

République du Mali

Un Peuple-Un But-Une Foi

MINISTÈRE DE L'ÉDUCATION NATIONALE

UNIVERSITÉ DE BAMAKO

Faculté de Médecine de Pharmacie et D'Odonto-Stomatologie

ANNEE : 2004-2005

Thèse N°.....

**Déterminants immunologiques et génomiques de la clairance des
souches de plasmodium falciparum résistantes à la chloroquine**

Thèse présentée et soutenue publiquement le 10 avril 2004
Devant la Faculté de Médecine de Pharmacie et D'Odonto-Stomatologie
Par M^{elle} **Dinkorma Ouologuem**

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

Examineurs :

Président:	Professeur Boubacar Sidiki Cissé
Membres :	Professeur Gaoussou Kanouté
	Professeur Anatole Tounkara
Codirecteur:	Abdoulaye Djimdé
Directeur	Professeur Ogobara Doumbo

**FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET
D'ODONTOSTOMATOLOGIE ANNEE UNIVERSITAIRE 2003-2004**

ADMINISTRATION

DOYEN : **Moussa TRAORE-PROFESSEUR**

1^{er} ASSESSEUR : **Massa SANOGO- MAITRE DE CONFERENCES**

2^{ème} ASSESSEUR: **Gangaly DIALLO-MAITRE DE CONFERENCES AGREGE**

SECRETAIRE PRINCIPAL: **Yénimégué Albert DEMBELE-MAITRE DE
CONFERENCES**

AGENT COMPTABLE : Madame Fatoumata Tall - **CONTROLEUR DES
FINANCES.**

PROFESSEURS HONORAIRES

Mr Aliou BA	Ophtalmologie
Mr Bocar SALL	Orthopédie-Traumatologie.Secourisme
Mr Souleymane SANGARE	Pneumo-Phtisiologie
Mr Yaya FOFANA	Hématologie
Mr Mamadou Lamine TRAORE	Chirurgie Générale
Mr Balla COULIBALY	Pédiatrie
Mr Mamadou DEMBELE	Chirurgie Générale
Mr Mamadou KOUMARE	Pharmacognosie
Mr Mohamed TOURE	Pédiatrie
Mr Ali Nouhoum DIALLO	Médecine Interne
Mr Aly GUINDO	Gastro-Entérologie

LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT PAR D.E.R. ET 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, Chef de D.E.R.
Mr Kalilou OUATTARA	Urologie
Mr Amadou DOLO	Gynéco-Obstétrique

2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Abdoulaye DIALLO	Ophtalmologie
---------------------	---------------

Mr Djibril SANGARE
Mr Abdel Kader TRAORE dit DIOP
Mr Alhousseyni Ag MOHAMED
Mr Abdoulaye K. DIALLO
Mr Gangaly DIALLO

Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
O.R.L.
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie viscérale

3. MAITRES DE CONFERENCES

Mme SY Aissata SOW	Gynéco-obstétrique
Mr Salif DIAKITE	Gynéco-obstétrique

4. MAITRES ASSISTANTS

Mme DIALLO Fatimata S DIABATE	Gynéco-Obstétrique
Mr Mamadou TRAORE	Gynéco-Obstétrique
Mr Sadio YENA	Chirurgie Générale
Mr Filifing SISSOKO	Chirurgie Générale
Mr Issa DIARRA	Gynéco-Obstétrique

5. ASSISTANTS

Mr Mounirou BABY	Hématologie
Mr Mahamadou A. THERA	Parasitologie- Mycologie

D.E.R. DE MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES

1. PROFESSEURS

Mr Abdoulaye Ag RHALY	Médecine Interne
Mr Mamadou K. TOURE	Cardiologie
Mr Mahamane MAIGA	Néphrologie
Mr Baba KOUMARE	Psychiatrie, Chef de DER
Mr Moussa TRAORE	Neurologie
Mr Issa TRAORE	Radiologie
Mr Mamadou M. KEITA	Pédiatrie
Mr Hamar Alassane TRAORE	Médecine Interne
Mr Dapa Aly DIALLO	Hématologie

2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Toumani SIDIBE	Pédiatrie
Mr Bah KEITA	Pneumo-Phtisiologie
Mr Boubacar DIALLO	Cardiologie
Mr Somita KEITA	Dermato-Leprologie
Mr Moussa Y. MAIGA	Gastro-entérologie
Mr Abdel Kader TRAORE	Médecine-Interne
Mr Siaka SIDIBE	Radiologie

3. MAITRES ASSISTANTS

Mr Mamadou DEMBELE	Médecine Interne
Mr Mamady KANE	Radiologie
Mme Tatiana KEITA	Pédiatrie
Mr Diankiné KAYENTAO †	Pneumo-Phtisiologie
Mme TRAORE Mariam SYLLA	Pédiatrie
Mr Adama D. KEITA	Radiologie

Mme SIDIBE Assa TRAORE
Mme Habibatou DIAWARA

Endocrinologie
Dermatologie

4. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Mr Bou DIAKITE	Psychiatrie
Mr Bougouzié SANOGO	Gastro-entérologie
Mr Saharé FONGORO	Néphrologie
Mr Bakoroba COULIBALY	Psychiatrie
Mr Kassoum SANOGO	Cardiologie
Mr Seydou DIAKITE	Cardiologie
Mr Mahamadou B. CISSE	Pédiatrie
Mr Arouna TOGORA	Psychiatrie
Mme DIARRA Assetou SOUCKO	Médecine Interne
Mr Boubacar TOGO	Pédiatrie
Mr Mahamadou B. TOURE	Radiologie
Mr Idrissa A. CISSE	Dermatologie
Mr Mamadou B. DIARRA	Cardiologie
Mr Anselme KONATE	Hépatho Gastro-Entérologie
Mr Moussa T. DIARRA	Hépatho Gastro-Entérologie
Mr Souleymane DIALLO	Pneumologie
Mr Souleymane COULIBALY	Psychologie
Mr Daouda K. MINTA	Maladies Infectieuses
M Soungalo DAO	Maladies Infectieuses

5. ASSISTANT

Mr Cheick Oumar GUINTO	Neurologie
------------------------	------------

6. ASSISTANTS CHEF DE CLINIQUE

Mr Mamadou L. DIOMBANA	Stomatologie
Mr Sékou SIDIBE	Ortho-Traumatologie
Mr Abdoulaye DIALLO	Anesthésie-Réanimation
Mr Tiéman COULIBALY	Ortho-Traumatologie
Mme TRAORE J. THOMAS	Ophtalmologie
Mr Nouhoum ONGOIBA	Anatomie & Chirurgie Générale
Mr Zanafon OUATTARA	Urologie
Mr Zimogo Zié SANOGO	Chirurgie Générale
Mr Adama SANGARE	Ortho-Traumatologie
Mr Youssouf COULIBALY	Anesthésie-Réanimation
Mr Samba Karim TIMBO	O.R.L.
Mme KONIPO Fanta TOGOLA	O.R.L.
Mr Sanoussi BAMANI	Ophtalmologie
Mr Doulaye SACKO	Ophtalmologie
Mr Ibrahim ALWATA	Ortho-Traumatologie

D.E.R. DE SCIENCES FONDAMENTALES

1. PROFESSEURS

Mr Daouda DIALLO	Chimie Générale & Minérale
Mr Bréhima KOUMARE	Bactériologie-Virologie
Mr Siné BAYO	Anatomo-Pathologie. Histoembryologie
Mr Yéya T. TOURE	Biologie
Mr Amadou DIALLO	Biologie,
Mr Moussa HARAMA	Chimie organique
Mr Ogobara DOUMBO	Parasitologie-Mycologie, Chef de D.E.R.

2. MAITRES DE CONFERENCE AGREGE

Mr Yénimégué A. DEMBELE	Chimie Organique
Mr Anatole TOUNKARA	Immunologie
Mr Amadou TOURE	Histoembriologie
Mr Flabou BOUGOUDOGO	Bactériologie

3. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Bakary M. CISSE	Biochimie
Mr Abdramane S. MAIGA	Parasitologie
Mr Adama DIARRA	Physiologie
Mr Mamadou KONE	Physiologie
Mr Massa SANOGO	Chimie analytique

4. MAITRES ASSISTANTS

Mr Mamadou CISSE	Biologie
Mr Sékou F.M. TRAORE	Entomologie Médicale
Mr Abdoulaye DABO	Malacologie, Biologie Animale
Mr Abdramane TOUNKARA	Biochimie
Mr Ibrahim I. MAIGA	Bactériologie
Mr Moussa Issa DIARRA	Biophysique
Mr Amagana DOLO	Parasitologie-Mycologie
Mr Kaourou DOUKOURE	Biologie
Mr Boureima KOURIBA	Immunologie
Mr Souleymane DIALLO	Bactériologie – Virologie
Mr Cheik Bougadari TRAORE	Anatomie-Pathologie

D.E.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

1. PROFESSEURS

Mr Boubacar Sidiki CISSE	Toxicologie
Mr Gaoussou KANOUTE	Chimie analytique

2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Arouna KEITA †	Matière Médicale
Mr Ousmane DOUMBIA	Pharmacie Chimique

3. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Boulkassoum HAIDARA	Législation
Mr Elimane MARIKO	Pharmacologie, Chef de D.E.R.

4. MAITRES ASSISTANTS

Mr Benoît KOUMARE	Chimie Analytique
Mr Drissa DIALLO	Matières Médicales
Mr Alou KEITA	Galénique
Mr Ababacar I. MAIGA	Toxicologie
Mr Yaya KANE	Galénique

D.E.R. DE SANTE PUBLIQUE

1. PROFESSEUR

Mr Sidi Yaya SIMAGA	Santé Publique, Chef de D.E.R.
---------------------	---------------------------------------

2. MAITRE DE CONFERENCES AGREGE

Mr Moussa A. MAIGA	Santé Publique
--------------------	----------------

3. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sanoussi KONATE	Santé Publique
--------------------	----------------

4. MAITRES ASSISTANTS

Mr Bocar G. TOURE	Santé Publique
Mr Adama DIAWARA	Santé Publique
Mr Hamadoun SANGHO	Santé Publique
Mr Massambou SACKO	Santé Publique
Mr Alassane A. DICKO	Santé Publique

CHARGES DE COURS & ENSEIGNANTS VACATAIRES

Mr N'Golo DIARRA	Botanique
Mr Bouba DIARRA	Bactériologie
Mr Salikou SANOGO	Physique
Mr Bokary Y. SACKO	Biochimie
Mr Boubacar KANTE	Galénique
Mr Souleymane GUINDO	Gestion
Mme DEMBELE Sira DIARRA	Mathématique
Mr Modibo DIARRA	Nutrition
Mme MAIGA Fatoumata SOKONA	Hygiène du Milieu
Mr Arouna COULIBALY	Mathématiques
Mr Mahamadou TRAORE	Génétique
Mr Souleymane COULIBALY	Psychologie Médicale
Mr Yaya COULIBALY	Législation
Mme Rokia SANOGO	Pharmacognosie
Mr Boubacar TRAORE	Pharmacognosie
Mr Saïdou MAIGA	Législation
Mr Ousmane KOITA	Parasitologie Moléculaire
Mr Samba DIOP	Anthropologie Médicale
Mr Seydou DOUMBIA	Epidémiologie
Mr Oumar THIERO	Bio statistique
Mr Mangara BAGAYOGO	Entomologie Moléculaire Médicale
Mr Guimogo DOLO	Entomologie Moléculaire Médicale
Mr Abdoulaye TOURE	Entomologie Moléculaire Médicale
Mr Djibril SANGARE	Entomologie Moléculaire Médicale
Mr Moctar DIALLO	Biologie Parasitologie

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

DEDICACES

Je dédie ce travail :

**Au prophète MOHAMED paix et salut sur lui, sa famille et ses compagnons
Amen !**

A mon père Abdoulaye OUOLOGUEM

Ton éducation rigoureuse a fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Tu nous as appris, ma sœur, mes frères et moi, le sens du travail bien fait, la loyauté et le respect du prochain. Nous n'avons jamais manqué de rien. Tu as suivi avec beaucoup d'intérêt toute notre vie scolaire. Ce travail est le résultat de tous les sacrifices et multiples efforts que tu as consentis pour moi. Je ne saurai jamais te remercier assez pour tous les conseils que tu nous as prodigué Papa, Trouves ici l'expression de mon attachement et de mon amour. Que DIEU le tout puissant te garde longtemps à nos côtés ! Amen!

A ma mère Aissata DOLO

Tu t'es beaucoup sacrifiée afin de nous donner une bonne éducation à mes frères et moi. Tes conseils, tes bénédictions et ton affection maternelle m'ont toujours accompagnée durant mes études. Puisse ce travail être un début au couronnement de tes efforts. Trouves ici l'expression de mon amour indéfectible Tanti. Que DIEU le tout puissant te garde longtemps à nos côtés ! Amen !

A mes frères Moussa, Laya, Ibrahim, Ousmane et ma sœur Fatoumata

Soucieux de ma réussite, vous m'avez soutenu et entouré de votre affection fraternelle. Soyez rassurés de ma profonde reconnaissance.

Puisse ce travail vous apporter une satisfaction légitime et puisse DIEU consolider chaque jour nos liens fraternels malgré la distance qui nous sépare. Amen!

REMERCIEMENTS

Mes remerciements s'adressent :

A mes oncles Idrissa et Issa OUOLOGUEM et leurs familles

C'est l'occasion pour moi de vous remercier du soutien tant moral que matériel que j'ai reçu de votre part depuis mon arrivée au Mali. Ce travail est le vôtre.

A mon fiancé Abdourahamane TOURE

Nous avons partagé tellement de choses ! Tu as été à mes côtés pendant les moments difficiles. Ce modeste travail est le tien. Que Dieu bénisse notre union et nous accorde longue vie!

A tous mes oncles et toutes mes tantes, fils et filles de feu Laya OUOLOGUEM et leurs familles

Merci pour votre soutien moral. Que ce travail soit le plus fort témoignage de ma reconnaissance!

A tous mes oncles et toutes mes tantes

Mes vifs remerciements pour vos conseils et vos encouragements.

A mes cousins et mes cousines

Toute ma sympathie, ce travail est le vôtre.

A tous mes oncles et Tantes leurs familles vivant au GABON

Je ne saurai jamais vous remercier assez pour toute l'assistance et la patience dont vous avez fait preuve pour ma formation tant scolaire que sociale tout au long de mon court séjour au GABON. Ce travail est avant tout le vôtre.

A Aissata ONGOIBA, Soumailla DIARRA et Mohamad Ag AYOYA

Un grand merci pour votre soutien.

A mon amie et camarade de promotion Amina AMADOU

Nous avons partagé ensemble tous les bons et mauvais moments tout au long de ce cycle. Tes encouragements et tes conseils ne m'ont jamais fait défaut. Restons unies et solidaires pour toujours.

Au Dr Abdoulaye DJIMDE :

Vous avez été plus qu'un grand frère pour moi. Vous nous avez initié à la biologie moléculaire avec patience. Nous avons énormément apprécié vos conseils et votre modestie. Merci infiniment Dr Djimdé pour tout le soutien dont vous avez fait preuve tout le long de mon apprentissage.

Aux membres du MEDRU : Dr Abdoul H. BEAVOGUI , Mamadou WELE, Dr TEKETE, Dr Mahamadou H. Assadou, Dr Hamma MAIGA, Dr FOFANA, Dr GARBA, Souleymane DAMA, Demba DEMBELE, Aminatou KONE, Sékou TOURE, Dr Bakary SIDIBE, Oumou KEITA

Je ne saurai jamais vous remercier assez pour tous les encouragements, l'assistance et la disponibilité dont vous avez fait preuve. Vos apports dans l'élaboration de cette thèse ont été d'une qualité inestimable. Merci infiniment pour tout car sans vous ce travail n'aurait jamais été réalisé.

Au Dr Mamadou DIAKITE

Vous avez été un frère avant tout. Votre souci du travail bien fait m'a beaucoup éclairé dans la réalisation de ce travail qui est aussi le tien. Reçez l'expression de mes sincères remerciements et ma profonde reconnaissance.

Au Dr Yacouba Sissoko

Votre disponibilité et votre patience m'ont beaucoup aidé pour l'élaboration de ce document. Merci infiniment Yacou !

A la famille Feue Mamata TOURE

Vous m'avez adopté comme les vôtres. Je vous remercie pour votre affection

A mes camarades et aînés du DEAP

Je vous dis merci pour votre sympathique collaboration.

A tous les chercheurs du DEAP/ MRTC

Une liste nominative serait longue. Recevez par ce présent document l'expression de tous mes respects et mes vifs remerciements.

A tout le personnel du DEAP/ MRTC (Informaticiens, Gestionnaires, Chauffeurs, Secrétaires et Manoeuvres)

J'aimerais vous remercier pour votre disponibilité et pour votre collaboration.

A tous les enseignants, personnel administratif et étudiants de la FMPOS

Mes sincères remerciements

A toute la population de KOLLE et de BANDIAGARA

Merci pour votre participation, votre générosité et votre hospitalité. Vous n'avez ménagé aucun effort pour la réalisation de ce travail.

A toute l'équipe du Pr Kwiatkowski au Wellcome Trust Center de l'Université d'Oxford en Angleterre

Recevez par ce présent document l'expression de tous mes respects et mes vifs remerciements

A toutes les personnes de bonne volonté qui ont contribué de près ou de loin à la réussite de ce travail

Qu'elles en soient remerciées et que la paix soit avec eux!

AUX MEMBRES DU JURY

A notre maître président du jury

Professeur Boubacar S.Cissé

Recteur honoraire

Professeur de toxicologie à la faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie.

Conseiller Technique au Ministère de la santé

Cher maître, nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider le jury de ce travail. Nous avons admiré vos qualités scientifiques et pédagogiques. Votre souci du travail bien fait, votre simplicité et votre lutte pour la cause des études pharmaceutiques et de la profession pharmaceutique au Mali, font de vous un grand maître digne d'admiration.

C'est un grand honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury.

Soyez assuré de notre reconnaissance.

A notre maître et juge

Professeur Gaoussou KANOUTE

Professeur de Chimie Analytique de Chromatographie et d'analyse instrumentale à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie.

Directeur du Laboratoire National de la Santé.

Nous avons eu le privilège de bénéficier de votre savoir-faire et de votre savoir être.

En acceptant de nous juger malgré vos multiples occupations vous nous honorez.

Veillez trouver ici, cher Maître, l'expression de notre reconnaissance et notre profond respect.

A notre maître et juge

Professeur Anatole TOUNKARA

Maître de conférence agrégé d'Immunologie à la faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie.

Chef du centre National de Transfusion Sanguine du Mali.

Nous nous réjouissons de votre disponibilité en acceptant de siéger dans ce jury malgré vos multiples occupations.

Vous demeurez pour nous un modèle de dévouement et de persévérance dans le travail bien fait.

Veillez trouver ici, cher Maître, l'expression de notre reconnaissance et notre profond respect.

A notre co-Directeur de thèse

Docteur Abdoulaye DJIMDE

PhD en Microbiologie et Immunologie

Chercheur au DEAP de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-stomatologie du Mali.

Permettez-nous de vous remercier, cher Maître, de la confiance que vous nous avez faite en nous proposant ce travail.

Nous avons admiré vos qualités scientifiques et sociales tout au long de cette thèse. Vous avez cultivé en nous, le sens du travail bien fait et la rigueur scientifique.

Vous êtes un homme de science et un brillant chercheur de votre Etat.

Recevez ici nos sincères remerciements.

A notre Maître et Directeur de thèse

Professeur Ogobara DOUMBO

Professeur de Parasitologie et Mycologie, Directeur du cours d'épidémiologie pour cadres supérieurs de la santé pour l'Afrique, Médecin chef du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires.

Cher Maître, nous vous remercions de la confiance que vous nous avez accordée en nous proposant ce travail. Votre rigueur, vos qualités humaines de courtoisie et de sympathie font de vous un encadreur admiré des étudiants. Nous sommes très honorés d'être parmi vos élèves. Recevez donc cher maître l'expression de notre profonde reconnaissance et attachement indéfectible.

TABLE DES MATIERES

I - INTRODUCTION	1
II - OBJECTIFS DE L'ETUDE	5
III - GENERALITES.....	6
III. 1 - LA REPOSE IMMUNITAIRE	6
III.1.1 - L'IMMUNITE NATURELLE.....	6
III.1.2 - L'IMMUNITE ACQUISE	7
III.1.3 - ROLE DE LA RATE	15
III. 2 - DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE.....	15
III. 3 - TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE	15
III. 4 - GENERALITE SUR LA RESISTANCE DU <i>Plasmodium falciparum</i> AUX ANTIPALUDIQUES	16
III.4.1 - LA RESISTANCE AUX ANTIMETABOLITES	17
III.4.2 - LA RESISTANCE AUX AMINES ALCOOLS:.....	17
III.4.3 - LA RESISTANCE AUX AMINO-4-QUINOLEINES.....	17
III. 5 - EVALUATION DE LA CHIMIORESISTANCE	20
III.5.1 - TEST <i>IN VITRO</i>	20
III.5.2 - TESTS " <i>IN VIVO</i> "	20
III. 6 - GENETIQUE HUMAINE, SUSCEPTIBILITE ET RESISTANCE AU PALUDISME	21
IV - METHODOLOGIE	23
IV. 1 - LIEUX D'ETUDE :	23
IV.1.1 - KOLLÉ	23
IV.1.2 - BANDIAGARA.....	24
IV. 2 - TYPE ET PERIODE D'étude.....	24
IV. 3 - POPULATION D'ETUDE	24
IV. 4 - ECHANTILLONAGE ET TAILLE DE L'ECHANTILLON	26
IV.4.1 - CRITERES D'INCLUSION	26
IV.4.2 - CRITERES DE NON – INCLUSION	28
IV. 5 - METHODES DE COLLECTE DES DONNEES	28
IV.5.1 - RENSEIGNEMENTS GENERAUX.....	28
IV.5.2 - DONNEES CLINIQUES ET TRAITEMENTS	28
IV.5.3 - DONNEES BIOLOGIQUES	29
IV.5.4 - DEROULEMENT DE L'ENQUETE.....	29
IV.5.5 - TECHNIQUES DE LABORATOIRE.....	30
IV. 6 - METHODES DE GESTION DES DONNEES	48
IV. 7 - PLAN D'ANALYSE DES DONNEES.....	48
IV. 8 - CONSIDERATIONS ETHIQUES ET DEONTOLOGIQUES	48
IV. 9 - Définitions opérationnelles des concepts et des variables	49
IV.9.1 - REPOSE CLINIQUE.....	49
IV.9.2 - REPOSE PARASITOLOGIQUE	50
V - RESULTATS	51
V. 1 - CARACTERISTIQUES SOCIO-DEMOGRAPHIQUES.....	51
V.1.1 - LE SEXE.....	51

V.1.2 - L'AGE.....	52
V. 2 - CARACTERISTIQUES PARASITO-CLINIQUES	53
V.2.1 - REPONSE CLINIQUE	53
V.2.2 - REPONSE PARASITOLOGIQUE.....	55
V. 3 - ETUDE MOLECULAIRE : FREQUENCE DE LA MUTATION <i>pfcr</i> K76T	57
V. 4 - ETUDE IMMUNOLOGIQUE.....	62
V.4.1 - DESCRIPTION DE LA POPULATION D'ÉTUDE.....	62
V.4.2 - ETUDE COMPARATIVE DES TAUX SERIQUES MEDIAN	63
V. 5 - ETUDE GENOMIQUE	69
V.5.1 - DESCRIPTION DE LA POPULATION D'ETUDE.....	69
V.5.2 - FREQUENCE DES DIFFERENTS GENOTYPES ET ALLELES	70
VI - COMMENTAIRES ET DISCUSSION	75
VI. 1 - METHODOLOGIE :	75
VI. 2 - CARACTERISTIQUES SOCIO-DEMOGRAPHIQUES	76
VI. 3 - CARACTERISTIQUES PARASITOLOGIQUES ET CLINIQUES	76
VI.3.1 - ECHEC THERAPEUTIQUE	76
VI.3.2 - RESISTANCE PARASITOLOGIQUE.....	77
VI. 4 - ETUDE MOLECULAIRE.....	77
VI. 5 - ETUDE IMMUNOLOGIQUE	78
VI.5.1 - POPULATION D'ETUDE.....	78
VI.5.2 - ETUDE COMPARATIVE DES TAUX SERIQUES MEDIAN EN FONCTION DE LA CLAIRANCE	78
VI. 6 - ETUDE GENOMIQUE	79
VI.6.1 - POPULATION D'ETUDE.....	80
VI.6.2 - FREQUENCES DES DIFFERENTS ALLELES	80
VI.6.3 - COMPARAISON DE LA FREQUENCE DES DIFFERENTS ALLELES EN FONCTION DE LA CLAIRANCE	80
VII - CONCLUSION	82
VIII - RECOMMANDATION	83
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	86
FICHE D'ENQUETE INDIVIDUELLE:	97
FICHE D'ASSENTIMENT ECLAIRE.....	103
FICHE DE CONSENTEMENT ECLAIRE.....	106
SERMENT DE GALIEN	109

LISTE DES ABREVIATIONS

ADCC	: Antibody Dependant Cell-mediated Cytotoxycity
ADN	: Acide DésoxyriboNucléique
AMA	: Apical Membrane Antigen
CBA	: Cytometric Bead Array
CC	: Centimètre Cube
CD4	: Cluster of Differentiation 4
CD8	: Cluster of Differentiation 8
CG2	: Candidate Gene 2
CI50	: Concentration Inhibitrice à 50 pour cent
CI90	: Concentration Inhibitrice à 90 pour cent
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
CMH	: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CRMT	: Centre Régional de Médecine Traditionnelle
CSP	: Circum Sporozoïte Protein
CTL	: Cytotoxic T Lymphocyte
CVD	: Center for Vaccine Development
ddl	: Degrés de Liberté
DEAP	: Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires.
DHFR	: Dihydrofolate Réductase
DHPS	: Dihydroptéroate Synthétase
dNTP	: désoxy-Nucléotides Tri Phosphate
DP	: Densité Parasitaire
EDTA	: Ethylène Diamine Tétra Acétique
ELISA	: Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
ET	: Echec Thérapeutique
ETP	: Echec Thérapeutique Précoce
ETT	: Echec Thérapeutique Tardif
FAO	: Fonds des Nations Unis pour l'Alimentation
FITC	: Fluoroisocyanate
FMPOS	: Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie
GE	: Goutte Epaisse
GIS	: Geographic Information System
GPS	: Global Positioning System

G6PD	: Glucose-6 Phosphate Déshydrogénase
Hb	: Hémoglobine
HLA	: Human Leucocyte Antigen
ICAM	: Intercellular Circulating Adhesion Molecule
IFN-γ	: Interféron gamma
Ig E	: Immunoglobuline E
Ig G	: Immunoglobuline G
IL-1	: Interleukine 1
IL-2	: Interleukine 2
IL-4	: Interleukine 4
IL-5	: Interleukine 5
IL-6	: Interleukine 6
IL-8	: Interleukine 8
IL-10	: Interleukine 10
IL-12	: Interleukine 12
I.P	: Indice Plasmodique
I.S	: Indice Splénique
KB	: Kilo base
KD	: Kilo Dalton
K76T	: Lysine (K) à la position 76 de la protéine remplacée par la Thréonine (T)
KgPC	: Kilogramme Poids Corporel
L.D.H	: Lactate Déshydrogénase
LSA	: Liver Stage specific Antigen
LB	: Lymphocyte B
LT	: Lymphocyte T
LTC	: Lymphocyte T Cytotoxique
MALDI-TOF MS	: Matrix Assisted Laser desorption/ionisation Time Of Flight Mass spectrometry
Mgcl2	: Chlorure de Magnésium
MRTC	: Malaria Research and Training Center
MSP1	: Major Surface Protein 1
NPP	: Nitro-Phenyl-Phosphate de sodium
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
OR	: Odd Ratio
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PE	: Phycoerythrine
PEP	: Primer extention Pre-amplification
PERCP	: Peridinin chlorophyll protein
Pf	: <i>Plasmodium falciparum</i>
Pfcr1	: <i>Plasmodium falciparum</i> Chloroquino-resistance Transporter
Pfmdr	: <i>Plasmodium falciparum</i> Multidrug Resistant
PNLP	: Programme National de Lutte contre le Paludisme

R	: Résistant
RI	: Résistance de type 1
RII	: Résistance de type 2
RIII	: Résistance de type 3
RCS	: Réponse Clinique Satisfaisant
RESA	: Ring-infected Erythrocyte Surface Antigen
S	: Sensible
SAP	: Shrimp Alkaline Phosphatase
SNPs	: Single Nucleotide Polymorphisms
SPSS	: Statistical Package for the Social Science
TA	: Tension Artérielle
Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	: Tris Borate EDTA
TCGF	: T Cell Growth Factor
Th	: T Helper
TNF-α	: Tumor Necrosis Factor alpha
TRAP	: Thrombospondin Related Adhesion Protein

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Propagation de la chloroquinorésistance. (Tom E. Wellems, NIH)	2
Figure 2: Résumé schématique des antigènes plasmodiaux (Filip Dubovsky,creating a vaccine against malaria)	8
Figure 3: Activité immune de l'IL-2 (Thèze J, Alzari P and Bertoglio J (1996), Immunology Today 17: 481–486)	11
Figure 4: Structure de la chloroquine	17
Figure 5: Sites d'études (Source: GIS/GPS MRTC)	25
Figure 6: Schéma du processus d'échantillonnage.....	27
Figure 7: Schéma de base d'analyse en sandwich pour le CBA (http://www.bdbiosciences.com/pharmingen/products/display_product.php?keyID=9)	35
Figure 8: Les différentes étapes du dosage cytométrique	36
Figure 9: Exemple d'histogrammes	38
Figure 10: Exemple de Courbe Standard (cas de l'IFN- γ)	39
Figure 11: Exemple de courbe avec droite de régression (cas de l'IFN- γ).....	39
Figure 12: Etapes du SEQUENOM.....	42
Figure 13: Compression des résultats.....	46
Figure 14: Exemple de représentation graphique (cas d'un hétérozygote CT de IL-1 a 889)	47
Figure 15: Exemple de représentation graphique (cas d'un homozygote T de l'IL-1 a 889)	47
Figure 16: Distribution de l'échantillon par sexe dans les deux sites d'étude	51
Figure 17: Distribution de la population d'étude par classe d'âge dans les deux sites d'étude.	52
Figure 18: Distribution de la réponse clinique dans les deux sites d'étude	53
Figure 19: Distribution de la réponse parasitologique en fonction du site d'étude	55
Figure 20: Répartition de la résistance parasitologique de <i>P. falciparum</i> à la chloroquine par classe d'âge en fonction du site d'étude.....	56
Figure 21: Prévalence de la mutation <i>pfprt</i> K76T de <i>P. falciparum</i> dans la population d'étude à J0 par site	57
Figure 22: Répartition de la population globale d'étude par site en fonction de la clairance...	59
Figure 23: Distribution de la population globale d'étude par tranche d'age et en fonction de la clairance.....	60
Figure 24: Taux d'élimination des parasites de génotypes résistants en fonction de l'âge et du site	61
Figure 25: Répartition de la population globale d'étude en fonction du taux sérique médian et de la clairance.....	64
Figure 26: Répartition de la population d'étude en fonction du taux sérique médian et de la clairance à Bandiagara.....	66
Figure 27: Répartition de la population d'étude en fonction du taux sérique médian et de la clairance à Kollé.....	68
Figure 28: Fréquence de la clairance des souches de <i>P. falciparum</i> de génotype résistants en fonction du site d'étude.....	69

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Schéma thérapeutique établi au niveau national par le PNLP	16
Tableau II: Calendrier des activités de base et suivi des sujets de l'étude.....	29
Tableau III: Composition du milieu réactionnel de la PEP PCR	43
Tableau IV: Programme d'amplification de la PEP PCR	43
Tableau V: Composition du milieu réactionnel pour la PCR multiplex	44
Tableau VI: Programme d'amplification de la PCR multiplex.....	44
Tableau VII: Programme déphosphorylation	44
Tableau VIII: Composition du milieu réactionnel pour la réaction d'extension	45
Tableau IX: Programme d'extension	45
Tableau X: Distribution de l'échantillon par sexe dans les deux sites d'étude	51
Tableau XI: Distribution de la population d'étude par classe d'âge dans les deux sites d'étude.....	52
Tableau XII: Distribution de la réponse clinique dans les deux sites	53
Tableau XIII : Distribution de la réponse clinique par tranche d'âge à Bandiagara.	54
Tableau XIV : Distribution de la réponse clinique par tranche d'âge à Kollé.	54
Tableau XV: Distribution de la réponse parasitologique en fonction du site d'étude	55
Tableau XVI: Comparaison de la résistance parasitologique de <i>P. falciparum</i> à la chloroquine par classe d'âge entre les sites d'étude	56
Tableau XVII: Prévalence de la mutation <i>pfcr</i> K76T de <i>P. falciparum</i> dans la population d'étude à J0 par site.....	57
Tableau XVIII: Distribution des génotypes de <i>P. falciparum</i> à J0 par tranche d'âge à Bandiagara	58
Tableau XIX: Distribution des génotypes de <i>P. falciparum</i> à J0 par tranche d'âge à Kollé ...	58
Tableau XX: Répartition de la population globale d'étude par site en fonction de la clairance.....	59
Tableau XXI: Distribution de la population globale d'étude par tranche d'âge et en fonction de la clairance.....	60
Tableau XXII: Taux d'élimination des parasites de génotypes résistants en fonction de l'âge et du site	61
Tableau XXIII: Description de la population d'étude en fonction de la clairance des souches de <i>P.</i> <i>falciparum</i> de génotype résistants par site d'étude	62
Tableau XXIV: Répartition de la population globale d'étude en fonction du taux sérique médian et de la clairance.....	63
Tableau XXV: Répartition de la population d'étude en fonction du taux sérique médian et de la clairance à Bandiagara.....	65
Tableau XXVI: Répartition de la population d'étude en fonction du taux sérique médian et de la clairance à Kollé.....	67
Tableau XXVII: Description de la population d'étude en fonction de la clairance des souches de <i>P.</i> <i>falciparum</i> de génotype résistants.....	69
Tableau XXVIII: Fréquences des différents génotypes dans la population d'étude :	70
Tableau XXIX: Fréquence des différents alleles dans la population d'étude en fonction de la clairance.....	72

I - INTRODUCTION

Le Paludisme ou Malaria est une parasitose due à des hématozoaires du genre Plasmodium. Cette affection est essentiellement transmise à l'homme par la piqûre infestante d'un moustique femelle du genre Anopheles. Cependant il existe d'autres voies de contamination telles que la voie sanguine (transfusion sanguine) et fœto-maternelle (1 ; 2).

Quatre espèces sont inféodées à l'homme : *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax*. Chez l'homme *P. falciparum* est le plus redoutable et le plus intensément implanté en Afrique (3).

En ce 21^{ème} siècle, le paludisme reste la plus importante des maladies parasitaires tropicales dans le monde ; C'est une maladie fébrile, hémolytique qui constitue un problème majeur de santé publique. Deux milliards d'individus sont exposés au paludisme; Il est enregistré chaque année près de 500 millions de cas cliniques avec 3 millions de morts dont 90% surviennent en Afrique noire subsaharienne chez les enfants de moins de 5 ans (4 ; 5).

Tous les efforts de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour contrôler ce fléau étaient dirigés vers l'éradication du paludisme. L'efficacité et la bonne tolérance de la chloroquine permettaient de prévenir facilement la maladie ; complétées par la lutte antivectorielle en zone d'endémie, elles laissaient entrevoir la possible éradication du paludisme (6).

Cependant à partir des années 60, l'avenir s'est assombri par la découverte des souches résistantes de *P. falciparum* et d'Anopheles respectivement aux antipaludiques et aux insecticides (7).

En 1968, l'OMS a dû renoncer à ce programme d'éradication trop ambitieux et s'en tenir à des projets plus limités de contrôle de la mortalité et de la morbidité. La chimiorésistance des souches de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine est un problème ancien qui a évolué dans le temps et dans l'espace (Figure 1).

Les premiers cas de résistance à la chloroquine ont été notés en Colombie, par Young et Moore. En Afrique elle a été signalée pour la première fois en 1978 (8 ; 9; 10).

Au Mali, les premiers cas furent signalés chez des expatriés français y ayant séjournés en 1987. Plus tard, les premiers cas chez les autochtones ont été décrits en 1989 (11).

Au fil du temps, la chimiorésistance pose de sérieux problèmes cliniques, thérapeutiques, sociaux et économiques.

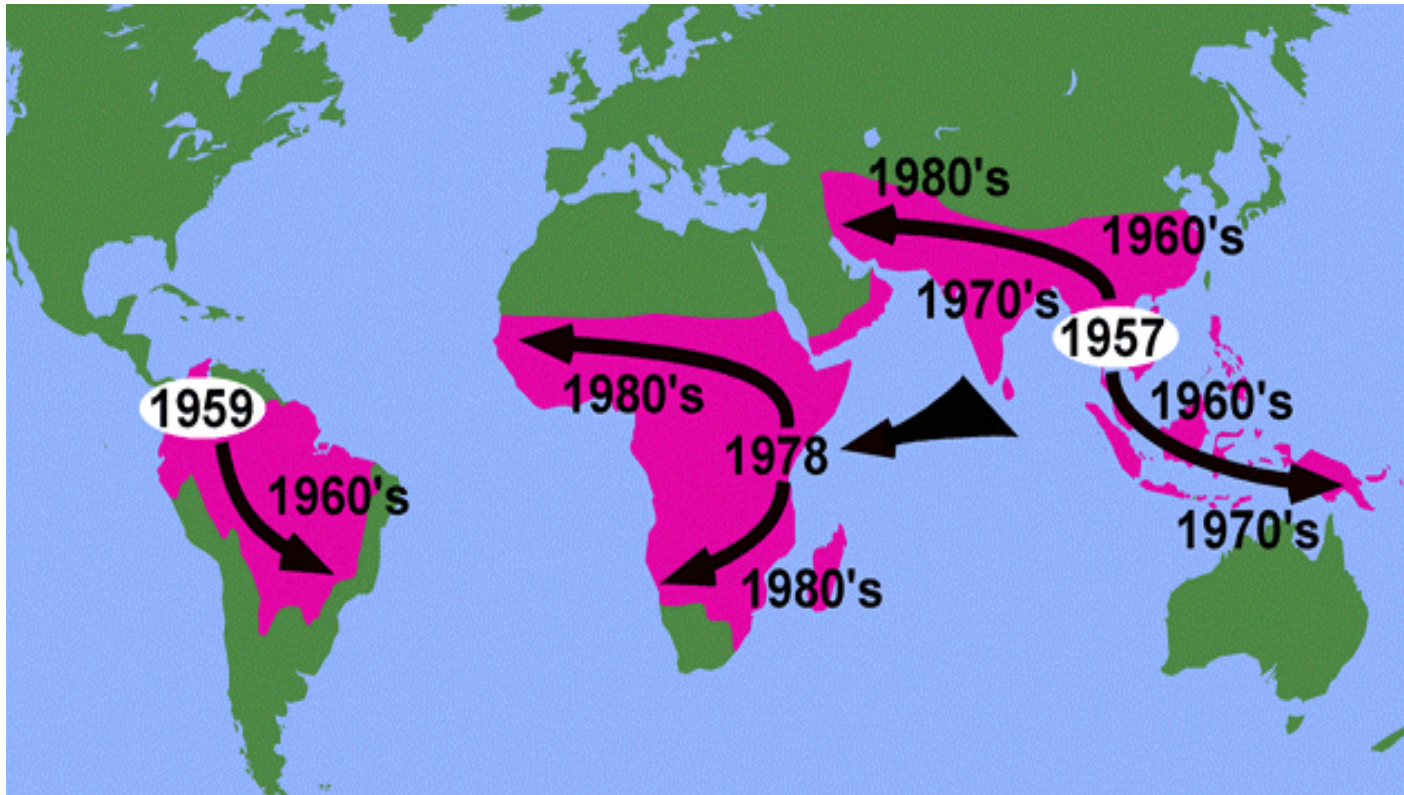


Figure 1: Propagation de la chloroquinorésistance. (Tom E. Wellems, NIH)

Plusieurs méthodes et protocoles ont été élaborés afin de mesurer plus objectivement ce phénomène de résistance : le test *in vivo* de l’OMS, les tests *in vitro* et les techniques moléculaires (PCR) (12).

Les avancées scientifiques dans le domaine de la biologie moléculaire ont montré le rôle principal de la protéine transmembranaire de la vacuole parasitophore du *P. falciparum* (PFCRT) dans la résistance à la chloroquine (13, 14).

Cependant les taux de résistances de *P. falciparum* aux antipaludiques mesurés par les méthodes *in vitro* et moléculaires sont plus élevés que les niveaux de chimiorésistances mesurés *in vivo*. Ceci pourrait suggérer que des parasites résistants puissent être éliminés *in vivo* par des facteurs inconnus liés à l’hôte (14, 15, 16).

La réponse immunitaire de l’hôte joue un grand rôle dans la physiopathologie des maladies infectieuses (17, 18). Décrite pour la première fois par Sergent et al. (1924), l’immunité anti-plasmodiale modifie la présentation clinique de la maladie et laisse persister une infection minimale. Cette protection est liée au niveau d’exposition de ces sujets aux piqûres de moustique ainsi qu’à l’âge (19, 20). La capacité d’éliminer des souches résistantes étant fortement liée à l’âge de l’hôte, l’immunité partiellement acquise au fil du temps pourrait être responsable de la clairance de *P. falciparum* chloroquino-résistant (21, 22).

La pathogénie de l’infection palustre résulte des interactions entre le parasite et le système de défense de l’hôte. Il existe une très grande variabilité de réponse à l’infection entre des individus vivant dans les mêmes zones d’endémie. Les cartes du génome humain établies récemment sur la base de marqueurs polymorphiques sont un outil fondamental dans les études impliquant des marqueurs génétiques (23, 24).

Le développement des méthodes de génétique épidémiologique utilisant les cartes génétiques, ainsi que le nombre croissant de gènes candidats, ont conduit à des avancées substantielles dans l’identification des gènes humains impliqués dans le paludisme. Les études dans ce domaine ont progressé selon deux voies complémentaires, la recherche de gènes influençant la survenue du phénotype clinique “paludisme sévère” par des études cas-témoins et l’étude de la régulation génétique de phénotypes biologiques (niveaux d’infection, réponse immunitaire) par des analyses familiales.

Le rôle de facteurs génétiques régulant la sévérité de l’infection paludéenne et les niveaux d’immunisation par certains antigènes parasitaires a été démontré chez l’animal (25, 26).

Les méthodes expérimentales étant inapplicables chez l'homme, c'est l'épidémiologie génétique qui cherche à identifier et déterminer la nature et la part respective des facteurs génétiques et du milieu (en particulier, les facteurs de contamination par l'agent infectieux). L'épidémiologie génétique se base sur l'observation de concentrations familiales et/ou d'informations apportées par les marqueurs génétiques (27, 28).

Ainsi la confirmation de l'implication de certains gènes au cours des affections humaines telle que le paludisme doit provenir d'études épidémiologiques approfondies sur certaines populations à haut risque.

Ce travail se propose de caractériser les facteurs liés à l'hôte qui pourraient être responsables de la clairance des parasites mutants. Il s'agira d'une part de mesurer l'association entre l'un des marqueurs spécifiques de la réponse immunitaire (cytokines) et la capacité de l'hôte à éliminer des parasites résistants ; et d'autre part de déterminer l'implication de certains polymorphismes au niveau du génome humain dans la clairance des parasites ayant un génotype résistant.

L'identification de ces facteurs pourrait améliorer la compréhension des événements immunologiques nécessaires au contrôle de l'infection à *P. falciparum*, précisera le rôle exact de certains gènes déjà identifiés et montrera probablement l'existence d'autres gènes encore non identifiés.

L'impact de ces découvertes sur la compréhension de la pathogénie du paludisme et sur le protocole des futures stratégies de prévention et de traitement sera considérable

II - OBJECTIFS DE L'ETUDE

OBJECTIF GENERAL

Etudier les facteurs immunologiques et génomiques de l'hôte impliqués dans la clairance de *P. falciparum* portant la mutation 76T du gène *pfcr*.

OBJECTIFS SPECIFIQUES

1. Déterminer les taux de résistance parasitologique, d'échec thérapeutique et de résistance moléculaire de *P. falciparum* à la chloroquine dans la population d'étude.
2. Mesurer la fréquence de la clairance des parasites ayant un génotype résistant dans la population d'étude.
3. Comparer les taux sériques médians de l'IL-1 β , l'IL-2, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-10, l'IL-12, l'IFN- γ et du TNF- α entre les patients ayant pu éliminer les souches mutantes de *P. falciparum* et ceux n'ayant pu le faire.
4. Comparer la fréquence de 2 à 5 SNPs sur les gènes codants pour le TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-8, G6PD, ICAM-1, HBC, HBS, et IL-4 entre les patients ayant pu éliminer les souches mutantes de *P. falciparum* et ceux n'ayant pu le faire.

III - GENERALITES

III. 1 - LA REPONSE IMMUNITAIRE

Au cours d'une infection palustre, l'organisme humain réagit selon deux types de mécanismes immunitaires :

- L'immunité naturelle ou résistance innée.
- L'immunité acquise qui est une réponse spécifique d'espèce, de souches et de stade de développement du parasite, impliquant la réponse humorale et cellulaire, et se développant après plusieurs expositions en zone d'endémie.

III.1.1 - L'IMMUNITE NATURELLE

La résistance innée au paludisme se traduit chez l'homme par un état réfractaire au parasite dès le premier contact.

Les mécanismes qui déterminent cette résistance impliquent essentiellement les facteurs liés au stade érythrocytaire et peuvent affecter l'habilité du parasite à envahir les érythrocytes ou inhiber son développement intra-érythrocytaire.

Cette résistance peut résulter soit de la présence chez l'homme d'une substance non propice au développement du parasite (hémoglobine anormale, déficit en G6PD), soit de l'absence de récepteurs impliqués dans la pénétration du parasite dans la cellule hôte (ex. : Antigène Duffy) **(29)**.

L'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes nécessite leur adhérence à la surface des érythrocytes par l'intermédiaire des récepteurs ou des antigènes spécifiques. La déformation des globules rouge lors de la pénétration du mérozoïte est un important facteur de résistance innée. Les principaux facteurs intra érythrocytaires de résistance innée chez l'homme sont d'origine génétique et concernent les déficits enzymatiques, notamment le déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), des modifications structurales de l'hémoglobine (hémoglobine S, C, E) ou des déficits quantitatifs dans la synthèse des chaînes de l'hémoglobine (thalassémies) **(30, 31, 32, 33)**.

Les études cas témoins réalisées en Gambie et au Kenya ont montré que le polymorphisme G6PD-A était associé à une réduction d'environ 50% du risque de développer un paludisme sévère chez les femmes hétérozygotes et les hommes hémizygotés (34).

Une autre étude a confirmé l'effet protecteur de l' α^+ thalassémie à l'état homozygote chez des enfants vivant en Papouasie Nouvelle Guinée, une région où cette hémoglobinosose touche 90 % de la population (35).

III.1.2 - L'IMMUNITÉ ACQUISE

Décrite pour la première fois par SERGENT et al. (1924), l'immunité anti-plasmodiale modifie la présentation clinique de la maladie et laisse persister une infection minimale qui entretient une semi-immunité ou prémunition.

Dans les zones d'endémies stables, les piqûres répétées d'anophèles permettent aux autochtones de développer une prémunition contre l'infection à *P. falciparum*. L'installation de cette immunité est d'autant plus précoce que la transmission est intense et stable et son maintien dépend de la durée d'exposition.

L'immunité acquise se manifeste par deux types de réponses :

- La réponse humorale (anticorps anti-plasmodiaux)
- La réponse cellulaire qui implique les monocytes, les lymphocytes T(CD4+ et CD8), les polynucléaires.

Actuellement plusieurs mécanismes immunologiques ont été proposés dans les processus de protection de l'hôte : La destruction des hématies infectées ou des mérozoïtes par le système ADCC, la phagocytose des hématies infectées ou des mérozoïtes libres par les monocytes et les polynucléaires. Ce dernier mécanisme est majoré par l'action du TNF- α , IL-4 et de l'IFN- γ (36).

La destruction des globules rouges parasités par *P. falciparum* en l'absence des anticorps peut aussi se faire par les cellules tueuses (37). Cependant la contribution de ces différents mécanismes à l'immunité antipalustre n'est pas encore bien comprise. Au cours de l'infection palustre, à chaque stade du cycle de développement du parasite correspond une réponse immunitaire spécifique (Figure 2).

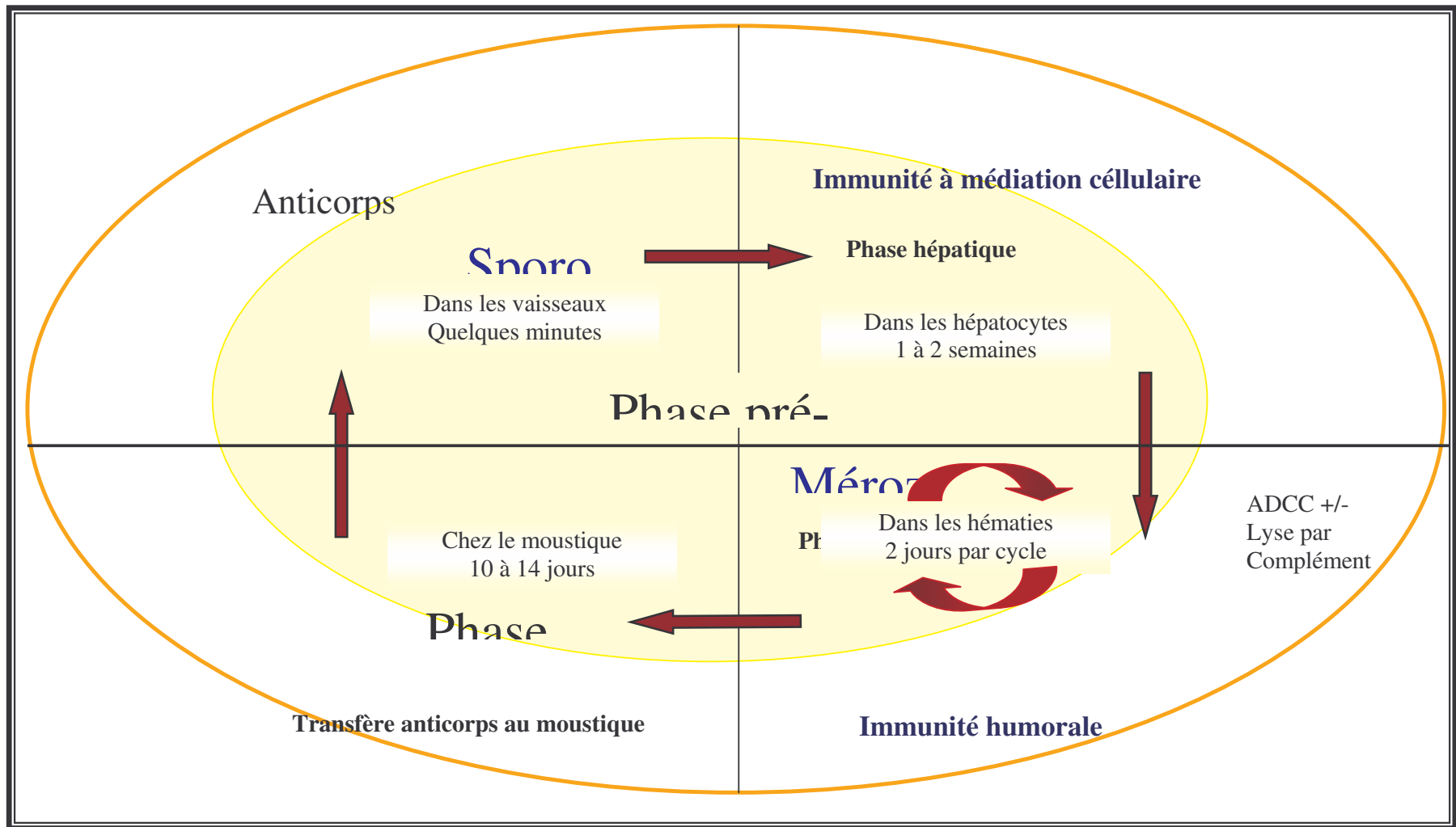


Figure 2: Résumé schématique des antigènes plasmodiaux (Filip Dubovsky, creating a vaccine against malaria)

III.1.2.1 - La réponse immune dirigée contre les formes pré-érythrocytaires

Les anticorps dirigés contre les sporozoïtes sont capables d'altérer leur revêtement de surface, d'inhiber leur pénétration dans les hépatocytes ou de ralentir leur développement intra-hépatocytaire.

III.1.2.1.1 - Blocage de l'invasion des hépatocytes

Des travaux ont montré que les anticorps anti-TRAP (*Thrombospondin Related Adhesion Protein*) inhibent *in vitro* l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes et que l'antigène LSA-3 (liver stage antigen-3) exprimés à la surface des sporozoïtes induit une réponse humorale spécifique (38).

Durant la phase hépatique, les parasites envahissent les hépatocytes et induisent la réponse à médiation cellulaire et humorale. L'immunité à médiation cellulaire fait intervenir des cellules effectrices qui agissent directement (lymphocytes T cytotoxiques) ou indirectement sur les formes exo-érythrocytaires par production de substances cytolytiques (monoxyde d'azote) et de cytokine (IFN- γ , IL-1, IL-2, TNF- α) produites par les cellules T *helper* (Th1, Th2) et d'autres cellules (Macrophages, NK etc...).

Après l'invasion de l'hépatocyte, de nombreux sporozoïtes libèrent les antigènes sporozoaires (surtout la Circum Sporozoïte Protéine : CSP) dans le cytoplasme des hépatocytes ; C'est uniquement au cours de cette phase que les antigènes sont exposés pendant un long moment aux anticorps sécrétés par l'homme. A ce niveau les molécules d'antigènes sont réduites en peptides (épitopes) qui s'associent aux molécules HLA de classe I. Ces épitopes associés aux molécules HLA de classe I sont exprimés à la surface des hépatocytes. Ce complexe est reconnu par les récepteurs des lymphocytes T. Cette reconnaissance entraîne une stimulation des cellules T qui prolifèrent et produisent des cytokines (39).

III.1.2.2 - La réponse immunitaire dirigée contre les formes érythrocytaires

Durant la phase érythrocytaire, les parasites se cachent dans les hématies. Les globules rouges n'expriment pas de molécule du Complexe Majeur d'Histocompatibilité, l'immunité cellulaire interviendrait secondairement à ce stade. En effet cette dernière est basée sur la reconnaissance des antigènes présentés aux lymphocytes T par l'intermédiaire des molécules du CMH. C'est donc l'immunité humorale avec la production d'anticorps par les plasmocytes issus des lymphocytes B qui serait la réponse appropriée.

Celle-ci s'effectue principalement par des anticorps anti-plasmodiaux dirigés contre les mérozoïtes. Ce sont des immunoglobulines G (Ig G) cytolytiques qui activent les fonctions effectrices cytotoxiques et phagocytaires des neutrophiles et des monocytes (40). Aucan et al. (2000) ont établi une corrélation entre la protection contre l'infection palustre, le taux élevé d'Ig G2 et le taux bas d'IgG4 (41).

L'infection plasmodiale implique aussi une production élevée d'immunoglobuline E (IgE). Le complexe immun (IgE- Antigène) est impliqué dans l'activation des monocytes qui produisent du monoxyde d'azote, substance très toxique pour les mérozoïtes.

Les travaux d'expérimentation sur le modèle animal ont montré que l'antigène AMA-1 (Apical Mererozoite Antigen 1) induit une réponse immune de type humorale qui bloque la pénétration des mérozoïtes dans les globules rouges. Les mêmes travaux ont montré que les antigènes de surface des mérozoïtes (MSP 1) sont très immunogènes et induisent une réponse de type humorale (42).

Les cellules T impliquées dans la réponse immune du stade érythrocytaire sont essentiellement les cellules CD4+. Des expériences sur le modèle animal ont permis de définir le rôle des cellules Th1 et Th2 productrices de cytokines (IL-2, IFN- γ , lymphotoxine, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-13) (43, 44). Les cytokines participent à la pathogénie de l'infection palustre mais également à la suppression de la réponse immunitaire (45).

III.1.2.2.1 - Interleukine 1

Décrite pour la première fois par Gery et Waskman en 1971, l'IL-1 est surtout produite par les macrophages mais aussi par d'autres cellules : LB, LT et cellules endothéliales. On distingue dans la famille de l'IL-1 : IL-1 α , l'IL-1 β et l'IL-1ra (antagoniste du récepteur de l'IL-1) (46).

Ces trois protéines sont codées par des gènes très proches les uns des autres situés sur le chromosome 2.

L'IL-1 est une cytokine pro-inflammatoire et ses effets sont assez semblables à ceux du TNF. Elle favorise la production d'autres facteurs hématopoïétiques, notamment l'IL-6 (47).

Elle est impliquée dans la différenciation et la croissance des lymphocytes T et B et joue ainsi un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire spécifique.

III.1.2.2.2 - Interleukine 2

Initialement appelé "Facteur de croissance des lymphocytes T" (TCGF), elle est l'une des premières interleukine à avoir été caractérisée. Elle appartient à la grande famille des Hématopoïétines incluant l'IL-4 et l'IL-10.

Le gène codant pour l'IL-2, situé sur le chromosome 4 (q26-q27), contient 4 exons qui codent pour 153 acides aminés (48, 49, 50, 51).

Le rôle principal de l'IL-2 sur les LT est d'accroître l'activité des CD4 et des CD8. Elle exerce une action autocrine sur les Th1 et paracrine sur les Th2. L'IL-2 n'a aucune influence sur la balance Th1/Th2. (Figure 3)

L'IL-2 est une cytokine pléiotrope avec une action pro-inflammatoire sur le système immunitaire à médiation cellulaire (NK, Monocytes) et humorale (LB et LT).

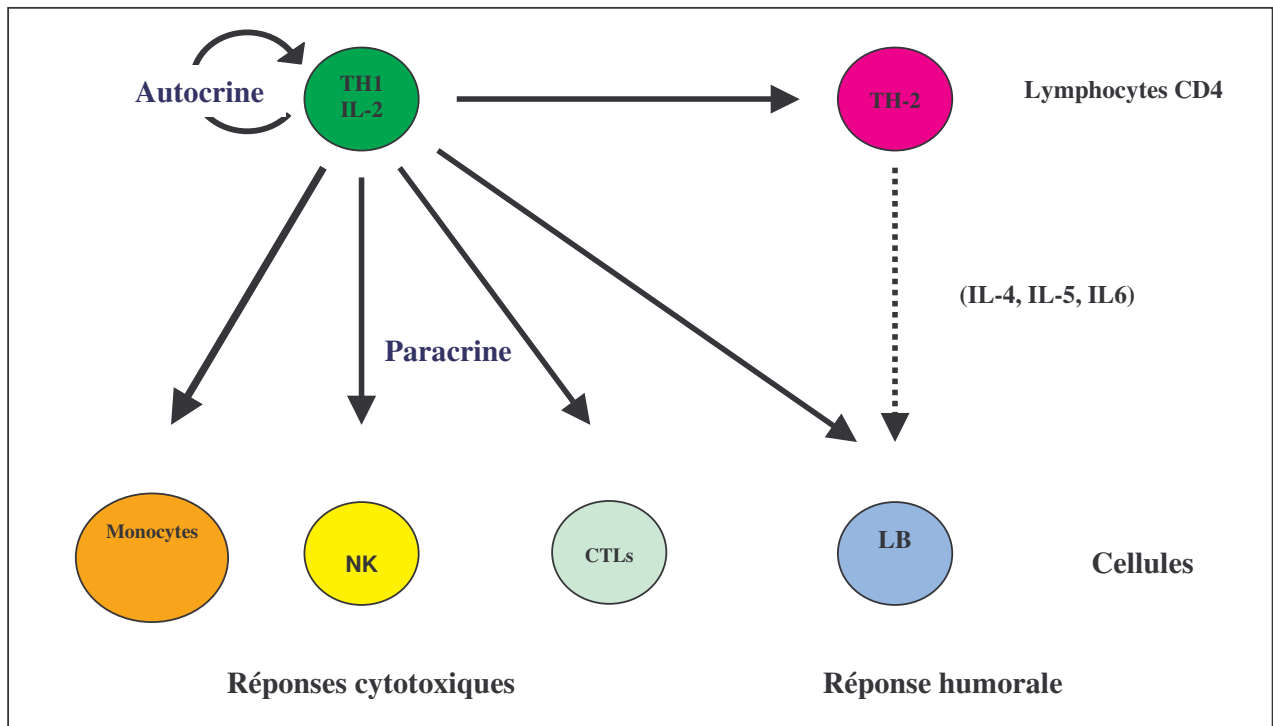


Figure 3: Activité immune de l'IL-2 (Thèze J, Alzari P and Bertoglio J (1996), Immunology Today 17: 481-486)

III.1.2.2.3 - Interleukine 4

Le gène de l'IL-4 est situé sur le chromosome 5 et code pour une protéine de 153 acides aminés. L'IL-4 est essentiellement produite par les LT du type CD4 (**Figure 3**) et joue un grand rôle dans la réponse cellulaire à médiation humorale. Elle augmente la croissance et la différenciation des LB préalablement activés. Elle favorise ainsi la sécrétion d'immunoglobulines (IgE, IgG1) et la mobilisation des éosinophiles.

III.1.2.2.4 - Interleukine 5 (eosinophil colony stimulating factor)

L'IL-5 est sécrétée par les LT CD4+ et certains mastocytes. Elle stimule la croissance, la différenciation et l'activité des éosinophiles qui jouent un rôle important dans la lutte contre les infections parasitaires.

Elle induit la prolifération des lymphocytes B et active les lymphocytes T cytotoxiques.

III.1.2.2.5 - Interleukine 6 (hepatocyte stimulating factor » ou « B cell stimulating factor)

L'IL-6 est une glycoprotéine sécrétée par les monocytes, les cellules endothéliales, les lymphocytes T et B, les fibroblastes etc.

L'IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire ; elle stimule la croissance et la différenciation des LB et augmente la production des plaquettes. Elle provoque, par activation des hépatocytes, la sécrétion des protéines de l'inflammation (le fibrinogène et la protéine C réactive) et elle joue un rôle central dans les mécanismes de défense de l'hôte.

III.1.2.2.6 - Interleukine 8 (neutrophil activating peptide)

L'IL-8 est un médiateur important de l'inflammation. Elle stimule la libération par les neutrophiles de molécules pro-inflammatoires et a un effet bactéricide par activation de radicaux oxygénés. Elle augmente l'activité des neutrophiles par chimiotactisme, et diminue l'adhésion des neutrophiles.

III.1.2.2.7 - Interleukine 10

Le gène de l'IL-10 est localisé sur le chromosome 1; Il est composé de 4 exons qui couvrent plus de 5,1 kb du génome.

L'IL-10, cytokine anti-inflammatoire, est produite par plusieurs types de cellules : LT activé, monocytes, LB, Kératinocytes, carcinome du colon, cellules du mélanome (**52**).

Comme plusieurs cytokines, l'IL-10 exerce une action pléiotrope (**53**) :

- Une interaction directe entre l'IL-10 et son récepteur situé sur le lymphocyte T, entraîne une suppression de la transcription du gène IL-2 et donc une suppression de la prolifération des LT. En plus de ces effets sur les Th1, IL-10 inhibe la synthèse de l'IFN- γ par les CD8 sans pour autant affecter leur cytotoxicité (54).
- Les différentes études expérimentales ont montré que les macrophages et les monocytes sont les premières cibles de l'IL-10. Elle a un effet prééminent sur leur morphologie, leur phénotype et aptitude à produire les cytokines. En effet, par la suppression de la production de l'IL-12 par les monocytes, elle inhibe la production de l'IFN- γ par les NK (55 ; 56).
- L'IL-10 inhibe la production du TNF alpha.

Contrairement à son action sur les monocytes, l'IL-10 agit en synergie avec IL-2 dans la différenciation des LB (57, 58) et induit l'expression du CMHII sur les LB.

Des études ont montré une corrélation entre les taux sériques élevés d'IL-10 et la sévérité de l'infection palustre à *P. falciparum*. (59, 60).

Par ailleurs, de récentes études ont montré qu'un faible taux d'IL-10 peut protéger contre l'anémie palustre (61).

III.1.2.2.8 - Interleukine 12

Elle a été découverte entre 1986 et 1990, grâce à son activité co-stimulante pour les LT et les NK, par quatre groupes indépendants de chercheurs.

L'interleukine-12 est une cytokine hétérodimérique au large spectre d'activités biologiques. Son rôle principal est de potentialiser l'activité cytotoxique et de participer à la régulation de la prolifération des lymphocytes T et des cellules NK. Elle induit la production de l'interféron gamma, et favorise la différenciation des cellules auxiliaires de type Th-1.

L'IL-12 intervient dans la phase précoce de la réponse immune contre les infections bactériennes et parasitaires et joue ainsi un grand rôle dans la résistance naturelle et le développement de l'immunité spécifique.

III.1.2.2.9 - Tumor Necrosis Factor (TNF- α)

Le TNF- α est une cytokine pro-inflammatoire non glycosylée de 17 kilodaltons qui dérive d'une molécule transmembranaire par clivage protéolytique. Durant l'infection, les macrophages synthétisent de grandes quantités de TNF- α . Celui-ci est également produit par les LT, LB, NK et les mastocytes.

L'ensemble formé par le TNF- α et son récepteur membranaire conduit à l'apoptose, à la prolifération et à l'expression d'un large spectre de gène. L'expression de ces gènes assure la production de cytokine, de facteurs de prolifération, de molécules d'adhésion cellulaire et de protéines du complexe majeur d'histocompatibilité. Ce complexe renforce non seulement la phagocytose, mais sert de médiateur dans la production de radicaux oxygénés et nitriques.

Il existe de nombreux indices pour penser que le TNF- α joue un rôle décisif dans la pathogenèse de l'accès pernicieux. Son rôle bénéfique ou délétère sur l'évolution d'un accès palustre est fonction de sa concentration (62, 63).

Au cours de l'accès palustre, l'activité de la multiplication du parasite entraîne la production de cette cytokine par les macrophages activés.

De faible taux du TNF- α sécrété confère une protection relative, tandis que des taux élevés peuvent être un facteur de mauvais pronostic au cours du neuropaludisme. Des études ont également permis d'établir une association entre des taux sériques élevés de TNF- α et plusieurs critères de gravité du paludisme (hypoglycémie, fièvre et hyperparasitémie) (64, 65).

Cette cytokine joue un rôle dans la production des lésions vasculaires et des nécroses hémorragiques.

III.1.2.2.10 - Interféron γ

Cette cytokine a été décrite pour la première fois en 1965 par Wheelock et est essentiellement produite par les cellules lymphoïdes. Les NK, LB, LT peuvent synthétiser l'IFN- γ après une stimulation adéquate.

Le gène de l'IFN- γ est situé sur le chromosome 12. C'est une protéine de 143 acides aminés.

IFN- γ augmente la reconnaissance et la présentation de l'antigène au LT. Elle a un rôle régulateur sur la production des immunoglobulines par les LB.

La production de l'IFN- γ par les CD8 activés par les antigènes des formes pré-érythrocytaires permet la protection de l'hôte contre l'anémie palustre (66).

Des expériences sur le model animal suggèrent que la clairance des parasites au cours de l'affection palustre simple nécessite une production précoce de l'IFN- γ (67).

III.1.3 - ROLE DE LA RATE

La rate joue un rôle crucial dans la protection contre l'infection palustre par l'élimination des globules rouges parasités.

Des études histologiques sur le modèle animal et sur l'homme ont montré qu'elle est un important site d'élimination des hématies parasitées au cours des infections aiguës.

Les expériences de laboratoire ont montré que la rate est un important site de phagocytose et de production d'anticorps au cours de l'infection plasmodiale.

Par ailleurs la phagocytose et l'hypertrophie splénique observées au cours de l'infection palustre entraînent l'élimination des parasites et des débris de globules rouges de la circulation sanguine.

III. 2 - DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

Il s'agit d'un diagnostic d'urgence qui repose sur la mise en évidence du parasite. Les prélèvements sont réalisés par piqûre au vaccinostyle au bout du doigt après désinfection usuelle et séchage.

- **Le frottis mince :** Il facilite le diagnostic d'espèce et celui d'autres agents pathogènes. Il permet également la détermination de la parasitémie.
- **La goutte épaisse :** Elle permet une concentration des parasites et la quantification de la parasitémie avec une plus grande sensibilité.
- **Les autres techniques de mise en évidence directe du Plasmodium ou d'antigènes plasmodiaux :**
 - La concentration en tube capillaire et réalisation d'un frottis.
 - L'utilisation de l'acridine d'orange et lecture au microscope à fluorescence QBC.
 - L'utilisation d'anticorps monoclonaux : Parasight F[®], Optimal[®] Test, Elisa
 - L'utilisation d'outil moléculaire : PCR (Polymerase chain reaction)

III. 3 - TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

La prise en charge d'un cas de paludisme est une urgence. Toutefois, la décision thérapeutique repose sur l'analyse clinique, le contexte épidémiologique et la confirmation biologique.

Les schémas thérapeutiques présentés dans le tableau I correspondent à ceux établis par le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP). Ils tiennent compte du niveau de chimiorésistance et de l'état de prémunition de la population.

La prophylaxie peut être soit collective soit individuelle :

- Collective : Elle comporte 2 cibles, la lutte contre l’anophèle adulte par l’utilisation d’insecticides et la suppression des gîtes larvaires par traitement mécanique, chimique ou biologique.
- La prophylaxie individuelle générale repose sur la lutte contre la piqûre de l’insecte et l’utilisation des moustiquaires imprégnées. La chimioprophylaxie est systématique pour les femmes enceintes et les sujets.

Tableau I: Schéma thérapeutique établi au niveau national par le PNL

	Première intention :	Deuxième intention
ACCES SIMPLE	<i>Chloroquine</i> : 10 mg/Kg/ voie orale les 2 premiers jours, puis 5 mg/Kg le troisième jour.	<i>Sulfadoxine-pyriméthamine</i> : 25mg/kg de sulfadoxine et 1.25mg/kg de pyriméthamine en prise unique par voie orale
ACCES GRAVE	Sels de quinine injectable à relayer par la voie orale à la dose de 24mg/kg par jour pendant 7 jours (<i>Sumaquine, Quinimax, Sulfate de quinine</i>)	

III. 4 - GENERALITE SUR LA RESISTANCE DU *Plasmodium falciparum* AUX ANTIPALUDIQUES

Actuellement la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques est un phénomène constaté sur tous les continents. Plusieurs études ont été menées pour expliquer le mécanisme de la résistance. Comme chez les bactéries, les principaux mécanismes de la résistance pourraient être dus :

- A l’inactivation enzymatique ou à la dégradation du médicament (68).
- A une altération du site de fixation du médicament(68).
- A une inhibition de l’entrée du médicament (69).
- A une excrétion active du médicament.

III.4.1 - LA RESISTANCE AUX ANTIMETABOLITES

La pyriméthamine et le proguanil sont les seuls antipaludiques dont le mode d'action est relativement bien connue (70).

Les gènes de la résistance du *P. falciparum* à la sulfadoxine (*dhps*) et à la pyriméthamine (*dhfr*) sont situés respectivement sur le cinquième et le quatrième chromosome.

Les mutations ponctuelles en position 51, 59 et 108 sur le *dhfr* peuvent être à l'origine des cas de résistances à la pyriméthamine observées *in vitro* (71, 72).

Les mutations ponctuelles en position 437 et 540 sur le *dhps* ont été associées à la résistance du *P. falciparum* à la sulfadoxine (73).

Le rôle des mutations DHFR et DHPS dans la résistance de *Plasmodium falciparum* à la pyriméthamine et à la sulfadoxine *in vivo* n'est pas encore établi avec certitude malgré les données *in vitro* (74).

Cependant les cumuls de mutation *dhfr* et *dhps* sont déterminantes dans la survenue de la résistance du *P. falciparum* à l'association sulfadoxine-pyriméthamine (75, 76).

III.4.2 - LA RESISTANCE AUX AMINES ALCOOLS:

Le gène *pfmdr* (*Plasmodium falciparum* multi drug resistance) a été décrit comme intervenant dans la résistance de *Plasmodium falciparum* à cette famille de médicament, notamment à l'halofantrine et à la méfloquine. Le mécanisme est peu élucidé (77, 78).

III.4.3 - LA RESISTANCE AUX AMINO-4-QUINOLEINES

III.4.3.1 - La chloroquine : (diéthylamino-4' méthyl-1' butylamino)-4 chloro-7 quinoléine C₁₈H₂₆ClN₃

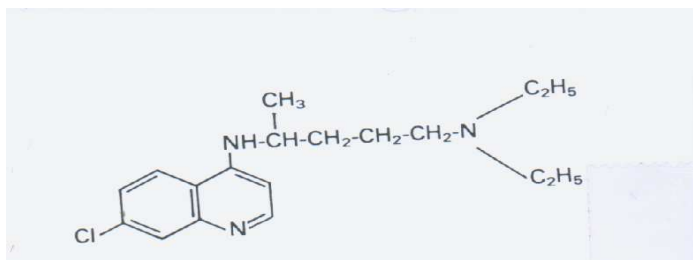


Figure 4: Structure de la chloroquine

La chloroquine a été découverte par les chercheurs allemands en 1934 (Resorchin®) puis développée en 1944 aux Etats-Unis (Nivaquine®, Aralen®) (79, 80).

- **Mécanisme d'action de la chloroquine :** La chloroquine est une base capable de traverser la membrane de l'érythrocyte parasité. Elle s'accumule dans la vacuole digestive du parasite en suivant le gradient de pH. A l'intérieur de cette vacuole, l'hémoglobine est dégradée par les protéases pour fournir une alimentation en acides aminés au parasite. Cette dégradation produit des groupements d'hème toxiques (hématine). Le parasite détoxifie l'hème en polymérisant le dérivé en hémazoïne. La chloroquine exerce son activité antimalarique en formant un complexe avec l'hème toxique pour le parasite, lequel inhibe sa séquestration en hémazoïne. L'hème libre est lytique pour la cellule. En tant que base faible, elle agit en bloquant l'activité des lysosomes. La chloroquine inhibe également l'ADN polymérase des hématozoaires, et les protéases acides parasitaires (81, 82).
- **Pharmacocinétique :** Après administration orale de la chloroquine, son absorption est rapide et quasi complète (80%). Elle apparaît dans le sang après 30 minutes. La chloroquine se fixe aux protéines plasmatiques dans 50% des cas, à des protéines tissulaires de nombreux tissus: foie, rein, rate, myocarde... Sa pénétration dans les hématies normales est très rapide, aboutissant à une concentration de 3 à 6 fois celle du plasma. Cette dernière s'élève considérablement dans les hématies parasitées par une souche sensible, de l'ordre de 100 fois. Les hématies parasitées par une souche résistante sont en revanche incapables de concentrer la chloroquine qui ressort de l'hématie. La chloroquine est éliminée lentement. Une partie est éliminée dans les selles (10%), la majorité dans les urines, dont 60% sous forme intacte et 30% sous forme métabolisée. Le principal métabolite est la mono-deséthylchloroquine, active également sur les hématozoaires. La demi-vie de la chloroquine est dose dépendante, de 3 jours après une prise de 150 mg, 5 jours après 600mg.

III.4.3.2 - La résistance à la chloroquine

La chloroquine est un des médicaments les plus utiles jamais développés. Les souches chloroquino-résistantes de *Plasmodium falciparum* sont fréquentes dans certains sites, entraînant des échecs thérapeutiques. Au cours des dix dernières années, de nombreux génotypes associés à la résistance de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine ont été identifiés. Actuellement, c'est à partir de deux

gènes qu'on tente d'expliquer la chloroquino-résistance: Le *pfmdr* et le *pfcr* qui est la dernière découverte.

III.4.3.2.1 - Le gène *pfmdr* (Plasmodium falciparum Multidrug Résistance)

Des homologues du gène *mdr*, responsables de la résistance multiple des cellules cancéreuses aux médicaments anticancéreux ont été découverts chez *P. falciparum* et nommés *pfmdr1* et *pfmdr2*.

Les variations au niveau du gène *pfmdr1*, situé sur le chromosome 5, ont été initialement considérées dans la chloroquino-résistance (83, 84).

Cette protéine serait impliquée dans le transport trans-membranaire de la chloroquine et d'autres molécules médicamenteuses (85).

Une mutation ponctuelle au niveau du *Pfmdr1* Asn-Tyr en position 86 peut contribuer à la chloroquinorésistance (86).

Des études récentes effectuées *in vivo* au Mali, n'ont pas montré une forte corrélation de ces variations de copies à la résistance (14).

III.4.3.2.2 - Le gène *cg2* (Candidate gène 2)

Situé sur le chromosome 7, le gène *cg2* code pour une protéine transmembranaire localisée dans la vacuole parasitophore et la membrane digestive (87).

Un polymorphisme de ce gène a été associé à la chloroquino-résistance dans certaines clones africains et asiatiques de *P. falciparum*. Cependant des travaux supplémentaires ont démentis le rôle de ce gène dans la chloroquino-résistance.

III.4.3.2.3 - Le *pfcr* (Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter)

Plusieurs mutations ont été identifiées au niveau de ce gene. Cependant, FIDOCK *et al* ont trouvé que la mutation en position 76 du gène *pfcr*, présent sur le chromosome 7 de *Plasmodium falciparum*, peut conférer la résistance à la chloroquine (88).

Une étude réalisée au Mali, adoptant le protocole modifié de l'OMS 1996 a montré que les patients présentant une infection palustre après traitement à la chloroquine présentaient ce gène (14). Ce résultat a été confirmé par une autre étude réalisée au Mali en 1999 (21). Cette étude a permis de confirmer le rôle déterminant du gène *pfcr* K76T comme bon marqueur de chloroquinorésistance

III. 5 - EVALUATION DE LA CHIMIORESISTANCE

L'évaluation de la chimiorésistance a été standardisée par l'OMS pour l'espèce *P. falciparum*. Il s'agit des épreuves d'évaluation *in vitro* et *in vivo*. (Tests standardisés de l'OMS de 14 jours et de 28 jours)

III.5.1 - TEST *IN VITRO*

Il consiste à mesurer l'inhibition de la maturation en schizontes des parasites isolés chez un sujet, en présence de doses croissantes d'un antipaludique donné.

On distingue :

- *Tests optiques*: Le micro-test OMS et le semi-microtest de Le Bras (89, 90).
- *Tests isotopiques*: Le microtest isotopique de Desjardins et le semi-microtest isotopique de Le Bras et Deloron (91, 92).
- *Test rapide de KROGSTAD* (93).
- Microtest de MARKII
- Test de MAKLER (94).

III.5.2 - TESTS "*IN VIVO*"

Elle consiste à administrer, à un sujet porteur de *Plasmodium falciparum*, la dose ordinairement recommandée de l'antipaludique à tester, et à contrôler la disparition des parasites du sang au bout d'un temps donné. L'évaluation de l'efficacité des schémas thérapeutiques se fait directement avec ces tests (le test prolongé de 28 jours, le test standard de 14 jours)

III.5.2.1 - Test standard de l'OMS . de 28 jours

Il consiste à administrer une dose de 25 mg de chloroquine base/kg poids corporel répartie en 3 jours chez un patient présentant une infection monospécifique à *Plasmodium falciparum* avec contrôle de la parasitémie aux jours J₁, J₂, J₃, J₇, puis à J₁₄, à J₂₁, et à J₂₈. Le suivi se faisait pendant 28 jours.

III.5.2.2 - Test standard de l'OMS . de 14 jours:

C'est le test actuellement admis pour l'évaluation de la chimiosensibilité.

Le principe consiste à administrer chez un patient une dose de 25 mg de chloroquine base par kilogramme de poids corporel répartie en 3 jours, soit 10 mg par kilogramme le premier jour, 10

mg le deuxième jour, et 5 mg le troisième jour avec contrôle de la parasitémie à J₃, J₇ et J₁₄. Le test se réalise pendant une période de 14 jours

Il est applicable au Fansidar avec l'administration de 25mg de sulfadoxine et 1,125mg de pyriméthamine en dose unique suivi de contrôle clinique à J1, J2, et de contrôle clinique et parasitologique à J3, J7 et J14

III. 6 - GENETIQUE HUMAINE, SUSCEPTIBILITE ET RESISTANCE AU PALUDISME

La pathogénie de l'infection palustre résulte des interactions entre le parasite et le système de défense de l'hôte. Il existe une très grande variabilité de réponse à l'infection palustre entre les individus vivant dans les mêmes zones d'endémie (95).

L'information apportée par les marqueurs génétiques sont les principaux outils de l'épidémiologie génétique. Ces informations permettent de déterminer la part des facteurs génétiques et identifier la nature de ces facteurs en cause (carte du génome humain, typage des Marqueurs génétiques).

L'avènement de l'immunogénétique moléculaire a ouvert une nouvelle ère dans la compréhension des facteurs génétiques impliqués dans la susceptibilité ou la résistance au paludisme. Les différentes stratégies adoptées sont essentiellement basées sur l'identification des gènes et la recherche des régions chromosomiques susceptibles d'être impliquées dans le contrôle des phénotypes cliniques et biologiques de l'infection palustre.

Dans le paludisme, les études d'épidémiologie génétique les plus nombreuses ont concerné la recherche des facteurs génétiques impliqués dans les formes graves de l'infection à *Plasmodium falciparum* (neuropaludisme, anémies sévères) (95).

Les premiers polymorphismes dont le rôle a été suggéré dans la survenue des paludismes sévères sont les anomalies génétiques touchant les globules rouges (hémoglobinopathies, déficits enzymatiques). En outre ceux qui sont liés à des anomalies génétiques du globule rouge, les polymorphismes qui ont été les plus étudiés dans la survenue des formes graves du paludisme sont situés au niveau du complexe HLA -TNF du chromosome 6p21 (95).

Ces études concernaient surtout les travaux de Hill menés en Gambie sur le rôle protecteur d'un antigène de Classe I, HLA-B-53, dont la fréquence était plus basse parmi les cas de paludisme sévère (15,7%) (96).

Des études de polymorphisme situé au niveau du promoteur du gène codant pour le TNF- α ont montré que ce gène candidat est fortement associé avec la susceptibilité au neuropaludisme (97). D'autres travaux dans le domaine de l'épidémiologie génétique du paludisme ont mis l'accent sur

l'étude de phénotypes biologiques reflétant soit les niveaux d'infection par le parasite, soit la réponse immunitaire (taux d'anticorps ou de cytokines spécifiques ou non de certains antigènes).

C'est ainsi que les études menées au Cameroun et au Burkina Faso ont mis en évidence, puis confirmé le rôle de la région *5q31-q33* dans le contrôle des niveaux d'infection par *Plasmodium falciparum* (95).

Cette région contient plusieurs gènes codant pour des molécules immunologiques telles que l'interleukine-4 et l'interleukine-12 qui sont impliquées dans la régulation de la balance des lymphocytes T auxiliaires: Th1 et Th2.

Luoni G et al.(2001) ont montré que l'allèle IL4-524T est fréquent chez la plupart des Peulhs (75%) qui sont moins susceptibles au paludisme que les Mossi et les Rimaïbé (98, 99). La présence de cet allèle est corrélée à une forte production d'anticorps dirigés contre les antigènes CSP et Pf322.

Des travaux sur le polymorphisme du gène *HLA* classe I ont montré que l'allèle HLA-B53 associé à l'antigène LSA-3 induit une réponse à médiation cellulaire de type CTL (cytotoxic T lymphocytes) (100).

D'autres études de polymorphisme ont montré que les porteurs de l'allèle HLA classe I H131 avaient une forte production d'immunoglobuline G2 anti-RESA (Ring Erythrocyte Surface Antigen) qui est associée à la résistance contre l'Infection palustre (101).

IV - METHODOLOGIE

IV. 1 - LIEUX D'ETUDE :

Notre étude s'est déroulée simultanément à Kollé et à Bandiagara. L'accessibilité géographique, l'existence de données épidémiologiques antérieures, l'adhésion de la population aux études antérieures et la présence de l'équipe du DEAP à Bandiagara et à Kollé étaient des facteurs prometteurs pour le bon déroulement de cette étude.

IV.1.1 - KOLLÉ

Kollé est un village situé dans la savane Nord soudanienne du Mali au sud-ouest de Bamako, la capitale. Il est distant de 57 Km de la capitale Bamako. Limité au sud par le fleuve Niger, il est distant de ce dernier de 9 Km. **(Figure 5)**

La transmission du paludisme y est saisonnière avec une allure hyper-endémique sur une courte saison, 3 à 4 mois. Le Taux d'inoculation entomologique durant la période de forte transmission est de 5,2 piqûres infestantes par personne et par mois **(22)**.

Le village est bâti sur une plaine d'environ 5020 hectares avec des zones inondables et des zones exondées.

Le climat est du type soudanien avec deux saisons distinctes au cours de l'année:

- L'une pluvieuse du mois de mai au mois d'octobre avec un maximum de pluie en août et septembre;
- L'autre sèche, allant du mois de novembre à celui d'avril. Cette dernière se subdivise à son tour en période fraîche (novembre- janvier) et une période chaude (février- mai).

La population de Kollé est estimée à 2500 habitants environ **(102)**.

Elle est principalement constituée de Malinkés qui cohabitent et tissent des liens étroits avec les autres ethnies : Bambara, Peuhls, Sénoufo.

La population de Kollé est essentiellement constituée de musulmans.

L'agriculture, l'élevage et le petit commerce représentent les principales activités économiques du village.

Le village de Kollé dispose d'un magasin de stockage des céréales, un dispensaire actuellement tenu par un aide soignant et une matrone, trois forages fonctionnels.

Sur le plan éducatif, le village dispose d'un centre d'alphabétisation, d'une medersa, d'une école primaire d'enseignement publique.

IV.1.2 - BANDIAGARA

La ville de Bandiagara est une commune rurale située dans la 5^{ème} région administrative du Mali, en zone sahéenne. Elle va de l'isohyète 200 mm à l'isohyète 700 mm. Elle est située sur le plateau Dogon et le relief est dominé par une grande table de grès. **(Figure 5)**

La transmission du paludisme y est saisonnière avec une allure hyper-endémique. Le Taux d'inoculation entomologique durant la période de forte transmission est de 4,0 piqûres infestantes par personne et par mois **(103)**.

Le climat est caractérisé par une courte saison des pluies allant du mois de juin/juillet au mois de septembre, avec une pluviométrie de 400 à 700 mm d'eau par an. La ville est irriguée par le Yamè, affluent du fleuve Niger.

La végétation y est de type sahéen.

La ville de Bandiagara est peuplée de 12500 habitants **(103)**.

Cette population est composée majoritairement de Dogons (environ 65%) suivi de Peuhls et d'autres ethnies.

L'activité est essentiellement agropastorale et le tourisme y est aussi développé.

Sur le plan éducatif, la ville dispose de trois groupes scolaires, et d'un lycée.

Comme infrastructure sanitaire la ville dispose d'un centre de santé de cercle tenu par quatre médecins, d'un Centre Régional de Médecine Traditionnelle (CRMT), et d'un centre de santé communautaire dirigé par un infirmier d'état.

IV. 2 - TYPE ET PERIODE D'ÉTUDE

Nous avons réalisé une étude longitudinale prospective du mois d'août 2002 au mois de janvier 2003 à Kollé et Bandiagara.

IV. 3 - POPULATION D'ETUDE

Notre étude a concerné tous les patients atteints de paludisme simple à *P. falciparum* et âgés de 6 mois et plus ayant consulté pendant la période de l'étude.

CARTE DU MALI : Sites d'étude



Figure 5: Sites d'études (Source: GIS/GPS MRTC)

IV. 4 - ECHANTILLONAGE ET TAILLE DE L'ECHANTILLON

Les résultats antérieurs à cette étude indiquent que la fréquence des polymorphismes que nous nous proposons d'étudier variait entre 5 et 20% dans la population. La prévalence de pfprt 76T était estimée à 70% et le taux de clairance à 50% dans notre population. L'inclusion de 740 cas de paludisme simple permettrait la détection d'un effet protecteur de 40% pour un polymorphisme dont la prévalence est de 10% avec une puissance de 80% et un intervalle de confiance de 95% (Epi-IFNo 6, CDC d'Atlanta). Pour tenir compte des perdus de vue, nous avons porté la taille de notre échantillon à 800.

Pour la première année de la constitution de cet échantillon notre recrutement exhaustif a porté sur l'ensemble de la population se présentant au dispensaire pour un accès palustre simple pendant la période d'étude. Pour les analyses biologiques nous avons sélectionné les échantillons selon un organigramme précis (**Figure 6**).

IV.4.1 - CRITERES D'INCLUSION

Les critères d'inclusion étaient basés sur la définition stricte des cas à savoir:

- Etre résident de Kollé/ Bandiagara depuis au moins 6 mois,
- Avoir un âge compris entre 6 mois et 70 ans
- Avoir des signes cliniques évocateurs d'un accès palustre simple (température axillaire non corrigée comprise entre 37,5 °C et 39°C)
- Avoir une goutte épaisse positive monospécifique à *P. falciparum* avec une densité parasitaire comprise entre 2000 et 100000 formes asexuées par millimètre cube de sang avec possibilité de traitement par voie orale sans contre indication à la chloroquine.
- Ne pas avoir de signes de paludisme grave ou compliqué (incapacité de boire, vomissements incoercibles, obnubilation, notion de convulsion récente, anémie sévère, détresse respiratoire etc.)
- Avoir le consentement éclairé du sujet ou l'assentiment éclairé des parents.

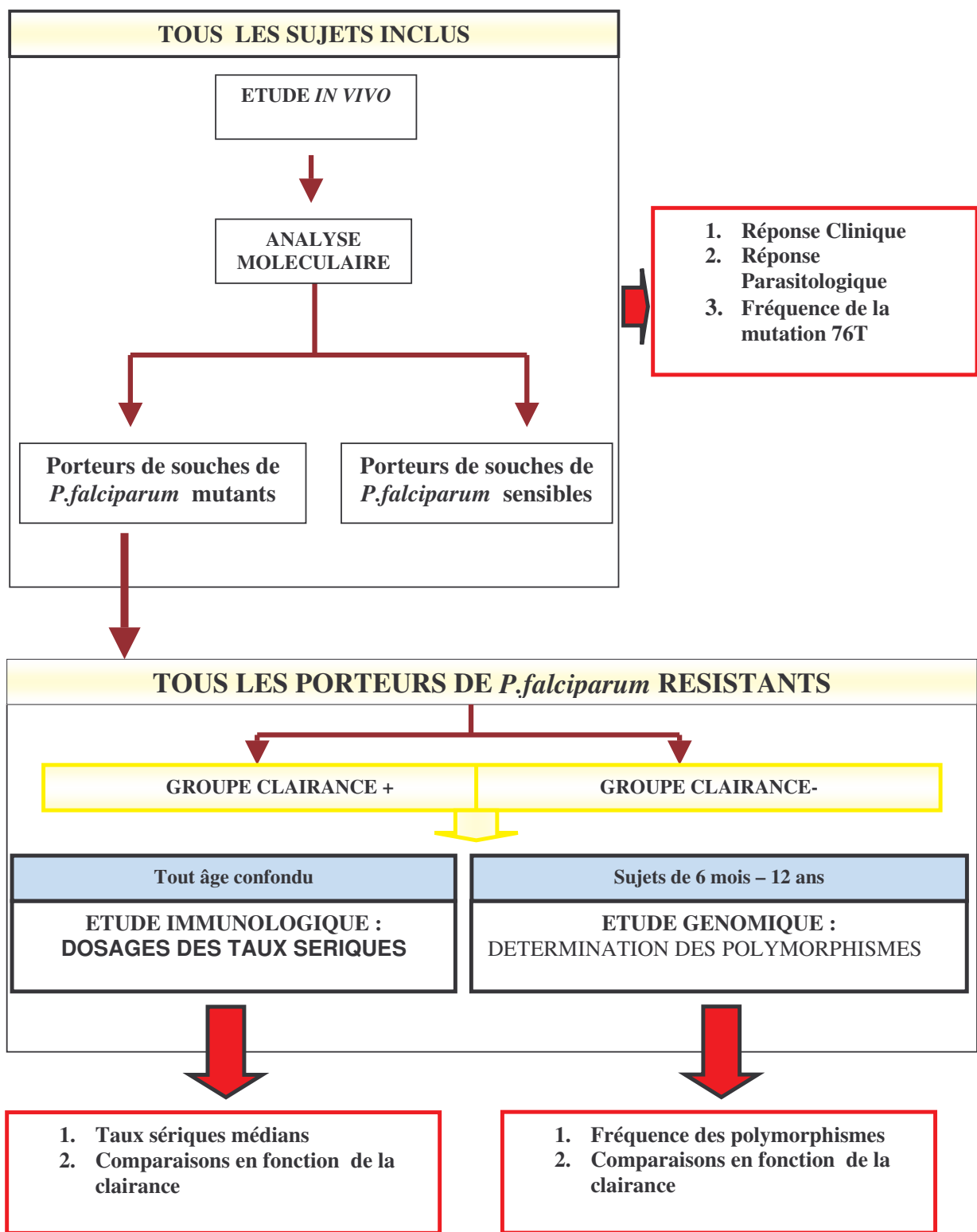


Figure 6: Schéma du processus d'échantillonnage

IV.4.2 - CRITERES DE NON – INCLUSION

Tous les sujets qui ne répondaient pas aux critères d'inclusion ci-dessus mentionnés, les sujets atteints de paludisme grave et les femmes enceintes ont été exclus de cette étude.

IV. 5 - METHODES DE COLLECTE DES DONNEES

Les données ont été collectées dans les locaux du dispensaire de Kollé et au centre de santé communautaire de Bandiagara par les équipes de recherche au moyen d'un dossier individuel d'enquête élaboré conformément aux objectifs de l'étude (*Cf. Annexe*).

Le test *in vivo* de 14 jours de l'OMS modifié a été utilisé pour évaluer les échecs thérapeutiques (**RCA, ETP et ETT**) et les différents types de résistances parasitologiques (**RI, RII et RIII**).

Les données collectées ont été classées en trois types : renseignements généraux, cliniques et biologiques.

IV.5.1 - RENSEIGNEMENTS GENERAUX

Les renseignements généraux recueillis au poste d'accueil par la technique d'interview directe, portaient essentiellement sur les variables d'identification et les motifs de consultation (*Cf. Annexe*). Ces données étaient ensuite consignées sur une feuille de papier par l'infirmier de l'équipe.

IV.5.2 - DONNEES CLINIQUES ET TRAITEMENTS

Les données cliniques ont été recueillies au poste clinique par interview directe et par l'examen physique complet des sujets par le médecin généraliste de l'équipe de recherche.

Les principales variables cliniques mesurées étaient le poids corporel, la taille, la température axillaire non corrigée, la splénomégalie selon la classification de Hackett, les fréquences cardiaque et respiratoire, la coloration des conjonctives...

Tous les sujets inclus de l'étude ont reçu en traitement la chloroquine en raison de 10mg/kg poids les deux premiers jours et 5 mg/kg le troisième jour. Dans le but d'une bonne observance du traitement, tous les sujets ont été observés 30-60 minutes sur place après administration du traitement. Tous les sujets qui ont vomi pendant ce temps d'observation ont bénéficié du renouvellement de leur dose de médicament. La fièvre a été traitée avec un antipyrétique.

IV.5.3 - DONNEES BIOLOGIQUES

Elles ont été collectées au poste de biologie à partir de prélèvements directs de sang capillaire et de sang veineux sur EDTA et tube sec par l'interne en pharmacie. Ces prélèvements ont servi à la confection de :

- Goutte épaisse et frottis mince
- Confettis
- Obtention du culot globulaire et du Sérum
- Mesure du taux d'hémoglobine.

IV.5.4 - DEROULEMENT DE L'ENQUETE

IV.5.4.1 - Calendrier des activités de base et suivi des sujets de l'étude :

Le premier jour du traitement étant J0, les sujets inclus étaient activement suivis les jours 3, 7 et 14.

En plus du suivi actif, ils ont également bénéficié d'un suivi passif du fait de la présence permanente de l'équipe de recherche sur place (visites imprévues dans le dossier individuel d'enquête (*Cf. Annexe*)).

Tableau II: Calendrier des activités de base et suivi des sujets de l'étude

JOURS	EXAMENS CLINIQUES	GOUTTE ÉPAISSE	HÉMOGLOBINE	TRAITEMENT	PRÉLÈVEMENT VEINEUX
J0	X	X	X	X	X
J1	X			X	
J2	X			X	
J3	X	X			
J7	X	X	X		X
J14	X	X	X		X
Autres jours	X	X		X	X

IV.5.4.2 - Critères de jugement de l'efficacité du traitement :

L'efficacité thérapeutique de la chloroquine sur *P. falciparum* a été appréciée en fonction de l'évolution des symptômes, des signes cliniques et de la parasitémie après le traitement pendant les 14 jours de suivi. La réponse clinique a été classifiée en réponse clinique satisfaisante (RCS), échec thérapeutique précoce (ETP) ou en échec thérapeutique tardif (ETT). La réponse parasitologique, elle a été classifiée en sensible, résistant de niveau RI, résistant de niveau RII et résistant de niveau RIII (12).

Les cas de parasitémie et de signes cliniques persistants ont été évalués par le médecin de l'équipe et traités à la sulfadoxine-pyriméthamine (Fansidar^R) comprimée ou à la quinine injectable selon le besoin.

IV.5.5 - TECHNIQUES DE LABORATOIRE

IV.5.5.1 - Examens parasitologiques

La recherche des hématozoaires du paludisme a été effectuée sur la goutte épaisse et le frottis mince. La goutte épaisse a servi à déterminer la densité parasitaire (DP). Le frottis mince, il a été utilisé pour déterminer l'espèce plasmodiale

IV.5.5.2 - Examen hématologique

L'examen hématologique a surtout concerné la mesure du taux d'hémoglobine. Pour ce faire nous avons utilisé un système d'Hémocue. Le sang est placé dans une microcuvette et un photomètre portable détermine l'hémoglobine.

Ce système comporte des microcuvettes à usage unique qui contiennent trois réactifs sous forme déshydratée qui convertissent l'hémoglobine en méthémoglobinazide (HiN3) :

Le désoxycholate de sodium hémolyse les cellules sanguines,

Le nitrite de sodium convertit l'hémoglobine (fer ferreux) en méthémoglobine (fer ferrique),

L'azide de sodium convertit la méthémoglobine en méthémoglobinazide (HiN3).

Le sang total est placé dans la microcuvette par action capillaire et insérée dans le photomètre de l'Hémocue. La lumière passe à travers l'échantillon et l'absorption de la méthémoglobinazide est mesurée à deux longueurs d'ondes (570 nm et 880 nm) pour compenser de façon automatique la turbidité (due à la lipidémie et la leucocytose). Les résultats sont fournis après 45 à 60 secondes en g/l sur la fenêtre numérique.



IV.5.5.3 - Etudes de biologie moléculaire :

Les études moléculaires ont été faites dans les locaux de l'unité de biologie moléculaire (MEDRU) du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires (DEAP). Il s'agissait d'identifier les de résistance de *P. falciparum* à la chloroquine en utilisant la PCR.

Le matériel biologique qui a servi à cette étude moléculaire était l'ADN plasmodial extrait à partir des confettis réalisés le jour de l'inclusion.

Le principe de cette technique moléculaire est d'utiliser de manière répétitive l'une des propriétés des ADN polymérase, celle de pouvoir synthétiser un brin complémentaire d'ADN à partir d'une amorce. Les acteurs de la PCR sont essentiellement l'ADN, deux amorces sens et anti-sens, une enzyme (la Taq Polymérase) et les 4 nucléotides : dGTP, dATP, dTTP, dCTP. La réaction correspond à la succession d'un certain nombre de cycles comportant chacun 3 étapes : une dénaturation, une hybridation et une élongation.

Les produits d'amplification sont ensuite soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose contenant du Bromure d'Ethidium.

Pour la détermination du génotype nous avons utilisé la restriction enzymatique. Le principe de ce type de PCR est de procéder à une première amplification de la portion du gène susceptible de comporter la mutation K76T, puis à une seconde amplification afin d'obtenir des amplicons plus petits et enfin on procède à une digestion enzymatique à l'aide d'une enzyme spécifique, Apo I. Une bonne réaction se traduit par la présence de bandes conformes à celle attendues. Il faut observer la conformité de la taille du produit attendu ainsi que celle des témoins positifs. Il ne doit pas y avoir de bande au niveau des témoins négatifs. L'enzyme ne coupe que les souches de génotypes sensibles. Les bandes de la même taille que le témoin sensible (100pb) correspondent aux souches sensibles à la chloroquine. Par contre celles qui ont la même taille que le témoin résistant (134pb) correspondent aux souches résistantes à la chloroquine. Les bandes qui apparaissent à la fois au niveau des deux témoins correspondent aux souches mixtes.

La taille attendue pour les produits d'amplifications est de 537 pb pour la 1^{ère} amplification et de 134 pb pour la 2^e.

IV.5.5.4 - Etude immunologique et génomique :

Le matériel biologique pour ces études était constitué :

- Des sera pour le dosage du taux sérique de IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, du TNF- α et de l'IFN- γ
- L'ADN humain extrait des monocytes du sang périphérique obtenu à l'aide d'un prélèvement veineux sur tube EDTA pour la détermination du polymorphisme.

IV.5.5.4.1 - Mode opératoire normalisé pour le prélèvement veineux :

a - Principe :

Il consiste à prélever du sang veineux dans un tube sans et/ou avec anticoagulant

La quantité de sang prélevé est fonction de l'âge du patient :

-5 ml pour les sujets âgés de 6 mois à 5 ans.

-10 ml pour ceux âgés de plus de 5 ans.

b - Matériel et réactifs :

Pour réaliser les prélèvements veineux nous avons utilisé : Gants stériles, coton hydrophile, Alcool à 70%, tubes sec 5 ml et 10 ml, tube EDTA 5 ml et 10 ml, seringue 5 ml et 10 ml, aiguilles, épicroaniens, portoires, garrot.

c - Mode opératoire :

- Attacher le garrot au-dessus du lieu de prélèvement ;
- Désinfecter le lieu de prélèvement avec un tampon d'alcool à 70% ;
- Inscrire le numéro d'identification du patient, la date et l'heure du prélèvement sur les tubes de prélèvement ;
- Introduire avec précaution l'aiguille dans la veine et prélever le volume de sang nécessaire ;
- Après le retrait de l'aiguille et déposer un coton sec sur le lieu de prélèvement ;
- Repartir le sang dans les tubes ;
- Placer les prélèvements sous une hotte.

IV.5.5.4.2 - Mode opératoire normalise pour l'obtention du sérum

a - Principe :

Il s'agit de prélever le surnageant obtenu après centrifugation du sang prélevé sur tube sec.

b - Matériel et réactifs :

Pour l'obtention du sérum nous avons utilisé: centrifugeuse, tubes Nunc, Congélateur, Micropipettes, Embouts, Hotte, Boites de cryoconservation.

c - Mode opératoire :

- Centrifuger le prélèvement veineux à 1500 tours/min pendant 5 min ;
- Replacer le prélèvement sous la hotte pour la séparation ;
- Inscrire sur un tube Nunc le numéro d'identification du patient ainsi que la date et l'heure du prélèvement ;
- Prélever à l'aide d'une micropipette le sérum ;
- Répartir ce sérum dans le tube Nunc ;
- Placer les tubes Nunc dans une boîte de cryoconservation à conserver à -20° .

IV.5.5.4.3 - Mode opératoire normalise pour l'obtention du culot globulaire

a - Principe :

Il s'agit de prélever le culot globulaire obtenu après centrifugation du sang prélevé sur tube EDTA.

b - Matériel et réactifs :

Pour l'obtention du culot globulaire nous avons utilisé: Centrifugeuse, tubes Nunc, tubes EDTA, Micropipettes, Embouts, Boites de cryoconservation, congélateur.

c - Mode opératoire :

- Centrifuger le prélèvement veineux à 1500 tours/min pendant 5 min ;
- Replacer le prélèvement sous la hotte pour la séparation ;
- Inscrire sur deux tubes Nunc le numéro d'identification du patient ainsi que la date et l'heure du prélèvement. Un tube servira pour la récupération du plasma et le second pour le culot ;
- A l'aide d'une micropipette prélever le plasma en évitant de toucher la fine couche de monocyte situé au-dessus du culot globulaire ;
- Répartir le plasma dans le tube Nunc destinés au plasma ;
- Prélever à l'aide d'une micropipette le culot globulaire après l'avoir mélangé ;
- Repartir le culot dans le tube Nunc destinés au culot ;

- Placer les tubes Nunc dans une boîte de cryoconservation puis conserver à -20° .

IV.5.5.4.4 - Dosage des différentes cytokines

Les différents dosages ont été effectués dans les locaux de l'unité de recherche vaccinale sur le paludisme MRTC/ DEAP.

Il s'agissait de déterminer le taux sérique de certaines cytokines dans les séras des porteurs de souches de *P. falciparum* de génotype résistant. Ces dosages ont concerné les prélèvements effectués avant le traitement le jour de l'inclusion.

Nous avons utilisé la cytométrie de flux pour déterminer ces taux.

Les cytokines concernées sont : IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , IFN- γ .

Pour effectuer ces dosages nous avons utilisé deux types de Kit commercial de la firme BD Pharmingen, dénommé Cytometric Bead Array ou « spectre de billes cytométriques » également connu sous le nom d'analyse multiplexée de perles.

- Pour doser l'IL-8, IL-1 β , IL-6 et IL-12p70, nous avons utilisé le kit destiné aux cytokines Proinflammatoire
- Pour doser l'IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ et TNF- α , nous avons utilisé le kit destiné aux cytokines TH1/TH2

Le principe du dosage est le même pour les deux Kits avec un même mode opératoire

Le CBA est une série de particules spectralement discrète qui peuvent être employées pour capturer et doser des analytes solubles. L'analyte est mesurée par détection avec la cytométrie de flux (104). En 1998, BioErgonomics est l'une des premières sociétés de biotechnologie à associer la cytométrie en flux au dosage quantitatif de plusieurs cytokines simultanément dans le même échantillon : les MultiFlowTM.

La cytométrie de flux est une technique d'analyse et de tri de constituants de fonctionnalité cellulaire, dans un système fluide très fin sous pression. La vitesse d'analyse permet l'examen d'un nombre important de cellules. Les particules en suspension sont guidées dans un fin capillaire, jusqu'à l'extrémité d'une buse, où elles vont traverser le faisceau d'un laser qui va exciter le ou les fluorochromes présents. Chacun d'entre eux va émettre une fluorescence qui sera séparée et transformée en signal électrique. L'intensité de la fluorescence est représenté sur des histogrammes prédéfinis qui s'affichent sur l'écran du cytomètre au fur et à mesure de l'acquisition des données. Certains cytomètres permettent en outre de collecter après tri les cellules souhaitées.

Utilisant la cytométrie de flux, le CBA est un ensemble de sondes fluorescentes composées d'anticorps fluoro-marqués spécifiques à la molécule à doser. Le CBA est basé sur une technique d'analyse en sandwich représentée sur le schéma suivant:

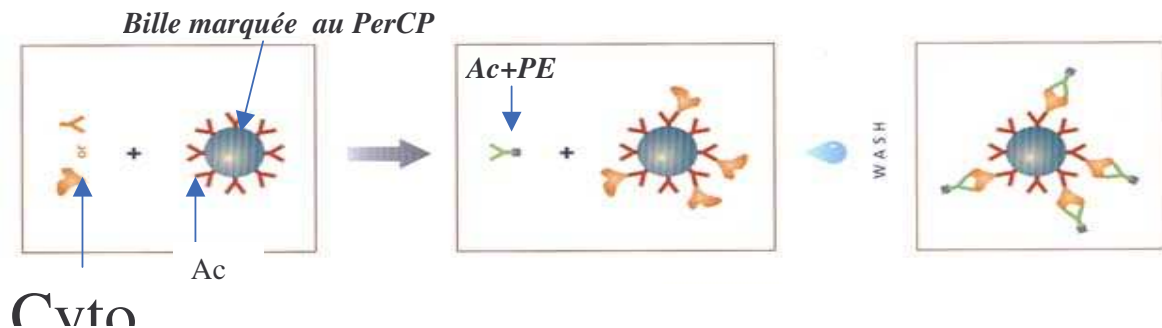


Figure 7: Schéma de base d'analyse en sandwich pour le CBA

(http://www.bdbiosciences.com/pharmingen/products/display_product.php?keyID=9)

Les principaux éléments du CBA sont :

- Billes de capture fluoro-marquées spécifiques pour la cytokine à doser : Dans les cas des Kits de BD Pharmingen, il s'agit d'un mélange de 6 séries différentes de billes marquées par le même fluorochrome (PERCP). Chaque série de billes a une intensité propre pour ce fluorochrome et est attachée à un anticorps spécifique dirigé contre une des cytokines à doser.
- Le réactif de détection fluoro-marqués : qui est constitué par les anticorps dirigés contre les cytokines à doser couplés à un autre fluorochrome la Phycoerythrine (PE).
- Un standard pour chaque cytokine permettant de déterminer les équations faisant la relation entre les fluorescences mesurées et les concentrations sériques des cytokines.

a - Mode opératoire :

Le dosage des différentes cytokines par la cytométrie de flux à partir des Kits se fait en plusieurs étapes :

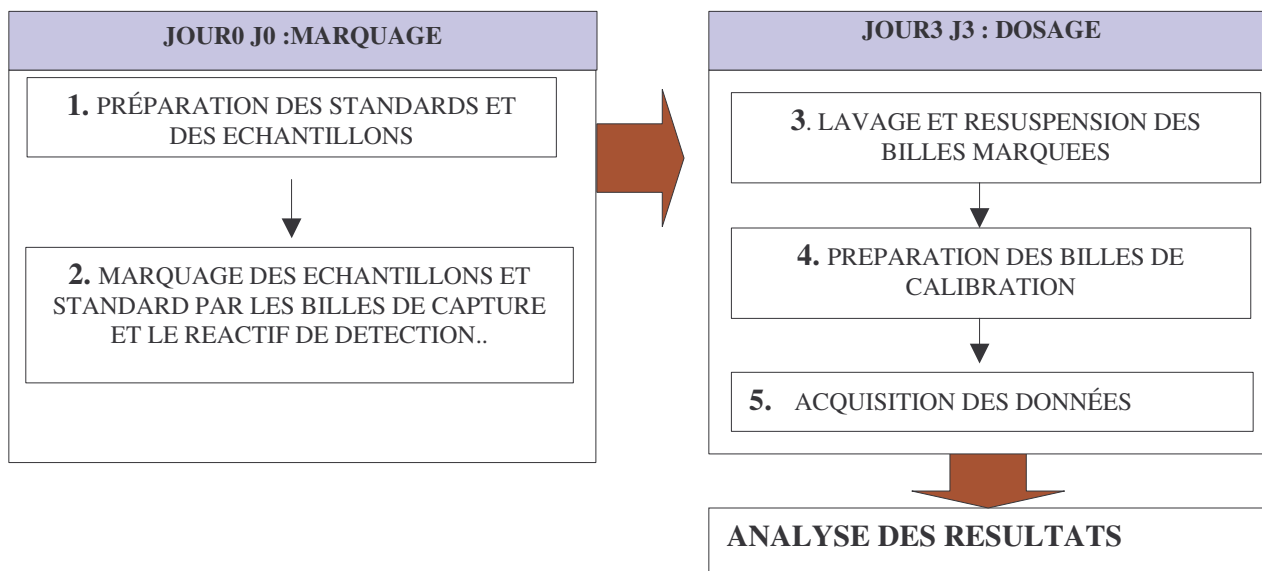


Figure 8: Les différentes étapes du dosage cytométrique

Chacun des Kits contient :

- Un tube pour chacune des séries de billes de captures spécifiques aux cytokines
- Un tube de billes pour le calibrage de l'appareil ;
- Un tube d'anticorps spécifiques fluoromarkés par du PE pour la réaction en sandwich ;
- Un tube de control positif de détection du PE destiné aux des billes de calibrage ;
- Un tube de control positif de détection du FITC destiné aux billes de calibrage ;
- Un tube de standard lyophilisé des cytokines ;
- Deux tubes de solution tampon pour le lavage ;
- Deux tubes de solution diluante pour les différentes dilutions.

a.1 - Dilution des standards :

Les standards sous forme de lyophilisat doivent être reconstitués et dilués avant d'ajouter le mélange des 6 billes de capture et du réactif de détection PE.

- Ajouter 0.2 ml de la solution de dilution pour obtenir un standard à 10X ;
- Agiter et laisser à la température ambiante pendant 15 min ;
- Incrire sur 10 tubes de 12 x 75mm les différentes dilutions et les ranger dans l'ordre suivant : **1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 et témoin négatif.**

- Ajouter 900 ul de la solution diluante dans le premier tube ;
- Ajouter 300 ul du diluant dans chacun des autres tubes ;
- Transférer 100 ul de la solution à 10X dans le premier tube à essai et mélanger;
- Commencer la série de dilution en transférant 300 ul du premier tube dans le second tube (1:2) et mélanger. Puis 300ul du tube 1:2 dans le tube 1:4 et ainsi de suite jusqu'au tube 1:256.
- Le dernier tube ne contenant que la solution diluante servira de contrôle négatif.

a.2 - Mélange des billes de capture :

Les six billes de capture sont conditionnées dans des flacons individuels.

Il est indispensable de les additionner avant de les ajouter au réactif de détection PE, aux standards ou aux échantillons.

- Déterminer le nombre de tube d'essais (y compris les standards, les deux témoins positifs et le contrôle négatif=18 tubes) ;
- Mélanger vigoureusement chacun des flacons contenant les billes de capture ;
- Prendre 8 ul par billes de capture et par échantillon à analyser ;
- Mélanger vigoureusement la solution ainsi obtenue.

Le mélange de bille de capture près pour le transférer dans les différents tubes test à raison de 40ul / tube.

a.3 - Marquage :

- Etiqueter les tubes a essai en fonction des échantillons ;
- Transférer 40 ul du mélange des billes de capture dans chacun des tubes à essais ;
- Ajouter 40 ul du standard dilué dans le tube approprié;
- Ajouter 40 ul de chaque échantillon à doser dans le tube à essai approprié;
- Ajouter 40 ul du réactif de détection PE dans chaque tube et mélanger ;
- Laisser incuber à 4 °C pendant 3 jours et à l'abri de la lumière;

a.4 - Lavage :

Les échantillons colorés sont lavés trois jours après l'incubation pour éliminer toutes les substances excédentaires.

- Ajouter 1ml de solution tampon de lavage dans chacun des tubes et centrifuger à 1500 rpm/ min pendant 5 min;
- Verser le surnageant;
- Ajouter 300ul de la solution tampon de lavage pour resuspendre les billes de capture

a.5 - Préparation des billes de calibration :

- Ajouter 40 ul des billes de calibration dans 3 tubes à essais A, B et C
- Ajouter 40ul du FITC, contrôle positif de détection, dans le tube B
- Ajouter 40ul de PE, contrôle positif de détection, dans le tube C
- Laisser à la température ambiante pendant 30 min à l'abri de la lumière les 3 tubes.
- Ajouter 400ul de la solution de lavage dans les tubes de contrôle positif B et C
- Ajouter 450ul de la solution de lavage dans le tube A

Utiliser les tubes A, B et C pour démarrer le dosage cytométrique

a.6 - Acquisition des données :

Elle se fait en passant les tubes marqués une à une dans le cytomètre. Il s'agit dans un premier temps de passer les tubes de calibration pour délimiter les régions des histogrammes ou on s'attend à avoir les intensités extrêmes. Ensuite le passage des différentes dilutions des standards permettra de recueillir les données pour le tracé ultérieur de la courbe de référence. Ce n'est qu'après ces étapes que les tubes contenant les échantillons seront passés au cytomètre. Les données de cette acquisition seront représentés sur les histogrammes de façon à ce que l'intensité en PerCP des différentes séries de billes de capture figurent sur l'axe des ordonnées. L'intensité en PE représentée sur l'axe des abscisses correspond à la quantité de cytokine mesurée.

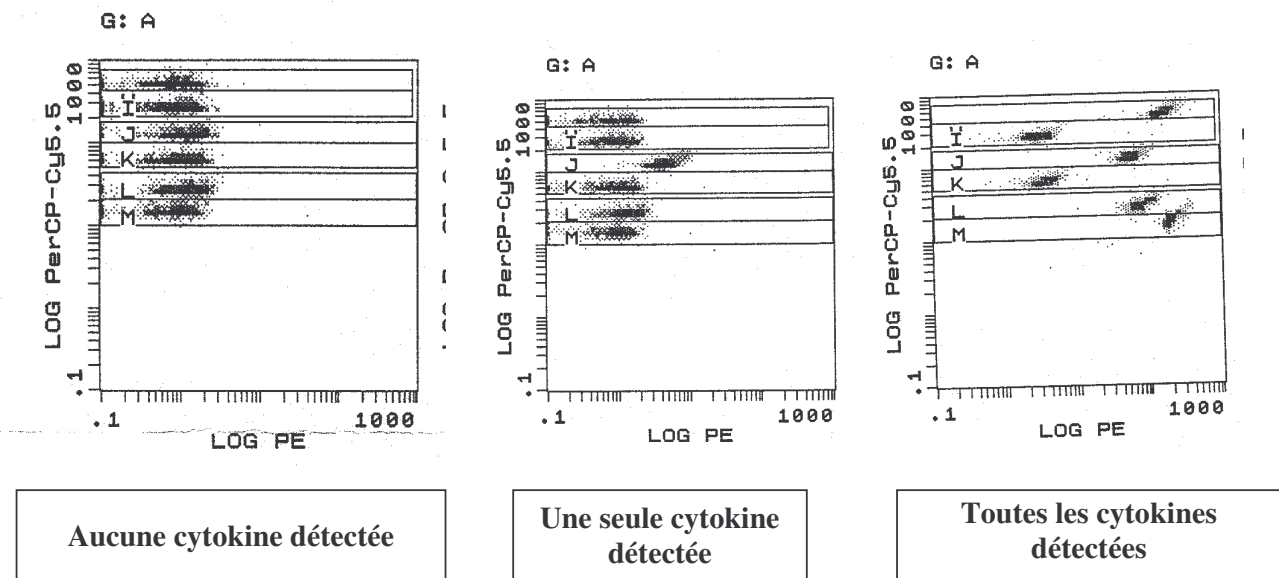


Figure 9: Exemple d'histogrammes

a.7 - Analyse des résultats

Nous l'avons fait sous le logiciel Excel 2000. Les valeurs obtenues en canal de fluorescence lors de l'acquisitions des donnée sur le cytomètre seront converties en pg/ml. La conversion comprend plusieurs étapes :

1. Le tracé la courbe de référence de chacune des différentes cytokines à partir des fluorescences émises par les standards :

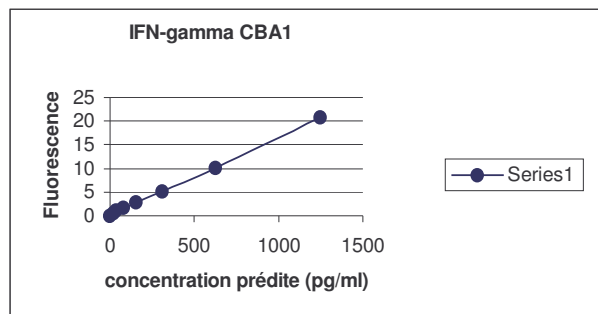


Figure 10: Exemple de Courbe Standard (cas de l'IFN- γ)

2. Déterminer l'équation de la droite de régression

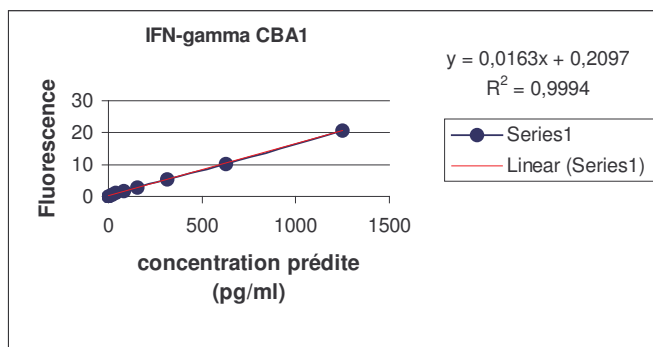


Figure 11: Exemple de courbe avec droite de régression (cas de l'IFN- γ)

3. Appliquer l'équation aux valeurs obtenues à partir du dosage des différents échantillons.

A partir des différentes courbes standards tracés, on détermine l'intervalle de sensibilité du test. Toutes fluorescences convertis en pg/ml devons être comprise entre ces deux valeurs.

Lorsque la valeur de la fluorescence convertie en pg/ml est supérieure à la concentration maximale, le résultat n'est pas interprétable. L'échantillon devra être dilué et dosé de nouveau.

Cependant lorsque la valeur est inférieure au seuil minimal de détection, elle est ramenée à la concentration minimale.

IV.5.5.4.5 - L'étude génomique :

L'étude génomique a été réalisée dans les locaux du Wellcome Trust Center de l'Université d'Oxford en Angleterre. Cette étude comprend:

1. Une extraction de l'ADN génomique
2. Une quantification et dilution de l'ADN
3. La détermination du polymorphisme par le SEQUENOM
4. L'analyse et interprétation des données

a - Mode opératoire normalisé pour l'extraction de l'ADN :

Il consiste à extraire l'ADN contenu dans le culot globulaire obtenu du prélèvement veineux du patient.

L'extraction n'a été réalisée que sur des échantillons pour lesquelles la PCR a montré la présence de souche de *Plasmodium falciparum* mutant à *pfct*.

Pour réaliser cette extraction nous avons utilisé Kit d'extraction *Nucleon BACC2 DNA extraction Kit (#RPN-8501, Amersham Pharmacia biotech, Buckinghamshire, UK Limited)* conformément aux recommandations du fabricant.

b - Mode opératoire normalisé pour la quantification et la dilution de l'ADN :

b.1 - Quantification

Il s'agit de déterminer la concentration de l'ADN contenu dans les différents tubes d'ADN après extraction par le « Nucleon BACC2 DNA extraction Kit ». Pour effectuer cette quantification nous avons utilisé un Kit de dosage, Picogreen^R dsDNA Quantitation Kit *200-2000 assays conformément aux recommandations du fabricant.

Le réactif Picogreen^R dsDNA, est une substance fluorescente ultra sensible qui se fixe aux brins d'ADN en solution. Le principe consiste à fixer ce fluorochrome aux brins d'ADN et de mesurer ensuite la fluorescence émise à 520 nm après une excitation à 480 nm.

Le dosage fluorométrique est une technique très sensible pour déterminer la concentration de l'ADN en solution **(105)**.

b.2 - Dilution :

Tous les échantillons pour lesquels la concentration sera supérieure à 20 ng/ml seront préalablement dilués afin d'obtenir un stock de travail à 20 ng/ul. La dilution se fait avec du TE faible (pH 8.0).

Toujours selon la concentration initiale, on effectue une deuxième dilution dans des plaques ELISA afin d'obtenir une concentration finale d'ADN à 1ng/ul.

c - Mode opératoire normalisé pour le SEQUENOM (MALDI-TOF Mass Spectrometry)

Au cours de ces dernières années, l'étude du polymorphisme humain et d'autres génomes a connu une grande avancée. Ainsi la nécessité de développer de nouvelles technologies qui permettent d'obtenir le maximum d'informations sur le génome en un temps minimum et coût moins considérable s'est fait sentir.

L'étude du polymorphisme d'un seul nucléotide (SNPs) et d'autres points de mutation constituent la majorité des études menée dans le domaine de la génétique clinique. De nombreuses techniques de génotypage des SNPs ont été mises au point ces dernières années. La plus importante de ces techniques est la spectrométrie de masse assistée d'un laser de désorption et d'ionisation en temps réel (matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS)

Introduite pour la première fois en 1988 par Karas et Hillenkamp cette technique a récemment été améliorée pour différencier le génotype en fonction de la masse de la séquence de l'ADN. Elle présente l'avantage d'accroître la résolution et la sensibilité en réduisant le temps entre l'ionisation et l'extraction des ions au cours de l'analyse spectrométrique.

La technique fait appel à des amorces d'extensions spécialement conçues pour le génotypage de SNPs présents dans l'ADN génomique amplifié au cours d'une PCR multiplex. Une matrice assistée d'un laser d'ionisation/désorption et de spectrométrie de masse permet de mesurer la masse d'une petite amorce d'extension terminée par un acide di-désoxyribonucleique.

L'analyse des acides nucléiques avec le MALDI-TOF MS présente quelques avantages :

- La rapidité : l'ionisation, la séparation par taille et la détection de l'acide nucléique ne durent que quelques millisecondes contrairement aux méthodes électrophorétiques usuelles
- Les résultats sont essentiellement basés sur la propriété intrinsèque de la masse/ratio. Contrairement aux techniques électrophorétiques et techniques d'hybridations qui sont toutes deux susceptibles à des complications dues à la structure secondaire des acides nucléiques.

- La robotisation de chacune de ces étapes depuis la préparation des échantillons jusqu'à l'acquisition et à l'analyse des données assure une grande potentialisation de l'application de l'analyse des acides nucléiques.

L'utilisation de la spectrométrie de masse dans la détermination des polymorphismes connus, devient particulièrement avantageuse du fait que plusieurs polymorphismes sont détectables au cours d'une seule réaction.

Le SEQUENOM comprend essentiellement une première phase manuelle et une seconde étape robotisée (**Figure 11**).

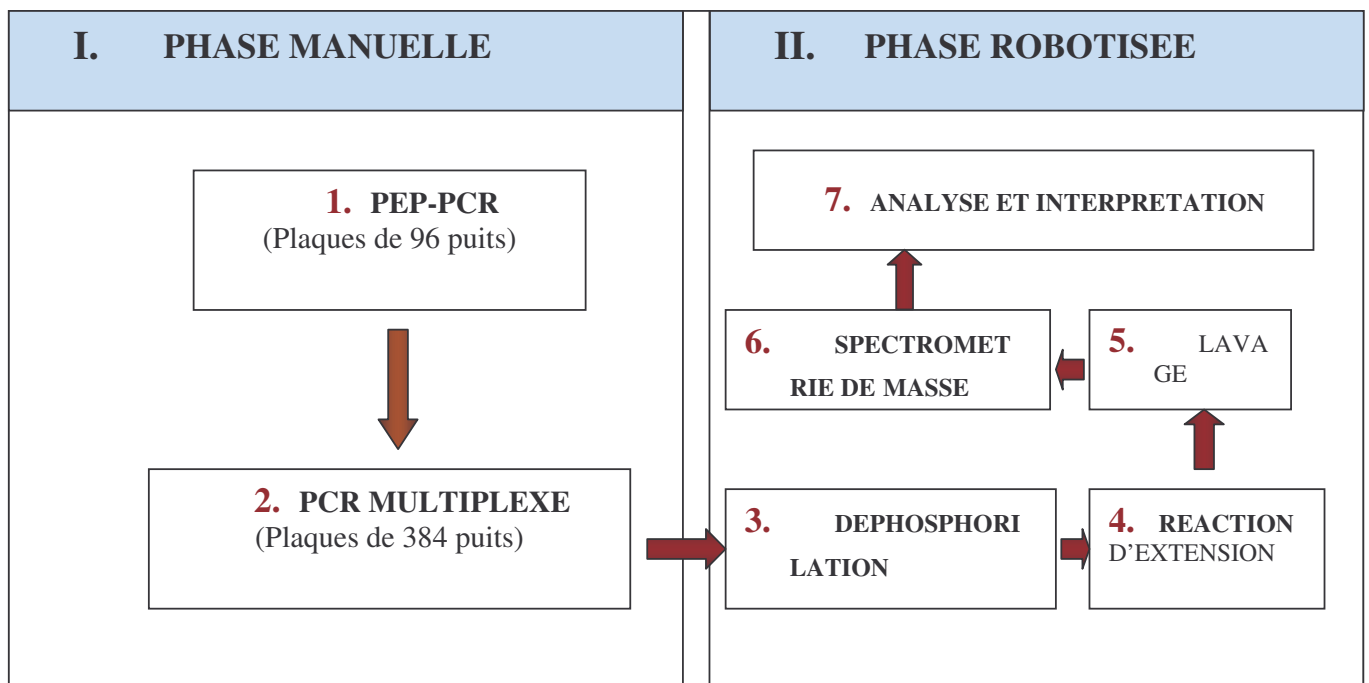


Figure 12: Etapes du SEQUENOM

c.1 - PEP (Primer Extension Pre-amplification) :

Le but de cette première PCR est d'amplifier tout le génome à partir de 15 amorces.

- Transférer 5 µl d'ADN à 1 ng /µl dans les puits correspondant d'une plaque Elisa.
- Préparer le MIX pour la réaction d'amplification.
- Repartir 45 µl de ce MIX dans chacun des puits à l'aide d'une pipette multicanaux.
- Mettre la plaque dans le thermocycleur et exécuter le programme correspondant.

Tableau III: Composition du milieu réactionnel de la PEP PCR

	POUR 1 RÉACTION	POUR 100 RÉACTIONS
10X PCR Buffer	5 µl	500 µl
50mM Mg ²⁺	2,5 µl	250 µl
20 mM dNTPs	2µl	200 µl
N15 primer	2,2 µl	220 µl
H ₂ O	32,8 µl	3280 µl
Taq Polymerase	0,5 µl	50 µl

Tableau IV: Programme d'amplification de la PEP PCR

ETAPE	TEMPÉRATURE	TEMPS
1	94 ⁰ C	3 min
2	94 ⁰ C	1 min
3	37 ⁰ C	2 min
4	Descendre d'0,1 ⁰ C/sec jusqu'à 55 ⁰ C	
5	55 ⁰ C	4 min
6	Retourner à l'étape 2, 49 fois	
7	72 ⁰ C	5 min
8	15 ⁰ C	15 min

c.2 - Deuxième PCR :

IL s'agit au cours de cette deuxième PCR, d'utiliser le produit de la PEP PCR et selon le(s) SNPs que l'on veut observer, d'amplifier la (les) portion(s) de la fraction d'ADN contenant le (les) SNPs. L'amplification se fera dans les plaques de 384 puits.

- Etablir une maquette de transfère des échantillons de la plaque Elisa à celle de 384 puits ;
- Transférer à l'aide d'une pipette multicanaux le produit de la PEP PCR dans le puits correspondant d'une plaque P1 de 384 puits ;
- Faire une dilution au 20ème du produit PEP dans une nouvelle plaque P2 de 384 puits avec du Phénol « rouge » à 50 µg/ml ;
- Transférer dans une nouvelle plaque P3 de 384 puits 2 µl la dilution de P2 ;
- Préparer le MIX pour la réaction d'amplification ;
- Transférer 3 µl de ce MIX dans chaque puits ;
- Mettre la plaque dans le thermocycleur et exécuter le programme correspondant.

Tableau V: Composition du milieu réactionnel pour la PCR multiplex

COMPOSANTS	POUR UN PUIITS
10X PCR Buffer	0,5 µl
8 mM dNTPs	0,25 µl
50 mM Mg ²⁺	0,2 µl
Taq polymerase 5U/ul	0,025 µl
Pour chaque amorce	0,01
H ₂ O	Compléter à 3 µl
TOTAL	3 µl

Tableau VI: Programme d'amplification de la PCR multiplex

ETAPE	TEMPÉRATURE	TEMPS
1	96 ⁰ C	1 min
2	94 ⁰ C	45 secs
3	56 ⁰ C	45 secs
4	12 ⁰ C	30 secs
5	Retourner à l'étape 2, 5 fois	
6	94 ⁰ C	45 secs
7	65 ⁰ C	45 secs
8	72 ⁰ C	30 secs
9	Retourner à l'étape 6, 29 fois	
10	72 ⁰ C	10 min
11	15 ⁰ C	

c.3 - Déphosphorylation :

Le but de cette étape est de déphosphoryler tous les résidus de nucléotide qui n'auront pas été utilisés au cours de la réaction de PCR et pourraient fausser la suite des opérations. Il s'agira d'ajouter au produit de la deuxième amplification une solution alcaline, SAP (Artric Shrimp Alkaline Phosphatase) :

- Ajouter au produit de la deuxième amplification, à l'aide du "Beckman MultiMek " la solution SAP ;
- Mettre les plaques dans un robocycleur et exécuter le programme suivant :

Tableau VII: Programme déphosphorylation

ETAPES	TEMPÉRATURE	TEMPS
1	37 ⁰ C	20 min
2	85 ⁰ C	5 min
3	4 ⁰ C	

c.4 - Réaction d'extension :

Au cours de cette réaction, on utilise des amorces d'extensions spécifiques de la mutation que l'on veut observer. L'extension débute juste au niveau ou dans une région très proche du SNP et elle est fonction du polymorphisme : Elle permettra de faire la différence entre l'homozygote normal, l'hétérozygote mutant et l'homozygote mutant. La différenciation se fera à partir de la différence de masse entre les différents produits de l'extension selon que le produit soit un allèle normal ou mutant en ayant recours à la spectrométrie de masse. La mesure du poids moléculaire permet de caractériser avec exactitude le génotype.

- Préparer le MIX pour la réaction d'amplification ;
- Transférer le MIX dans les différents puits en utilisant le Beckman MultiMek ;
- Mettre la plaque dans un thermocycleur et exécuter le programme correspondant ;

Tableau VIII: Composition du milieu réactionnel pour la réaction d'extension

COMPOSANTS	POUR 1 PUIITS
H ₂ O	1,728 µl
10X hMR terminator mix	0,200 µl
Amorce d'extension	0,054 µl
Thermosequenase (32U/ul)	0,018 µl
	2 µl

Tableau IX: Programme d'extension

ETAPES	TEMPÉRATURE	TEMPS
1	94 ⁰ C	110 min
2	94 ⁰ C	5 secs
3	52 ⁰ C	5 secs
4	72 ⁰ C	5 secs
5	4 ⁰ C	

c.5 - Lavage :

Le but de ce lavage est d'éliminer tous les résidus de nucléotides. Pour se faire, on ajoute une solution de lavage aux produits d'extension ; puis l'on centrifuge à 1600 tours/min pendant 25 minutes.

c.6 - Analyse spectrométrique et Bioinformatique :

Pour réaliser l'analyse spectrométrique, le Robot transfère 15 nanolitres du produit d'extension lavé de la plaque de 384 puits sur une plaque spéciale appelée SpectroCHIP.

Le génotype est ensuite déterminé simultanément par un logiciel approprié, le SpectroTYPper-RT.

Ce logiciel utilise des modules spécifiques :

- La détermination du poids moléculaire
- La compression des résultats (**Figure 15**).
- L'interprétation.

Le génotype est déterminé grâce à un graphique. La position de chacun des pics est fonction du poids de la séquence amplifiée (**Figure 12, 13 et 14**).

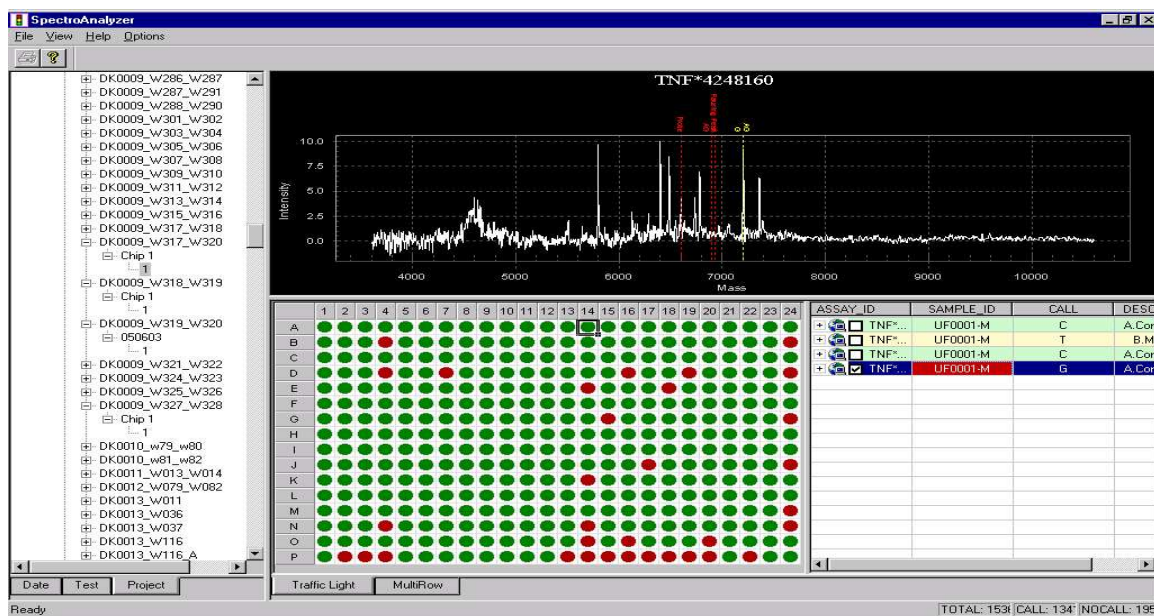


Figure 13: Compression des résultats

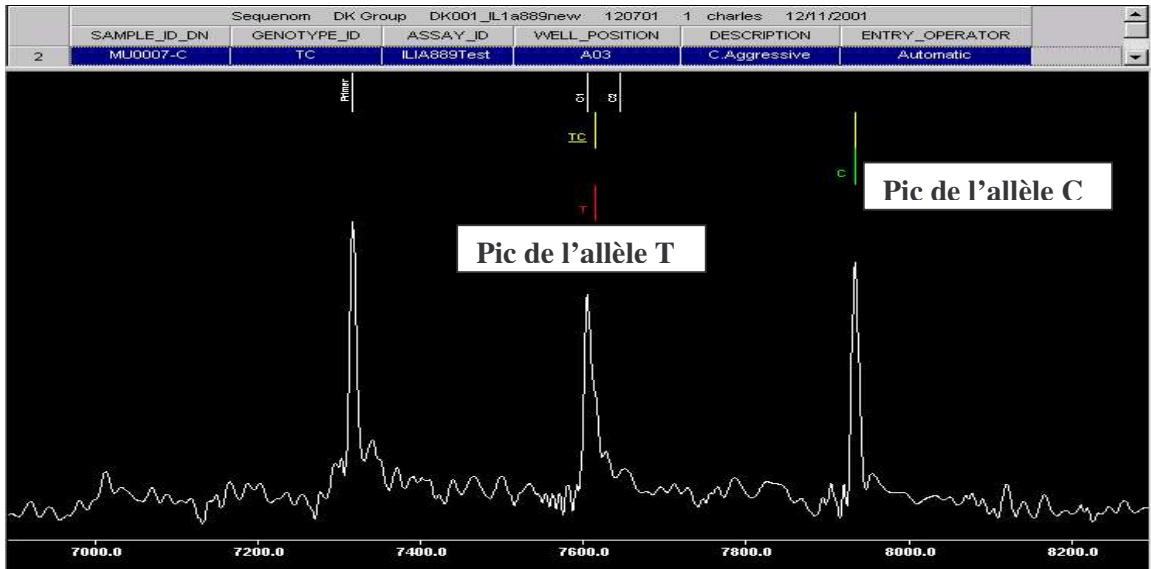


Figure 14: Exemple de représentation graphique (cas d'un hétérozygote CT de IL-1 a 889)

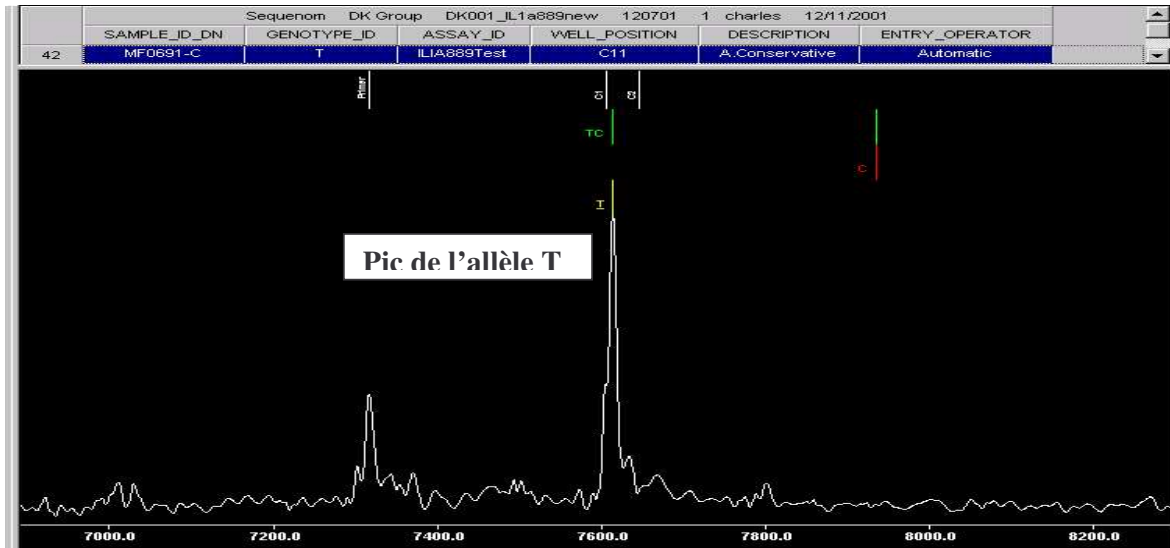


Figure 15: Exemple de représentation graphique (cas d'un homozygote T de l'IL-1 a 889)

IV. 6 - METHODES DE GESTION DES DONNEES

Le dossier individuel d'enquête, la lame de goutte épaisse, les confettis et les prélèvements veineux portent le numéro d'identification du sujet pour lequel ils ont été confectionnés.

L'ensemble des données (lame de goutte épaisse, confettis, dossiers individuels d'enquête, cahiers et registres) sont soigneusement gardés sous clef dans une cantine métallique.

IV. 7 - PLAN D'ANALYSE DES DONNEES

Les dossiers individuels d'enquête ont été relus et corrigés au besoin. Ils ont ensuite été saisis et analysés à l'aide des logiciels: Epi-IFN 2000, SPSS, Intercooled STATA 7.

Le test de khi carré et de probabilité exacte de Fisher ont été utilisés pour la comparaison des variables qualitatives.

L'odds ratio et le risque relatif ont permis de rechercher les facteurs de risque ou de protection.

Pour l'analyse des données immunologique nous avons procédé à la détermination des différents taux sériques médians afin de répartir la population d'étude en deux grands groupes. Ceux qui avaient un taux sérique inférieur ou égal à la médiane ont été placé dans le groupe TSI (Taux sérique inférieur). Ceux qui avaient un taux sérique supérieur à la médiane ont été placé dans le groupe TSS (Taux sérique supérieur). Le test de khi carré et de probabilité exacte de Fisher ont été utilisés pour l'analyse comparative.

IV. 8 - CONSIDERATIONS ETHIQUES ET DEONTOLOGIQUES

Le protocole de l'étude a été soumis à l'approbation du Comité d'Ethique de la faculté de Médecine de Pharmacie d'Odontostomatologie de l'Université de Bamako, ainsi qu'à ceux de l'Université de Maryland et de l'Université d'Oxford.

Il a été expliqué en langue nationale, Bambara, aux sujets ou parents concernés par l'étude.

Nous avons obtenu les consentements éclairés des autorités coutumières, des adultes malades et l'assentiment pour les enfants mineurs avant de procéder à la collecte des données. Il a été spécifié à la population que la participation à l'étude était volontaire.

IV. 9 - DÉFINITIONS OPÉRATIONNELLES DES CONCEPTS ET DES VARIABLES

IV.9.1 - REPONSE CLINIQUE

On distingue :

Echec thérapeutique précoce (ETP) : On parle d'ETP, si le malade présente l'un de des signes suivants au cours des trois premiers jours de suivi :

1. Apparition de signes de danger ou d'un paludisme grave les jours 1, 2 ou 3 en réponse d'une parasitémie ;
2. Température axillaire non corrigée $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ le jour 2 avec une parasitémie supérieure ou égale à celle du J0.
3. Température axillaire non corrigée $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ le jour 3 en présence d'une parasitémie
4. Parasitémie supérieure d'au moins 25% à celle du jour 0.

Echec thérapeutique tardif (ETT): La réponse au traitement est classée comme échec thérapeutique tardif (ETT), si le malade présente l'un des signes suivants pendant les jours 4 à 14 de la période de suivi:

1. Apparition de signes de danger ou d'un paludisme grave en présence d'une parasitémie n'importe quel jour entre le jour 4 et le jour 14, sans que le malade ait auparavant répondu aux critères d'échec thérapeutique précoce ;
2. Température axillaire corrigée $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ en présence d'une parasitémie n'importe quel jour entre le jour 4 et le jour 14, sans que le malade ait auparavant répondu aux critères d'échec thérapeutique précoce ;

Réponse clinique satisfaisante (RCS): La réponse au traitement est classée comme réponse clinique satisfaisante (RCS), si le malade ne présente pas de parasitémie le jour 14 quelle que soit la température axillaire ou si la température axillaire non corrigée $< 37,5^{\circ}\text{C}$ avec ou sans parasitémie sans que le malade ait auparavant répondu aux critères d'échec thérapeutique précoce ou tardif au cours de la période de suivi.

IV.9.2 - REPOSE PARASITOLOGIQUE

Il s'agit de déterminer le comportement du parasite vis à vis de l'antipaludique utilisé à J3, J7 et J14. La réponse parasitologique est classée selon les types sensibles et résistants (RI, RII, RIII)

Résistance « in vivo » : C'est la possibilité pour une souche de parasites (*P. falciparum*) de survivre et/ou de se multiplier dans l'organisme d'un malade en dépit de l'administration et de la résorption d'un médicament à des doses égales ou supérieures à celles habituellement recommandées, sans toutefois dépasser les limites de la tolérance du sujet **(12)**.

Souche sensible « in vivo » (S) : Une souche est dite sensible lorsque la parasitémie à J3, J7, J14 est nulle ou lorsque la parasitémie à J3 est inférieure à 25% de la parasitémie à J0 et que la parasitémie à J7, J14 est nulle **(12)**.

Résistance de type I (RI) : Disparition de la parasitémie à J3 et réapparition entre J7 et J14 **(12)**.

Résistance de type II (RII) : La parasitémie à J3 est inférieure à 25% de la parasitémie à J0 en présence d'une parasitémie positive à J7 et à J14 **(12)**.

Résistance de type III (RIII) : La parasitémie J3 est supérieure ou égale à 25% de la parasitémie à J0 ou lorsque la parasitémie augmente progressivement de J0 à J14 **(12)**.

V - RESULTATS

V. 1 - CARACTERISTIQUES SOCIO-DEMOGRAPHIQUES

V.1.1 - LE SEXE

Tableau X: Distribution de l'échantillon par sexe dans les deux sites d'étude

SEXES \ SITES	BANDIAGARA		KOLLE		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
MASCULIN	65	46,4	130	47,6	195	47,2
FEMININ	75	53,6	143	52,4	218	52,8
TOTAL	140	100	273	100	413	100

La population d'étude de Kollé était constituée à 47,6% de sujets de sexe masculin. Le sexe ratio féminin masculin était de 1,1.

La population d'étude de Bandiagara était constituée à 46,4% de sujets de sexe masculin. Le sexe ratio féminin masculin était de 1,1.

Il n'y a pas de différence significative entre les deux villages quant à la répartition de l'échantillon par sexe ($\text{Chi}^2 = 0,05$; $p = 0,82$)

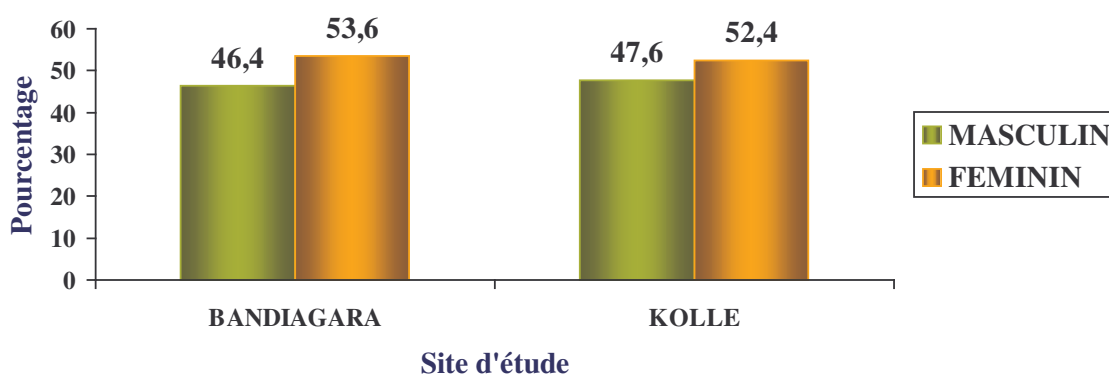


Figure 16: Distribution de l'échantillon par sexe dans les deux sites d'étude

V.1.2 - L'AGE

Tableau XI: Distribution de la population d'étude par classe d'âge dans les deux sites d'étude

CLASSES D'AGES	SITES		BANDIAGARA		KOLLE		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%	N	%
6 mois -1 an	11	7.8	18	6.6	29	7.0		
2 – 3 ans	35	25	33	12.1	68	16.5		
4 – 5 ans	20	14.3	34	12.5	54	13.1		
6 – 12 ans	48	34.3	141	51.6	189	45.8		
>12 ans	26	18.6	47	17.2	73	17,6		
TOTAL	140	100	273	100	413	100		

Les enfants âgés de 6-12 ans étaient les plus représentés dans les deux sites avec 34,3 % à Bandiagara et 51,6 % à Kollé.

Il y a une différence statistiquement significative entre les deux sites quant à la distribution de l'échantillon par classe d'âge ($\chi^2 = 16,01$; $p = 0,003$).

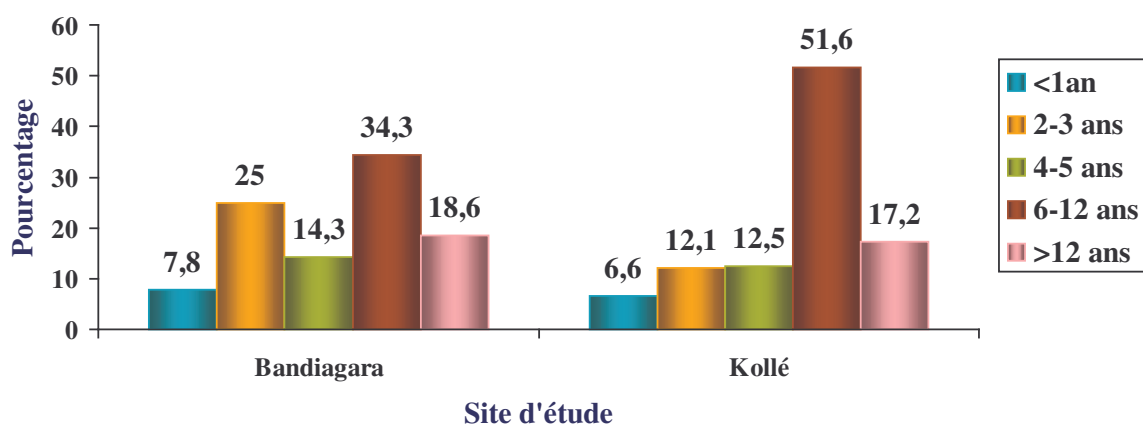


Figure 17: Distribution de la population d'étude par classe d'âge dans les deux sites d'étude

V. 2 - CARACTERISTIQUES PARASITO-CLINIQUES

Il s'agissait d'étudier la réponse clinique et parasitologique au traitement par la chloroquine dans nos deux populations d'étude.

V.2.1 - REPOSE CLINIQUE

Tableau XII: Distribution de la réponse clinique dans les deux sites

REPONSES CLINIQUES	SITES		BANDIAGARA		KOLLE		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%	N	%
RCS	132	94,4	257	94,1	389	94,2		
ETP	4	2,8	7	2,6	11	2,7		
ETT	4	2,8	9	3,3	13	3,1		
TOTAL	140	100	273	100	413	100		

La RCS était de 94,4% à Bandiagara contre 94,1% à Kollé.

Le taux global d'échec thérapeutique était de 5,6% à Bandiagara contre 5,9% à Kollé.

Statistiquement la différence entre ces taux n'était pas significative (p=0,9).

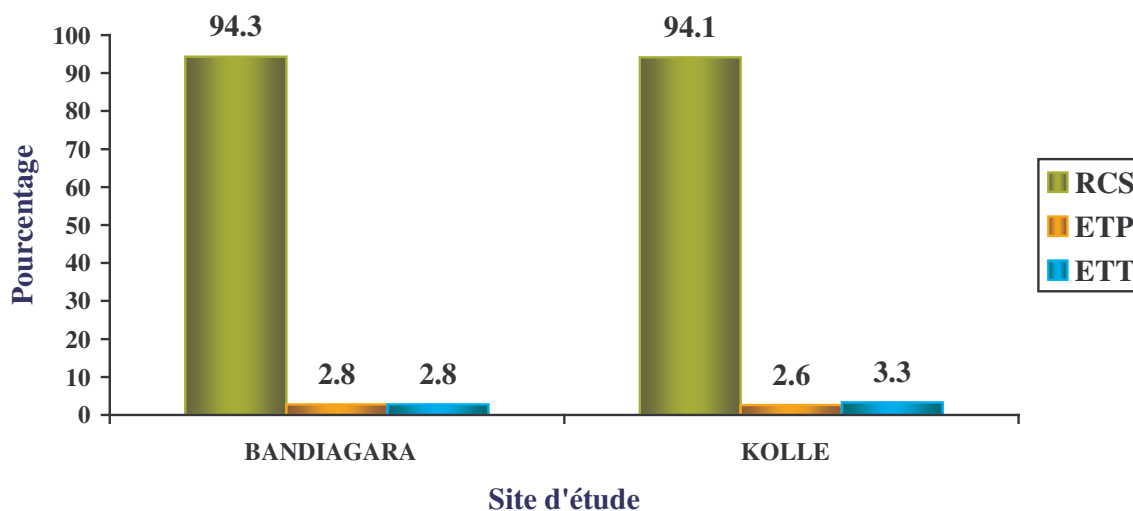


Figure 18: Distribution de la réponse clinique dans les deux sites d'étude

Tableau XIII : Distribution de la réponse clinique par tranche d'âge à Bandiagara.

REPONSES CLINIQUES CLASSES D'AGES	RCS		ETP		ETT		TOTAL
	N	%	N	%	N	%	N
6 mois – 1 an	10	90,9	0	0	1	9,1	11
2 – 3 ans	30	85,7	2	5,7	3	8,6	35
4- 5 ans	20	100	0	0	0	0	20
6-12 ans	46	95,8	2	4,2	0	0	48
>12 ans	26	100	0	0	0	0	26
TOTAL	132	94,4	4	2,8	4	2,8	140

Les cas d'ETT ont été observés chez les enfants d'un âge inférieur à 3 ans avec un taux plus élevé dans la tranche 6 mois – 1 an (9,1%)

Quant aux ETP, ils ont été observés chez les sujets âgés de 2 à 12 ans avec une fréquence plus élevée dans la tranche 2-3 ans (5,7%).

Tableau XIV : Distribution de la réponse clinique par tranche d'âge à Kollé.

REPONSES CLINIQUES CLASSES D'AGES	RCS		ETP		ETT		TOTAL
	N	%	N	%	N	%	N
6 mois – 1 an	13	72,2	2	11,1	3	16,7	18
2 – 3 ans	29	87,9	1	3,0	3	9,1	33
4- 5 ans	34	100	0	0	0	0	34
6-12 ans	135	95,8	3	2,1	3	2,1	141
>12 ans	46	97,9	1	2,1	0	0	47
TOTAL	257	94,1	7	2,6	9	3,3	273

Les cas d'ETT ont été observés chez les enfants de 6 mois à 12 ans avec un taux plus élevé dans la tranche 6 mois – 1 an (16,7%)

La survenue des ETP était plus élevés dans la tranche d'âge 6 mois-1 an (11,1%).

V.2.2 - REPONSE PARASITOLOGIQUE

Tableau XV: Distribution de la réponse parasitologique en fonction du site d'étude

REPOSE PARASITOLOGIQUE	SITES		KOLLE		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
Sensible	126	90,0	188	68,9	314	76,0
RI	12	8,6	76	27,8	88	21,3
RII	0	0,0	5	1,8	5	1,2
RIII	2	1,4	4	1,5	6	1,5
TOTAL	140	100	273	100	413	100

90% des souches de *P. falciparum* étaient sensibles à la chloroquine à Bandiagara contre 68,9% à Kollé. La résistance parasitologique globale était de 10% à Bandiagara contre 31,1% à Kollé. La différence entre ces deux valeurs était statistiquement significative ($\text{Chi}^2 = 23,32$; $p < 10^{-5}$).

Dans chacun des sites la résistance parasitologique était dominée par la résistance de type RI avec 8,6% à Bandiagara contre 27,8% à Kollé.

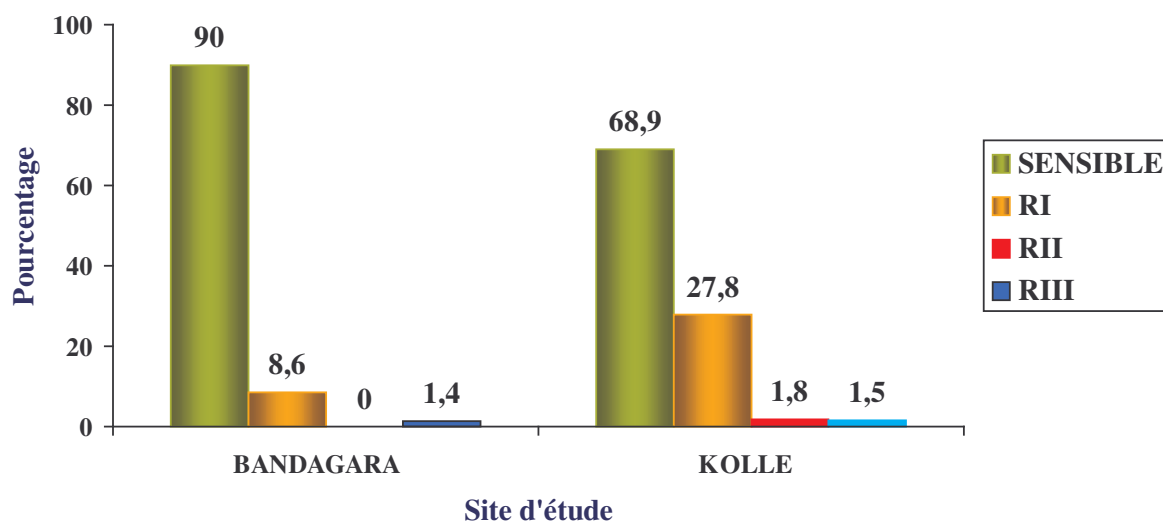


Figure 19: Distribution de la réponse parasitologique en fonction du site d'étude

Tableau XVI: Comparaison de la résistance parasitologique de *P. falciparum* à la chloroquine par classe d'âge entre les sites d'étude

CLASSES D'AGES \ SITES	BANDIAGARA		KOLLE		TESTS STATISTIQUE
	%	N	%	N	
6 mois – 1 an	9,1	11	61,1	18	P de Yate= 0,01
2-3 ans	17,1	35	48,5	33	Chi2= 7,62 p= 0,006
4-5 ans	10	20	44,1	34	Chi2=6,8 p= 0,009
6-12 ans	10,4	48	27,0	141	P de Yate= 0,02
>12 ans	0	26	10,1	47	
TOTAL	10,0	140	31,1	273	Chi2= 22,68 p=2. 10 ⁻⁵

Il y avait une différence statistiquement significative dans la répartition de la résistance parasitologique à la chloroquine entre les deux villages chez les sujets de 6 mois à 12 ans. La résistance globale à la chloroquine était plus forte à Kollé ($p=2. 10^{-5}$).

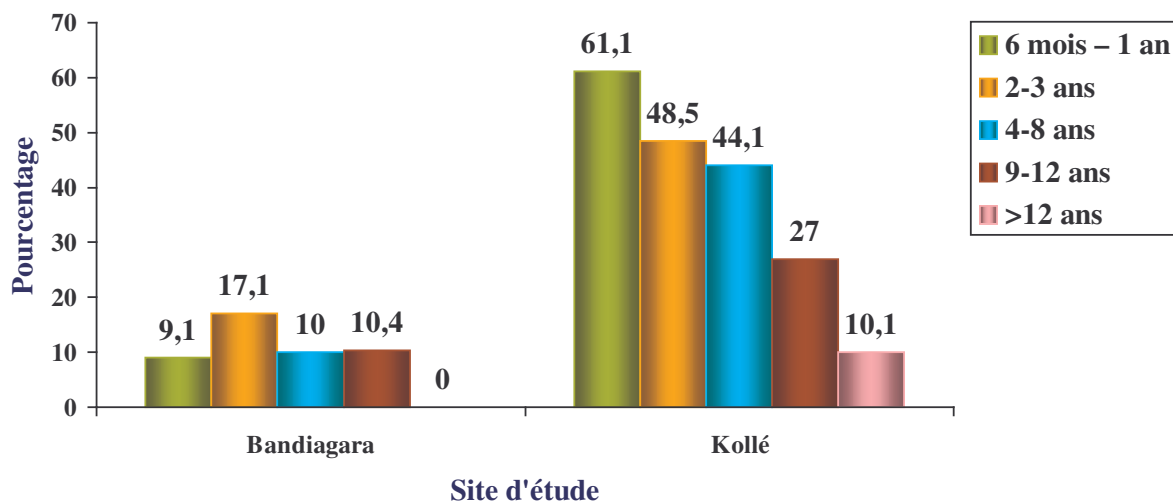


Figure 20: Répartition de la résistance parasitologique de *P. falciparum* à la chloroquine par classe d'âge en fonction du site d'étude

V. 3 - ETUDE MOLECULAIRE : FREQUENCE DE LA MUTATION *pfert* K76T

Tableau XVII: Prévalence de la mutation *pfert* K76T de *P. falciparum* dans la population d'étude à J0 par site

GENOTYPES	SITES		BANDIAGARA		KOLLE		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%	N	%
S	86	61,4	49	18,4	135	33,2		
R	54	38,6	218	81,6	272	66,8		
TOTAL	140	100	267	100	407	100		

L'analyse moléculaire des souches de *P. falciparum* à J0 a montré qu'à Bandiagara 61,4 % des souches étaient de génotype sensible. A Kollé 18,4% des souches étaient de génotype sensible. La différence était statistiquement significative ($\text{Chi}^2 = 76,88$; $p > 10^{-6}$).

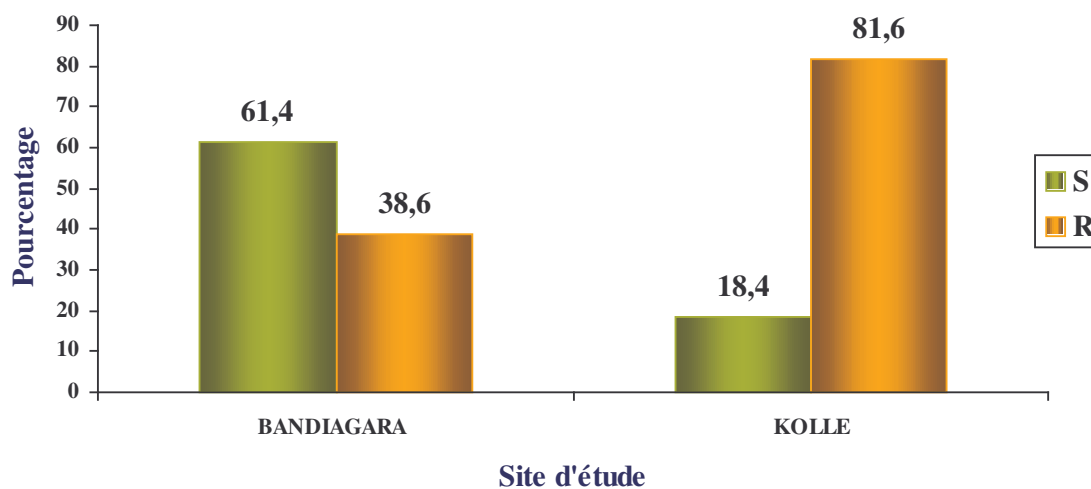


Figure 21: Prévalence de la mutation *pfert* K76T de *P. falciparum* dans la population d'étude à J0 par site

Tableau XVIII: Distribution des génotypes de *P. falciparum* à J0 par tranche d'âge à Bandiagara

GENOTYPES CLASSE D'AGES	S		R		TOTAL
	N	%	N	%	N
6 mois- 1 an	8	72,7	3	27,3	11
2 – 3 ans	23	65,7	12	34,3	35
4 – 5 ans	11	55,0	9	45,0	20
6 – 12 ans	27	56,2	21	43,8	48
>12 ans	17	65,4	9	34,6	26
TOTAL	86	61,4	54	38,6	140

La fréquence des souches de génotypes résistants était inférieure à 50% dans toutes les tranches d'âges.

Tableau XIX: Distribution des génotypes de *P. falciparum* à J0 par tranche d'âge à Kollé

GENOTYPES CLASSES D'AGES	S		R		TOTAL
	N	%	N	%	
6 mois- 1 an	0	0,0	17	100	17
2 – 3 ans	5	15,6	27	84,4	32
4 – 5 ans	5	15,6	27	84,4	32
6 – 12 ans	28	20,1	111	79,9	139
> 12 ans	11	23,4	36	76,6	47
TOTAL	49	18,3	218	81,7	267

La prévalence de la mutation était plus élevée chez les enfants de 6 mois à 5 ans avec 100%, 84,4% et 84,4 % respectivement dans les tranches 6 mois-1 an, 2-3 ans et 4-5 ans.

Tableau XX: Répartition de la population globale d'étude par site en fonction de la clairance

SITES \ CLAIRANCES	CLAIRANCE +		CLAIRANCE -		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
BANDIAGARA	43	79.6	11	20.4	54	19.9
KOLLE	146	67.3	71	32.7	217	80.1
TOTAL	189	69.7	82	30.3	271	100

Sur l'ensemble des sujets porteurs de *P. falciparum* résistants, 69.7% ont pu éliminer leurs parasites.

Le taux de clairance était de 79.6% à Bandiagara et 67.3% à Kollé. Il n'y avait pas de différence significative entre les deux sites. ($p = 0.07$; $\text{Chi}^2 = 3.12$)

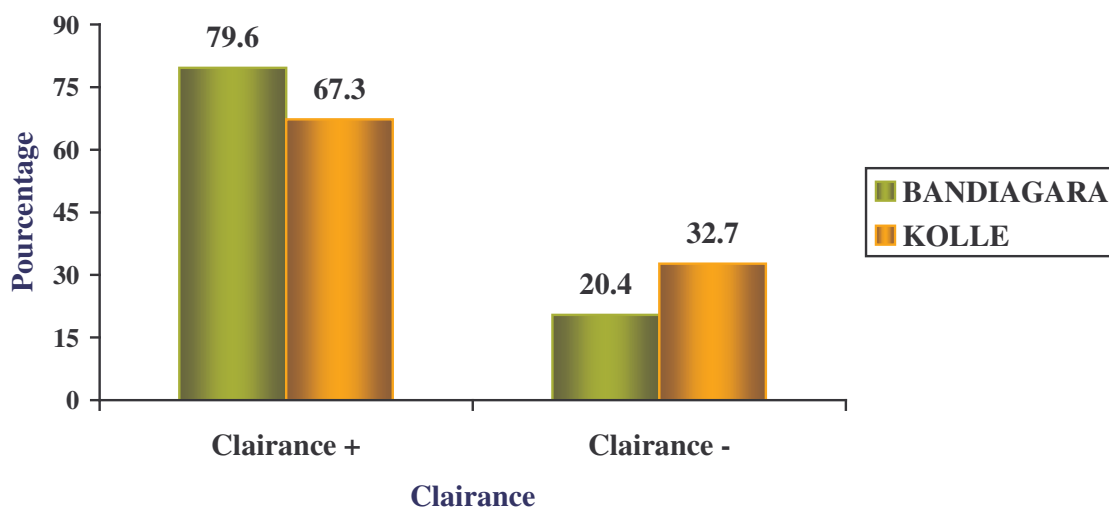


Figure 22: Répartition de la population globale d'étude par site en fonction de la clairance

Tableau XXI: Distribution de la population globale d'étude par tranche d'age et en fonction de la clairance

CLASSE D'AGE	CLAIRANCE +		CLAIRANCE -		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
6 mois- 1 an	8	40	12	60.0	20	7.4
2 – 3 ans	20	51.3	19	48.7	39	14.4
4 – 5 ans	22	61.1	14	38.9	36	13.3
6 – 12 ans	100	75.8	32	24.2	132	48.7
> 12 ans	39	88.6	5	11.4	44	16.2
TOTAL	189	69.7	82	30.3	271	100

La clairance des parasites résistants augmente en fonction de la tranche d'age. La différence est statistiquement significative entre les différents groupes d'âges ($p=3. 10^{-5}$)

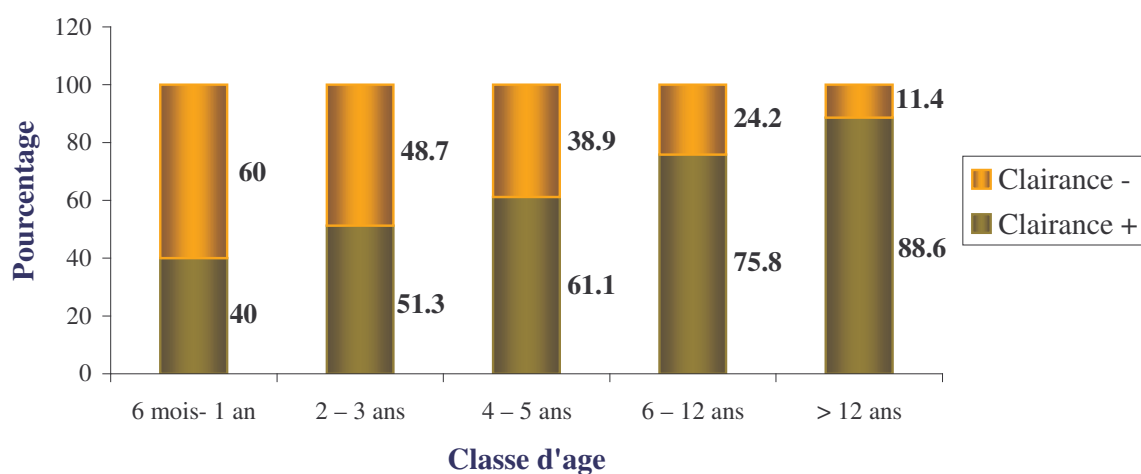


Figure 23: Distribution de la population globale d'étude par tranche d'age et en fonction de la clairance

Tableau XXII: Taux d'élimination des parasites de géotypes résistants en fonction de l'âge et du site

CLASSES D'AGES \ SITES	BANDIAGARA		KOLLE	
	N	%	N	%
6 mois- 1 an	2	66,7	6	35,3
2 – 3 ans	8	66,7	12	44,4
4 – 5 ans	7	77,8	15	55,6
6 – 12 ans	17	81,0	83	74,8
>12	9	100	30	85,7
TOTAL	54	79,6	271	67,3

A Bandiagara plus de 66% des enfants de moins de 3 ans ont réussi à éliminer les souches de géotypes résistants. A Kollé moins de 45% des enfants du même âge ont éliminé les souches de géotypes résistants.

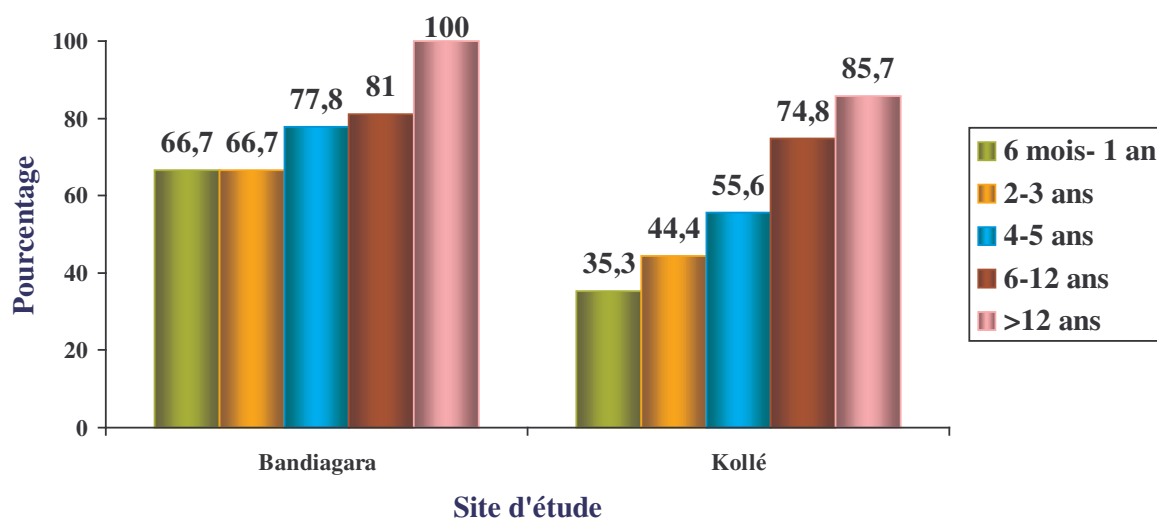


Figure 24: Taux d'élimination des parasites de géotypes résistants en fonction de l'âge et du site

V. 4 - ETUDE IMMUNOLOGIQUE

L'étude immunologique a porté sur les sera prélevés sur 238 sujets porteurs de souches de *P. falciparum* de génotype résistant. Le taux sérique des différentes cytokines a été mesuré par cytométrie de flux.

Nous avons déterminé les taux sériques médians de chacune des cytokines pour définir deux grands groupes. Ceux qui avaient un taux sérique inférieur ou égal à la médiane ont été placé dans le groupe TSI (Taux sérique inférieur). Ceux qui avaient un taux sérique supérieur à la médiane ont été placé dans le groupe TSS (Taux sérique supérieur).

V.4.1 - DESCRIPTION DE LA POPULATION D'ÉTUDE

Tableau XXIII: Description de la population d'étude en fonction de la clairance des souches de *P. falciparum* de génotype résistants par site d'étude

Site	Clairance	CLAIRANCE +		CLAIRANCE-		TOTAL	
		N	%	N	%		
	KOLLE	130	77,8	63	88,7	193	81,1
	BANDIAGARA	37	22,2	8	11,3	45	9,9
	TOTAL	167	70,2	71	29,8	238	100

Sur l'ensemble des échantillons analysés, 81,1% provenaient de Kollé. Au total, 70,2% des échantillons appartenait au groupe "clairance +".

V.4.2 - ETUDE COMPARATIVE DES TAUX SERIQUES MEDIAN

Tableau XXIV: Répartition de la population globale d'étude en fonction du taux sérique médian et de la clairance.

CYTOKINES	Taux median (pg/ml)	Groupe	CLAIRANCE +		CLAIRANCE -		P
			N	%	N	%	
IL-1	20	TSI	109	65.3	53	74.6	0.2
		TSS	58	34.7	18	25.4	
IL-2	14.4	TSI	85	5.09	34	47.9	0.7
		TSS	82	49.1	37	52.1	
IL-4	23	TSI	82	49.1	37	52.1	0.7
		TSS	85	50.9	34	47.9	
IL-5	10	TSI	161	96.4	69	97.2	1
		TSS	6	3.6	2	2.8	
IL-6	18.4	TSI	83	50.0	36	50.7	0.9
		TSS	83	50.0	35	49.3	
IL-8	13.8	TSI	80	48.0	39	54.9	0.3
		TSS	86	51.8	32	45.1	
IL-10	115.7	TSI	88	52.7	31	43.7	0.2
		TSS	79	47.3	40	56.3	
IL-12	10	TSI	117	70.1	54	76.1	0.4
		TSS	50	29.9	17	23.9	
TNF- α	10	TSI	159	95.2	69	97.2	0.7
		TSS	8	4.8	2	2.8	
IFN- γ	33.4	TSI	92	55.1	27	38.0	0.02
		TSS	75	44.9	44	62.0	

La proportion de sujet ayant un taux sérique IFN- γ bas (55,1%) est plus élevée chez les sujets qui ont pu éliminer leurs parasites de génotype résistant. La différence était statistiquement significative. (p= 0,02)

Pour toutes les autres cytokines nous n'avons observé aucune différence entre les deux groupes.

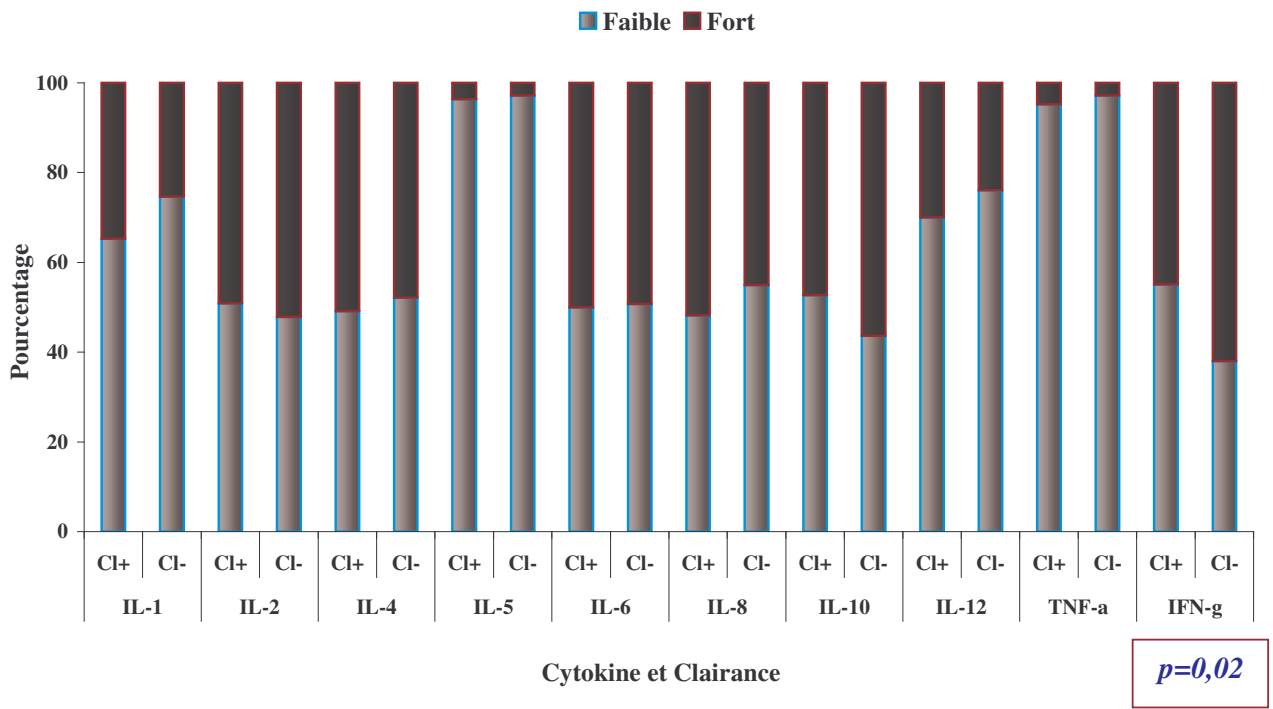


Figure 25: Répartition de la population globale d'étude en fonction du taux sérique médian et de la clairance.

Tableau XXV: Répartition de la population d'étude en fonction du taux sérique médian et de la clairance à Bandiagara.

CYTOKINES	Taux médian (pg/ml)	Groupe	CLAIRANCE +		CLAIRANCE -		P
			N	%	N	%	
IL-1	40	TSI	40	85.1	7	87.5	0.7
		TSS	7	14.9	1	12.5	
IL-2	15	TSI	19	51.4	4	50.0	0.9
		TSS	18	48.6	4	50.0	
IL-4	25	TSI	17	45.9	5	62.5	0.4
		TSS	20	54.1	3	37.5	
IL-5	10	TSI	35	94.6	7	87.5	0.4
		TSS	2	5.4	1	12.5	
IL-6	105.9	TSI	16	44.4	6	75.0	0.1
		TSS	20	55.6	2	25.0	
IL-8	67.7	TSI	16	44.4	6	75.0	0.1
		TSS	20	55.6	2	25.0	
IL-10	114.3	TSI	18	48.6	4	50.0	0.9
		TSS	19	51.4	4	50.0	
IL-12	10	TSI	19	51.4	6	75.0	0.2
		TSS	18	48.6	2	25.0	
TNF- α	10	TSI	31	83.8	7	87.5	1
		TSS	6	16.2	1	12.5	
IFN- γ	12.8	TSI	22	59.5	1	12.5	0.02
		TSS	15	40.5	7	87.5	

La production de l'IL-1, IL-5, IL-12 et du TNF- α était relativement nulle dans la population d'étude.

Le taux médian de l'IL-2 est très faible (15 pg/ml) tandis que ceux de IL-6, IL-8 et de l'IL-10 sont élevées (respectivement 105,9 pg/ml, 67,7 pg/ml et 114,3 pg/ml).

La proportion de sujet ayant un taux sérique IFN- γ bas (59,5 %) est plus élevé chez les sujets qui ont pu éliminer leurs parasites de génotype résistant. La différence était statistiquement significative. (p=0.02)

Pour toutes les autres cytokines nous n'avons observé aucune différence entre les deux groupes.

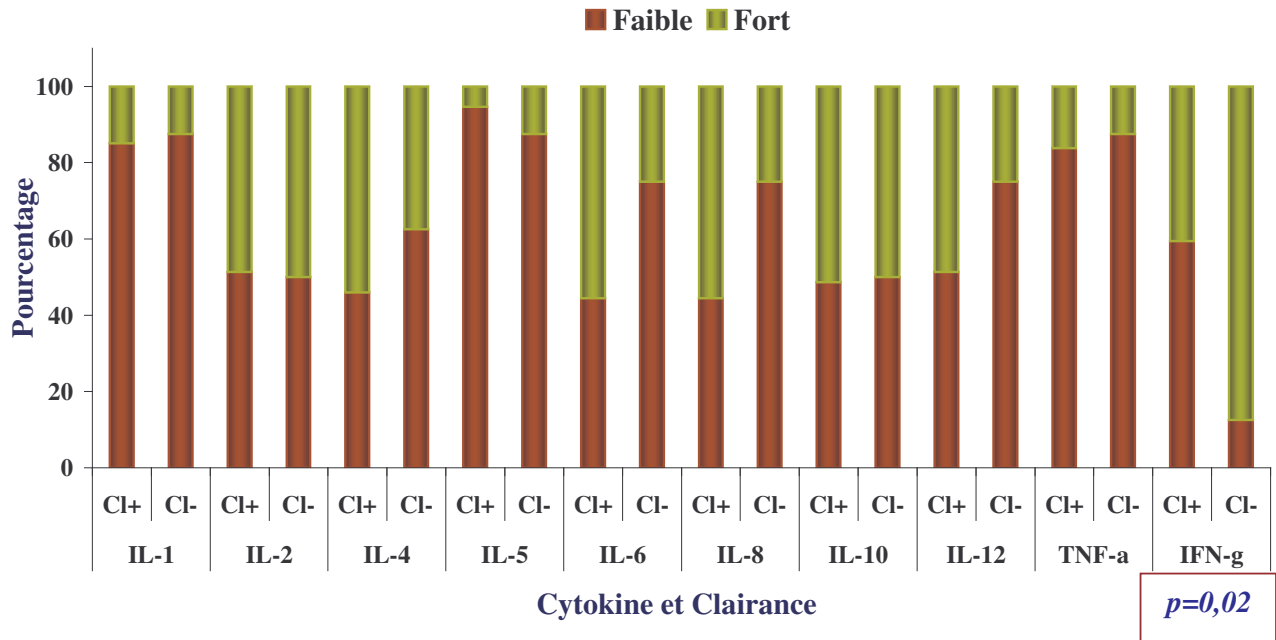


Figure 26: Répartition de la population d'étude en fonction du taux sérique médian et de la clairance à Bandiagara

Tableau XXVI: Répartition de la population d'étude en fonction du taux sérique médian et de la clairance à Kollé.

CYTOKINES	Taux median (pg/ml)	Groupe	CLAIRANCE +		CLAIRANCE -		P
			N	%	N	%	
IL-1	20	TSI	109	83.8	53	84.1	0.9
		TSS	21	16.2	10	15.9	
IL-2	14.2	TSI	71	54.6	25	39.7	0.05
		TSS	59	45.4	38	60.3	
IL-4	22.3	TSI	70	53.8	27	42.9	0.2
		TSS	60	46.2	36	57.1	
IL-5	10	TSI	126	96.9	62	98.4	1
		TSS	4	3.1	1	1.6	
IL-6	10.1	TSI	67	51.5	29	46.0	0.5
		TSS	63	48.5	34	54.0	
IL-8	10	TSI	72	55.4	36	57.1	0.8
		TSS	58	44.6	27	42.9	
IL-10	117	TSI	69	53.1	28	44.4	0.3
		TSS	61	46.9	35	55.6	
IL-12	10	TSI	98	75.4	48	76.2	0.9
		TSS	32	24.6	15	23.8	
TNF- α	10	TSI	128	98.5	62	98.4	1
		TSS	2	1.5	1	1.6	
IFN- γ	35.7	TSI	70	53.8	26	41.3	0.1
		TSS	60	46.2	37	58.7	

De toutes les cytokines dosées seules l'IFN- γ et l'IL-10 étaient légèrement élevées.

Les différents taux sériques observés n'ont aucune influence sur la clairance. Nous n'avons observé aucune différence entre les patients ayant un taux sérique de cytokine bas et ceux ayant un taux élevé quant à leur comportement face à la clairance.

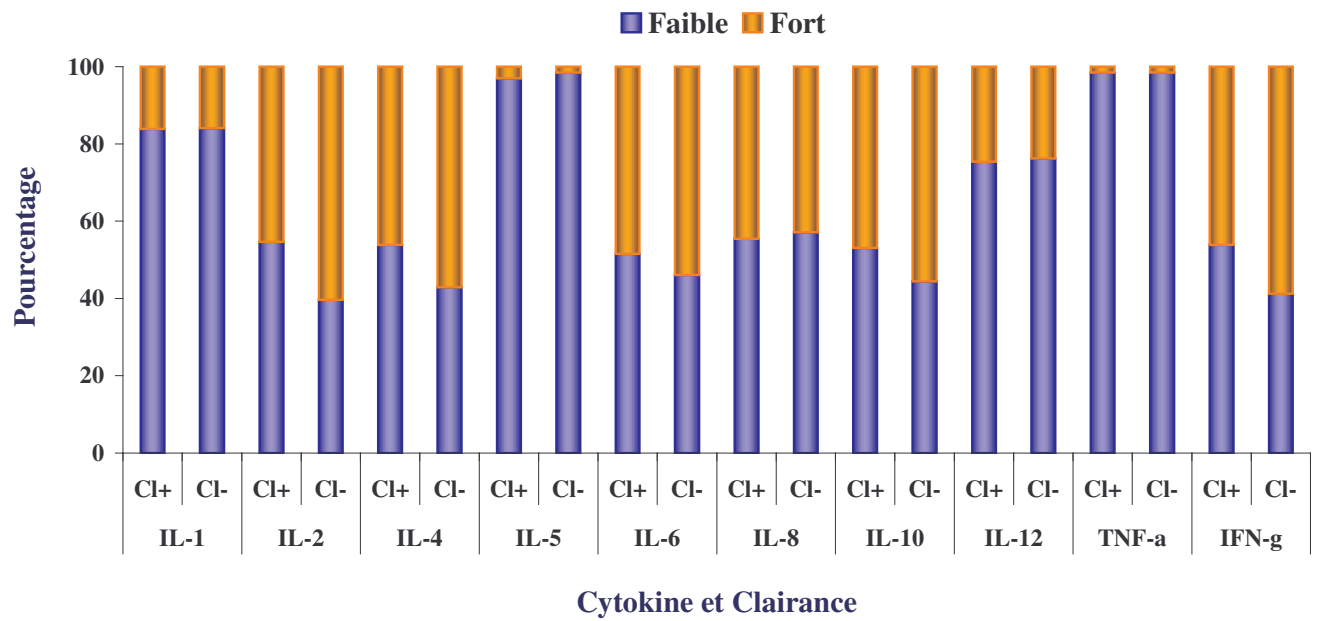


Figure 27: Répartition de la population d'étude en fonction du taux sérique médian et de la clairance à Kollé.

V. 5 - ETUDE GENOMIQUE

L'étude génomique a porté sur 190 sujets âgés de 6 mois à 12 ans. Une étude menée par Djimdé au Mali (22) montrait qu'au delà de 12 ans le taux de clairance était supérieur à 80%. La tranche d'âge critique était celle de 1-3 ans. Par ailleurs le taux de clairance chez les sujets de 4- 12 ans variait entre 50- 80%. De ce fait il est plus important d'axer l'étude génomique chez les sujets de moins de 12 ans.

V.5.1 - DESCRIPTION DE LA POPULATION D'ETUDE

Tableau XXVII: Description de la population d'étude en fonction de la clairance des souches de *P. falciparum* de génotype résistant

FREQUENCE	N	%
CLAIRANCES		
CLAIRANCE +	126	66,3
CLAIRANCE-	64	33,7
TOTAL	190	100

Dans notre population d'étude, 66,3% appartenait au groupe "clairance +".

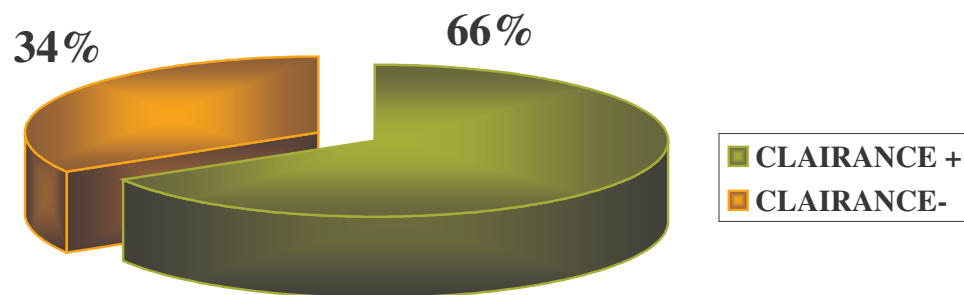


Figure 28: Fréquence de la clairance des souches de *P. falciparum* de génotype résistants en fonction du site d'étude

V.5.2 - FREQUENCE DES DIFFERENTS GENOTYPES ET ALLELES

Tableau XXVIII: Fréquences des différents génotypes dans la population d'étude :

SNPS	CODON	ALLELES	
G6PD	202	C	T
		89.5	10.5
	376	C	T
		32.8	67.2
ICAM 1	29	A	T
		68.5	31.5
	469	A	G
		86.2	13.8
HB	HBC	A	G
		7.3	92.7
	HBS	A	T
		93.6	6.4
IL-4	-589	C	T
		21.5	78.5
	2243251	C	T
		14.5	85.5
IL-8	781	C	T
		93.5	6.5
TNF- α	-308	A	G
		10.7	89.3
	-1031	C	T
		9.6	90.4
	-376	A	G
		17.1	82.9

SNPS	CODON	ALLELES	
IFN- γ	-1616	C	T
		46.1	53.9
	2200	C	T
		4.5	95.5
	3234	C	T
		23.7	76.3
	4640	C	T
		97.3	2.7
5173	A	G	
	84.7	15.3	
874	A	T	
	86.8	13.2	
893	C	G	
	97.3	2.7	
IFN- γ R1	-56	C	T
		48.7	51.3
IL-10	-1082	C	T
		29.3	70.7
	-592	G	T
		50.7	49.3
	-819	A	G
		28.8	71.2

Sur l'ensemble des SNPs étudié, 7 de ces SNPs avait un allèle dont la fréquence était inférieure à 10%.

Tableau XXIX: Fréquence des différents alleles dans la population d'étude en fonction de la clairance.

GENE	CODON		Clairance +		Clairance -		p
			<i>c</i>	<i>t</i>	<i>c</i>	<i>t</i>	
G6PD	202	<i>n</i>	209	29	106	8	0.1
		<i>freq</i>	87.8	12.2	93	7	
	376	<i>n</i>	82	160	42	76	0.7
		<i>freq</i>	33.9	66.1	35.6	64.4	
ICAM-1	29	<i>n</i>	159	69	88	34	0.6
		<i>freq</i>	69.7	30.3	72.1	27.9	
	469	<i>n</i>	205	37	108	12	0.1
		<i>freq</i>	84.7	15.3	90	10	
HB	HBC	<i>n</i>	20	216	5	115	0.1
		<i>freq</i>	8.5	91.5	4.2	85.8	
	HBS	<i>n</i>	217	13	113	9	0.5
		<i>freq</i>	94.3	5.7	92.6	7.4	
IL-4	- 589	<i>n</i>	63	181	33	89	0.8
		<i>freq</i>	25.8	74.2	27	73	
	2243251	<i>n</i>	40	198	28	90	0.1
		<i>freq</i>	16.8	83.2	23.7	76.3	
TNF- α	- 308	<i>n</i>	35	211	8	116	0.03
		<i>freq</i>	14.2	85.8	6.5	93.5	
	- 376	<i>n</i>	42	152	26	90	0.9
		<i>freq</i>	21.6	78.4	22.4	77.6	
	- 1031	<i>n</i>	16	188	13	95	0.2
		<i>freq</i>	7.8	92.2	12	88	

GENE	CODON		Clairance +		Clairance -		p
INF- γ	- 1616	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>t</i>	<i>c</i>	<i>t</i>	0.9
			99	107	51	53	
		<i>freq</i>	48.1	51.9	49	51	
	+ 2200	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>t</i>	<i>c</i>	<i>t</i>	0.8
			8	208	5	109	
		<i>freq</i>	3.7	96.3	4.4	95.6	
	+ 3234	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>t</i>	<i>c</i>	<i>t</i>	0.3
			72	164	31	93	
		<i>freq</i>	30.5	69.5	25	75	
	+ 4640	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>t</i>	<i>c</i>	<i>t</i>	0.3
			241	5	121	5	
		<i>freq</i>	98	2	96	4	
	+ 5173	<i>n</i>	<i>a</i>	<i>g</i>	<i>a</i>	<i>g</i>	0.09
			204	42	111	13	
		<i>freq</i>	82.9	17.1	89.5	10.5	
	+874	<i>n</i>	<i>a</i>	<i>t</i>	<i>a</i>	<i>t</i>	0.03
		181	35	98	8		
	<i>freq</i>	83.8	16.2	92.5	7.5		
+ 893	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>g</i>	<i>c</i>	<i>g</i>	1	
		241	7	123	3		
	<i>freq</i>	97.2	2.8	97.6	2.4		
INF- γ R1 - 56	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>t</i>	<i>c</i>	<i>t</i>	0.4	
		108	104	46	54		
	<i>freq</i>	50.9	49.1	46	54		

GENE	CODON		Clairance +		Clairance -		p
			<i>c</i>	<i>t</i>	<i>c</i>	<i>t</i>	
IL-10	1082	<i>n</i>	87	159	39	85	0.4
		<i>freq</i>	35.4	64.6	31.5	68.5	
	819	<i>n</i>	91	149	39	83	0.3
		<i>freq</i>	37.9	62.1	32	68	
	592	<i>n</i>	131	119	68	54	0.5
		<i>freq</i>	52.4	47.6	55.7	44.3	
IL-8	+781	<i>n</i>	213	13	109	9	0.5
		<i>freq</i>	94.2	5.8	92.4	7.6	

Nous avons observé que les allèles TNF- α ^{-308 A} et IFN- γ ^{+874 T} étaient 2,2 fois plus élevée chez les sujets ayant pu éliminer leurs parasites de génotype résistant (14,2 %) que chez ceux n'ayant pu les éliminer (6,5%). La différence était statistiquement significative

Pour tous les autres polymorphismes étudiés nous n'avons observé aucune différence entre les patients ayant pu éliminer leurs parasites et ceux n'ayant pas pu les éliminer.

VI - COMMENTAIRES ET DISCUSSION

Le but de ce travail était d'étudier les facteurs immunologiques et génomiques de l'hôte impliqués dans la clairance des souches de *P. falciparum* ayant un génotype résistant.

Pour ce faire nous avons choisi deux sites d'études, le village de Kollé et la ville de Bandiagara, qui réunissaient les conditions pour mener à bien ce travail.

En effet l'accessibilité géographique en toute saison, l'existence de données épidémiologique antérieures, l'adhésion de la population aux études antérieures et la présence de l'équipe du DEAP à Bandiagara et Kollé était des facteurs prometteurs pour le bon déroulement de cette étude.

VI. 1 - METHODOLOGIE :

Au cours de cette étude nous avons effectué un suivi longitudinal pour déterminer dans un premier temps la résistance clinique et parasitologique. Pour ce faire nous avons appliqué le protocole standard modifié de l'OMS de 14 jours sur un échantillonnage exhaustif de tous les malades répondant aux critères d'inclusions.

Ce protocole de 14 jours, utilisé par Traoré à Kollé en 1997 (103), par Djimdé à Bandiagara en 1997 (14) et par Tékété à Bancoumana et Kollé en 1998 (22), est une méthode efficace pour identifier les différents aspects des échecs thérapeutiques et la résistance de *P. falciparum* à la chloroquine.

Pour l'évaluation moléculaire de la chloroquino-résistance nous avons utilisé la PCR. Cette technique nous a permis de déterminer de la fréquence de la mutation *pfcr*t K76T.

Tout au long de l'étude nous avons effectué des prélèvements sanguins à J0 afin de procéder à l'étude de certains facteurs immunologiques et génomiques de l'hôte. Il s'agissait essentiellement de sera et de culot.

L'étude immunologique a été effectuée chez les sujets porteurs de souche de *P. falciparum* de génotype résistants âgés d'au moins 6 mois. Le dosage des différentes cytokines a été effectué par la cytométrie de flux.

Par contre l'étude génomique a porté uniquement sur les enfants âgés de 6 mois à 12 ans et porteurs de souche de *P. falciparum* de génotype résistants. En effets, l'étude menée en 1998 par Tékété montrait que la capacité d'éliminer des souches résistantes était fortement liée à l'âge de l'hôte. Les enfants de 3 à 8 ans avaient près de 50% de chance d'éliminer les souches de génotypes résistants tandis qu'au-delà de 9 ans plus de 80% des sujets porteurs de souches de génotypes

résistant éliminent leurs parasites. De plus une étude menée par Djimdé au Mali (22) montrait qu'au delà de 12 ans le taux de clairance était supérieur à 80%. La tranche d'âge critique était celle de 1-3 ans. Le taux de clairance chez les sujets de 4- 12 ans variait entre 50- 80%. De ce fait il est plus important d'axer l'étude génomique chez les sujets de moins de 12 ans.

L'analyse génétique a été effectuée par le SEQUENOM, une nouvelle technique de PCR couplée à la spectrométrie de masse.

Toutes les techniques utilisés ont été mises au point, validées et sont reproductibles.

VI. 2 - CARACTERISTIQUES SOCIO-DEMOGRAPHIQUES

Les variables démographiques étudiées étaient le sexe et l'âge des sujets inclus.

Notre échantillon était majoritairement constitué de sexe féminin (52,8%) avec un sexe ratio de 1,1. Il n'y a pas de différence significative entre les deux villages quant à la répartition de l'échantillon par sexe ($p=0,82$) (Tableau X)

Dans la population globale, les enfants de 6 à 12 ans étaient les plus représentés avec 45.8%. (Tableau XI)

VI. 3 - CARACTERISTIQUES PARASITOLOGIQUES ET CLINIQUES

VI.3.1 - ECHEC THERAPEUTIQUE

Le taux global de l'échec thérapeutique était de 5,8% avec 2,7% d'ETP et 3,1% d'ETT.

Statistiquement il n'y avait pas de différence significative entre nos deux sites d'étude ($p=0,9$). (Tableau XII)

Ce taux global est comparable à celui observé à Bandiagara en 1997 par DOUMBO S.N (9,6%, N=282) (106), à Kollé en 1999 par TEKETE (7,2%, N=327) et celui trouvé à Bancoumana en 2001 par KATILE (9,6%, N=364) (107).

La stabilité de ce taux d'échec dénote que la chloroquine reste encore efficace pour la prise en charge des cas de paludisme simple dans nos deux zones d'étude.

A Bandiagara, le taux d'échec thérapeutique était plus élevé dans la tranche 2-3 ans (14,3%). (Tableau XIII).

Par contre à Kollé, les enfants de 6 mois à 1 an étaient les plus touchés (27,8%). (Tableau XIV)

TEKETE également observait à Kollé au cours de son étude, que la survenue des échecs thérapeutiques était plus fréquente dans la tranche 6 mois- 1 an (18,7%).

Par contre les résultats obtenus à Bancoumana par KATILE et TEKETE révèlent que la survenue des échecs thérapeutiques est plus fréquente dans la tranche 1-3 ans.

VI.3.2 - RESISTANCE PARASITOLOGIQUE

Dans la population d'étude globale, la résistance parasitologique était de 24% avec 21,3% de type RI, 1,2% de type RII et 1,5% de type RIII. (**Tableau XV**)

La résistance parasitologique était de 10% à Bandiagara contre 31,1 % à Kollé. La différence entre ces deux valeurs était statistiquement significative ($p < 10^{-5}$). Cette différence pourrait s'expliquer par la présence permanente de l'équipe du DEAP à Bandiagara.

Le taux de résistance observé à Bandiagara et Kollé sont comparables respectivement à ceux trouvés par DOUMBO S. N. (12,9%) et TEKETE (31,2%).

Dans chacun des sites la résistance parasitologique était dominée par la résistance de type RI avec 8,6% à Bandiagara contre 27,8 % à Kollé. DOUMBO S. N, KATILE et TEKETE ont fait le même constat au cours de leurs études.

La résistance parasitologique, chez les enfants de 6 mois à 5 ans, était plus élevée à Kollé qu'à Bandiagara. (**Tableau XVI et Figure 21**).

A Bandiagara, la résistance était plus fréquente dans la tranche 2-3 ans tandis qu'à Kollé elle l'était dans celle de 6 mois- 1 an.

Une étude menée en Côte d'Ivoire en 1995 par VILLADARY et al, a identifié la tranche 6 mois- 5 ans comme étant un facteur de risque de la résistance (**108**).

L'élévation de ce taux dans la tranche 2-3 serait due à une faible prémunition.

VI. 4 - ETUDE MOLECULAIRE

Le taux global de résistance moléculaire dans notre population d'étude était de 66,8%.

A Bandiagara 61,4 % des souches étaient de génotype sensible tandis qu'à Kollé 18,4% des souches l'étaient. La différence était statistiquement significative ($p < 10^{-6}$). (**Tableau XVII**)

TEKETE avait trouvé à Kollé une prévalence de la mutation *pfcr* 76T de 67,2%. La fréquence de la mutation est statistiquement plus élevée au cours de notre étude ($p = 7.10^{-5}$)

La distribution des génotypes en fonction de l'âge, montre qu'à Bandiagara la fréquence des souches de génotypes résistants était inférieure à 50% dans toutes les tranches d'âges. (**Tableau XVIII**)

A Kollé, la prévalence de la mutation était élevée chez les enfants de 6 mois à 5 ans avec 100%, 84,4% et 84,4% respectivement dans les tranches 6 mois-1 an, 2-3 ans et 4-5 ans. (**Tableau XIX**)

Sur l'ensemble des sujets porteurs de *P. falciparum* résistants, 69.7% ont pu éliminer leurs parasites. Le taux de clairance était de 79.6% à Bandiagara et 67.3% à Kollé. Il n'y avait pas de différence significative entre les deux sites ($p=0.07$). (**Tableau XX et Figure 23**)

Toutefois, globalement et sur chacun de nos sites, la clairance des parasites de génotypes résistants augmentait avec l'âge. (**Tableau XXI et XXII, Figure 24 et 25**)

Ce phénomène peut s'expliquer par l'acquisition d'une immunité antipalustre au fil du temps.

VI. 5 - ETUDE IMMUNOLOGIQUE

VI.5.1 - POPULATION D'ETUDE

L'étude immunologique a porté sur 238 sujets dont 81,1% était de Kollé et 9,9% de Bandiagara.

La répartition de la population en fonction de la clairance montre que 70.2 % des sujets ont éliminé leurs parasites de génotypes résistants. (**Tableau XXIII**)

VI.5.2 - ETUDE COMPARATIVE DES TAUX SÉRIQUES MÉDIAN EN FONCTION DE LA CLAIRANCE

Nous avons déterminé les taux sériques médians de chacune des cytokines pour définir deux grands groupes. Ceux qui avaient un taux sérique inférieur ou égal à la médian ont été placés dans le groupe TSI. Ceux qui avaient un taux sérique supérieur à la médian ont été placés dans le groupe 2 TSS.

Concernant les taux sériques médians, nous remarquons que celui du TNF- α est relativement nul sur chacun de nos sites d'étude. Cette cytokine était à peine décelable chez nos patients. Ceci est compréhensible vu que notre étude a porté uniquement sur des cas de paludisme simple.

L'IL-10 était la cytokine la plus présente dans les séras analysés. Cette tendance a été observée au cours d'une étude menée par Othoro C et al au Kenya (**109**).

Bien que les dosages que nous avons effectués ont juste une valeur qualitative sur la production des cytokines, les taux médians que nous avons observés (117 pg/ml à Kollé et 114 pg/ml à Bandiagara) sont comparables à ceux trouvés par Othoro (122 \pm 13 pg/ml). Les taux élevés d'IL-10 concordent avec les taux faibles de TNF- α .

Chez la majorité de nos patients, les taux sériques de l'IFN- γ et de l'IL-4 étaient très faibles. Ce résultat est comparable à celui trouvé par OTHORO au cours de son étude (**109**).

Le profil cytokinique des sujets varie d'un site à l'autre. En effet, Il y avait plus de cytokine décelable dans le sera des sujets de Bandiagara. A Kollé, de toutes les cytokines dosées seules l'IFN- γ et l'IL-10 étaient légèrement élevées.

Quant à la répartition de la population d'étude en fonction de la clairance et du taux sérique médian, nos résultats montrent qu'à Bandiagara, l'IFN- γ avait une association négative à J0 avec la clairance ($p= 0.02$) tandis qu'à Kollé nous n'avons observé aucune association. Les résultats combinés de Kollé et de Bandiagara sont identiques à ceux de Bandiagara ($p=0.02$). (**Tableau XXIV, Tableau XXV, Tableau XXVI**)

Ces résultats révèlent qu'il y a une différence dans le profil immunitaire entre les sujets de Bandiagara et ceux de Kollé. Cette différence peut s'expliquer d'une part par la différence ethnique. A Bandiagara la population est majoritairement Dogon, tandis qu'à Kollé elle est Malinké. D'autres part l'âge pourrait être un facteur influençant.

Pour toutes les autres cytokines nous n'avons observé aucune différence entre les deux groupes.

Des études supplémentaires doivent être menées afin d'éclaircir le rôle de ces cytokines. Durant la convalescence il y a une variation du taux sériques de ces cytokines et que les dosages effectués uniquement sur les sera prélevé à l'inclusion ne reflètent pas le profile cytokinique du sujet.

VI. 6 - ETUDE GENOMIQUE

L'étude génomique concernait un certain nombre de SNPs qui ont très souvent été décrits comme associés à la résistance ou à la susceptibilité au paludisme grave: G6PD^{202C/T}, G6PD^{376 C/T}, ICAM-1^{29A/T}, ICAM-1^{469 A/G}, HBC^{A/G}, HBS^{A/T}, IL-4^{-589 T/C}, IL-4^{2243251 T/C}, IL-8^{+781 C/T}, TNF- α ^{-308 G/A}, TNF- α ^{-376 G/A}, TNF- α ^{-1031 T/C}, IFN- γ ^{4640T}, IFN- γ ^{893 G}, IFN- γ ^{-1616 T/C}, IFN- γ ^{+2200 T/C}, IFN- γ ^{+3234 T/C}, IFN- γ ^{+5173 A/G}, IFN- γ ^{+874 A/T}, IFN- γ R1^{-56 C/T}, IL-10^{-1082 T/C}, IL-10^{-592 G/T}, IL-10^{-819 G/A}, IL-10^{232428480 C/A} (**97, 116, 118, 123, 124, 125**) .

Le but de cette étude était d'une part de déterminer la fréquence de ces SNPs dans la population d'étude et d'autre part d'identifier le rôle de ces polymorphismes dans la clairance de souches de génotypes résistants au cours du paludisme simple à *P. falciparum*.

La détermination de la fréquence des différents SNPs étudiés permettra de calculer la taille de l'échantillon nécessaire pour d'autres études immunogénétiques. En effet seul les SNPs dont la fréquence est supérieure ou égale à 10% seront retenus.

VI.6.1 - POPULATION D'ETUDE

L'étude a porté sur 190 sujets âgés de 6 mois à 12 ans. Le choix de cette tranche d'âge a été guidé par les résultats d'une étude menée par Djimdé au Mali (22).

Ces résultats montraient qu'au delà de 12 ans le taux de clairance était supérieur à 80%. La tranche d'âge critique était celle de 1-3 ans. Par ailleurs le taux de clairance chez les sujets de 4- 12 ans variait entre 50- 80%. De ce fait il est plus important d'axer l'étude génomique chez les sujets de moins de 12 ans.

Sur les 190 sujets sur lesquels nous avons axé l'étude génomique, 66,3% ont éliminé leurs parasites de génotypes résistant tandis que 33,7 % n'ont pas pu les éliminer (**Tableau XXVII**).

VI.6.2 - FREQUENCES DES DIFFERENTS ALLELES

Sur les 24 SNPs étudiés, sept SNPs avait un allèle dont la fréquence est inférieure à 10% : IFN- γ 4640T, IFN- γ 893 G, IFN- γ +2200 C, IL-8 +781 T, TNF- α -1031 C, HBC A, HBS T (**Tableau XXVIII**).

VI.6.3 - COMPARAISON DE LA FREQUENCE DES DIFFERENTS ALLELES EN FONCTION DE LA CLAIRANCE

Nous avons observé que la fréquence des allèles TNF- α ^{-308 A} et IFN- γ ^{+874 T} était 2,2 fois plus élevée chez les sujets ayant pu éliminer leurs parasites de génotype résistant que chez ceux n'ayant pu les éliminer. La différence était statistiquement significative (**Tableau XXXIV**).

Les résultats obtenus au cours de notre étude montrent que l'allèle TNF- α ^{-308 A} a une association positive avec la clairance des souches de *P. falciparum* de génotypes résistants (110, 111).

Cependant, HILL et al ont trouvé que les homozygotes pour l'allèle TNF- α ^{-308A} avait un risque accru pour le neuropaludisme. Ce résultat était confirmé par l'étude menée par MEYER, qui a montré que l'allèle TNF- α ^{-308A} augmentait les risques de réinfections avec *P. falciparum* chez les sujets atteints de paludisme grave. Ces deux études ont porté sur des cas de paludisme sévère, tandis que dans notre étude, il s'agissait de sujets atteints de paludisme simple à *P. falciparum*.

Cependant, la majorité des études qui ont porté jusqu'à lors sur le TNF- α ^{-308 A}, ont toujours montré le rôle négatif de cet allèle au cours des manifestations de plusieurs maladies infectieuses et non infectieuses (112, 113, 114, 115).

D'un autre coté, nos résultats montrent que l'allèle IFN- γ ^{+874 T} a une association positive avec la clairance des souches de *P. falciparum* de génotypes résistants. Ce polymorphisme a été associé à la forte production de L'IFN- γ (116). Cependant lorsque l'on observe les résultats immunologiques, la proportion de sujet ayant pu éliminer leur parasite est plus élevée chez ceux pour lesquels, le taux sérique d'IFN- γ était inférieure à la médiane. Ces derniers avaient donc un taux sérique d'IFN- γ relativement bas.

A priori les résultats immunologiques et génomiques sont contradictoires.

Cependant il ne faut pas perdre de vu que :

- Le phénotype de clairance a été défini chez les sujets qui ont été traité à la chloroquine, médicament qui influence la production de certaine cytokines (117).
- Et que les sera utilisés pour les différents dosages ont été prélevé uniquement le jour de l'inclusion, donc avant le traitement.

Le fait d'être porteur de l'allèle IFN- γ ^{+874 T} n'est qu'un facteur favorisant la production d'IFN- γ . Aussi pour mieux observer cette corrélation chez l'homme il faudrait faire des dosages sur des sera prélevés régulièrement chez des sujets porteurs de souches de *P. falciparum* de génotype résistant et qui n'auront pas été traité.

Ainsi les résultats obtenus dans notre série ne nous permettent pas de faire une corrélation directe entre les taux sériques IFN- γ et la fréquence de l'allèle IFN^{+874T}, car les taux sériques ont été dosés chez les sujets de façons ponctuelles. Il faudrait pour cela mener d'autres études rétrospectives sur les sera, les cellules mononuclées du sang et les parasites provenant de sujets inclus dans l'étude ; et des études prospectives en tenant compte de tous les antécédents des sujets pouvant influencer la production des cytokines.

Pour tous les autres polymorphismes étudiés nous n'avons observé aucune différence entre les patients ayant pu éliminer leurs parasites et ceux n'ayant pas pu les éliminer.

Cependant dans la littérature, certains de ces gènes sont impliqués dans la susceptibilité au paludisme ou d'autres affections et l'augmentation du taux sérique de certaines cytokines:

- ICAM-1 29 T augmenterait la susceptibilité au paludisme cérébrale (118).
- IL-4 589 T Influencerait la production d'IgE, Favorise le développement de l'Asthme (119, 120).
- TNF- α -376 A augmenterait la production de TNF- α (121).
- IL-10 -1082 A est impliqué dans la diminution de la production d'IL-10 (122).

VII - CONCLUSION

Le but de cette étude était de déterminer le rôle des facteurs immunologiques et génétiques impliqués dans la clairance des souches de *P. falciparum* de génotypes résistants.

Les résultats *in vivo* montrent le taux d'échec thérapeutique et de résistance parasitologique à Bandiagara et à Kollé reste comparable à ceux obtenus les années antérieures par d'autres auteurs. En tenant compte des définitions de nos différentes variables (ETT, ETP, RCS, RI, RII, RIII) sur chacun de nos sites, la chloroquine reste un antipaludique efficace, bien qu'à Kollé, le taux de résistance moléculaire soit alarmant. Cependant il est nécessaire de reprendre cette analyse en tenant compte des dernières modifications apportées par l'OMS sur la détermination du niveau de résistance.

Les résultats immunologiques indiquent qu'un taux sérique élevé d'IFN- γ au début d'une infection palustre n'est pas favorable à la clairance des souches *P. falciparum* mutants.

Sur le plan génomique nous avons constaté que les allèles TNF- α ^{-308A} et IFN- γ ^{+874T} sont positivement associés au phénotype de clairance.

Les résultats immunologiques et génomiques recueillies ont jeté un jalon vers la compréhension de l'implication des ces facteurs dans la clairance des parasites résistants. Néanmoins des études supplémentaires plus approfondies tenant compte de nombreux aspects (l'influence possible de l'antipaludique utilisé, le suivi de la santé des sujets bien avant et après le traitement etc...) doivent être effectués pour confirmer les résultats préliminaires obtenus.

VIII - RECOMMANDATION

Au terme de cette étude, nous formulons les recommandations suivantes aux scientifiques :

Aux autorités sanitaires :

- La poursuite de l'utilisation de la CQ comme médicament de première intention à Bandiagara, mais le remplacement de cette molécule par une autre à Kollé

Aux scientifiques :

- La poursuite d'études similaires sur d'autres sites afin de vérifier les résultats préliminaires obtenus.
- L'approfondissement de la recherche des facteurs génomiques et parasitaires qui pourraient être impliqués dans la clairance des souches de génotypes résistants (génotypage d'autres gènes humains en tenant compte des haplotypes).
- L'approfondissement de la recherche des facteurs immunologiques qui pourraient être impliqués dans la clairance des souches de génotypes résistants en explorant l'immunité cellulaire (La présence de certains anticorps dirigés contre les antigènes plasmodiques connus, Activité cytotoxique des lymphocytes T, Production de cytokines après stimulation par des antigènes plasmodiques *in vivo*).

Nom : OUOLOGUEM

Prénom : Dinkorma

Nationalité : Malienne

Date de soutenance : le 10 Avril 2004

Ville de soutenance : Bamako

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

Secteur d'intérêt : Epidémiologie, Parasitologie, Immunologie, Biologie moléculaire

Titre : Déterminants immunologiques et génomiques de la clairance des souches de *Plasmodium falciparum* résistantes à la chloroquine.

Résumé :

Nous avons effectué simultanément de juin 2002 à janvier 2003 à Kollé et à Bandiagara une étude des facteurs immunologiques et génomiques de l'hôte impliqués dans la clairance des souches mutantes de *P. falciparum*.

Pour la détermination de la résistance *in vivo* à la chloroquine, nous avons appliqué le protocole standard modifié de l'OMS de 14 jours.

Nous avons utilisé une technique de PCR, la « Nested PCR », pour la détection de la mutation ponctuelle du gène *Pfcr* *K76T*. Nous avons mesuré les taux sériques des différentes cytokines par la cytométrie de flux. La détermination des différents polymorphismes au niveau du génome humain a été faite par la technique de PCR multiplex couplée à la spectrométrie de masse assistée d'un laser de désorption et d'ionisation en temps réel (MALDI-TOF MS).

Au total 413 sujets ont été inclus au cours de cette première année d'étude.

Les taux d'échecs thérapeutiques étaient de 2,6% d'ETP (Echec Thérapeutique Précoce) et 3,3% d'ETT (Echec Thérapeutique Tardif) à Kollé contre 2,8% d'ETP et ETT à Bandiagara.

A Kollé, les taux de résistance parasitologique étaient de 31,1% avec 27,8% de type RI, 1,8% de type RII et 1,5% de type RIII. A Bandiagara, les taux de résistance parasitologique étaient de 10% avec 8,6% de type RI et 1,4% de type RIII.

La prévalence de la mutation 76T du gène *Pfcr* à Kollé était de 81,6% tandis qu'à Bandiagara elle était de 38,6%.

Les résultats immunologiques ont montré que les taux sériques élevés d'IFN- γ ont une association négative avec la clairance de souches mutantes de *P. falciparum*.

Du point de vue génomique les allèles TNF- α ^{-308 A} et IFN- γ ^{+874 T} ont une association positive avec la clairance de souches mutantes de *P. falciparum*.

En conclusion, les résultats immunologiques et génomiques recueillis contribuent à une meilleure compréhension de l'implication de ces facteurs dans la clairance des parasites résistants à la chloroquine. Néanmoins des études supplémentaires et plus approfondies doivent être effectuées pour mieux élucider la clairance des souches de *P. falciparum* de génotype résistant par l'hôte.

Mots clé : Paludisme, *Pfcr*, Chloroquinorésistance, Cytokines, SNPs.

Name : OUOLOGUEM

Surname : Dinkorma

Nationality: Malian

Defense date: April 10th 2004

Town of defense: Bamako

Place of storage: Library of Faculty of Medicine, Pharmacy and Dentistry.

Area of interest: Epidemiology, Parasitology, Immunology, Molecular Biology

Title : Immunologicals and genomics Factors implicated in the clearance of *P. falciparum* resistant genotype strain.

Summary :

We performed from June to December 2002 in Kollé and Bandiagara a study on Immunological and genomics Factors that are possibly implicated in the clearance of *P. falciparum* resistant genotype strain.

To determine the *in vivo* drug-resistance to chloroquine, We used the WHO 14 days standard protocol.

We performed a nested PCR assay, to find point mutation of the pfcr K76T gene. We measured the level of different cytokines in sera using flow-cytometry. Different polymorphisms was determined by mass spectrometry assisted by desorption and ionisation in real time laser (MALDI-TOF MS).

413 subjects was enrolled.

The clinical response level was de 94.1% of CSR, 2.6% ETF and 3.3% d'LTF in Kollé. In Bandiagara we found 94.4% of ACR, 2.8% ETF and LTF.

In Kollé, 68.9% of strains was sensibles. The parasitological failure level was 31.1% with 27.8% of RI type, 1.8% of RII type and 1.5% of RIII type. In Bandiagara, 90% of strains was sensibles. The level of therapeutic failure was 10% with 8.6% of RI type and 1.4% of RIII type.

The proportion of resistant genotypes strains was 81.6% In Kollé, and 38.6% in Bandiagara.

In Bandiagara, the early production of IFN- γ was negatively associated with clearance of *P. falciparum* resistant genotypes. In Kollé we observed no association.

The alleles TNF- α ^{-308 A} and IFN- γ ^{+874 T} was positively associated to clearance phenotype.

To conclude, the informations immunological and genomic found are a light toward the understanding of those factors implicated in the clearance of chloroquine resistant parasites. Nevertheless supplementary and advanced studies have to be done to confirme the obtained results.

Key-words : Malaria, Pfcr, Chloroquine-resistance, Cytokines, SNPs

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Carme B, Kenmorgne D, Copin N, Mbisi A.** Indices plasmodiques et charges parasitaires chez des donneurs de sang à Brazaville CONGO. *Ann.Soc.Belge Med Trop* 1993; 73: 179-87
- Darie H, Habu M.** Paludisme congénital. *Med Trop* 1992; 52: 175-8.
- Bruce-chwatt LJ.** The Manson oration, May 1979. Man against malaria: conquest or defeat. *Trans.R.Soc.Trop. Med. Hyg.* 1979; 73: 605-17.
- Danis M, Gentilini M.** [Malaria, a worldwide scourge] Le paludisme fléau mondial. *Rev. Prat.* 1998; 483: 254-7.
- World malaria situation in 1994.** Part I. Population at risk. *Wkly. Epidemiol.rec.* 1997; 7236: 269-74.
- OMS.** Comité d'experts du Paludisme. Série de Rapports techniques N-123, 957
- Akogbeto M, Yakouou S.** Resistance of malaria vectors to pyrethrins used for impregnating mosquito nets in Benin, West africa. *Bull Soc Pathol exot.* 1999 May; 922: 123-30
- Young MD, Moore DV.** Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg.* 1961 May; 10: 317-20.
- Campbell CC, Chin W, Collins WE et al.** Chloroquine resistant *P. falciparum* from East Africa cultivation and drug sensitivity of the tanzanian I/CDC strain from an american tourist. *Lancet* 1979 Dec 1; 2(8153) :1151-4.
- Khan AA, Maghire MT.** Relative chloroquine resistance of *P. falciparum* in Zambia. *Brit Med* Jun1978; 1: 1669-72.
- Camara F..** Evolution de la chimioresistance des souches maliennes de *P. falciparum* aux amino-4-quinoleines de 1985 à 99. Thèse Médecine ; ENMP, 1991 N-41.
- OMS 1996.** Evaluation de l'efficacité thérapeutique des antipaludiques par le traitement de *P. falciparum* non compliqué dans les regions de transmission élevée. WHO/MAL/96/1077.
- Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzehunov SM, Ferdig MT et al.** Mutation in the *P. falciparum* digestive Vacuole transmembrane Proteine Pfcr1 and Evidence for their Role in chloroquine resistance. *Mol.cell* 2000; 64: 861-71
- Djimde A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourte Y et al.** A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. *N.Engl.J.Med.* 2001; 3444: 257-63.

- Brasseur P, Guiguemde R, Diallo S, Guiyedi V, Kombila M, Ringwald P et al.** Amodiaquine remains effective for treating uncomplicated malaria in west and central Africa. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.*1999; 936: 645-50.
- Bickii J, Basco LK, Ringwald P.** Assessment of three *in vitro* test and an *in vivo* test for chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* clinical isolates. *J.Clin.microbiol.*1998; 361: 243-7.
- Plebanski M, Hill AVS.** The imunology of malaria infection. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 437-41
- Luty AJ, Perkins DJ, Lell B, Schmidt-ott R, Lehman G, Luckner D, et al.** Low interleukin-12 activity in severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun* 2000; 68: 3909-15
- Baird JK, Jones TR, Danudirgo EW, Annis BA, Bangs MJ, Basri H et al.** Age-dependent acquired protection against *Plasmodium falciparum* in people having two years exposure to hyperendemic malaria. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1991; 451: 65-76.
- Kamol-Ratanakul P, Chirakalwasarn N, Lertmaharit S, Dhanamun B, Seublinwong T, Udomsangpetch R et al.** Seroepidemiologic studies of humoral immune response to the *Plasmodium falciparum* antigens in Thailand. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1992; 475: 554-61.
- Tekete MM.** Sensibilité de *P. falciparum* à la chloroquine dans deux villages de la savane malienne : Kollé et Bancoumana. Thèse Pharmacie FMPOS 2001 n°96
- Djimde A, Doumbo OK, Traore O, Guindo A, Kayentao K, Diourte Y, Doumbo SN, Hensmann M, Kwiatkowski D and Plowe CV.** Clearance of drug-resistant parasites as a model for protective immunity in falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2003 Nov; 69 (5) :558-63.
- Miller LH, Good MF and Millon G.** Malaria pathogenesis. *Science.* Jun 24 1994, 264(5167): 1878-83.
- Dib C, Fauré S, Fizames C et al.** A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature.* Mar 1996; 380 (6570):152-4.
- Wakelin DM and Blackwell JM.** Genetics of resistance to bacterial and parasitic infection. Taylor and Francis, London 1988; pp : 138-44.
- Cooke GS, Hill AV.** Genetics of susceptibility to human infectious disease. *Nat Rev Genet.* 2001 Dec; 212: 967-77.
- Abel L and Dessein A.** Genetic epidemiology of infectious diseases in humans, with special reference to design of human population studies. *Emerg Infect Dis* 1998; 4: 593-603
- Lander ES and Schork NJ.** Genetic dissection of complex traits. *Science* 1994; 265: 2037-48

- Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH.** The resistance factor to *Plasmodium vivax* in black. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. N Engl J Med 1976 Aug 5; 295: 302-4.
- Allison AC.** Population genetics of abnormal human haemoglobins and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. In:Jonxis JHP, ed . abnormal human haemoglobins in Africa. Oxford, England: Blackwell Scientific 1956-1957; 6(3):431-4
- Flint J, Harding RM, Boyce AJ, Clegg JB.** The population genetics of the haemoglobinopathies. Baillieres Clin Haematol. 1998 Mar; 111: 1-51.
- Modiano D, Luoni G, Sirima BS, Simporo J, Verra F, Konate A, Rastrelli E, Olivieri A, Calissano C, Paganotti GM, D'Urbano L, Sanou I, Sawadogo A, Modiano G, Coluzzi M.** Haemoglobin C protects against clinical *P. falciparum* malaria. Nature 2001 Nov 15; 414:681: 305-8.
- Weatherall DJ, Clegg JB.** Thalassaemia Syndromes. 4th ed. Oxford, England : Blackwell Scientific ; 2001
- Ruwende C, Fhoo SC, Snow RW, Yates SNR, Kwiatkowski D.** Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria. Nature 1995 ; 376 :246-9 .
- Allen SJ, O'donnell A, Alexander NDE, Alpers MP, Petoa.** ALPHA+-Thalassaemia protects children against disease caused by other Infections as well as malaria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997 ; 94 :14736-41.
- Bouharoun-Tayoun H, Ouevray C, Lunel F, Druilhe P.** Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. J Exp Med 1995 Aug 1;182:409-18.
- Orago AS and Facer CA.** Cytotoxicity of human natural killer NK cell subsets for *Plasmodium falciparum* erythrocytic schizonts: stimulation by cytokines and inhibition by neomycin.Clin Exp Immunol. 1991 Oct; 86:22-9.
- Aidoo M, Lalvani A, Gilbert SC, Ting HU J, Daubersies P, Hurt N, Whittle HC, Druihle P, Hill AVS.** Cytotoxic T-lymphocyte Epitopes for HLA-B53 and other HLA Types in the Malaria Vaccine Candidate Liver-Stage Antigen 3. Infection and Immunity 2000; 68: 227-32
- Suhrbier A, Winger LA, Castellano E, Sinden RE.** Survival and antigenic profile of irradiated malarial sporozoites in Infected liver cells. Infect Immun. 1990 Sep; 58: 2834-9.
- Perlman P, Troye-blomberg M.** Malaria blood-stage Infection and its control the immune system. Folia Biologica Praha 2000 ; 46: 210-18.

- Aucan C, Traore Y, Tall F, Nacro B, Traore-Leroux T, Fumoux F, Rihet P.** High immunoglobulin TSS IgTSS and low IgG4 levels are associated with human resistance to *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun.* 2000 Mar; 68:1252-8.
- Saul A, Miller LH.** A robust neutralization test for *Plasmodium falciparum* malaria. *The journal of Experimental medicine* 2001 ; 193: 51-4.
- Mosman TR, Cherwinsky H, Bond MW, Giedlin MW, Coffman RL.** Two types of murine helper T cell clone: Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted protein. *J Immunol* 1986.136: 2348-57
- Mosmann TR, Coffman RL.** Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989 ; 7: 145-73
- Wahlgren M, Abrams JS, Fernandez V, Bejarano MT, Azuma M, Tori Aikawa M, Howard RJ.** Adhesion of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes to human cells and secretion of cytokines IL-1- β , IL-1RA, IL-6, IL-8, IL-10, TGF β , TNF- α , G-CSF, GM-CSF. *Scand J Immunol.* 1995 Dec ; 426: 626-36.
- Auron PE, Webb AC, Rosenwasser LJ, Mucci SF, Rich A, Wolff SM, Dinarello CA.** Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 Dec; 81:24: 7907-11.
- Muegge K, Durum S.** The role of interleukin 1 in the immune response. In: Bomford R and Henderson B eds *Interleukin 1, Inflammation and Disease* 1989. Amsterdam : Elsevier.
- Nicola NA.** *Guidebook to Cytokines and their Receptors* ed 1994. Oxford: Oxford University Press.
- Thèze J.** Cytokine receptors: a combinatorial family of molecules. *European Cytokine Network* 1994; 5: 353-68.
- Thèze J, Alzari P and Bertoglio J.** IL-2 and IL-2 receptors: recent advances and new immunological functions. *Immunology Today* 1996; 17: 481-6.
- Thomson AW.** *The Cytokine Handbook*, 2nd ed 1994. London: Academic Press.
- Holland G and Zlotnik A.** Interleukin-10 and cancer. *Cancer Investigation* 1993; 11: 751-8.
- Mosmann TR.** Properties and functions of interleukin-10. *Advances in Immunology* 1994; 56: 1-26.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P et al.** IL-10 acts on the antigen presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *Journal of Immunology* 1991; 146: 3444-51.
- Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, De Vries JE.** Interleukin 10 IL-10 inhibits cytokine synthesis by human monocytes: An autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *Journal of Experimental Medicine* 1991;174: 1209-20.

- Carson WE, Lindemann MJ, Baiocchi R et al.** The functional characterization of interleukin-10 receptor expression on human natural killer cells. *Blood* 1995; 85: 3577–85.
- Rousset F, Garcia E, Defrance T et al.** Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1992; 89: 1890–93
- Vries JE.** Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of interleukin 10. *Annals of Medicine* 1995; 27: 537–41
- Peyron F, Burdin N, Ringwald P, Vuillez JP, Rousset F, Banchereau J.** High levels of circulating IL-10 in human malaria. *Clin Exp Immunol* 1994 ; 95: 300-3.
- Ho M, Sexton MM, Tongtawe P, Looareesuwan S, Suntharasamai P, Webster HK .** Interleukin-10 inhibits tumor necrosis factor production but not antigen-specific lymphoproliferation in acute *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 1995 Sep;172(3):838-44.
- Othoro C, Lal AA, Nahlen B, Koech D, Orago AS, Udhayakumar V.** A low interleukine-10 tumor necrosis factor-alpha ratio is associated with malaria anemia in children residing in holoendemic malaria region in western Kenya. *J Infect Dis* 1999; 179:279-82.
- Kwiatkowski D, Hill AV, Sambou I et al.** TNF concentration in fatal cerebral, non fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet* 1990; 336: 1201-4
- Kern P, Hemmer CJ, Van Damme J, Gruss HJ, Dietrich M.** Elevated tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 serum level as markers for complicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Med* 1989; 87:139-43.
- Karunaweera N, Grau G, Gamage P, Carter R, Mendis K.** Dynamics of fever and serum levels of tumor necrosis factor are closely associated during clinical paroxysms in *Plasmodium vivax* malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 3200-3
- Mordmuller BG, Metzger WG, Juillard P et al.** Tumor necrosis factor in *Plasmodium falciparum* malaria : high plasma level is associated with fever but high production capacity is associated with rapid fever clearance. *Eur Cytokine Netw* 1997; 8: 29-35
- Ong'echa JM, Lal AA, Terlouw DJ, Ter Kuile FO, Kariuki SK, Udhayakumar V, Orago AS, Hightower AW, Nahlen BL, Shi YP.** Association of interferon-gamma responses to pre-erythrocytic stage vaccine candidate antigens of *Plasmodium falciparum* in young Kenyan children with improved hemoglobin level. *Am J Trop Med Hyg.* 2003 May; 685: 590-7
- Taylor Robinson AW.** Regulation of immunity to malaria valuable lessons learned from murine models. *Parasitol Today* 1995; 11: 334-42.
- Spratt BG.** Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science* 1994. 264: 388-93.

- Nikaido H et al.** Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Science* 1994; 264: 382-8.
- Basco LK, Ruggeri C, Le Bras J.** Molécules antipaludiques: Mécanisme d'action, mécanisme de résistance et relation structure-activité des schizonticides sanguins. Masson, Paris, Barcelone, 1994 ; 26.
- Bzik DJ, Li WB, Horii T, Inselburg J.** Molecular cloning and sequence analysis of *P. falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthetase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84: 8360-4
- Zolg JW, Plitt JR, Chen GX, Palmers S.** Mutations point in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene as the molecular basis for pyrimethamine resistance in *P. falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1989; 36: 253-62
- Hyde JE.** The dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene in malaria the drug malaria resistance of malaria parasites. *Pharma Ther* 1990; 48: 45-9
- Diourte Y, Djimde A, Doumbo OK, Sagara I, Coulibaly Y, Dicko A, Diallo M, Diakite M, Cortese JF, Plowe CV.** Pyrimethamine-sulfadoxine efficacy and selection for mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase in Mali. *Am J Trop Med Hyg* 1999 Mar; 603: 47.
- Peterson DS, Walliker D, Wellems TE.** Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in falciparum malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 9114-8.

- Wang P, Read M, Sims PF, Hyde JE.** Sulfadoxine resistance in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* is determined by mutations in dihydropteroate synthetase and an additional factor associated with folate utilisation. *Molec Microbiol* 1997; 235: 979-86.
- Wilson CM, Volkman SK, Thaithong S, Martin RK, Kyle DE, Muhous WK, Wirth DF.** Amplification of *pfmdr 1* associated with mefloquine and halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Mol Biochem Parasitol* 1993 jan ; 571: 151-60.
- Ritchie GY, Mungthin M, Green JE, Bray PG, Hawley SR, Ward SA.** *In vitro* selection of halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* is not associated with increased expression of *Pgh1*. *Mol biochem Parasitol* 1996 Dec 2 ; 831: 35-46.
- Thompson PE, Werbel LM.** Antimalarial agents: chemistry and pharmacology. In : DeStevens G, ed. *Medicinal chemistry*, Vol. 12. New York : Academic Press, 1972
- Coatney GR.** Pitfalls in a discovery: the chronicle of chloroquine. *Am J Trop Med Hyg* 1963. 12 :121-8
- Yayon A, Cabantcick ZI, Ginsberg H.** Identification of the acidic compartment of *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes as the target of the antimalarial drug chloroquine. *EMBO J.* 1984 Nov;3(11):2695-700.
- Fitch CD.** 1972 *Proc. Helminth. Soc. Washington* 39, 265-27.
- Basco LK, Le Bras J, Rhoades Z, Wilson MC.** Analysis of *pfmdr1* and drug susceptibility in fresh isolates of *Plasmodium falciparum* from subsaharan Africa. *Mol Biochem Parasitol*, 1995; 74: 157-66.
- Bray PG, Ward SA.** A comparison of the phenomenology and genetics of multidrug resistance in cancer cells and quinoline resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol Ther* 1998; 77: 1-28.
- Henk B, Henbrik W, Van V, Bert P, Arnold JM, Driessen WNK.** Mecanism of MDR transporters; *FEMS Microbiology Rewiews* 21 1997; 55-84.
- Duraisingh MT, Drakeley CJ, Muller O, Bailey R, Snounou G, Targett GA, Greenwood BM, Warhurst DC.** Evidence for selection for the tyrosine-86 allele of the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum* by chloroquine and amodiaquine. *Parasitology*, 1997; 177: 1429-33.
- Su XZ, Kirman LA, Fuzioka H, Wellems TE.** Complex polymorphism's in a 330-kDa protein are linked to chloroquine-resistant *P. falciparum* in Southeast Asia and Africa. *Cell* 1997; 91: 593-603.
- Fidock DA, Nomura T, Talley AK et al.** Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembranaire protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine résistance. *Mol cell.* 2000; 6: 861-71.

- Payne D.** Aspects pratiques de l'utilisation des systèmes standard OMS d'épreuve *in vitro* macro et microtest pour la détermination de la sensibilité de *P. falciparum* à la chloroquine, la méfloquine, l'amodiaquine et la quinine. WHO/MAL 1984; 84 :2-21
- Le Bras J, Deloron P.** *In vivo* study of drug sensitivity of *P. falciparum* : evaluation of a new semi-microtest. Am J Trop Med Hyg 1983; 32: 447-53.
- Desjardin RE, Canfield CJ, Haynes JP, Chnulay JD.** Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semi-automated microdilution technique. Antimicrob Agents Chemother 1979; 16: 710-8.
- Le Bras J, Andrieu B, Hatin I, Savel J, Coulaud JP.** *Plasmodium falciparum* : Interprétation du semi-microtest de chimiosensibilité *in vitro* par incorporation de 3-hypoxanthine. Path Bio 1984; 32: 463-6.
- Krogstad DJ, Schlesinger PH.** The basis of antimalaria action : non-weak base effects of chloroquine on acid vacuole pH. Am J Trop Med Hyg 1987; 32: 213-20.
- Makler MT, Hinrichs DJ.** Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. Am J Trop Med Hyg. 1993 Feb;48(2):205-10.
- Garcia A, Marquet S, Bucheton B, Hillaire D, Cot M, Fievet N, Dessein AJ, Abel L.** Linkage analysis of blood *Plasmodium falciparum* levels: interest of the 5q31-q33 chromosome region. Am J Trop Med Hyg. 1998 Jun; 586: 705-9.
- Allsopp CE, Hill AV, Kwiatkowski D, Hughes A, Bunce M, Taylor CJ, Pazmany L, Brewster D, McMichael AJ, Greenwood BM.** Sequence analysis of HLA-Bw53, a common West African allele, suggests an origin by gene conversion of HLA-B35. Hum Immunol. 1991 Feb; 302: 105-9.
- McGuire W, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D.** Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. Nature. 1994 Oct 6; 3716497: 508-10.

- Modiano D, Chiucchiuini A, Petrarca V, Sirima BS, Luoni G, Perlmann H, Esposito F, Coluzzi M.** Humoral response to *Plasmodium falciparum* Pf155/ring-Infected erythrocyte surface antigen and Pf332 in three sympatric ethnic groups of Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg.* 1998 Feb; 582: 220-4.
- Luoni G, Verra F, Arca B, Sirima BS, Troye-Blomberg M, Coluzzi M, Kwiatkowski D, Modiano D.** Antimalarial antibody levels and IL4 polymorphism in the Fulani of West Africa. *Genes Immun.* 2001 Nov;27:411-4
- Aidoo M, Lalvani A, Gilbert SC, Hu JT, Daubersies P, Hurt N, Whittle HC, Druihle P, Hill AV.** Cytotoxic T-lymphocyte epitopes for HLA-B53 and other HLA types in the malaria vaccine candidate liver-stage antigen 3. *Infect Immun.* 2000 Jan; 681: 227-32.
- Aucan C, Traore Y, Tall F, Nacro B, Traore-Leroux T, Fumoux F, Rihet P.** High immunoglobulin TSS IgTSS and low IgG4 levels are associated with human resistance to *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun.* 2000 Mar; 683: 1252-8.
- TRAORE O.** Evaluation du niveau de la réponse clinique, parasitologique *in vivo* et des mutations du pfcrt de *Plasmodium falciparum* à Kollé Mali Thèse Pharmacie, FMPOS, Bamako, 1999, n°239.
- Coulibaly D, Diallo DA, Thera MA, Dicko A, Guindo AB, Kone AK, Cissoko Y, Coulibaly S, Djimde A, Lyke K, Doumbo OK, Plowe CV.** Impact of pre-season treatment on incidence of falciparum malaria and parasite density at a site for testing malaria vaccines in Bandiagara, Mali. *Am J Trop Med Hyg.* 2002 Dec; 67(6):604-10.
- Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C.** Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1993 Feb 26 ; 159 1-2 :197-207.
- Singer VL, Jones LJ, Yue ST, Haugland RP.** Characterization of picogreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantification. *Anal Biochem* 1997; 249: 228-38.
- DOUMBO SAFIATOU N.** Sensibilité *in vivo* de *P. falciparum* à la chloroquine dans la région de Mopti : Intérêt du nouveau protocole de 14 jours. Thèse de Médecine, Bamako, 1999. N°99-M-117
- ABDOULAYE KATILE.** Dynamique de l'efficacité thérapeutique de la chloroquine dans un village à transmission palustre saisonnière intense : Bancoumana Mali, Thèse Médecine FMPOS .

- Villadary I, Paquet C, Helmelsdael E, Blanchard G, Saki ZM.** Chimiosensibilité *in vivo* de *Plasmodium falciparum* dans la region de Tabou en Côte d'Ivoire. Bull. Soc. Ath. Ex 1997; 901:10-3
- Othoro C, Lal AA, Nahlen B, Koech D, Orago AS, Udhayakumar V.** A low interleukin-10 tumor necrosis factor-alpha ratio is associated with malaria anemia in children residing in a holoendemic malaria region in western Kenya. J Infect Dis. 1999 Jan; 179 (1): 279-82
- Hill AV, Allsopp CE, Kwiatkowski D, Anstey NM, Twumasi P, Rowe PA, Bennett S, Brewster D, McMichael AJ, Greenwood BM.** Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. Nature 1991; 352: 595-600.
- Meyer CG, May J, Luty AJ, LELL B., KREMSNER P. G.** TNF α -308A associated with shorter intervals of *Plasmodium falciparum* reinfections. Tissue Antigens. 2002 Apr;59(4):287-92
- Quasney MW, Zhang Q, Sargent S, Mynatt M, Glass J, McArthur J.** Increased frequency of the tumor necrosis factor-alpha-308 A allele in adults with human immunodeficiency virus dementia. Ann Neurol 2001; 50: 157-62.
- Roy S, McGuire W, Mascie-Taylor CG, Saha B, Hazra SK, Hill AV, Kwiatkowski D.** Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. J Infect Dis 1997 ; 176: 530-2.
- Nuntayanuwat S, Dharakul T, Chaowagul W, Songsivilai S.** Polymorphism in the promoter region of tumor necrosis factor-alpha gene is associated with severe melioidosis. Hum Immunol 1999; 60: 979-83.
- Dunstan SJ, Stephens HA, Blackwell JM, Duc CM, Lanh MN, Dudbridge F, Phuong CX, Luxemburger C, Wain J, Ho VA, Hien TT, Farrar J, Dougan G.** Genes of the class II and class III Major Histocompatibility Complex are associated with Typhoid Fever in Vietnam. J Infect Dis 2001 ; 183: 261-8.
- Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV.** A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. Hum Immunol. 2000 Sep; 61(9):863-6.
- Rosa R, Silveira H, Seixas E, Rolao N, Santos-Gomes G, do Rosario V.** The effect of chloroquine on the production of interferon-gamma, interleukin (IL)-4, IL-6, and IL-10 in *Plasmodium chabaudi chabaudi* in infected C57BL6 mice. J Parasitol. 1999 Oct;85(5):956-60.
- Fernandez-Reyes D, Craig AG, Kyes SA, Peshu N, Snow RW, Berendt AR, Marsh K, Newbold CI.** A high frequency African coding polymorphism in the N-terminal domain of

- ICAM-1 predisposing to cerebral malaria in Kenya. *Human Molecular Genetics* 1997; 6 (8): 1357-60.
- Kabesch M, Tzotcheva I, Carr D, Hofler C, Weiland SK, Fritzsche C, von Mutius E, Martinez FD.** A complete screening of the IL4 gene: novel polymorphisms and their association with asthma and IgE in childhood. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Nov;112(5):893-8.
- Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, Takeda K, Yokouchi Y, Kawashima T, Yanagi H, Matsui A, Hamaguchi H.** Association of asthma and the interleukin-4 promoter gene in Japanese. *Clin Exp Allergy* 1998 Apr;28(4):449-53.
- Knight JC, Udalova I, Hill AV, Greenwood BM, Peshu N, Marsh K, Kwiatkowski D.** A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. *Nat Genet* 1999; 22: 145-150.
- Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV.** An investigation of polymorphism in the interleukin 10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997; 24: 1-8.
- Mombo LE, Ntoumi F, Bisseye C, Ossari S, Lu CY, Nagel RL, Krishnamoorthy R.** Human genetic polymorphisms and asymptomatic *Plasmodium falciparum* malaria in Gabonese schoolchildren. *Am J Trop Med Hyg.* 2003 Feb;68(2):186-90
- Kabesch M, Tzotcheva I, Carr D, Hofler C, Weiland SK, Fritzsche C, von Mutius E, Martinez FD.** A complete screening of the IL4 gene: novel polymorphisms and their association with asthma and IgE in childhood. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Nov;112(5):893-8.
- Reuss E, Fimmers R, Kruger A, Becker C, Rittner C, Hohler T.** Differential regulation of interleukin-10 production by genetic and environmental factors--a twin study. *Genes Immun.* 2002 Nov;3 (7): 407-13

FICHE D'ENQUETE INDIVIDUELLE:

Determinants of Clearance of Drug Resistant Malaria

CASE RECORD FORM

Village: _____

Census Identification No. of the Volunteer : - - - -

Name of Volunteer: _____

Family First Middle

Name of Chief of Family _____

Family First Middle

Address _____

INFORMATION SUR L'INSCRIPTION

Enrollment Information:

Census Identification Number: - - - - - - - - - -

Study ID: - - - - - - - - - -

Date of Birth: - - - - - - - - - -
d d m m y y

Name of Volunteer: _____
First Middle Family

Name of Chief of Family: _____
First Middle Family

Gender: (circle one) Male or Female

Signature : _____ **Date:** _____

CALENDRIER DES VISITES EN CLINIQUE - HISTORIQUE ET EXAMEN

MEDICAL

CENSUS ID - - - Study ID

Visit Day:	0	1	2	3	7	14
Date (dd/mm/yy)	<u> </u> / <u> </u> / <u> </u>	<u> </u> / <u> </u> / <u> </u>	<u> </u> / <u> </u> / <u> </u>	<u> </u> / <u> </u> / <u> </u>	<u> </u> / <u> </u> / <u> </u>	<u> </u> / <u> </u> / <u> </u>
Time (24 h time clock)	<u> </u> : <u> </u> <u> </u>	<u> </u> : <u> </u> <u> </u>	<u> </u> : <u> </u> <u> </u>	<u> </u> : <u> </u> <u> </u>	<u> </u> : <u> </u> <u> </u>	<u> </u> : <u> </u> <u> </u>
History since the last clinical visit						
Fever, chills	Y N	Y N	Y N	Y N	Y N	Y N
Headaches	Y N	Y N	Y N	Y N	Y N	Y N
Vomiting	Y N	Y N	Y N	Y N	Y N	Y N
Diarrhea/abdominal pain	Y N	Y N	Y N	Y N	Y N	Y N
Lethargy/abnormal consciousness	Y N	Y N	Y N	Y N	Y N	Y N
Convulsions	Y N	Y N	Y N	Y N	Y N	Y N
Respiratory Symptoms	Y N	Y N	Y N	Y N	Y N	Y N
Pruritus	Y N	Y N	Y N	Y N	Y N	Y N
Anti-malarial Med. since last visit	Y N	Y N	Y N	Y N	Y N	Y N
Physical Exam						
Axillary Temperature in °C	<u> </u> <u> </u> .	Y N	Y N	Y N	<u> </u> .	<u> </u> .
Resp. rate /min	<u> </u> <u> </u>	Y N	Y N	Y N	<u> </u> <u> </u>	<u> </u> <u> </u>
Dehydration	Y N	Y N	Y N	Y N	Y N	Y N
Malnutrition	Y N	Y N	Y N	Y N	Y N	Y N
Anemia/Pallor	Y N	Y N	Y N	Y N	Y N	Y N
Icterus/Jaundice	Y N				Y N	Y N
Abnormal lung exam	Y N				Y N	Y N
Spleen size	0 1 2 3 4 5				0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5

T_≥37.5 °C or any symptom or examination finding marked *Yes* requires completion of a Symptomatic Surveillance Form.

**CALENDRIER DES VISITES EN CLINIQUE
EXAMEN DE LABORATOIRE**

CENSUS ID __-__-__-__-__-__-__ Study ID __-__-__-__-__-__-__

Visit Day:	0		3		7		14	
Date (dd/mm/yy)	__/__/__		__/__/__		__/__/__		__/__/__	
Time (24 h time clock)	__:__:__		__:__:__		__:__:__		__:__:__	
	__		__		__		__	
Giemsa smear								
Positive by thin	Y	N	Y	N	Y	N	Y	N
Positive by thick	Y	N	Y	N	Y	N	Y	N
Parasites/μl								
Initials / Date								
Filter paper sample								
Done	Y	N	Y	N	Y	N	Y	N
Initials / Date								
Venous blood								
Done	Y	N	Y	N	Y	N	Y	N
Initials / Date								
HGB								
Value								
≤6 mg/dl	Y	N	Y	N	Y	N	Y	N
Initials / Date								

**CALENDRIER DES VISITES IMPREVUES
HISTORIQUE ET EXAMEN MEDICAL**

CENSUS ID __-__-__-__-__-__-__ Study ID _____

Visit Day:				
Date (dd/mm/yy)	__/__/__	__/__/__	__/__/__	__/__/__
Time (24 h time clock)	__:__	__:__	__:__	__:__
History since the last clinical visit				
Fever, chills	Y N	Y N	Y N	Y N
Headaches	Y N	Y N	Y N	Y N
Vomiting	Y N	Y N	Y N	Y N
Diarrhea/abdominal pain	Y N	Y N	Y N	Y N
Lethargy/abnormal consciousness	Y N	Y N	Y N	Y N
Convulsions	Y N	Y N	Y N	Y N
Respiratory Symptoms	Y N	Y N	Y N	Y N
Pruritus	Y N	Y N	Y N	Y N
Anti-malarial Med. since last visit	Y N	Y N	Y N	Y N
Physical Exam				
Axillary Temperature in °C	____.____	____.____	____.____	____.____
Resp. rate /min	_____	_____	_____	_____
Dehydration	Y N	Y N	Y N	Y N
Malnutrition	Y N	Y N	Y N	Y N
Anemia/Pallor	Y N	Y N	Y N	Y N
Icterus/Jaundice	Y N	Y N	Y N	Y N
Abnormal lung exam	Y N	Y N	Y N	Y N
Spleen size	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5

T_≥37.5°C or any symptom or examination finding marked *Yes* requires completion of a Symptomatic Surveillance Form.

TESTS DE LABORATOIRE SUPPLEMENTAIRES

CENSUS ID - - - - - Study ID - - - - -

Visit Day:				
Date (dd/mm/yy)	<u> </u> / <u> </u> / <u> </u>	<u> </u> / <u> </u> / <u> </u>	<u> </u> / <u> </u> / <u> </u>	<u> </u> / <u> </u> / <u> </u>
Time (24 h time clock)	<u> </u> : <u> </u>	<u> </u> : <u> </u>	<u> </u> : <u> </u>	<u> </u> : <u> </u>
Giemsa smear				
Positive by thin	Y N	Y N	Y N	Y N
Positive by thick	Y N	Y N	Y N	Y N
Parasites/μl				
Initials / Date				
Filter paper sample				
Done	Y N	Y N	Y N	Y N
Initials / Date				
Venous blood				
Done	Y N	Y N	Y N	Y N
Initials / Date				
HGB				
Value				
≤6 mg/dl	Y N	Y N	Y N	Y N
Initials / Date				
Physician notified				
Time	<u> </u> : <u> </u>	<u> </u> : <u> </u>	<u> </u> : <u> </u>	<u> </u> : <u> </u>
Initials / Date				

FICHE D'ASSENTIMENT ECLAIRE

Consentement pour participer à une étude intitulée : «DETERMINANTS DE LA CLEARANCE DU PALUDISME CHIMIO-RESISTANT A BANDIAGARA & KOLLE »
(sujets âgés de 6 mois à <18 ans)

Investigateurs: _____

Site: _____

Nom du Volontaire _____

Prénom

2eme Nom

Nom de Famille

Numéro d'Identification _ - _ - _ - _ - _ - _ - _ - _ - _ - _ - _ - _ - _ - _ - _ - _ - **Age** _____ **années**

Nom et prénoms de l'adulte consentant _____

Prénom

2eme Nom

Nom de Famille

Relation avec l'enfant _____

Nous invitons votre enfant à prendre part à une étude de recherche sponsorisée par la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de l'Université du Mali et les Instituts Nationaux de la Santé des Etats Unis d'Amérique. Il est extrêmement important que vous compreniez plusieurs principes généraux qui s'appliquent à tous ceux qui prennent part à cette étude :

1. La participation de votre enfant à cette étude est entièrement volontaire.
2. Des bénéfices personnels pour votre enfant peuvent ne pas résulter de sa participation à l'étude, mais les connaissances obtenues pourraient être bénéfiques pour lui et d'autres dans l'avenir.
3. Vous pouvez décider de retirer votre enfant de l'étude à tout moment sans perte de bénéfices pour vous.

Le paludisme est une maladie causée par de très petits parasites qui peuvent entrer dans le corps quand les moustiques vous piquent. Il peut causer de la fièvre, des maux de tête, des douleurs du corps et de la faiblesse. Non traité avec des médicaments appropriés, il peut évoluer vers des formes sévères ou mortelles, notamment chez les enfants. Traités avec des médicaments appropriés, il peut guérir complètement mais certains parasites peuvent devenir résistants à ces médicaments.

L'objectif de cette étude est de savoir comment les habitants de votre village (Bandiagara ou Kolle) infectés par des parasites résistants éliminent ces parasites. Cette information nous sera utile pour mieux diagnostiquer le paludisme chimio-résistant et pour comprendre l'immunité contre le paludisme.

Si vous acceptez que votre enfant participe à cette étude, nous l'examinerons et ferons des analyses de laboratoire sur son sang. Si nous constatons que votre enfant souffre d'un paludisme simple, nous le traiterons avec un médicament recommandé par le Programme National de Lutte contre le Paludisme et nous ferons des contrôles aux jours 1, 2, 3, 7 et 14 après le traitement pour nous assurer que l'enfant est guéri de son paludisme. Nous nous attendons à ce que ce médicament guérisse complètement la grande majorité des malades inclus dans cette étude. Cependant, au cas où ce médicament ne guérirait pas le paludisme de votre enfant, nous utiliserons un autre médicament efficace comme le Fansidar^R ou la Quinine pour re-traiter votre enfant et continuerons à le suivre jusqu'à ce qu'il (elle) aille mieux.

L'étude s'étendra de juillet à décembre mais la participation de votre enfant sera de 2 semaines. Au total 880 personnes devront prendre part à cette étude.

Si nous découvrons que votre enfant souffre d'un paludisme sévère, il (elle) sera hospitalisé et traité avec des médicaments puissants et d'autres soins ainsi que recommander par le Ministère de la Santé.

Chaque fois que nous lui prélèverons du sang pour rechercher la présence du paludisme, nous mettrons quelques gouttes sur un morceau de papier buvard qui sera utilisé pour mieux comprendre les caractéristiques des parasites qui causent sa maladie. Le premier jour nous prélèverons du sang du bras de votre enfant. Selon l'évolution de la maladie de votre enfant nous ferons un ou deux prélèvements supplémentaires. La quantité de sang à prélever dépendra de l'âge: enfants de 6 mois – 6 ans : une à deux cuillerées à café de sang, sujet ≥ 7 ans : deux à quatre cuillerées à café de sang. Ce sang sera utilisé pour comprendre comment votre enfant se comporte vis-à-vis de la maladie. Nous conserverons une partie du sang pour des analyses ultérieures liées au paludisme. Vous avez le droit de refuser de faire conserver le sang de votre enfant et vous pouvez demander de détruire ce sang en stockage a tout moment.

Acceptez-vous la conservation du sang de votre enfant ? Oui Non

Les risques associés à cette étude sont minimes. Cependant l'antipaludique peut causer des problèmes, des démangeaisons le plus souvent. Il est très rare d'observer des problèmes médicaux plus sévères. Le prélèvement de sang peut très rarement causer des saignements, un évanouissement ou une infection. Nous nettoierons le bras ou le doigt avec des solutions antiseptiques avant de faire le prélèvement de sang et utiliserons du matériel stérile.

Nous offrirons à votre enfant un traitement complet et gratuit du paludisme ainsi que des autres maladies aiguës découvertes pendant la durée de l'étude. Les traitements que nous offrons sont les mêmes que ceux recommandés par le Programme National de Lutte contre le Paludisme et l'Organisation Mondiale de la Santé.

Les résultats de cette étude pourront être présentés au cours des réunions nationales et internationales ou publiées dans des revues médicales. Mais les informations sur votre enfant ne seront rendues disponibles à personne d'autre en dehors des investigateurs de l'étude.

Avez- vous des questions concernant la participation de votre enfant à cette étude? Si vous avez des questions complémentaires ou d'autres préoccupations vous pouvez demander à discuter avec des membres de notre équipe ou vous pouvez aussi demander à votre chef de village ou de quartier d'envoyer une lettre au Dr Abdoulaye Djimdé ou au Pr. Ogobara Doumbo, à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie au Point G, BP 1805, Tél/Fax: 22 81 09, Tél: 22 51 77, Bamako ou encore à M. Yénimégué Albert Dembélé, Secrétaire Général du comité d'éthique de la FMPOS, BP : 1805, Tel : 222-52-77, Fax :222-229658.

Si vous êtes d'accord que votre enfant participe à cette étude, veuillez mettre votre empreinte (ou votre signature) au bas de cette page (comme vous le faites quand vous partez chercher une carte d'identité).

Empreinte digitale - ou - _____ Signature du tuteur _____ Date

Signature de l'investigateur _____ Date

Pour les tuteurs illettrés : J'ai été témoin du consentement éclairé et peut attester que le tuteur a compris les explications de l'étude et a eu des réponses à toutes ses questions.

Signature du Témoin _____ Date

FICHE DE CONSENTEMENT ECLAIRE

Consentement pour participer à une étude intitulée : «DETERMINANTS DE LA CLEARANCE DU PALUDISME CHIMIO-RESISTANT A BANDIAGARA & KOLLE » (sujets agés de >18 ans)

Investigateurs: _____

Site: _____

Nom du Volontaire _____

Prénom

2eme Nom

Nom de Famille

Numéro d'Identification _ - _ _ _ - _ _ _ _ **Age** _____ années

Nous vous invitons à prendre part à une étude de recherche sponsorisée par la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie de l'Université du Mali et les Instituts Nationaux de la Santé des Etats Unis d'Amérique. Il est extrêmement important que vous compreniez plusieurs principes généraux qui s'appliquent à tous ceux qui prennent part à cette étude :

1. Votre participation à cette étude est entièrement volontaire.
2. Des bénéfices personnels pour vous peuvent ne pas résulter de votre participation à l'étude, mais les connaissances obtenues pourraient être bénéfiques pour vous et d'autres dans l'avenir.
3. Vous pouvez décider de vous retirer de l'étude à tout moment sans perte de bénéfices pour vous.

Le paludisme est une maladie causée par de très petits parasites qui peuvent entrer dans le corps quand les moustiques vous piquent. Il peut causer de la fièvre, des maux de tête, des douleurs du corps et de la faiblesse. Non traité avec des médicaments appropriés, il peut évoluer vers des formes sévères ou mortelles, notamment chez les enfants. Traités avec des médicaments appropriés, il peut guérir complètement mais certains parasites peuvent devenir résistants à ces médicaments.

L'objectif de cette étude est de savoir comment les habitants de votre village (Bandiagara ou Kolle) infectés par des parasites résistants éliminent ces parasites. Cette information nous sera utile pour mieux diagnostiquer le paludisme chimio-résistant et pour comprendre l'immunité contre le paludisme.

Si vous acceptez de participer à cette étude, nous vous examinerons et ferons des analyses de laboratoire sur votre sang. Si nous constatons que vous souffrez d'un paludisme simple, nous vous traiterons avec un médicament recommandé par le Programme National de Lutte contre le Paludisme et nous ferons des contrôles aux jours 1, 2, 3, 7 et 14 après le traitement pour nous assurer que vous êtes guéris du paludisme. Nous nous attendons à ce que ce médicament guérisse complètement la grande majorité des malades inclus dans cette étude. Cependant, au cas où ce médicament ne guérirait pas votre paludisme, nous utiliserons un autre médicament efficace comme le Fansidar^R ou la Quinine pour vous re-traiter et continuerons à vous suivre jusqu'à ce que vous alliez mieux.

L'étude s'étendra de juillet à décembre mais votre participation sera de 2 semaines. Au total 880 personnes devront prendre part à cette étude.

Si nous découvrons que vous souffrez d'un paludisme sévère, vous serez hospitalisé et traité avec des médicaments puissants et d'autres soins ainsi que recommandé par le Ministère de la Santé.

Chaque fois que nous vous prélèverons du sang pour rechercher la présence du paludisme, nous mettrons quelques gouttes sur un morceau de papier buvard qui sera utilisé pour mieux comprendre les caractéristiques des parasites qui causent sa maladie. Le premier jour nous prélèverons du sang de votre bras. Selon l'évolution de votre maladie nous ferons un ou deux prélèvements supplémentaires. La quantité de sang à prélever dépendra de l'âge: enfants de 6 mois – 6 ans : une à deux cuillerées à café de sang, sujets ≥ 7 ans: deux à quatre cuillerées à café de sang. Ce sang sera utilisé pour comprendre comment vous vous comportez vis-à-vis de la maladie. Nous conserverons une partie du sang pour des analyses ultérieures liées au paludisme. Vous avez le droit de refuser de faire conserver votre sang et vous pouvez demander de détruire ce sang en stockage a tout moment.

Acceptez-vous la conservation de votre sang? Oui Non

Les risques associés à cette étude sont minimes. Cependant l'antipaludique peut causer des problèmes, des démangeaisons le plus souvent. Il est très rare d'observer des problèmes médicaux plus sévères. Le prélèvement de sang peut très rarement causer des saignements, un évanouissement ou une infection. Nous nettoierons le bras ou le doigt avec des solutions antiseptiques avant de faire le prélèvement de sang et utiliserons du matériel stérile.

Nous vous offrirons un traitement complet et gratuit du paludisme ainsi que des autres maladies aiguës découvertes pendant la durée de l'étude. Les traitements que nous offrons sont les mêmes que ceux recommandés par le Programme National de Lutte contre le Paludisme et l'Organisation Mondiale de la Santé.

Les résultats de cette étude pourront être présentés au cours des réunions nationales et internationales ou publiés dans des revues médicales. Mais les informations sur vous ne seront rendues disponibles à personne d'autre en dehors des investigateurs de l'étude.

Avez- vous des questions concernant votre participation à cette étude? Si vous avez des questions complémentaires ou d'autres préoccupations vous pouvez demander à discuter avec des membres de notre équipe ou vous pouvez aussi demander à votre chef de village ou de quartier d'envoyer une lettre au Dr Abdoulaye Djimdé ou au Professeur Ogobara Doumbo, à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie au Point G, BP 1805, Tél/Fax: 22 81 09, Tél: 22 51 77, Bamako ou encore à M. Yénimégué Albert Dembélé, Secrétaire Général du comité d'éthique de la FMPOS, BP : 1805, Tel : 222-52-77, Fax :222-229658.

Si vous êtes d'accord pour participer à cette étude, veuillez mettre votre empreinte (ou votre signature) au bas de cette page (comme vous le faites quand vous partez chercher une carte d'identité).

Empreinte digitale - ou - _____
Signature du volontaire _____
Date

Signature de l'investigateur _____
Date

Pour les sujets illettrés : J'ai été témoin du consentement éclairé et peut attester que le volontaire a compris les explications de l'étude et a eu des réponses a toutes ses questions.

Signature du Témoin _____
Date

SERMENT DE GALIEN

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

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

D'exercer dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et 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 des actes criminels ;

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

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

JE LE JURE.