizygotés et homozygotes. Comparativement aux sujets normaux, nous constatons une réduction de la maturation de *p. falciparum* de 28.98% chez les sujets hétérozygotes, 36.07% chez les hémizygotés, 22.01% chez les homozygotes.
- Au deuxième cycle de développement du parasite, nous avons observé des inhibitions de croissance beaucoup plus grande qu'au premier cycle. Ainsi une inhibition de croissance de 76.6% chez les sujets hétérozygotes, 75% chez les hémizygotés, et 72.22% chez les homozygotes a été observé comparativement aux sujets normaux.

Les résultats ainsi trouvés au deuxième cycle de développement du parasite confirment l'hypothèse que les inhibitions observées sont dues à l'altération des globules rouges par les conditions de culture. Aussi l'hémolyse observée avec les GR déficitaires en G6PD(A) au cours de la culture suppose que ces derniers sont plus sensibles aux conditions de culture que les globules rouges des sujets normaux.

Les connaissances actuelles ont démontré que l'adhésion des hématies parasitées associée à d'autres phénomènes contribuerait à la sévérité du paludisme, ce qui nous a amené à explorer le phénomène d'adhésion des hématies parasitées aux cellules endothéliales. Les concepts physiopathologiques du paludisme grave font intervenir trois types de modifications physiopathologiques :

- ✓ La séquestration des hématies parasitées ;

- ✓ L'activité du système immunitaire à médiation cellulaire ;
- ✓ La libération des cytokines macrophagiques.

La séquestration s'explique par le fait que les hématies parasitées par les plasmodies expriment à leur surface des protubérances protéiniques dans lesquelles sont incorporés des antigènes plasmodiques comme les PfEMP-1 et 2, le PfHRP-1 et le RESA ... Ces protubérances appelées Knobs permettent aux érythrocytes parasités d'adhérer à la paroi endothéliale des vaisseaux de petit calibre pour ainsi échapper à la clairance splénique. Ces cellules endothéliales expriment également à leur surface des récepteurs spécifiques comme l'ICAM, le VCAM, le CD36...auxquels adhèrent les antigènes plasmodiques entraînant ainsi la séquestration des GRP dans la micro circulation responsable de la plupart des manifestations cliniques du paludisme grave notamment le neuropaludisme par séquestration des GRP au niveau du cerveau [33]. L'adhésion induit également d'autres mécanismes responsables de la gravité du paludisme comme la vasodilatation attribuée à la libération de NO, les œdèmes, la libération des cytokines pro-inflammatoires etc.... Ainsi nous avons formulé l'hypothèse d'une moindre adhésion des globules rouges parasités de sujets déficients en G6PD(A) pour expliquer la protection que confère le déficit en G6PD contre le paludisme grave.

Au cours de notre étude nous avons observé que la moyenne de score relatif de la cytoadhérence chez l'hémizygote était de 83,9%, et 74.3% chez l'homozygote inférieur à celui de la normale, ce qui soutendrait une réduction de certains phénomènes aggravant de la maladie chez les sujets hémizygotes et homozygotes d'où leur protection contre les formes graves de paludisme à *P. falciparum* observé au cours de notre étude. Cette estimation de la réduction est une moyenne, mais pourrait être variable en fonction de la souche plasmodique en cause. Bien que nous ayons observé une réduction générale de score de cytoadhérence, certains globules rouges parasités déficients en G6PD(A) adhéraient plus que les globules rouges parasités normaux. Nous avons utilisé la méthode statique de cytoadhérence qui pourrait donner des résultats différents de celui de la méthode de flux.

VI-CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

➤ Conclusion

A l'issue de notre étude qui a porté sur 63 expériences de culture *in vitro* visant à déterminer les différents phénomènes associés au déficit en G6PD(A) nous avons constaté :

- Une diminution de certains phénomènes liés à la gravité du paludisme chez les sujets déficitaires en G6PD. Ainsi la réduction de la maturation intra-érythrocytaire de *P. falciparum*, la faible adhésion des GRP aux cellules endothéliales et la diminution d'invasion des GR par *P. falciparum* pourraient expliquer en partie la protection conférée par le déficit en G6PD contre les formes graves de paludisme, ceux-ci à travers le contrôle du taux de parasitémie, une diminution de la séquestration des GRP dans la micro circulation sanguine, une augmentation de la clearance splénique des GRP.

➤ Recommandations

Au terme de ce travail nous formulons les recommandations suivantes :

- ✚ Conduire une étude sur un échantillon de taille plus grand afin d'évaluer l'évolution intra-érythrocytaire de *P. falciparum* exclusivement au cycle 1.
- ✚ Mener une étude *in vitro* couplée à une étude *in vivo* pour exclure toute influence des conditions de culture.
- ✚ Déterminer les mécanismes de protection des autres polymorphismes génétiques pouvant être associés à une susceptibilité ou à un risque accru de développer un paludisme grave.

VIII-REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- Douki JB. L, Traore B, Fabio T. M. Costa, Thierry F, Pouvelle B, Sterkers Y, Artur Scherf and Jürg Gysin.** (2002). Sequestration of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte to chondroitin sulfate A, a receptor for maternal malaria; monoclonal antibodies against the native parasite ligand reveal pan-reactive epitopes in placental isolates. *Blood*. 100 :1478-83.
- 2- Beutler E.** (1990). The genetics of G6PD deficiency. *Seminars in Hematology*; 27: 137-164.
- 3- Beutler E.** (1978). Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency. In *Plenum Medicals, New-York*; 23: p: 167.
- 4- Ruwende C; Hill A.** (1998). Glucose-6-6Phosphate deshydrogenase deficiency and malaria. *J MOL Med*; 76:581-588
- 5- Luzzatto L, Mehta.** (1989). A human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic basis of inherited disease*, 6th edn. Mc Graw-Hill, New York. pp 2237-2265.
- 6- Martin SK, Miller LH, Alling D, Okoye VC, Esan GJF, Osunkoya BO, and Deane M.** (1979). Severe malaria and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: A reappraisal of the malaria/ G.-6-P.D. hypothesis. *Lancet* 1:524-526.
- 7- Luzzatto L and Battistuzzi G.** (1985). Glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Adv. Med. Genet.* 14: 217-329.
- 8- Siniscalco M, Berini L, Filippi G, Latte B, Meera Khan P, Piomeli S, and Rattazzi M.** (1966). Population genetics of hemoglobin variants, thalassemia

and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, with particular reference to the malaria hypothesis. Bull. WHO 34: 379-393.

9- Kidson C and Gorman JG. (1962). A challenge to the concept of selection by malaria in glucose -6-phosphate dehydrogenase deficiency. Nature 196: 49-51.

10- Traoré A. Déficit en G6PD érythrocytaire: fréquence, relation avec le paludisme dans une population âgée de 3 mois à 20 ans des villages de Kangaba et Kéla Région de Koulikoro (Mali) Thèse de pharmacie, Bamako, 2003, N°54.

11- Ruwende C, Khoo SC, Snow RW, Yates SN, Kwiatkowski D, Gupta S, Warn P, Allsopp CE, Gilbert SC, Peschu N. (20 July 1995). Natural selection of hemi and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria. Nature, Vol 376. (6537):246-9.

12- Allison C and Clyde DF. (1961). Malaria in African children with deficient erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. Br.Med. J. 1.1346-1349.

13- Mochenhaupt FP, Mandelkow J, Till H, Ehrhardt S, Eggelte TA, Bienze U. (2003). Reduced prevalenc of plasmodium infestation and of concomitant anaemia in pregnant women with heterozygous G6PD deficiency. Trop Med Int Heath. 118-24.

14- Luzzatto, in Nathan et Oski's. (1998) Hematology of infancy and childhood. Philadelphia, WB Saunders company.

15- Luzzatto L., Metha A. (1995). glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. In seriver C.R., Beudet AL. Shy WS, Valle D., eds. The Metabolic Basis of Inherited Disease. London: Mc Graw-Hill, Inc. p. 3364-3398.

- 16- Cappadoro M, Giribaldi G, O'Brien E, Turrini F, Mannu F, Ulliers D, Simula G, Luzzatto L, Arese P.** (1998 Oct 1). Early Phagocytosis of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD)-deficient erythrocytes parasitized by plasmodium falciparum may explain malaria protection in G6PD deficiency. *92(7): 2527-34.*
- 17- WHO.** (1989). Working Group Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Vol. 67. Bull WHO: p.601.
- 18- J.-E. Touze, P. Paule, T Fusai.** (2001). Concepts physiopathologique du paludisme grave dans paludisme grave de Jean-Marie Saissy. Arnette.
- 19- Rowe, J.A., Moulds, J.M., Newbold, C.I. & Miller, L.H.** (1997). *P. falciparum* rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1. *Nature*, 388, 292-95.
- 20- Rowe, A., Obeiro, J., Newbold, C.I. & Marsh, K.** (1995). *Plasmodium falciparum* rosetting is associated with malaria severity in Kenya. *Infect. Immun.* 63, 2323-26.
- 21- Persico MG, Viglietto G, Martino G, Toniolo D, Paonessa G, Moscatelli C, Dono R, Vulliamy TJ, Luzzatto L, D'urso M.** (1986). Isolation of human cDNA clones: Primary structure of proteine and unusual 5 non coding region. *Nucleic acids Res*; 14:2511.
- 22- Beutler E.** (1991). Glucose-6-Phosphate Deshydrogenase deficiency. *The New England Journal of Medecine*; 324:169-174.
- 23- Beutler E.** (1994). G6PD Deficiency, *Blood*, 11 :3613-36.
- 24- www.gs-im3.fr/G6PD/G6PDGenet.html** (17/07/08). - 9k - En cache - Pages similaires

- 25- Pai GS, Sprenkle JA, Do TT, Marena CE, Migeon BR.** (1980). Localisation of loci for hypoxanthine phosphoribosyltransferase and glucose-6-phosphate dehydrogenase and biochemical evidence of X-chromosome expression from studies of a human X-autosome translocation. Proc Natl Acad Sci USA. 77:2810-2813.
- 26- Keats B.** (1983). Genetic mapping: X-chromosome. Hum Genet 64: 28.
- 27- Sarah A. Tishkoff, Robert varkonyi, Nelie Cahinhinan, Salem Abbes, Georges Argyropoulos, Giovanni Destro-Bisol, Anthi Drousiotou, Bruce Dangerfield, Gerard Lefranc, Jacques Loiselet, Anna Piro, Mark Stoneking, Antonio Tagarelli, Giuseppe Tagarelli, Elias H. Touma, Scott M. Williams, Andrew G. Clark :** (July 20, 2001). Haplotype Diversity and Linkage Disequilibrium at Human G6PD: Recent Origin of alleles That Confer Malarial Resistance. Science, Vol. 293, Issue 5529, 455-462.
- 28- Beuzard Y; Rosa J; Galacteros F.** (1984). Maladies héréditaires du globule rouge. Coordinateurs Paris Doin; 252 p: 24cm n4416.
- 29- Najman A; Verdy E; Potron G.** (1994). Précis des maladies du sang. Paris Ellipse. Tr 463p 27cm: 363-367.
- 30- British Medical Association and the Royal Pharmaceutical Society of Great Britain.** (1996). Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency. British National Formulary; 32:380.
- 31- Friedman MJ.** (1979). Oxidant damage mediates variant red cell resistance to malaria. Nature, 280:245-247.
- 32- Roth EF, Raventos-Suarez C, Rinaldi A, and Nagel RL.** (1983). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency inhibits in vitro growth of *plasmodium falciparum*. Proc. Natl. Acad. Sci USA 80:298-299

- 33- Miller, L.H., Baruch, D.I., Marsh, K. & Doumbo, O.K.** (2002). The pathogenic basis of malaria. *Nature* 2002, 415, 673-79.
- 34- Haldane JBS.** (1949). The rate of mutation of human genes. *Hereditas*, 35(suppl 1): 267-73.
- 35- Hirono A, Beutler E.** (1988). Molecular cloning and nucleotide sequence of DNA for human Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 3951-3954.
- 36- Jolly D.** (2000). Le déficit en G6PD, une affection génétique fréquente et mal connue. Les Dossiers de l'institut d'études des politiques de santé. Paris : Médecine-Sciences Flammarion.
- 37- Guindo Aldiouma, Fairhurst Rick M, Doumbo Ogobara K, Wellems Thomas E, Diallo Dapa A..** (2007). X-linked G6PD deficiency protects hemizygous males but not heterozygous females against severe malaria *PLoS Med.* Mar; 4(3):e66.
- 38- Thérèse Duriez, Lucien Dujardin, Daniel Afchain.** Paludisme Copyright: Laboratoire de parasitologie Faculté de Pharmacie BP 83 59006 Lille cedex. Dernière mise à jour: 2/07/02, 12:55:54.
- 39- WHO.** (2000). Severe and complicated malaria. *Trans R Soc Med Hyg*; 94 (Suppl 1): 1-94.

IX-ANNEXES

Description des techniques :

1-Technique de détermination de la parasitémie: goutte épaisse

Principe

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

Matériel et consommables pour la goutte épaisse

- ✓ Tabouret
- ✓ Coton hydrophile
- ✓ Alcool à 70°C
- ✓ Gants en polyvinyle
- ✓ Lames porte-objet
- ✓ Vaccinostyles
- ✓ Boîte de collection de l'OMS
- ✓ Crayon de papier
- ✓ Paires de ciseaux
- ✓ Scotch
- ✓ Giemsa pur
- ✓ Comprimé tampon (Buffer tablet pH=7,2)
- ✓ Papier hygiénique
- ✓ Râtelier
- ✓ Bac de coloration
- ✓ Microscope optique binoculaire
- ✓ Huile d'immersion
- ✓ Compteur manuel, calculatrice
- ✓ Poubelle.
- ✓ Eprouvette graduée
- ✓ Source d'électricité

Mode opératoire

- Prélever une goutte de sang capillaire, par une ponction au niveau de la pulpe du doigt après désinfection à l'alcool à 70°C.
- Essuyer la première goutte de sang puis déposer la seconde au milieu d'une lame.
- A l'aide de l'angle d'une deuxième lame, étaler la goutte sur 1 cm de diamètre en tournant pendant quelques secondes.
- Laisser sécher.

NB : La goutte épaisse doit être transparente.

La coloration des lames se fait au Giemsa dilué à 5% (c'est à dire 5ml de Giemsa pur pour 95ml d'eau distillée tamponnée). L'eau tamponnée était préparée en dissolvant 1 comprimé tampon dans 1 litre d'eau distillée.

- Emerger la lame dans un bac de coloration contenant la solution de Giemsa à 5% pendant 25 minutes.
- Rincer la lame à l'eau de robinet, puis sécher sur le râtelier à l'air ambiant.
- Examiner les lames au microscope

La lecture s'effectue au microscope optique à l'objectif 100 en immersion.

- A l'aide d'un compteur manuel, compter les parasites et les leucocytes. (Ce comptage débute dès l'observation d'un parasite dans le champ visionné et se fait sur 300 leucocytes. La charge parasitaire est exprimée en rapportant le nombre de parasites pour les 300 leucocytes à 7500 leucocytes. Les 7500 leucocytes étant considérés comme la moyenne du nombre des leucocytes par mm³ de sang.

Soit P la parasitémie par mm³ de sang, X le nombre de parasites comptés et Y le nombre de leucocytes correspondant à X.

La parasitémie P est déterminée par la formule suivante :

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

2-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.

Matériels et composition du Kit QIAamp® (QIAGEN)

- ✓ Ciseaux
- ✓ Gants stériles
- ✓ Pipettes de 20 µl, 200 µl, 1000 µl
- ✓ Embouts de 20 µl, 200 µl, 1000 µl
- ✓ Agitateur
- ✓ Chronomètre
- ✓ Congélateur
- ✓ Box de conservation
- ✓ Marqueur indélébile
- ✓ Plaque chauffante
- ✓ Racks pour les tubes
- ✓ Centrifugeuse
- ✓ Mouchoir
- ✓ Thermomètre
- ✓ Tube Ependorf de 1,5ml
- ✓ Tube de 2ml
- ✓ Colonne Qiagen munie de filtre
- ✓ Ethanol absolu (96-100%)
- ✓ Kit QIAGEN
- ✓ Le Kit QIAGEN est composé de :
- ✓ Buffer ATL
- ✓ Buffer AL
- ✓ Buffer AW1
- ✓ Buffer AW2
- ✓ Buffer AE

✓ Protéinase K

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, incuber à 85°C pendant 10 minutes,
- Centrifuger et ajouter 20 µl de protéinase K, mélanger 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 des colonnes 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 150 µl de Buffer AE dans la colonne et incubé à 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)

3-Génotypage de la G6PD par la technique de polymérase Chain Réaction-Rstriction enzyme Analysis (PCR-REA)

Principe

Le principe consiste à faire le diagnostic de la mutation ponctuelle au niveau du gène de la G6PD 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, ils 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.

Matériels

- ✓ 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
- ✓ Bain marie
- ✓ Balance
- ✓ Erlenmeyer
- ✓ Moule
- ✓ Micro onde
- ✓ Eprouvette graduée 100ml

- ✓ Peignes pour gel
- ✓ Bac de migration
- ✓ Appareil photo UV
- ✓ Film polaroid
- ✓ Parafilm
- ✓ Générateur
- ✓ Source de lumière UV

Réactifs :

- ✓ Les Amorces : Deux paires d'amorces sont utilisés :

A2 : GTCTTCTGGGTCAGGGAT et B2 : GGAGAAAGCTCTCTCTCC pour la première amplification, NA4: CCTGTTCCCTCTGCCACA et NB4: GGGGGTCTCAAGAAGTAC pour la deuxième amplification

- ✓ Platinum supermix
- ✓ Eau pour biologie moléculaire
- ✓ Solution de buffer K 10X
- ✓ Solution de BSA 10X
- ✓ Enzyme Hsp92II
- ✓ Agarose ultra pure GIBCO BRL
- ✓ Solution de Bromure d'Ethidium (Sodium)
- ✓ TBE 0.5X
- ✓ Dye (buffer de chargement)
- ✓ Marqueur de poids moléculaire

Procédure de la PCR :

- ❖ 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 identifiés 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 µl (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 pour la première amplification (le programme B 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
- ✚ Sortir les tubes et les garder au réfrigérateur à 4°C.

Programme de la deuxième amplification :

- ✚ Dénaturation initiale à 94°C pendant 2 minutes

Puis 35 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 une durée illimitée

Digestion enzymatique :

- ❖ Déterminer le nombre N d'échantillon à traiter,
- ❖ Prendre un tube eppendorf 1.5 ml,
- ❖ Mettre Nx13 µl d'eau pour Biologie moléculaire
- ❖ 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
- ❖ Ajouter 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.

Préparation du gel de migration : Gel à 1.5%

- ❖ Peser 1.5 g de poudre d'agarose et le mettre dans une fiole (erlenmeyer)
- ❖ Ajouter 100 ml de solution de TBE 0.5X
- ❖ Bouillir dans le micro onde pendant 3 minutes
- ❖ Laisser 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.

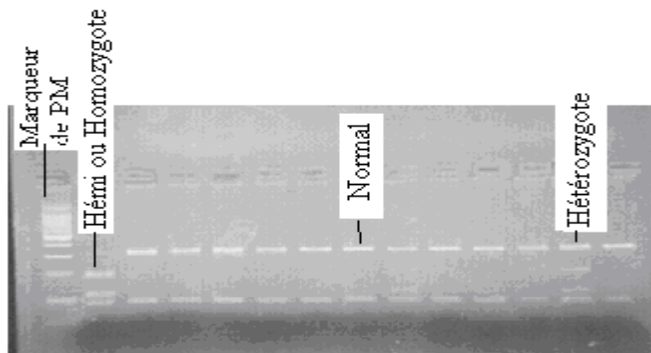
La migration :

- ❖ 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'une camera polaroid.
- ❖ Numéroter les bandes.

Interprétation de la photographie

Après digestion et la migration, 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: photographie d'une bande d'ADN de la G6PD après digestion



4-Phénotypage de l'Hémoglobine :

Il a été réalisé par la méthode de chromatographie en phase liquide haute performance. (**D-10 Bio-Rad**). Cette méthode est très efficace et rapide, Elle permet de déterminer les différents types d'hémoglobine et leur proportion dans un échantillon.

5-Culture de *P. falciparum*

Matériels :

- ✓ Becher
- ✓ Balance
- ✓ Agitateur magnétique
- ✓ Filtre 500ml,
- ✓ Filtre 1 litre
- ✓ Réfrigérateur
- ✓ Tubes coniques 15ml labellées
- ✓ Centrifugeuse
- ✓ Pompe aspirateur
- ✓ Incubateur à 37°C et 5%CO₂
- ✓ Flasques de 15ml ou 100ml
- ✓ Disques ronds
- ✓ Pipettes pasteur
- ✓ Lame
- ✓ Microscope
- ✓ Hotte

Réactifs

- ✓ Eau stérilisée pour culture
- ✓ RPMI (poudre)
- ✓ HEPES (poudre)
- ✓ Hypoxanthine (poudre)
- ✓ Bicarbonate de sodium (solution)
- ✓ Gentamicine (solution)
- ✓ Albumax (poudre)

Collecte du sang parasité

Avec le consentement d'un patient paludéen (GE+) ou ceux de ses parents ou tuteurs (s'il est enfant), faire un prélèvement veineux sur anticoagulant de préférence l'héparine (jamais l'EDTA car ce produit consomme le Ca⁺⁺ du sang nécessaire au métabolisme du plasmodium)

Collecte des GR non parasités

Elle se fait dans les mêmes conditions que celles du sang parasité mais chez un sujet sain de préférence de Groupe O+ et d'hémoglobine de type AA

Préparation du milieu incomplet (RPMI solution)

Pour 1 litre

- ❖ Rincer le Becher avec de l'eau distillée
- ❖ Peser 5,95g de HEPES et 50mg d'hypoxanthine
- ❖ Mettre dans le becher 500ml d'eau stérilisée pour culture et ajouter le HEPES et l'hypoxanthine pesés
- ❖ Laisser agiter sur l'agitateur magnétique à 40°C jusqu'à dissolution totale (~60min)
- ❖ Ajouter 1 sachet de RPMI et rincer l'intérieur du sachet pour récupérer tout le RPMI
- ❖ Compléter la solution à 1 litre en ajoutant le reste du litre d'eau stérilisée pour culture
- ❖ Laisser agiter sur l'agitateur magnétique à 40°C jusqu'à dissolution totale (~60min)

- ❖ Filtrer dans un filtre de 1 litre : on obtient 1 litre de milieu incomplet ou RPMI solution

Préparation milieu complet de culture (CM)

- ❖ A 485ml de RPMI, ajouter 2,5g d'albumax
- ❖ Agiter sur l'agitateur magnétique jusqu'à dissolution totale de tout l'albumax (sans chauffer car l'albumax est sensible à la chaleur)
- ❖ Ajouter 14ml de la solution de bicarbonate de sodium à 7,5%, 1ml de la solution de gentamicine
- ❖ Filtrer sur 1 filtre de 500ml et on obtient 500ml de CM prêt à l'utilisation

On obtient 500ml de CM

NB : Le RPMI et le CM sont stockés dans le réfrigérateur à 4°C et sont toujours ramenés à la température de 37°C avant utilisation.

Lavage des globules rouges

Il a pour but d'enlever tous les anticorps et leucocytes pouvant entraver le développement du plasmodium.

- ❖ Transvaser les sangs dans les tubes coniques 15ml labellés et centrifuger à 2000 rpm pendant 5min (le nombre de rpm et de minute est fonction de la viscosité du sérum et du volume total du produit à centrifuger)
- ❖ Aspirer à l'aide de la pompe aspirateur tout le surnageant (plasma) et la couche superficielle du culot constituer essentiellement de leucocytes et de plaquette.
- ❖ Ajouter une quantité suffisante de RPMI pour résuspendre le culot de globule rouge
- ❖ Bien agiter sans provoquer la lyse des globules rouge et centrifuger à 2000 rpm pendant 2 minutes
- ❖ Reprendre cette opération trois fois
- ❖ Enfin suspendre le culot de GR dans le RPMI à 50% d'hématocrite et le garder à 4°C

NB : Les GRP sont lavés de la même façon avant leur mise en culture.

Mise en culture

Il s'agit d'un bouillon de culture. Les GRP issus de sang de patient ayant une GE positive sont lavés et résuspendus dans du CM à un hémocrite convenable (fonction de la parasitémie initiale) et incubés à 37°C sous une atmosphère de 5% CO₂.

La culture peut se faire soit dans les flasques de 15 ou 100ml suivant le besoin sous un incubateur à 37°C et 5% CO₂ ou dans les disques ronds sous une couveuse en verre munie de bougie.

NB : Pour les flasques de 15ml ou les disques ; le volume de la culture est de 5ml ; pour les flasques de 200 ou 250ml, on utilise un volume total de culture de 15ml. L'hématocrite de la solution de culture est fonction de la parasitémie initiale. Plus la parasitémie est élevée, plus l'hématocrite doit être faible soit environ : l'hématocrite est généralement de 1 à 5%.

Le CM est fréquemment changé pour apporter à la culture les nutriments nécessaires à la croissance des parasites.

Pour cela,

- ❖ Faire sortir les flasques de culture de l'incubateur sans les agiter
- ❖ Aspirer le surnageant de la culture à l'aide de la pompe aspirateur munie d'une pipette pasteur préalablement stérilisée au bec- Bunsen
- ❖ Faire un frottis de contrôle
- ❖ Ajouter à peu près la même quantité de CM que le surnageant aspiré
- ❖ Agiter sans hémolyse des GR
- ❖ Replacer les flasques dans l'incubateur à 37°C, 5% CO₂.

NB : Lorsque la parasitémie avoisine les 5% il faut faire une dilution de la culture. Plus la parasitémie est élevée plus fréquemment il faut changer le milieu de culture.

6-La culture in vitro des HMVECs avec des facteurs de croissances

Matériels

- ✓ Flasque T25
- ✓ Lame à 8 chambres
- ✓ Tube de 50ml
- ✓ Tube de 15ml
- ✓ Centrifugeuse
- ✓ Hotte
- ✓ Pipette pasteur 2ml
- ✓ Pipette pasteur 5ml
- ✓ Pipette pasteur 10ml
- ✓ Pipette pasteur 25ml
- ✓ Micropipette de 200ul
- ✓ Micropipette de 1000ul
- ✓ Micropipette de 10ul
- ✓ Agitateur magnétique
- ✓ Microscope
- ✓ Microscope d'inversion
- ✓ Pistolet aspirateur
- ✓ Pompe aspirateur
- ✓ Incubateur à CO₂

REACTIFS

- ✓ HMVECs
- ✓ HEPES

- ✓ Trypsine/EDTEA
- ✓ TNS
- ✓ EGM-2
- ✓ EBM-2

Mode opératoire

- ❖ Décongeler les cellules endothéliales (HMVECs Cambrex)
- ❖ Mettre 10 ml du milieu de culture enrichi pour cellule endothéliale (EGM-2) préalablement ramené à 37°C dans un flasque T25 de culture.
- ❖ Transvaser les cellules endothéliales décongelées dans le milieu de culture contenu dans le flasque de culture.
- ❖ Placer le flasque de culture contenant la suspension de culture dans l'incubateur à 37°C et 5% CO₂.
- ❖ Changer le milieu de culture le lendemain en aspirant les 10ml de surnageant par la pompe aspirateur et en y ajoutant 10 ml de milieu de culture frais.
- ❖ Changer le milieu de culture chaque deux jours jusqu'à ce que la culture soit confluente.

Passage des cellules

- ❖ Décongeler la trypsine, la solution de neutralisation de trypsine, HEPES et faire des aliquotes. La trypsine doit être à 37°C
- ❖ Réchauffer le milieu de culture (EGM-2) à 37°C

NB : Il ya confluence lorsque la surface des flasques de culture est saturée à 80 - 90%.

- ❖ Agiter le milieu de culture contenu dans le flasque T25
- ❖ Laver les cellules avec 5ml de HEPES
- ❖ Couvrir les cellules avec 2ml de trypsine/ EDTA et agiter le flasque doucement jusqu'au détachement et l'isolement (observer au microscope à l'inversion (5x objective))

- ❖ Attendre que les cellules soient décollées de la paroi du flasque de culture (minimum 5 mn)
- ❖ Ajouter 3ml de TNS et transférer le contenu du flasque dans un nouveau tube de 15ml
- ❖ Rincer encore le flasque avec le TNS puis ajouter au contenu du tube de 15ml le reste du détachement de HMVEC
- ❖ Centrifuger à une température de 2°C en raison de 1500-2000 rpm < 5mn
- ❖ Enlever la solution de trypsine TNS par aspiration, faire très attention pour n'est pas toucher le fond, si nécessaire laisser une petite quantité de solution (trypsine TNS) et arrêter au niveau de la boulette
- ❖ Secouer le fond pour la résuspension des cellules
- ❖ Ajouter 1ml de la solution de culture et secouer jusqu'à ce que les cellules soient totalement résuspendues
- ❖ Ajouter encore 4ml de la solution de culture et mélanger attentivement la suspension
- ❖ Faire différentes dilutions dans les flasques T25 et les lames de cytoadhérence.

7-Sélection des GR contenant les formes matures pures de *P. falciparum* : méthode magnétique.

Principe

Les formes mûres de *P. falciparum* sont très riches en hémotoïne, un pigment à affinité magnétique très élevée. Il s'agit de retenir toutes les formes mûres de *P. falciparum* sur une colonne contenant un aimant et placée dans un champ magnétique et de les récupérer après avoir enlevé la colonne du champ magnétique par élution avec le CM.

Le dispositif de purification est composé de :

- Une colonne contenant un aimant ;
- Un aimant en U pour créer le champ magnétique ;
- Un robinet auquel on peut adapter une aiguille et une seringue.

Faire le montage du dispositif de purification;

Fermer le robinet;

Charger la seringue avec du MIC sans bulle d'air;

Adapter la seringue au robinet et transférer le MIC dans le robinet jusqu'à ce que le MIC monte dans la colonne;

Compléter la colonne avec du MIC;

Ouvrir le robinet et laisser couler le MIC (on veillera à ce que la colonne ne soit pas totalement vidée);

Fermer le robinet et verser dans la colonne le sang parasité à purifier et suspendu à 0.5%;

Ouvrir le robinet : on récupère dans un tube conique un filtrat contenant les formes immatures de *P. falciparum*. (Ne pas attendre que la colonne soit totalement vidée);

Enlever la colonne de l'aimant en U et faire l'élution des formes matures de *P. falciparum* avec 5 ml CM;

On récupère dans un autre tube conique une solution contenant essentiellement des formes matures de *P. falciparum*.

NB : Après la purification le dispositif doit être nettoyé avec du MIC.

8-Test de cytoadhérence

Principe

Consiste à évaluer la capacité de fixation des GRP sur les cellules endothéliales des micro-vasculaires humaines exprimant les récepteurs de PfEMP-1 sur leur surface.

Matériels

- ✓ Flasque de culture
- ✓ Lame à 8 chambres
- ✓ MACS colonne

- ✓ MACS stopcock
- ✓ Hemacytometre
- ✓ Tube 50 ml
- ✓ Tube 15ml
- ✓ Centrifugeuse
- ✓ Hotte
- ✓ Pipette Pasteur de 2ml, 5ml, 10ml, 25ml
- ✓ Pipette de 1000ul, 200ul, 10ul
- ✓ Rotateur
- ✓ Microscope
- ✓ Microscope d'inversion
- ✓ Pistolet aspirateur
- ✓ Pompe aspirateur

Réactifs

- ✓ Eau stérilisée pour la culture
- ✓ RPMI
- ✓ HERPES sans acide
- ✓ BSA (poudre)
- ✓ Hyposanthine
- ✓ HMVECS
- ✓ Parasite à cultiver
- ✓ Glutaraldehyde
- ✓ Gemsa

Mode opératoire

Préparer le tampon de fixation (500ml de RPMI+ 2,5mg de BSA, bien agiter pour dissoudre et garder à 4°C)

Préparer la forme mature du parasite par purification et résuspendre dans le tampon de fixation (1%HT et 5% parasitémie) (utiliser l'hémacytometre)

Aspirer le milieu de culture contenu dans la chambre de la lame de culture des cellules endothéliales.

Immédiatement rincer avec le tampon de fixation (ne pas enlever le tampon de fixation jusqu'à ce que la suspension de parasite soit prête)

Ensuite enlever le tampon de fixation de la lame.

Ajouter 150ul de la suspension de forme mature de parasite dans chaque chambre.

Faire les frottis pour chacun des échantillons ajoutés à la cellule endothéliale dans les chambres pour faire le compte exact de la parasitémie

Incuber la lame à chambre à la température ambiante sous agitateur pendant 1heure.

A 45mn préparer la solution de fixation (4ml de 25% EM grade aldéhyde dans un tube flacon de 50ml ajouter 4,6ml de PBS 10*x et compléter à 50ml avec de l'eau de culture).

Enlever les suspensions de parasite de chaque chambre (faire vite pour éviter l'assèchement de cellules).

Enlever attentivement les chambres de la lame et laver la lame avec le tampon de fixation en y plongeant de façon horizontale 2 fois (très doucement dans 2 récipients différents).

Immédiatement placer la lame dans la solution de fixation préalablement préparée.

Laisser la lame dans la solution de fixation 2 à 4 mn à la température ambiante.

Rincer la lame avec de l'eau distillée.

Colorer la lame au gamsa à 2% pendant 1 heure.

Rincer la lame avec de l'eau distillée.

Sécher la lame sous la hotte.

On compte au moins 350 cellules endothéliales dans chaque chambre et le nombre de parasite fixé sur chaque cellule endothéliale (éviter les angles de la chambre).

$$\frac{\text{Nombre de parasite fixé}}{\text{Nombre de cellule endothéliale}} = \text{score de cytoadhérence}$$



Fiche Signalétique

Nom : **SOMBORO**

Prénom : **Anou Moïse**

Titre : **Mécanismes de protection du déficit en G6PD(A) contre les formes graves de paludisme à *P. falciparum* : Résultats d'études préliminaires *in vitro*.**

Pays d'origine : **Mali**

Ville de soutenance : **Bamako**

Lieu de dépôt : **Bibliothèque de la Faculté de Médecine de Pharmacie et D'Odonto-Stomatologie.**

Secteur : **Hématologie, Parasitologie**

Résumé : Le déficit en G6PD est une enzymopathie érythrocytaire principalement retrouvée dans les zones d'endémie palustre où il confère une protection contre les formes graves de paludisme aux personnes qui en sont porteuses. Il s'agissait pour nous dans cette étude de proposer des mécanismes par lesquels cette protection s'exerce. Ainsi, nous avons évalué l'évolution intra-érythrocytaire de *P. falciparum* et la capacité d'invasion des globules rouges par le *P. falciparum* en fonction des différents génotypes de G6PD(A), et étudié l'adhésion des globules rouges parasités aux cellules endothéliales.

Au terme de cette étude nous avons constaté que:

- ❖ L'évolution intra-érythrocytaire de *P. falciparum* se trouvait réduite de 46,7% dans les globules rouges du sujet hémizygote comparés aux globules rouges du sujet normal.
- ❖ Le taux d'augmentation de la parasitémie au passage du stade de trophozoïte au stade de ring était de 38,69% pour les globules rouges du sujet hémizygote contre 172,21% pour les globules rouges du sujet normal
- ❖ L'adhésion des globules rouges parasités des sujets hémizygotes et homozygotes aux cellules endothéliales était réduite respectivement de 16,1% et de 25,7% comparée à celle observée pour les globules rouges parasités du sujet normal.

Nous avons conclu que les réductions observées au niveau de l'ensemble de ces phénomènes pourraient expliquer au moins partiellement la protection que confère le déficit en G6PD(A) contre le paludisme grave.

Mots clés : **G6PD, paludisme, P. falciparum, protection.**

SERMENT DE GALIEN



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

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

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

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

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

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

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