

Ministère de l'Enseignement

République du Mali

Supérieur et de la recherche scientifique

Un peuple-Un but-Une foi

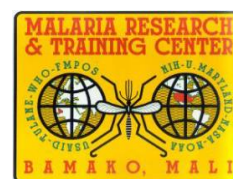
\*\*\*\*\*

Université des Sciences, Techniques et  
Technologie de Bamako

Année : 2018-2019

\*\*\*\*\*

FACULTE DE PHARMACIE



**Fréquence des variants d'hémoglobine et son impact sur la parasitémie à *Plasmodium*, les paramètres hématologiques et biochimiques chez les volontaires ayant participé aux études de vaccin contre le paludisme Pfs25-230D1M-EPA/AS01 à Bancoumana Mali**

## THESE

Présentée et soutenue publiquement le 28 / 05 / 2019 devant le jury de la Faculté de Pharmacie du Mali

Par :

***M. Modibo TRAORE***

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

### Jury

**Président :** Professeur Mahamadou Ali THERA  
**Membres :** Docteur Issaka SAGARA  
Docteur Merepen dite Agnès GUINDO  
**Co-directeur :** Docteur Amatigué ZEGUIME  
**Directeur de Thèse :** Professeur Amagana DOLO



## FACULTÉ DE PHARMACIE



### LISTE DES MEMBRES DE L'ADMINISTRATION ET DU CORPS ENSEIGNANT A LA FACULTÉ DE PHARMACIE ANNEE UNIVERSITAIRE 2018-2019

#### ADMINISTRATION

**DOYEN** : M. Boubacar TRAORE, Professeur

**VICE-DOYEN** : M. Ababacar MAIGA, Professeur

**SECRÉTAIRE PRINCIPAL** : M. Seydou COULIBALY, Administrateur Civil

**AGENT COMPTABLE** : M. Famalé DIONSAN, Contrôleur des Finances.

#### LES PROFESSEURS HONORAIRES

M. Boubacar	Sidiki CISSE	Toxicologie
M. Mahamadou	CISSE	Biologie
M. Daouda	DIALLO	Chimie Générale et Minérale
M. Souleymane	DIALLO	Bactériologie, Virologie
M. Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
M. Ousmane	DOUMBIA	Chimie thérapeutique
M. Boulkassoum	HAÏDARA	Législation
M. Gaoussou	KANOUTE	Chimie Analytique
M. Alou A.	KEÏTA	Galénique
M. Mamadou	KONE	Physiologie
M. Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
M. Brehima	KOUMARE	Bactériologie/Virologie
M. Abdourahamane S.	MAÏGA	Parasitologie
M. Elimane	MARIKO	Pharmacologie

#### DER : SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES

##### 1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE

M. Mounirou	BABY	Hématologie
M. Bakary M.	CISSE	Biochimie
M. Abdoulaye	DABO	Biologie/Parasitologie
M. Mahamadou	DIAKITE	Immunologie-Génétique
M. Alassane	DICKO	Santé Publique

M. Amagana	DOLO	Parasitologie-Mycologie
M. Akory Ag	IKNANE	Sante publique/ Nutrition
M. Ousmane	KOITA	Biologie-Moléculaire
M. Boubacar	TRAORE	Parasitologie-Mycologie

## 2. MAITRES DE CONFÉRENCES/MAITRE DE RECHERCHE

M. Flabou	BOUGOUDOGO	Bactériologie-Virologie
M. Abdoulaye	DJIMDE	Parasitologie-Mycologie
M. Aldjouma	GUINDO	Hématologie
M. Kassoum	KAYENTAO	Sante publique/ Bio-statistique
M. Bourèma	KOURIBA	Immunologie, Chef de DER
M. Issaka	SAGARA	Bio-statistique
M. Mahamadou Soumana	SISSOKO	Bio-statistique
M. Ousmane	TOURE	Santé Publique/ Santé environnement

## 3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGE DE RECHERCHE

M.Mohamed	AG BARAIKA	Bactériologie-virologie
M. Charles	ARAMA	Immunologie
M.Boubacar Tiétié	BISSAN	Biologie clinique
M. Djibril Mamadou	COULIBALY	Biochimie clinique
M.Seydou Sassou	COULIBALY	Biochimie clinique
M. Antoine	DARA	Biologie Moléculaire
M. Souleymane	DAMA	Parasitologie-Mycologie
Mme.Djénèba Koumba	DIABITAO	Biologie moléculaire
M.Laurent	DEMBELE	Biotechnologie microbienne
M.Klétigui Casimir	DEMBELE	Biochimie clinique
M. Seydina S. A.	DIAKITE	Immunologie
M.Yaya	GOÏTA	Biochimie clinique
M. Ibrahima	GUINDO	Bactériologie Virologie
Mme.Aminatou	KONE	Biologie Moléculaire
M.Birama Apho	LY	Santé publique

M.Dinkorma	OUOLOGUEM	Biologie cellulaire
M.Samba Adama	SANGARE	Bactériologie
M. Fanta	SANGHO	Santé publique

#### **4. ASSISTANTS/ATTACHE DE RECHERCHE**

M. Djeneba	COULIBALY	Nutrition/Diététique
M. Issa	DIARRA	Immunologie
Mme. Fatou	DIAWARA	Epidémiologie
Mme Merepen dit Agnès	GUINDO	Immunologie
M. Oumar	GUINDO	Epidémiologie
M. Falaye	KEÏTA	Santé publique/Santé environnement
Mme. N'Deye Lailah Nina	KOITE	Nutrition
M. Amadou Birama	NIANGALY	Parasitologie-Mycologie
M. Oumar	SANGHO	Epidémiologie
M. Diakaridja	TRAORE	Hématologie

#### **DER : SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

##### **1. PROFESSEURS/DIRECTEUR DE RECHERCHE**

M. Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
M. Saïbou	MAÏGA	Législation
Mme.Rokia	SANOGO	Pharmacognosie Chef de DER

##### **2. MAITRES DE CONFÉRENCES/MAITRE DE RECHERCHE**

Néant

##### **3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE**

M. Loséni	BENGALY	Pharmacie hospitalière
M. Bakary M.	CISSE	Galénique
M. Yaya	COULIBALY	Législation
M. Issa	COULIBALY	Gestion
M Balla F.	COULIBALY	Pharmacie Hospitalière
M. Mahamane	H Aidara	Pharmacognosie
M .Hama Boubacar	MAÏGA	Galénique
M. Moussa	SANOGO	Gestion

Mme .Adiaratou TOGOLA Pharmacognosie

#### **4. ASSISTANTS/ATTACHE DE RECHERCHE**

M. Seydou L COULIBALY Gestion Pharmaceutique  
M. Daouda L. DEMBELE Pharmacognosie  
M. Adama DENOUE Pharmacognosie  
M. Sekou DOUMBIA Pharmacognosie  
Mme Assitan KALOGA Législation  
M. Ahmed MAÏGA Législation  
Mme Aïchata B. A. MARIKO Galénique  
M. Aboubacar SANGHO Législation  
M. Bourama TRAORE Législation  
M. Karim TRAORE Sciences Pharmaceutiques  
M. Sylvestre TRAORE Gestion Pharmaceutique  
Mme Aminata T. TRAORE Pharmacie Hospitalière  
M. Mohamed dit S TRAORE Pharmacie Hospitalière

#### **DER : SCIENCES DU MÉDICAMENT**

##### **1. PROFESSEURS/DIRECTEUR DE RECHERCHE**

M. Benoit Yaranga KOUMARE Chimie Analytique  
M. Ababacar I. MAÏGA Toxicologie

##### **2. MAITRES DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE**

M Sékou BAH Pharmacologie, Chef de DER

##### **3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGE DE RECHERCHE**

M. Dominique P. ARAMA Pharmacie Clinique  
M. Mody CISSE Chimie Thérapeutique  
M. Ousmane DEMBELE Chimie Thérapeutique  
M. Tidiane DIALLO Toxicologie  
M. Hamadoun Abba TOURE Bromatologie

##### **4. ASSISTANTS/ATTACHE DE RECHERCHE**

M. Mahamadou BALLO Pharmacologie  
Mme Dalaye B. COULIBALY Chimie Analytique

M. Blaise	DACKOUO	Chimie Analytique
Mme Fatoumata	DAOU	Pharmacologie
M. Abdourahamane	DIARA	Toxicologie Bromatologie
M. Aiguerou dit A.	GUINDO	Pharmacologie
M. Madani	MARIKO	Chimie Analytique
M. Mohamed E. B	NACO	Chimie Analytique
M. Mahamadou	TANDIA	Chimie Analytique
M. Dougoutigui	TANGARA	Chimie Analytique

## **DER : SCIENCES FONDAMENTALES**

### **1. PROFESSEURS/DIRECTEUR DE RECHERCHE**

M. Moctar	DIALLO	Biologie / Chef de DER
M. Cheick F	TRAORE	Biologie/ Entomologie
M.Mamadou	TRAORE	Génétique

### **2. MAITRES DE CONFÉRENCES/MAITRE DE RECHERCHE**

M.Lassana	DOUMBIA	Chimie appliquée
-----------	---------	------------------

### **3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE**

M. Abdoulaye	KANTE	Anatomie
M. Boureima	KELLY	Physiologie Médicale

### **4. ASSISTANTS/ATTACHE DE RECHERCHE**

M. Seydou SIMBO	DIAKITE	Chimie Organique
M. Modibo	DIALLO	Galénique
M. Mamadou Lamine	DIARRA	Botanique-Biologie végétale
M.Moussa	KONE	Chimie organique
M. Massiriba	KONE	Biologie Entomologie

### **CHARGES DE COURS (VACATAIRES)**

M. Cheick O.	BAGAYOKO	Informatique
M. Babou	BA	Anatomie
M. Adourahamane	COULIBALY	Anthropologie Médicale
M. Souleymane	COULIBALY	Psychologie de la Santé

M. Bouba	DIARRA	Bactériologie
M. Modibo	DIARRA	Nutrition
M. Moussa I	DIARRA	Biophysique
M. Babacar	DIOP	Chimie
M. Atimé	DJIMDE	Bromatologie
M. Yaya	KANE	Galénique
M. Boubacar	KANTE	Galénique
M. Aboubakary	MAÏGA	Chimie organique
M. Massambou	SACKO	SCMP/SIM
M. Modibo	SANGARE	Anglais
M. Sidi B.	SISSOKO	Histologie-Embryologie
Mme Fatoumata	SOKONA	Hygiène du Milieu
M. Fana	TANGARA	Maths
M. Abdel K.	TRAORE	Pathologies Médicales
Mme. Djenebou	TRAORE	Sémiologie et Pathologie médicale
M. Boubacar	ZIBEÏROU	Physique

## **DEDICACE**

Je dédie ce présent travail,

**A Dieu le Tout Puissant le Clément et le Miséricordieux ;** Que soit loué ici Dieu pour m'avoir donné la durée de vie, le courage et la mentalité nécessaire à la réalisation de ce travail. J'implore ton pardon pour toutes mes fautes commises et formule ici les vœux que tu me donnes une longue vie et guides mes pas dans l'avenir.

**A la mémoire de mon père feu Djigui TRAORE ;** je m'incline devant la volonté de DIEU qui t'a arraché à notre affection pendant que j'étais non loin de devenir pharmacien, un métier que tu admirais tant. Tu étais présent à tout moment que j'avais besoin de toi. Tu as fait tout ce qu'un bon père puisse faire pour son enfant. Toi qui m'as appris le sens de l'honneur, du respect, de la dignité, de l'amour du prochain et j'en passe. Une chose est sûre, tous ceux-ci vont me servir dans la vie. Tu resteras toujours gravé dans ma mémoire. Cher père qu'ALLAH accueille ton âme dans son paradis (Amen).

**A la mémoire de mon feu grand frère Soumaïla TRAORE ;** qui nous a abandonné dans la nostalgie éternelle à l'âge de 36 ans quand j'étais presque au terme de ce travail. Qu'ALLAH accueille ton âme dans son paradis (Amen).

**A mes mères Yassa DIABATE, Diéty DOUMBIA ;** vous qui m'avez mis au monde et élevé avec beaucoup d'amour malgré tous les dérangements que je vous ai fait subir. Vous m'avez toujours soutenu et redonné l'espoir aux moments difficiles. Ce travail est le fruit de vos engagements et de votre courage. Qu'ALLAH puisse vous prêter longue vie et me garder longtemps à vos côtés pour vous servir (Amen) !

**Mes frères et sœurs N'gnélé, Sy, Bintou, Moussa, Doussou, Drissa, Oumou, Mamadou, Adama, Awa, Aïssata, Aminata, Bakary, Oumar, Ramatou, Alou, Koké ;** Le soutien social dont j'ai bénéficié de votre part a été d'un appui inestimable pour la réalisation de ce travail. Puisse Dieu renforcer la solidarité au sein de la famille.

**A ma femme bien aimée Mariam DOUMBIA ;** Tu as su me supporter pendant cette période si difficile. Tu m'as accepté comme tel et m'as aimé malgré ma situation socio-économique difficile. Sache que je n'oublierai jamais ton aide et je prie le bon Dieu pour qu'il te donne une longue vie et beaucoup de Sa grâce.

**A mes enfants Djigui dit Brahima, Tamba et Noumory :** Vous ne savez pas à quel point je vous adore, Soyez rassurés de mon amour. Qu'ALLAH vous donne le courage de surmonter les pas de votre père et une vie pleine de prospérité de bonheur et de santé. Trouvez dans ce travail l'expression de ma plus haute considération



**A mes amis Sinaly YOROTE, Diakaridia KEITA, Kanimory S BAGAYOKO** : vous avez été plus qu'un ami pour moi. Je me souviendrais toujours des moments durs et agréables vécus ensemble. Je demande au tout puissant de renforcer davantage notre relation et de réaliser tous nos vœux. Bonne chance! Et courage dans la vie

## **REMERCIEMENTS**

A tous les Professeurs responsables de cours à la faculté de Pharmacie (FAPH) et à la faculté de Médecine et d'Odonto-Stomatologie (FMOS), pour la qualité de l'enseignement que nous avons reçu d'eux.

**A mon très cher Professeur Brahima CAMARA Doyen de la FLSL** : pour votre conseil, votre soutien matériel et moral. Vous êtes la première personne soucieuse des études des enfants de notre quartier plus particulièrement de ma personne. Je vous remercie pour votre humanisme, vos encouragements ; votre disponibilité, l'assistance et votre ouverture d'esprit à mon égard. Ce travail est le fruit de vos efforts. Trouvez en ce travail, l'expression de ma profonde gratitude et de ma reconnaissance.

**Aux Dr Agnes GUINDO, Dr Assadou MAIGA, Dr Mamady KONE, Dr Kourane SISSOKO, Dr Sibiri SISSOKO, Dr Bouran SIDIBE, Dr Mohamed Lamine MAIGA, Dr KATILE, Dr KAMATE, Dr Bayaya HAIDARA, Dr Boucar DEMBELE, Dr Sadio K DIARRA, Dr Seydou SANKARE**, merci pour la formation reçue, pour vos conseils et votre disponibilité. Trouvez ici l'expression de ma profonde gratitude.

**A Dr Sidiki PEROU**, pour sa participation physique, morale et intellectuelle. Les mots me manquent pour vous exprimer ma vive reconnaissance et ma gratitude. Merci à vous, je vous souhaite santé, bonheur et succès dans toutes vos activités. Je vous en serais toujours reconnaissant.

**Mes profonds remerciement à tout le personnel du Cap-Lab Dr Amatigue ZEGUIME, Syntri SANOGO, M'Bouye DOUCOURE Moussa B KANOUTE, Aichata Djoba DOUMBIA, Bourama SAMAKE, Drissa DEMBELE, Ali TOGORA, Korotoumou GOITA, Boucary OUOLOGUEM, Souleymane TRAORE, Alaye TOLO, Baba DJIGUIBA**, merci pour vos conseils et vos soutiens

**A tous les internes du MRTC / DEAP**, en particulier **A. OUATTARA, B. COULIBALY, B. TOGO, A. DJIGUIBA, H. DOUCOURE**, mes remerciements et mes encouragements.

**A toute la 9<sup>ème</sup> promotion du Numerus clausus de la FAPH (Promotion N'Golo DIARRA).**

**A mes camarades de classe Dr Adama GUINDO, Dr Abdoul K DIALLO.**

**Aux personnels de la pharmacie LOTHIOZAN**. Merci de m'avoir accueilli à bras ouverts. Je vous en serai toujours reconnaissant.

**A tout le personnel du MRTC/DEAP** merci pour votre humanisme

**A la chefferie de quartier Sibiribougou** : pour vos nombreuses prières et bénédictions à mon égard. Merci pour Tout.

## **HOMMAGE AUX MEMBRES DU JURY**

### **A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DU JURY**

#### **Professeur Mahamadou Ali THERA**

- ❖ Professeur Titulaire de Parasitologie-Mycologie à la FMOS,
- ❖ Directeur Scientifique du Bandiagara Malaria Project (BMP),
- ❖ Chef, de l'Unité de Développement Clinique du Vaccin Antipaludique au Mali (MVCDU).
- ❖ Chevalier de l'Ordre National du Mali

Cher Maitre,

Vous nous avez accordé un immense honneur et un grand privilège en acceptant la présidence de notre jury de thèse. Nous vous remercions aussi pour la gentillesse et la spontanéité avec lesquelles vous nous avez accueillis. Nous vous prions, cher Maître, d'accepter dans ce travail le témoignage de notre haute considération, de notre profonde reconnaissance et de notre sincère respect.

## **A NOTRE MAITRE ET JUGE DE THESE**

### **Docteur Issaka SAGARA**

- ❖ Médecin chercheur et Biostatisticien au MRTC/DEAP/FMOS-FAPH,
- ❖ Chef de l'unité Data Management et Biostatistique au MRTC/DEAP/FMOS de Bamako.
- ❖ Investigateur principal (PI) des essais vaccinaux à Bancoumana, Donéguébougou et Sotuba.

Cher Maître,

Nous vous remercions vivement pour l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail. Votre compétence, votre dynamisme, ainsi que vos qualités humaines et professionnelles exemplaires ont toujours suscité notre admiration. Qu'il soit permis, cher Maître, de vous exprimer notre sincère reconnaissance, notre profond respect et notre plus grande estime.

## **A NOTRE MAITRE ET JUGE DE THESE**

### **Docteur Merepen dite Agnès GUINDO**

- ❖ Assistante en Immunologie à la FAPH
- ❖ Pharmacienne chercheur au MRTC/DEAP/FMOS-FAPH

Cher Maître,

Nous vous remercions vivement pour l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail. Nous sommes très sensibles à votre gentillesse, votre accueil très aimable, votre volonté d'enseigner et à votre profond humanisme. Que ce travail soit pour nous l'occasion de vous exprimer notre admiration ainsi que notre gratitude. Veuillez croire, chère Maître, en nos sentiments les plus respectueux

## **A NOTRE MAITRE ET CO-DIRECTEUR DE THESE**

**Docteur Amatigué ZEGUIME**

- ❖ Lab manager du Cap-Lab. DEAP/MRTC
- ❖ Pharmacien chercheur DEAP/MRTC.

Cher Maître,

Nous ne saurons jamais trouver assez de mots pour vous témoigner notre reconnaissance, non seulement pour l'intérêt que vous portez à ce travail, mais aussi, la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de codiriger cette thèse. Veuillez accepter cher Maître, le témoignage de notre profond respect et de notre sincère gratitude.

## **A NOTRE MAITRE ET DIRECTEUR DE THESE**

### **Professeur Amagana DOLO**

- ❖ Professeur Titulaire de Parasitologie-Mycologie à la FAPH
- ❖ Directeur de l'Ecole Doctorale des Sciences et des Technologies du Mali (EDSTM)
- ❖ Chef de l'équipe de la pharmacie du MRTC/DEAP

Cher Maitre,

Merci pour nous avoir accueilli dans votre service, pour la confiance que vous nous avez accordé du début à la fin de ce travail et pour votre disponibilité. Vous n'avez jamais lésiné ni sur votre temps ni sur votre savoir tout le long de ce travail. Merci pour votre soutien, votre patience, vos encouragements et votre optimisme infaillible. Nous vous prions de trouver ici, cher Professeur, le témoignage de notre profonde reconnaissance et de notre immense respect.

## **SIGLES ET ABREVIATIONS:**

**AGC** : Absolute Granulocyte Count (nombre de granulocytes)

**ALAT**: Alanine Aminotransférase

**ALC** : Absolute Lymphocyte Count (nombre de lymphocytes)

**AMA**: Antigen Membrane Apical

**ANC** : Absolute Neutrophile Count (nombre de neutrophiles)

**ARNm**: Acide ribonucléique messenger

**ASAT**: Aspartate Aminotransférase

**CCMH**: Concentration Corpusculaire (ou globulaire) Moyenne en Hémoglobine

**CD** : Cluster of Differentiation (Grappe de Différenciation)

**CLHP**: Chromatographie en phase Liquide de Haute Performance

**CMH**: Complexe Majeur d'Histocompatibilité

**CQ**: Contrôle de Qualité

**Cr** : Créatinine sérique

**CSCOM**: Centre de Santé Communautaire

**CSP**: Circum Sporozoite Protein (Protéine de Surface)

**CTA**: Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine

**DEAP** : Département d'Epidémiologiques des Affections Parasitaires

**DDT**: Dichloro Diphenyl Trichloroéthane

**EDTA**: Ethyle Diamine Tétra Acétique

**ELISA**: Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay

**ET**: Ecart-Type

**FDA**: Food and Drug Administration

**FLSL** : Faculté des Lettres, des Langues et des Sciences du Langage ;

**FMPOS** : Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie

**G**: Giga

**g**: Gramme

**G6PD**: Glycose-6-Phosphate Déshydrogénase

**Gf** : Gamétocyte *falciparum*

**GR**: Globule Rouge



**Hb:** Hémoglobine  
**ID:** Identification  
**IFN:** Interféron  
**IL:** Interleukine  
**IOP:** Insuffisance Ovarienne Précoce  
**IP:** Indice Plasmodique  
**IS:** Indice Splénique  
**l:** Litre  
**mEq:** Milliéquivalent  
**mm:** Millimètre  
**mmol:** Millimole  
**MRTC:** Malaria Research and Training Center  
**MSP:** Mérozoïte Surface Protein  
**MV :** Malaria Vaccine  
**NFS:** Numération Formule Sanguine  
**NIAID:** National Institute of Allergy and Infection Disease  
**OHRP:** Office for Human Research Protection  
**OMS:** Organisation Mondiale de la Santé  
**PCR:** Polymerase Chain Reaction  
**Pfs :** *Plasmodium falciparum*  
**pg:** Picogramme  
**pH:** Potentiel d'Hydrogène  
**RN:** Route Nationale  
**RTS, S:** Fusion protéique entre l'antigène circum sporozoïte protéin du *Plasmodium falciparum*, Antigène de surface de virus de l'hépatite B (HbsAg)  
**SOP:** Standard Operating Procedure (Procédures Standard Opératoires ou normalisées)  
**SP:** Sulfadoxine-Pyriméthamine  
**SRCU:** Unité du Conteneur d'Échantillons et de Réactifs  
**SST:** Serum Separator Tube  
**TCMH:** Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine  
**TGO:** Transaminases Glutamique-Oxalo-Acétique

**TGP:** Transaminases Glutamique-Pyruvique

**TIE:** Taux d'Inoculation Entomologique

**UI:** Unité Internationale

**μmol:** Micromole

**USTTB :** Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako

**VGM:** Volume Globulaire Moyen

**VH:** Virus de l'Hépatite

**VIH:** Virus de l'Immunodéficience Humaine

Table des matières

<b>DEDICACE</b> .....	VIII
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	X
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>Pages</b> ..... XXI
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>Pages</b> ..... XXII
<b>I. INTRODUCTION :</b> .....	1
<b>II. OBJECTIFS DE L'ETUDE :</b> .....	4
<b>II.1 Objectif général :</b> .....	4
<b>II.2 Objectifs spécifiques :</b> .....	4
<b>III. GENERALITES :</b> .....	5
<b>III.1 L'HEMOGLOBINE</b> .....	5
<b>III.1.1 La structure</b> .....	5
<b>III.1.2 La synthèse</b> .....	6
<b>III.1.3 La fonction</b> .....	7
<b>III.2 LES VARIANTS NORMALES ET ANORMALES DE L'HEMOGLOBINE</b> .....	7
<b>III.2.1 Les hémoglobines normales</b> .....	7
<b>III.2.2 Les hémoglobines anormales</b> .....	8
<b>III.2.3 Techniques de détermination des variants d'hémoglobine :</b> .....	12
<b>III.3 LE PALUDISME, LE PARASITE, <i>Plasmodium falciparum</i> ET L'ANOPHÈLE</b> .....	12
<b>III.3.1 HISTORIQUE</b> .....	12
<b>III.3.2 EPIDÉMIOLOGIE</b> .....	14
<b>III.3.3 CAUSES</b> .....	17
<b>III.4 PROTECTION ANTIPALUDIQUE CONFEREE PAR LES HEMOGLOBINOPATHIES</b> .....	19
<b>III.5 DES DÉFENSES POUR L'HÔTE : L'IMMUNITÉ ANTI PALUSTRE</b> .....	20
<b>III.5.1 Immunité naturelle :</b> .....	20
<b>III.5.2 Immunité acquise de type "prémunition" :</b> .....	20
<b>III.5.3 Mécanismes de protection :</b> .....	20
<b>III.5.4 Vaccination Anti-palustre</b> .....	21
<b>III.5.5 Les différents types de vaccins anti-palustres</b> .....	21
<b>III.5.6 Des défenses pour l'hôte : les facteurs génétiques</b> .....	23
<b>III.6 LES PARAMETRES HEMATOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES :</b> .....	24
<b>III.6.1 Paramètres Hématologiques :</b> .....	24
<b>III.6.2 Paramètres Biochimiques :</b> .....	26
<b>IV. METHODOLOGIE :</b> .....	29
<b>IV.1 Site d'étude :</b> .....	29

<b>IV.2</b>	<b>Période d'étude</b> .....	30
<b>IV.3</b>	<b>Population d'étude :</b> .....	30
<b>IV.4</b>	<b>Type d'étude</b> .....	30
<b>IV.5</b>	<b>Critères d'inclusion et de non inclusion</b> .....	31
<b>IV.5.1</b>	<b>Critères d'inclusion</b> .....	31
<b>IV.5.2</b>	<b>Critères de non inclusion</b> .....	31
<b>IV.6</b>	<b>Déroulement et procédures de l'étude</b> .....	31
<b>IV.6.1</b>	<b>Consentement</b> .....	31
<b>IV.6.2</b>	<b>Le dépistage</b> .....	32
<b>IV.7</b>	<b>Techniques de Laboratoire</b> .....	32
<b>IV.7.1</b>	<b>Diagnostic du Paludisme</b> .....	32
<b>IV.7.2</b>	<b>Technique de détermination des paramètres hématologiques :</b> .....	33
<b>IV.7.3</b>	<b>Technique de détermination des paramètres biochimiques :</b> .....	33
<b>IV.7.4</b>	<b>Technique de détermination des variants d'hémoglobine avec le D-10 :</b> .....	33
<b>IV.8</b>	<b>Considération Ethique :</b> .....	34
<b>IV.9</b>	<b>Collecte, Traitement et Analyses des données :</b> .....	34
<b>V.</b>	<b>RESULTATS:</b> .....	36
<b>V.1</b>	<b>RESULTATS SOCIO-DEMOGRAPHIQUES :</b> .....	36
<b>V.2</b>	<b>RESULTATS DE LA PARASITEMIE :</b> .....	37
<b>V.3</b>	<b>RESULTATS DES PARAMETRES HEMATOLOGIQUES :</b> .....	38
<b>V.4</b>	<b>RESULTATS DES PARAMETRES BIOCHIMIQUES :</b> .....	39
<b>VI.</b>	<b>COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS :</b> .....	40
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS</b> .....	43
	<b>REFERENCES</b> .....	45
	<b>RESUME</b> .....	50
	<b>ANNEXES</b> .....	XVI

<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>Pages</b>
<b>Figure 1</b> : Molécule de l'hème .....	5
<b>Figure 2</b> : Structure de l'hémoglobine : tétramère constitué de quatre chaînes de globine identiques deux à deux et de quatre molécules d'hème renfermant chacune un atome de fer.....	6
<b>Figure 3</b> : Organisation des gènes de globine sur les chromosomes 11 et 16.....	6
<b>Figure 4</b> : Evolution de la synthèse des différentes chaînes de globine au cours de la vie.....	7
<b>Figure 5</b> : Hématies falciformes (ou drépanocytes) au microscope électronique à balayage (à gauche) et au microscope optique sur frottis sanguin (à droite).....	10
<b>Figure 6</b> . Frottis sanguin d'un cas d'hémoglobinose C homozygote avec nombreuses hématies cibles et microsphérocytes.....	11
<b>Figure 7</b> : risque de contamination par <i>P. falciparum</i> pour un séjour de moins d'un mois....	17
<b>Figure 8</b> : Cycle de vie du <i>Plasmodium falciparum</i> . .....	18
<b>Figure 9</b> : Différents types de vaccins antipaludiques et leurs cibles. ....	23
<b>Figure 10</b> : Carte montrant le site d'étude, Bancoumana, Mali.....	30
<b>Figure 11</b> : Courbe de survenu de l'infection a <i>Plasmodium</i> selon les variants de l'hémoglobine .....	37
<b>Figure 12</b> : Technique de lecture d'une lame.....	XVII
<b>Figure 13</b> : schémas de confection d'un frotti.....	XVIII
<b>Figure 14</b> : Ecran de l'appareil ABX Pentra C200 après la connexion .....	XXI
<b>Figure 15</b> : Ecran principal de l'appareil ABX Pentra C200 .....	XXI
<b>Figure 16</b> : Ecran de l'inventaire des réactifs .....	XXII
<b>Figure 17</b> : fenêtre d'enregistrement de contrôle .....	XXV
<b>Figure 18</b> : illustration de la position du tube sur porte échantillon .....	XXVI
<b>Figure 19</b> : fenêtre d'analyse des échantillons .....	XXIX

<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>Pages</b>
<b>Tableau I</b> : Nomenclature des principales hémoglobines anormales par ordre alphabétique...9	
<b>Tableau II</b> : Les valeurs normales du taux d'hémoglobine (Hb) sanguin.....25	
<b>Tableau III</b> : les valeurs de la créatininémie.....27	
<b>Tableau IV</b> : Répartition de la population d'étude selon le sexe.....35	
<b>Tableau V</b> : Fréquence des variants d'hémoglobine dans la population d'étude .....35	
<b>Tableau VI</b> : Fréquence des variants d'hémoglobine selon le sexe.....35	
<b>Tableau VII</b> : Taux moyen de la parasitémie à <i>Plasmodium falciparum</i> selon le type d'hémoglobine aux différentes .....36	
<b>Tableau VIII</b> : Fréquence des espèces plasmodiales selon les variants d'hémoglobines.....36	
<b>Tableau IX</b> : Taux moyen des paramètres Hématologiques selon le type d'hémoglobine.....37	
<b>Tableau X</b> : Taux moyen des paramètres biochimiques selon le type d'hémoglobine .....38	

## I. INTRODUCTION :

Les hémoglobines sont les composantes principales des hématies sous formes de pigments, elles ont pour rôle principal, le transport de l'oxygène des poumons vers les tissus, ainsi que l'élimination du dioxyde de carbone des tissus vers les poumons. Elles participent ainsi au maintien du pH intra érythrocytaire [1].

Une mutation de l'un des gènes codant pour les chaînes de globine peut aboutir à une hémoglobinopathie, correspondant soit à une anomalie qualitative ou quantitative de l'hémoglobine. Les anomalies qualitatives de l'hémoglobine, ou hémoglobinoses, sont liées à la production des variants de l'hémoglobine constituée d'une chaîne de globine anormale, les plus fréquentes étant les hémoglobines Glu6Val (**HbS**), Glu6Lys (**HbC**) et Glu26Lys (**HbE**). Les anomalies quantitatives, appelées thalassémies, correspondent à un déficit partiel ou complet de la synthèse de globine, sans altération de la protéine [2].

Avec plus de 300 000 naissances d'individus affectés par an, les anomalies qualitatives et quantitatives de l'hémoglobine figurent parmi les anomalies génétiques les plus fréquentes dans le monde [2].

En Afrique sub-Saharienne 10-30% de la population porte le gène de l'HbS et la même proportion serait porteuse de HbC [3].

Au Mali les taux de prévalence pour les hémoglobinoses S et C variaient respectivement selon les régions entre 1,2 - 20 %, et 0 - 18 % [3].

Le gène de la drépanocytose est devenu courant en Afrique parce que le trait drépanocytaire confère une résistance au paludisme à *P. falciparum* au cours d'une période critique de la petite enfance, favorisant la survie de l'hôte et donc la transmission ultérieure du gène anormal.

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé lors de la cent dix-septième session du conseil exécutif du 22 décembre 2005, on constate que la drépanocytose est à l'origine de l'équivalent de 5 % des décès d'enfants de moins de cinq ans sur le continent africain. Dans certaines parties de l'Afrique Subsaharienne elle touche jusqu'à 2% des nouveau-nés. La prévalence du trait drépanocytaire (porteur sain n'ayant hérité qu'un gène muté d'un seul de ses parents) atteint 10 à 40 % en Afrique équatoriale, de 1 à 2 % en Afrique du Nord et de moins de 1 % en Afrique du Sud.

Aux États-Unis, les individus atteignant l'âge adulte, une telle mutation ne pouvait "survivre" que sous une forme hétérozygote, associant hémoglobine A et hémoglobine S. La présence du trait drépanocytaire protège contre le risque de décès par malaria. Les enfants hétérozygotes voient leur risque de mourir par malaria réduit comme suit : enfants hétérozygotes AC, de 29% ; hétérozygotes AS de 73% [4]. Dès 1946, Beet observe une résistance meilleure à la malaria des

patients drépanocytaires. Bien que les individus hétérozygotes aient l'avantage de la résistance contre le paludisme, il est à noter que la forme homozygote est létale malgré l'amélioration apportée par l'avancée de la médecine. La mutation "falciforme" est à double tranchant, transmettant à la communauté des avantages et des inconvénients. En termes de génétique, la distribution de la drépanocytose augmente les chances de survie pour les porteurs hétérozygotes, équilibrant le prix de l'anémie falciforme [5].

A nos jours, plus de 800 variants d'hémoglobine ont été décrits. Toutefois, la majorité des variants de l'hémoglobine sont asymptomatiques et sont donc découverts fortuitement [6]. Quelques dizaines de variants seulement ont une importance clinique, dont l'hémoglobine S, responsable de la drépanocytose, et découverte en 1949 par Pauling *et al.* [7]. Il s'agit de la plus fréquente des hémoglobinopathies, notamment en Afrique subsaharienne, mais également aux Antilles, en Inde, au Moyen-Orient et dans le bassin méditerranéen [8,9]. Toutefois, du fait des migrations de populations, les différentes hémoglobinopathies se sont répandues dans tous les pays.

Le deuxième variant de l'hémoglobine le plus fréquent, après l'hémoglobine S, est l'hémoglobine C [10,6]. Celle-ci serait originaire du plateau voltaïque et se serait propagée par diffusion concentrique. Elle est ainsi très répandue dans les zones impaludées de l'Afrique de l'Ouest, notamment au niveau du golfe du Bénin, au Ghana et aux Antilles françaises.

Le troisième variant de l'hémoglobine le plus fréquent est l'hémoglobine E, très présente notamment en Asie du Sud-Est [11]. L'hémoglobinose E se présente donc comme une thalassémie discrète. Les sujets hétérozygotes (A/E) sont asymptomatiques, tandis que les sujets homozygotes (E/E) présentent une discrète anémie hémolytique microcytaire et légèrement hypochrome en général bien tolérée [10].

En Afrique, sur les anomalies quantitatives, seule l'alpha thalassémie-2, est présente dans sa forme modérée. Elle n'a aucune conséquence clinique chez le porteur, mais elle peut interférer avec l'hémoglobine S. Par exemple, l'alpha thalassémie entraîne une diminution du taux d'hémoglobine S chez les sujets AS [12].

Des facteurs génétiques confèrent une résistance, en particulier des facteurs de résistance érythrocytaires : modifications de la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine (HbS, HbC, HbE), modifications des taux de synthèse des chaînes de globine (thalassémies).

En Afrique subsaharienne, il est admis que le paludisme est dû à *P. falciparum* et à *P. malariae*, plus rarement à *P. ovale* [13]. Dans une étude à Bandiagara, une région sahélienne du Mali, en Afrique de l'Ouest où la population est à majorité Duffy négative, on a observé 1 à 3 occurrences d'infections à *P. vivax* chez chacun des 25 enfants Duffy négatifs inclus dans l'étude. L'anémie,



cependant, était la principale expression clinique de l'infection. *Plasmodium vivax* pourrait devenir un fardeau pour l'Afrique subsaharienne en cas de réduction de la prévalence de *P. falciparum*. Les preuves de la circulation autochtone de *P. vivax* doivent être prises en compte dans la conception des stratégies de contrôle et d'élimination du paludisme en Afrique. [14].

Les échecs des campagnes d'éradication menées jusqu'à présent sont essentiellement dus à la résistance acquise du vecteur, anophèle femelle, aux insecticides et celle progressive du parasite aux antipaludiques classiques notamment à la chloroquine. Aujourd'hui, pratiquement tous les médicaments antipaludiques semblent être touchés à des degrés divers par la chimiorésistance qui s'étend géographiquement et en intensité. De plus l'emploi d'antipaludiques efficaces telles que l'amodiaquine ou l'association sulfadoxine/pyriméthamine a dû être réduit à cause d'effets secondaires sérieux [15].

Les vaccins constituent à cet effet les outils privilégiés de lutte contre les maladies infectieuses, les outils le plus bénéfiques en santé publique. De nouvelles stratégies de lutte anti palustres deviennent nécessaires. La vaccination en diminuant l'incidence des accès palustres, sera un atout majeur dans la lutte contre ce fléau [15].

Pfs25 et Pfs230, des antigènes de surface exprimés chez le moustique (zygote et ookinète) et chez l'homme (gamétocyte) de *P. falciparum*, sont des candidata principaux pour un vaccin bloquant la transmission du paludisme. Un vaccin pouvant interrompre la transmission du paludisme serait un outil précieux pour l'élimination locale ou l'éradication de cette maladie et pourrait contenir les composants permettant le blocage de la transmission chez le moustique (comme Pfs25 ou Pfs230) ou ceux pouvant prévenir l'infection chez l'homme (comme le vaccin RTS, S). [16].

Bronner P. Gonçalves et al, en 2017 montre l'impact des hémoglobinopathies sur les parasites du paludisme dans une étude sur les variants de l'hémoglobine qui façonnent la distribution des parasites du paludisme dans les populations et leur possibilité de transmission.

Nous n'avons pas eu d'étude sur l'impact des variants de l'hémoglobine sur les paramètres hématologiques et biochimiques dans notre recherche.

L'hémoglobine étant la composante principale de l'hématie et que l'hématie représente 80% du sang total ; dans le souci d'avoir un bon résultat à l'essai clinique d'un vaccin contre le paludisme, notre étude avait pour but l'identification des variants d'hémoglobine en vue d'évaluer leur fréquence et leur impact sur la parasitémie, les paramètres hématologiques et biochimiques chez les volontaires ayant participé à l'étude du vaccin Pfs25-230/AS01 à Bancoumana, Mali

## **II. OBJECTIFS DE L'ETUDE :**

### **II.1 Objectif général :**

Evaluer la fréquence des variants d'hémoglobine et son impact sur la parasitémie à *Plasmodium*, les paramètres hématologiques et biochimiques.

### **II.2 Objectifs spécifiques :**

- ✓ Déterminer la prévalence des variants d'hémoglobine dans la population d'étude ;
- ✓ Déterminer le taux moyen de la parasitémie en fonction des variants d'hémoglobine;
- ✓ Etablir une relation entre les variants d'hémoglobines et la survenue d'infection palustre ;
- ✓ Déterminer le taux moyen des paramètres hématologiques et biochimiques en fonction des variants d'hémoglobine.

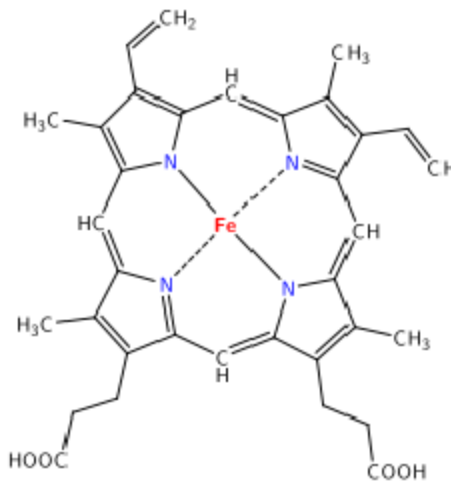
### III. GENERALITES :

#### III.1 L'HEMOGLOBINE

L'hémoglobine (Hb) est une molécule (protéine) abondante dans l'organisme humain; il y a 14 g/dl de sang, soit 735 g au total chez un adulte de 70 Kg. Les valeurs normales du taux d'hémoglobine dépendent du sexe et de l'âge du sujet. Un taux d'hémoglobine inférieur à la norme définit une anémie [17].

##### III.1.1 La structure

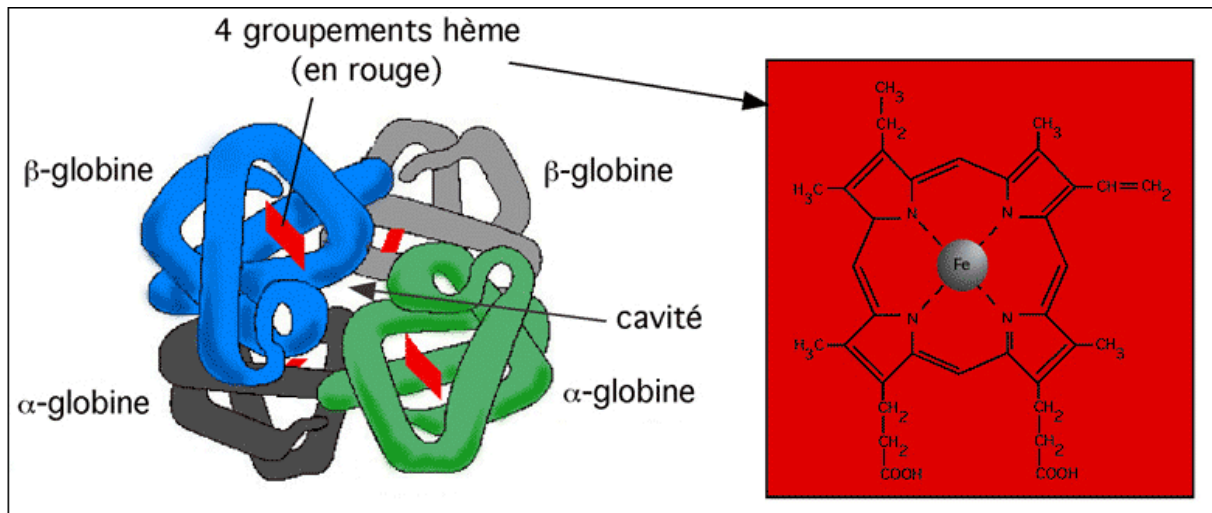
L'hémoglobine est un tétramère de poids moléculaire de 64.500 Da faite de l'union d'une portion protéique (la globine) et d'un pigment porphyrrique contenant du fer (l'hème). L'hème est une molécule plane composée de quatre (4) noyaux pyrrol à sommet azoté réunis par des ponts méthène (-CH=); huit (8) chaînes latérales (4 méthyles, 2 vinyles, 2 acides propioniques), un atome de fer central fixé aux 4 atomes d'azote des noyaux pyrrol avec deux (2) valences libres.



**Figure 1** : Molécule de l'hème (*source* : <http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Heme.svg#file>)

La globine comporte quatre (4) chaînes polypeptidiques identiques deux (2) à deux (2) : deux (2) chaînes  $\alpha$  avec 141 acides aminés et deux (2) chaînes non  $\alpha$  ( $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ) avec 146 acides aminés. Chacune est reliée à un groupement hémique par un atome de fer.

La molécule complète d'hémoglobine comporte donc 4 chaînes globiniques et quatre (4) groupements hèmes avec quatre (4) noyaux de fer et peut fixer quatre (4) molécules d'oxygène. Dans l'Hb A, chaque chaîne  $\alpha$  ou  $\beta$  s'enroule sur elle-même, réalisant une structure en double hélice donnant la structure secondaire. Les sous unités  $\alpha 1$ - $\beta 1$  et  $\alpha 2$ - $\beta 2$  sont des liaisons fortes et forment des dimères. La réunion de ces dimères réalise la structure quaternaire.



**Figure 2** : Structure de l'hémoglobine : tétramère constitué de quatre chaînes de globine identiques deux à deux et de quatre molécules d'hème renfermant chacune un atome de fer [18].

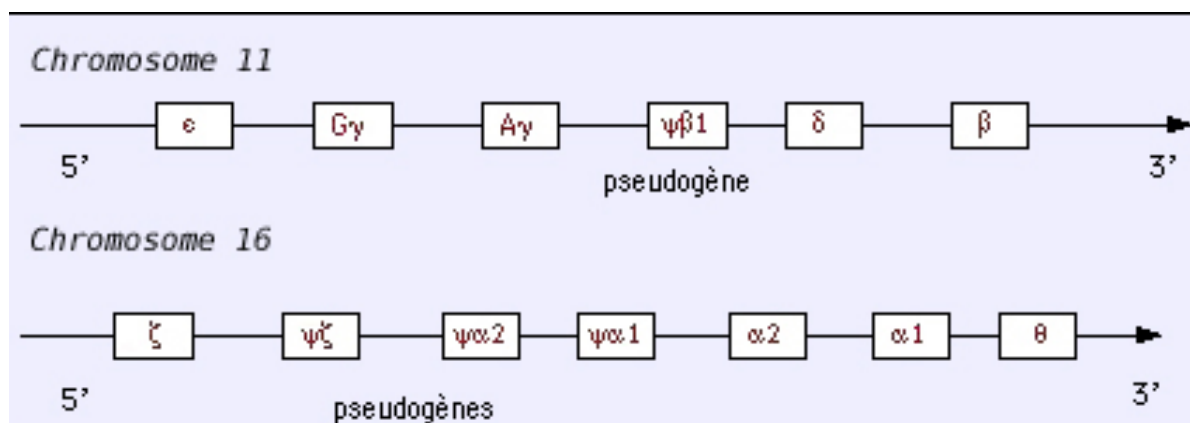
### III.1.2 La synthèse

La synthèse de l'Hb commence dès la troisième semaine de la vie intra-utérine. La synthèse de l'hème a lieu dans les mitochondries à partir de la glycine et de l'acide succinique ; les porphyrines sont synthétisées puis le fer s'incorpore pour donner la molécule de l'hème [17].

La synthèse de la globine suit le schéma de la synthèse des protéines et est sous la dépendance de gène de structure autosomique. La synthèse des chaînes  $\alpha$  est contrôlée par des gènes situés sur le bras court de chaque chromosome 16. Ces chaînes sont codées successivement par les gènes,  $\zeta$ (Zeta),  $\psi$ (Psi)  $\zeta$ ,  $\psi\alpha 2$ ,  $\psi\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 1$ ,  $\theta$ .

En ce qui concerne les chaînes non  $\alpha$  ( $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ) elles sont codées par plusieurs gènes :  $\epsilon$ ,  $G\gamma$ ,  $A\gamma$ ,  $\psi\beta 1$ ,  $\delta$ ,  $\beta$ , situés sur le bras court du chromosome 11.

La synchronisation de la synthèse de l'hème et de celle de la globine est assurée par l'hème qui stimule la synthèse des chaînes de la globine [17].



**Figure 3** : Organisation des gènes de globine sur les chromosomes 11 et 16 (Source :

<http://AtlasGeneticsOncology.org/Educ/GenHemoglobinID30014FS.html>)

### III.1.3 La fonction

La principale fonction de l'hémoglobine est la fonction respiratoire. L'Hb assure donc la fixation de l'oxygène au niveau des poumons puis sa libération au niveau des tissus. Au cours de la fixation ou de la libération de l'oxygène, les sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  se déplacent les unes par rapport aux autres avec dilatation de la molécule à l'état désoxygéné et contraction à l'état oxygéné ce qui fait comparer la molécule d'Hb à un poumon à l'échelle moléculaire. Elle assure également le transport du dioxyde de carbone des tissus aux poumons, ce gaz se combine aux groupements aminés de la globine pour former la carbaminohémoglobine [17].

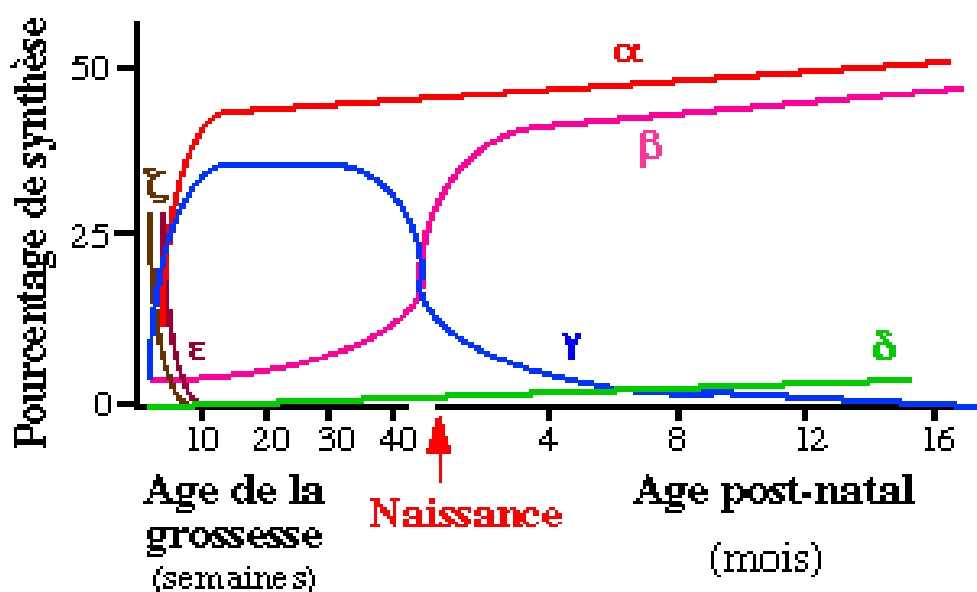
## III.2 LES VARIANTES NORMALES ET ANORMALES DE L'HEMOGLOBINE

### III.2.1 Les hémoglobines normales

L'homme possède plusieurs variétés d'hémoglobines qui se succèdent et se chevauchent au cours de la vie. Au cours de l'embryogenèse, des chaînes  $\zeta$  précèdent les chaînes  $\alpha$ .

Parmi les chaînes non  $\alpha$ , il convient de citer les chaînes  $\epsilon$  pour l'hémoglobine embryonnaire,  $\gamma$  pour l'hémoglobine fœtale,  $\beta$  et  $\delta$  pour les hémoglobines de l'adulte. On distingue donc trois types d'hémoglobines normales.

- Les hémoglobines embryonnaires constituées des hémoglobines Gower 1 ( $\zeta_2\epsilon_2$ ), Gower 2 ( $\alpha_2\epsilon_2$ ), Portland ( $\zeta_2\gamma_2$ ).
- L'hémoglobine fœtale ( $\alpha_2\gamma_2$ ).
- Les hémoglobines adultes comprenant l'Hb A1 ( $\alpha_2\beta_2$ ), l'Hb A2 ( $\alpha_2\delta_2$ ) et l'Hb F ( $\alpha_2\gamma_2$ ) à l'état de trace.



**Figure 4:** Evolution de la synthèse des différentes chaînes de globine au cours de la vie.  
(Source : <http://erasmeinfo.ulb.ac.be/globule/index.htm>)

### **III.2.2 Les hémoglobines anormales**

Les hémoglobinopathies sont des anomalies congénitales de l'hémoglobine ; leur transmission génétique suit les lois de Mendel. On distingue deux types d'anomalies de l'hémoglobine : les hémoglobinopathies qualitatives et les hémoglobinopathies quantitatives [20].

#### **III.2.2.1 Les hémoglobinopathies qualitatives**

La plupart des anomalies de structure sont dues au remplacement par mutation d'un acide aminé par un autre sur une chaîne de globine. Dans la majorité des cas, une mutation ponctuelle dans la région codante de la chaîne de globine conduit à l'expression d'un variant. La majorité de variants structurales est latente. Mais il y a certains qui ont un retentissement clinique et biologique, provoquant ainsi des phénomènes pathologiques plus ou moins graves. Ces anomalies peuvent aboutir à une modification de la charge de la molécule, ce qui entraîne une modification de la solubilité de l'hémoglobine et / ou à un changement des mobilités électrophorétiques [20].

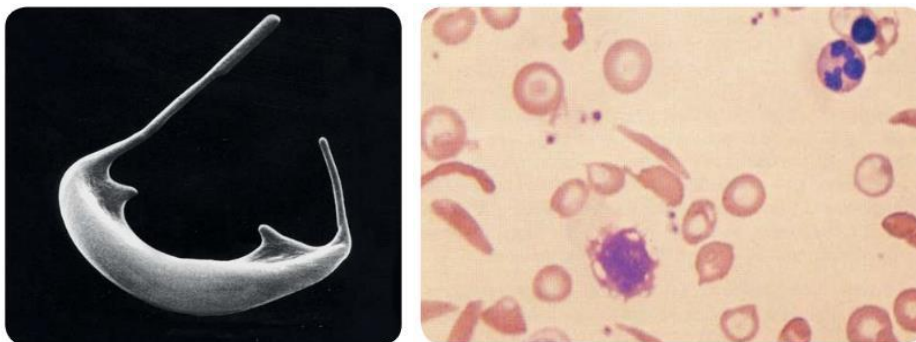
Avant de débiter la description des principales hémoglobines anormales, il est important d'en avoir une vision globale et d'en connaître la nomenclature par ordre alphabétique, dont l'origine vient de leur profil de migration en électrophorèse à pH alcalin (**Tableau I**).

**Tableau I** : Nomenclature des principales hémoglobines anormales par ordre alphabétique [21]

Nom de l'hémoglobine	Mutation décrite ou caractéristiques
Hb A	Hb adultes (A <sub>0</sub> , A <sub>1</sub> , A <sub>1c</sub> , A <sub>2</sub> ..)
Hb C	β6 Glu→Lys
Hb D	Mutations β du groupe +1
Hb E	β26 Glu→Lys
Hb F	Hb foetale
Hb G	Mutations α du groupe +1
Hb H	Tétramère β
Hb I	Mutations α du groupe -2
Hb J	Variants α et β du groupe -1
Hb K	Variants α et β rapides entre -1 et -2
Hb M	Variants responsables de méthémoglobinémies
Hb N	Variants rapides β du groupe -2
Hb O	O-Arab β121 Glu→Lys
Hb P	P-Nilotic Gène-fusion
Hb Q	Variants α du groupe +1
Hb S	β6 Glu→Val
Hb T	T-Cambodia

Quelques dizaines de variants seulement ont une importance clinique, dont l'hémoglobine S, responsable de la drépanocytose, et découverte en 1949 par Pauling *et al.* [7]. Il s'agit de la plus fréquente des hémoglobinopathies, notamment en Afrique subsaharienne, mais également aux Antilles, en Inde, au Moyen-Orient et dans le bassin méditerranéen [8,9]. Toutefois, du fait des migrations de populations, les différentes hémoglobinopathies se sont répandues dans tous les pays [22]. La drépanocytose est due à une mutation ponctuelle sur le sixième codon du gène β-globine conduisant au remplacement d'un acide glutamique par une valine (β6Glu→Val) et donc à la synthèse d'une hémoglobine anormale : l'hémoglobine S. Par hypo-oxygénation, cette hémoglobine S se polymérise en longues fibres entraînant une rigidification et une déformation de l'hématie en forme de faucille (**Figure 5**). Les hématies, ayant perdu leur élasticité, obstruent les capillaires des organes, provoquant une ischémie par manque d'apport d'oxygène et donc des crises vaso-occlusives douloureuses.

Par ailleurs, il survient une anémie hémolytique en raison de la plus grande fragilité des hématies [9,23]. Les sujets homozygotes (S/S) sont atteints et souffrent d'un syndrome drépanocytaire majeur. La concentration en hémoglobine se situe entre 6 et 10 g/dl et les hématies contiennent alors principalement de l'hémoglobine S, ainsi qu'une fraction d'hémoglobine F généralement augmentée (de l'ordre de 5 à 20 %) et une faible fraction d'hémoglobine A<sub>2</sub>. L'hémoglobine A<sub>0</sub> est quant à elle absente. En revanche, lorsque la mutation  $\beta$ S ( $\beta$ 6Glu→Val) ne concerne qu'un seul des deux gènes  $\beta$  (drépanocytose hétérozygote A/S), les sujets sont le plus souvent asymptomatiques. L'étude de l'hémoglobine montre un profil comportant environ 40 % d'hémoglobine S anormale et au moins 50 % d'hémoglobine A normale, les concentrations d'hémoglobine A<sub>2</sub> et d'hémoglobine F restant normales. En outre, les formes hétérozygotes composites, dans lesquelles un allèle porteur de la mutation  $\beta$ 6Glu→Val est associé à un allèle porteur d'une autre anomalie génétique (hémoglobine C, hémoglobine O-Arab, hémoglobine D-Punjab,  $\beta$ -thalassémie notamment), peuvent également être à l'origine de syndromes drépanocytaires majeurs [10,24].



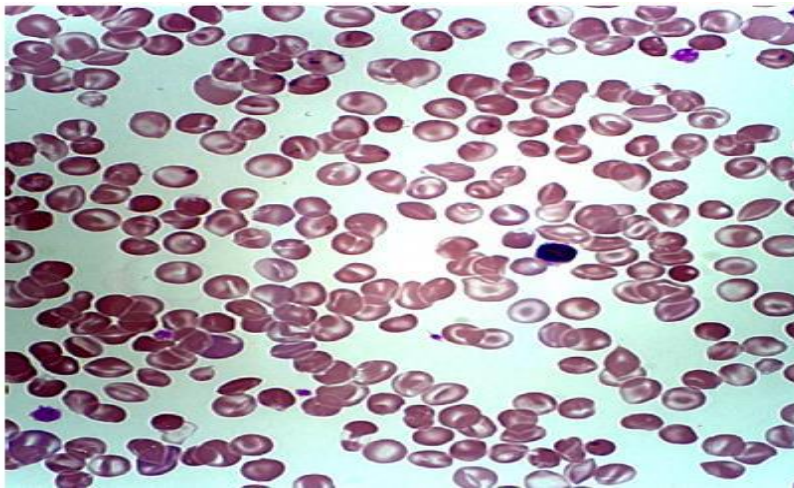
**Figure 5** : Hématies falciformes (ou drépanocytes) au microscope électronique à balayage (à gauche) et au microscope optique sur frottis sanguin (à droite) [9].

Le deuxième variant de l'hémoglobine le plus fréquent, après l'hémoglobine S, est l'hémoglobine C [6,10]. Celle-ci serait originaire du plateau voltaïque et se serait propagée par diffusion concentrique. Elle est ainsi très répandue dans les zones impaludées de l'Afrique de l'Ouest, notamment au niveau du golfe du Bénin, au Ghana et aux Antilles françaises.

Toutefois, des cas d'hémoglobinose C apparemment autochtones ont également été observés en Asie du Sud-Est, remettant en cause cette théorie [8,25]. L'hémoglobine C résulte d'une mutation ponctuelle sur le gène de la chaîne  $\beta$  de la globine, aboutissant à la substitution en position 6 d'un acide glutamique par une lysine. Les individus hétérozygotes (A/C) sont cliniquement asymptomatiques mais peuvent présenter sur le plan hématologique une microcytose modérée. Quant aux sujets homozygotes (C/C), ils présentent le plus souvent des



manifestations bénignes (crises douloureuses, syndromes thoraciques aigu) liées à une hémolyse compensée avec splénomégalie. Les complications potentielles apparaissant à l'âge adulte sont notamment l'hypersplénisme, des crises douloureuses abdominales et articulaires, la lithiase biliaire, la carence en folates et des rétinopathies [6,26]. Sur le plan hématologique, ces patients présentent une discrète anémie hémolytique microcytaire et une proportion importante d'hématies cibles sur le frottis sanguin (**Figure 6**), ainsi que des hématies contenant des cristaux d'hémoglobine C [10,27].



**Figure 6.** Frottis sanguin d'un cas d'hémoglobinosose C homozygote avec nombreuses hématies cibles et microsphérocytes [6].

Le troisième variant de l'hémoglobine le plus fréquent est l'hémoglobine E, très présente en Asie du Sud-Est notamment khmères : Cambodge, Laos, Thaïlande et Birmanie ; elle semble plus rare au Viêt-Nam [11]. Elle résulte d'une mutation faux sens du codon 26 du gène  $\beta$ -globine remplaçant un acide glutamique par une lysine. Ceci crée un site alternatif d'épissage, partiellement utilisé, qui dévie une partie de l'ARN messager (ARNm) vers une maturation anormale, aux dépens de la production d'ARNm normal. Cette substitution d'acides aminés conduit donc à un défaut de production d'hémoglobine par diminution du taux d'ARNm normal, sans affecter la fonction de l'hémoglobine [28].

L'hémoglobinosose E se présente donc comme une thalassémie discrète. Les sujets hétérozygotes (A/E) sont asymptomatiques, tandis que les sujets homozygotes (E/E) présentent une discrète anémie hémolytique microcytaire et légèrement hypochrome en général bien tolérée [10]. La gravité de l'hémoglobinosose E tient surtout à son association avec diverses formes d' $\alpha$ - et de  $\beta$ -thalassémies. En outre, ces associations sont relativement fréquentes en raison du paludisme qui a sélectionné et amplifié ces différentes formes au sein des mêmes populations.

Beaucoup de ces formes composites sont graves, elles peuvent présenter des phénotypes complexes et le diagnostic peut se montrer difficile. D'une manière générale, le diagnostic repose sur la mise en évidence de l'hémoglobine E, souvent associée à un pourcentage élevé d'hémoglobine F (10 à 15 %) [29].

Plus rarement rencontrées, les hémoglobines instables constituent également un type d'hémoglobines anormales. Elles sont caractérisées par une tendance à la dénaturation, avec formation de corps amorphes ou corps de Heinz à l'intérieur de l'érythrocyte. Ces inclusions diminuent la durée de vie des hématies et sont responsables d'anémies hémolytiques de sévérité variable. Actuellement, on connaît plus d'une centaine d'hémoglobines instables cliniquement significatives, parmi lesquelles figure l'hémoglobine Köln, l'hémoglobine Zurich ou encore l'hémoglobine Hasharon [30].

Enfin, les hémoglobines hyper affines pour l'oxygène représentent un autre type d'hémoglobines anormales rares. En raison d'une mauvaise distribution de l'oxygène aux tissus, les patients porteurs d'une hémoglobine hyper affine développent une polyglobulie réactionnelle, induite par une synthèse accrue d'érythropoïétine. Parmi ces hémoglobines anormales à haute affinité, on peut citer l'hémoglobine Tak et l'hémoglobine Pierre-Bénite notamment [31].

### **III.2.3 Techniques de détermination des variants d'hémoglobine :**

Environ 1 ml de sang sur anticoagulant (EDTA) a été utilisé pour le typage de l'hémoglobine. L'échantillon peut se conserver au maximum 8 jours à +4 °C. Dans la majorité des cas, le diagnostic d'une hémoglobinopathie repose sur l'analyse du phénotype. L'étude de l'hémoglobine utilise essentiellement des méthodes séparatives.

#### **Électrophorèses :**

L'électrophorèse est une méthode de séparation de particules chargées électriquement par migration différentielle sous l'action d'un champ électrique.

Les différents types d'électrophorèses sont :

- Électrophorèse à pH alcalin sur acétate de cellulose ;
- Électrophorèse sur gel d'agar à pH acide ;
- Électrophorèse capillaire ;

### **Chromatographie liquide haute performance (CLHP) sur colonne échangeuse de cations :**

## **III.3 LE PALUDISME, LE PARASITE, *Plasmodium falciparum* ET L'ANOPHÈLE.**

### **III.3.1 HISTORIQUE.**

C'est la fièvre qui prédomine dans les observations cliniques de cette maladie à travers la période historique et c'est la quinine qui, à partir de 1663, fera l'unanimité pour la combattre.

Hippocrate, médecin grec de l'antiquité (IV<sup>ème</sup> siècle avant J.-C.) a donné une description extrêmement précise de l'accès fébrile et de sa périodicité ; ces fièvres périodiques sont aussi citées par les Egyptiens. Les Chinois, quant à eux, donnent de l'accès une description particulièrement imagée faisant se succéder au chevet du patient, des démons armés du brasero, du marteau et de la marmite d'eau froide.

Les noms donnés officiellement à l'infection palustre, Malaria (en italien: mauvais air), fièvre des marais ou paludisme (du latin palus: marais), évoquent toute la responsabilité des eaux de surface.

Pelletier et Caventou isolent le principe actif, la quinine, en 1870.[33].

Jusqu'en 1935, on se contente de la quinine comme thérapeutique du paludisme: c'est un bon médicament, fiable, bon marché et peu toxique. Il faut attendre les guerres, accompagnées de difficultés d'approvisionnement en écorce de quinquina, pour voir la recherche thérapeutique se mettre en action:

En 1939, Muller décrit les propriétés insecticides du Dichloro Diphenyl Trichloroéthane (DDT). Cette découverte, avec celle de la chloroquine, amène l'espoir de pouvoir un jour se débarrasser du paludisme à l'échelle de la planète et, entre 1950 et 1970, l'Organisation Mondiale de la Santé lance le programme global d'éradication du paludisme ("*le monde uni contre le paludisme*").

Dès avant 1960, certains *Anopheles* deviennent résistants au DDT. Les produits de remplacement sont plus chers, parfois plus toxiques et moins efficaces.

Entre 1962 et 1970, l'apparition dans certaines régions du monde, de souches de *P. falciparum* résistantes à la chloroquine relance la recherche de nouvelles molécules actives, mais les résultats sont assez décevants.

Sans que les phénomènes de résistances en soient la cause exclusive, l'échec de l'éradication est reconnu à partir de 1970 et on ne parle plus que du "contrôle".

Il faut alors songer à un nouveau moyen de protection... . [34]

L'utilisation des Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine CTA est recommandée par l'OMS depuis 2004. En cas de paludisme grave, le traitement est basé sur l'artesunate injectable, ou les sels de quinine en perfusion intraveineuse.

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

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

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

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

- **artésunate plus méfloquine** (données de toxicité insuffisantes pour recommander son utilisation en Afrique) qui est contre-indiquée en cas d'épilepsie [35].

### III.3.2 EPIDÉMIOLOGIE.

Le paludisme par sa fréquence et sa gravité, demeure encore de nos jours l'un des problèmes de santé publique les plus importants des pays du monde tropical. Au niveau mondial, le nombre de cas de paludisme est estimé à 219 millions en 2017, contre 239 millions en 2010 et 217 millions en 2016. Au niveau mondial, l'incidence du paludisme a reculé entre 2010 et 2017, passant de 72 cas pour 1 000 habitants exposés au risque de paludisme à 59 pour 1 000. En Afrique, elle est restée à 219 cas pour 1 000 habitants exposés au risque de paludisme en 2016 et 2017. Au niveau mondial, le nombre de décès dus au paludisme a été estimé à 435 000 dont 93% en Afrique. Les enfants de moins de cinq ans ont payés un lourd tribut en représentant 61% de cas de décès due au paludisme dans le monde en 2017.

Près de 80 % des décès dus au paludisme dans le monde en 2017 ont été concentrés dans 17 pays Africains et en Inde. Sept de ces pays représentent 53 % des décès associés : le Nigéria (19 %), la République démocratique du Congo (11 %), le Burkina Faso (6 %), la République-Unie de Tanzanie (5 %), la Sierra Leone (4 %), le Niger (4 %) et l'Inde (4 %) [36].

Dans une population donnée ; un certain nombre de paramètres paludométriques permettent de quantifier rapidement la situation épidémiologique du paludisme à savoir :

- **L'indice sporozoïtique** : C'est le pourcentage d'*Anopheles* femelles présentant des sporozoïtes dans les glandes salivaires.

- **L'indice d'anthropophilie** : C'est le pourcentage d'*Anopheles* femelles fraîchement gorgées avec du sang humain.

- **Le taux d'inoculation entomologique (TIE)**: C'est le nombre moyen de piqûres infectantes reçues par un homme par unité de temps.

- **L'indice splénique (IS)** : Il correspond au nombre de grosses rates palpées chez 100 sujets examinés.

- **L'indice plasmodique (IP)** : Correspond au nombre de personnes présentant des parasites dans le sang par rapport à 100 sujets examinés [37].

## **CLASSIFICATION DES SITUATIONS ÉPIDÉMIOLOGIQUES.**

Il existe différentes sortes de paludisme que l'on peut différencier en six classes ou faciès.

Le faciès épidémiologique est une aire géographique où le paludisme présente un profil caractéristique en terme de transmission, d'endémicité, de développement, de la prémuniton et en terme d'impact sur la population.

- L'endémicité, qui se rapporte à un degré de prévalence incluant fréquence et intensité des infections.

- L'épidémie, qui consiste en une augmentation soudaine et importante de la morbidité et de la mortalité dues au paludisme.

### **a). En Afrique:**

Ce continent présente géographiquement plusieurs faciès épidémiologiques hétérogènes et dynamiques. De nombreux facteurs écologiques, anthropologiques, climatiques et biologiques interviennent dans la définition d'un faciès épidémiologique. Ce sont:

- l'environnement éco climatique et socio-économique;
- le parasite (espèce en cause);
- le vecteur : éco phénotype, dynamique des populations et capacité vectorielle;
- la population dont le degré de réceptivité à l'infection palustre est fonction du :

- lieu et du type d'habitat (urbain, périurbain, rural, etc.)

- mode de vie, du degré de prémuniton, des activités, de la prise ou non d'antipaludiques et des mesures de protection contre les vecteurs.

Les faciès épidémiologiques décrits en Afrique sont :

- ✓ Des zones de paludisme endémique stable à transmission permanente où l'état de prémuniton des enfants survivant à l'infection palustre est acquis précocement avant l'âge de 5 ans. On rencontre ce faciès surtout dans la zone équatoriale des forêts.
- ✓ Des zones de paludisme endémique à recrudescence saisonnière où l'état de prémuniton des enfants survivant à l'infection est à apparaître. Il est observé en zone de savane tropicale.
- ✓ Des zones de paludisme instable à transmission épisodique qui ne permet pas d'acquérir un degré de prémuniton suffisante et s'observe surtout en zone sahélienne. Certains auteurs ajoutent un quatrième faciès.
- ✓ Des zones de paludisme sporadique [37].

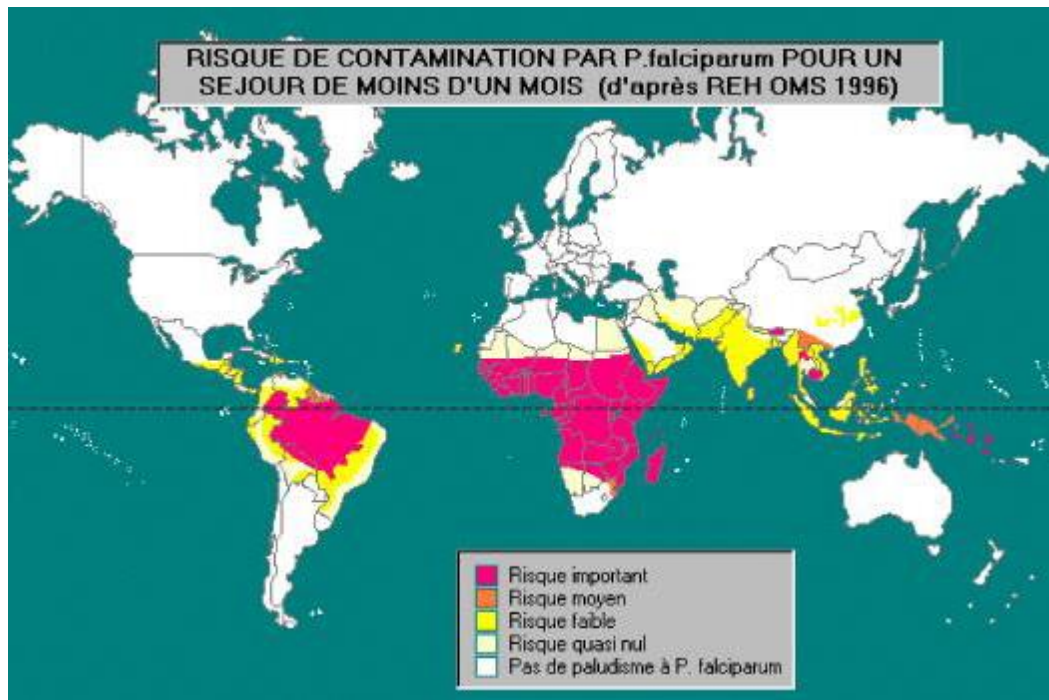
A côté de ces différents faciès épidémiologiques, il existe également le paludisme des régions côtières, le paludisme lagunaire, le paludisme des oasis et celui du milieu urbain.

**b). Au Mali:**

Le Mali est un pays endémique avec 5 faciès épidémiologiques [38]. Le paludisme existe presque sur tout le territoire du Mali avec un gradient d'endémicité variant du sud-nord. On y rencontre 5 espèces plasmodiales (*P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax*). Initialement décrite au nord du Mali dans la population leucoderme [39], la distribution de *P. vivax* a été récemment confirmé au centre et au sud du Mali dans la population mélanoderme [14]

Ces faciès sont :

- ✓ Une zone soudano-guinéenne à transmission saisonnière longue de 4 à 6 mois ; le paludisme y est holo-endémique avec un indice plasmodique  $IP > 85\%$  et  $IS > 75\%$
- ✓ Une zone de transmission saisonnière courte de 3 à 4 mois. Elle correspond à la zone Nord soudanienne et au sahel. Le paludisme y est hyper-endémique avec un indice plasmodique variant entre 50 -75% et IS qui varie de 51 à 75 %.
- ✓ Une zone de transmission sporadique voire épidémique correspondant au Sahara avec un indice plasmodique inférieur à 5%.
- ✓ Des zones de transmission bi ou plurimodales comprenant le delta intérieur du fleuve Niger et les zones de barrage: Sélingué, Manantali et Markala. Le paludisme est de type méso-endémique avec un indice plasmodique IP de 26 à 50% et IS de 11 à 50%.
- ✓ Des zones peu propices à l'impaludation : les milieux urbains (Bamako et Mopti) où le paludisme est hypo-endémique avec un indice plasmodique et IS inférieurs à 10%. Les enfants vivant dans ces zones sont exposés aux formes graves et compliquées du paludisme. Cette hypo-endémicité du milieu urbain expose les enfants citadins aux formes graves et compliquées du paludisme, souvent à un âge plus avancé par rapport aux enfants des zones rurales [37].



**Figure 7** : Risque de contamination par *P. falciparum* pour un séjour de moins d'un mois (D'après REH OMS 1996)

### III.3.3 CAUSES.

Le paludisme est causé par un parasite protozoaire du genre *Plasmodium* (phylum *Apicomplexa*). Chez les humains, le paludisme est causé par *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* et *P. knowlesi*. *P. falciparum* est la cause de la forme la plus grave du paludisme et est responsable d'environ 80% de tous les cas de paludisme, ainsi que de 90 % des décès en Afrique au sud du Sahara [41]. En dehors de l'Afrique, *P. vivax* est l'espèce la plus répandue.

*Plasmodium* a été découvert par le médecin militaire Laveran à Constantine en 1880. Il se présente sous la forme d'un protozoaire très petit (1 à 2  $\mu$  selon les formes) ; la coloration au May-Grünwald-Giemsa montre qu'il est constitué d'un cytoplasme bleu pâle entourant une vacuole nutritive claire, et contenant un noyau rouge et du pigment brun doré ou noir (hémozoïne). [33].

#### III.3.3.1 L'ANOPHÈLE ET LE CYCLE EVOLUTIF DU PARASITE.

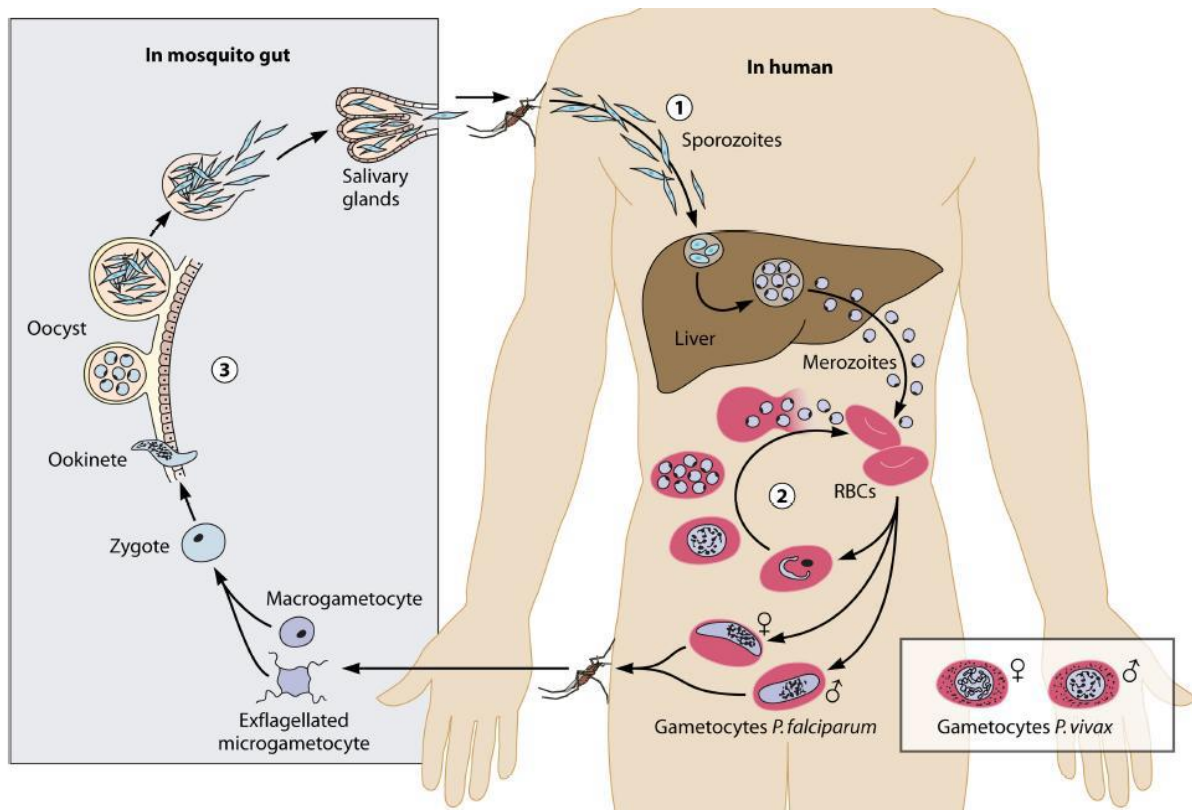
Le vecteur du parasite ainsi que son hôte définitif est la femelle du moustique du genre *Anopheles*. Lors d'un repas sanguin sur un individu infecté, l'*Anopheles* femelle ingère des gamétocytes, à potentiel sexuel mâle ou femelle. Ceux-ci parviennent dans l'estomac du moustique et se transforment en gamètes.

Le gamétocyte mâle subit un processus d'exflagellation à la suite duquel les microgamètes mâles sont émis. Le gamétocyte femelle subit un processus de maturation pour former un

macrogamète femelle. Chaque macrogamète femelle est fécondé par un seul microgamète mâle. Il en résulte un zygote appelé ookinète ; celui-ci s'implante sous la paroi stomacale en formant un oocyste.

Cette brève phase diploïde s'achève par une division méiotique et est suivie par plusieurs milliers de mitoses qui conduisent au développement des sporozoïtes. L'éclatement de l'oocyste libère ces éléments mobiles et haploïdes dans l'hémolymphe. Les sporozoïtes gagnent préférentiellement les glandes salivaires du moustique d'où ils pourront être injectés avec la salive lors d'une piqûre infectante.

Chez le moustique, l'ensemble de ce cycle se déroule en 10 à 40 jours, suivant la température extérieure et les espèces en cause [42].



**Figure 8 :** Cycle de vie de *Plasmodium falciparum*, (Figure modifiée de (Bousema & Drakeley 2011b)).

Seules les femelles du moustique absorbent le sang pour la maturation de leurs œufs. Les mâles ne transmettent pas la maladie. Les femelles *Anopheles* prennent leur repas de sang, de préférence la nuit, à partir du crépuscule. Les parasites peuvent aussi être transmis par transfusion sanguine, bien que ce moyen de transmission soit assez rare [42].



### III.4 PROTECTION ANTIPALUDIQUE CONFÉRÉE PAR LES HEMOGLOBINOPATHIES

Dans une importante étude prospective au Mali, il a été rapporté une réduction de 150 parasites/ $\mu$ l de sang de la parasitémie chez les sujets HbAS malades comparés aux sujets HbAA malades. Cette même étude rapportait une réduction de 34% de l'incidence du paludisme chez les sujets HbAS par rapport au sujet HbAA [43].

La protection conférée par l'HbAS contre le paludisme varie en fonction des divers aspects de l'infection palustre. Elle est très forte contre les formes graves du paludisme comme le neuropaludisme et l'anémie sévère, modérée contre les accès simples de paludisme et presque nulle contre les infections asymptomatiques. On note aussi un allongement de l'incubation du paludisme chez les sujets HbAS.

L'association entre l'HbC et la protection contre le paludisme fut décrite pour la première fois en 2000 chez les dogons du Mali, une population caractérisée par une forte prévalence de l'HbC et une faible prévalence de l'HbS. En effet, Agarwal et ses collaborateurs ont rapporté que dans cette population, les sujets porteurs d'HbAC présentaient 29% de moins de risque de souffrir d'un neuropaludisme que les sujets HbAA. Cependant, May et ses collaborateurs avaient trouvé que la protection conférée par l'HbC contre le paludisme concernait seulement le neuropaludisme et non les autres aspects du paludisme comme le paludisme simple ou même l'anémie sévère palustre [44]. Dans une récente étude prospective menée chez les enfants de 0 à 6 ans au Mali, l'HbC réduisait de 183 jours le temps médian que passaient les enfants sans paludisme comparé à l'HbAA [45].

La protection conférée par l'HbC contre le paludisme est admise concernant le paludisme grave notamment le neuropaludisme. A la différence de l'HbS, cette protection revêt un caractère dose dépendant c'est-à-dire que l'état homozygote de l'HbC (HbCC) confère une protection beaucoup plus marquée que l'état hétérozygote HbAC. Cela s'explique par le fait que l'homozygotie HbCC est beaucoup moins symptomatique que l'homozygotie HbSS.

La protection des sujets porteurs d' $\alpha$ -thalassémie hétérozygote et homozygote contre les formes graves du paludisme a été étudiée par plusieurs investigateurs. Si certains n'ont pas trouvé d'association significative entre la forme hétérozygote de l' $\alpha$ -thalassémie et une protection contre le neuropaludisme [45], presque tous ont rapporté la protection des sujets  $\alpha$ -thalassémiques hétérozygotes et homozygotes contre l'anémie palustre grave [44]. D'autres auteurs ont toutefois trouvé une réduction de l'incidence du paludisme grave chez ces sujets. Cependant les résultats des études relatives à la protection des sujets  $\alpha$ -thalassémiques contre le paludisme simple ou asymptomatique sont moins concluants [44].

### **III.5 DES DÉFENSES POUR L'HÔTE : L'IMMUNITÉ ANTI PALUSTRE.**

#### **III.5.1 Immunité naturelle :**

Etat réfractaire d'un hôte vis-à-vis du pathogène, relevant de la constitution génétique de l'hôte (incapacité de *P. berghei* du rongeur à se développer dans les globules rouges de l'homme par exemple).

#### **III.5.2 Immunité acquise de type "prémunition" :**

Etat immunitaire (permanent en zone endémique), conférant une protection relative acquise progressivement, provoqué et entretenu par la présence du parasite dans l'organisme de l'hôte. Il s'estompe après le départ de la zone d'endémie, peu après la disparition des parasites (12 à 24 mois).

Au cours de l'infection palustre, le système immunitaire réagit contre tous les antigènes exprimés par le parasite. La majorité des antigènes n'induisent pas d'immunité protectrice. Les antigènes qui induisent la protection sont situés à la surface du parasite. Ils sont spécifiques à chaque stade, d'où l'absence de protection croisée entre immunité anti-sporozoïte, anti-mérozoïte et anti-gamétocyte.

De plus, il est étonnant de constater qu'une protection efficace contre les formes asexuées du sang n'est acquise, en zone endémique, qu'après plus de 6 ou 8 ans de contact avec les parasites. C'est en effet vers cet âge que les densités parasitaires baissent de manière significative chez les enfants pourtant continuellement infectés.

Une explication plausible serait que les parasites qui se succèdent chez l'enfant, suite aux multiples inoculations par le moustique, présentent une diversité génétique énorme qui se traduit au niveau des schizontes sanguins par des contenus antigéniques différents (polymorphisme antigénique). Le sporozoïte est en effet un stade hybride résultant de la fécondation de deux gamètes pouvant avoir des origines différentes.

#### **III.5.3 Mécanismes de protection :**

Les anticorps participent à la protection aussi bien que les cellules T et les monocytes sécréteurs de monokines.

La formation de complexes antigènes-anticorps au niveau de la CSP (Circumsporozoïte Surface Protein) facilite la phagocytose des sporozoïtes et leurs destructions dans les macrophages.

Pour le stade hépatique, ce sont les lymphocytes T cytotoxiques qui sont responsables de la cytotoxicité sur l'hépatocyte infecté exprimant l'antigène parasitaire en surface par l'intermédiaire du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I.

L'immunité anti-sporozoïte comme l'immunité anti-mérozoïte pourrait agir indirectement sur le parasite et sa cellule hôte, respectivement au début et à la fin du développement du schizonte, au moment où les antigènes spécifiques de ces stades sont exprimés par l'hépatocyte infecté: sécrétion de cytokines, particulièrement l'interféron  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) et l'interleukine 6 (IL6).

Pour le stade érythrocytaire, c'est une opsonisation qui a lieu au niveau de la surface des mérozoïtes. Elle neutralise les sites de reconnaissance cellulaire et interfère donc avec le mécanisme d'invasion des érythrocytes.

Les parasites intracellulaires pourraient être atteints par les lymphokines et les globules rouges infectés peuvent également subir l'opsonisation par les anticorps reconnaissant les antigènes parasitaires exposés en surface.

La reconnaissance des antigènes de surface des gamétocytes et leur opsonisation les rend inaptes à la fécondation [42].

#### **III.5.4 Vaccination Anti-palustre**

La vaccination est l'administration d'un vaccin ayant pour effet de conférer une immunité active, spécifique d'une maladie infectieuse, rendant l'organisme réfractaire à cette maladie. Le principe actif d'un vaccin est un antigène destiné à stimuler les défenses naturelles de l'organisme.

#### **III.5.5 Les différents types de vaccins anti-palustres**

Les efforts pour la mise au point d'un vaccin anti palustre devient de plus en plus productifs. Plusieurs équipes de chercheurs, mènent actuellement des travaux orientés sur l'identification, la synthèse et l'emploi d'antigènes issus de l'un des stades de développement parasitaire, permettant ainsi le blocage du cycle.

Il existe trois sortes de vaccins anti-palustres qui sont :

##### **III.5.5.1 Vaccins contre les stades pré-érythrocytaires (vaccins anti-sporozoïtes)**

Un vaccin dirigé contre les sporozoïtes qui visent à assurer une protection très précoce, dès le moment de la piqûre infectante.

Les vaccins pré-érythrocytaires préviennent l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes ou entraînent la destruction des parasites dans les hépatocytes infectés.

Le mécanisme de cette immunité protectrice est encore mal connu mais le rôle des lymphocytes T CD8 est évident dans la lyse des hépatocytes infectés, en effet une expérience de vaccination, chez les souris déficientes en lymphocytes T CD8 n'ont pas été protégées par cette forme d'immunisation [46].

Les anticorps dirigés contre les antigènes du parasite du stade hépatique préviendraient l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes. La protéine la mieux caractérisée est le CSP

(Circumsporozoïte surface Protein) qui est exprimée avant et pendant l'infection des hépatocytes [47], beaucoup d'attentions ont été focalisées sur l'épitope Immuno-dominant composé par un tétra-peptide répétitif NANP (Asn-Ala-Asn-Pro) de cette protéine.

Le RTS, S/AS02A a été un bon inducteur de la réponse cellulaire de type Th1 et a entraîné une forte réponse humorale avec production d'une forte concentration d'IgG dirigée contre la région répétitive du CSP [48].

### **III.5.5.2 Vaccins contre les stades asexués érythrocytaires (Vaccins anti mérozoïtes)**

Ce vaccin peut interrompre le cycle endoérythrocytaire et par conséquent, éviter la survenue des symptômes. La schizogonie érythrocytaire étant responsable des manifestations cliniques, les vaccins contre ces stades érythrocytaires pourraient réduire la pathogénicité, la morbidité et la mortalité du paludisme donc permettrait d'éviter les complications telles que : le paludisme cérébral, l'anémie palustre, la défaillance rénale et d'autres formes graves du paludisme chez la femme enceinte en bloquant l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes.

Apical Membrane Antigen (AMA1) et Mérozoïte Surface Protein (MSP1) sont les antigènes les plus étudiés pour le développement d'un tel vaccin.

### **III.5.5.3 Vaccins contre les stades sexués (Vaccin anti gamétocytes)**

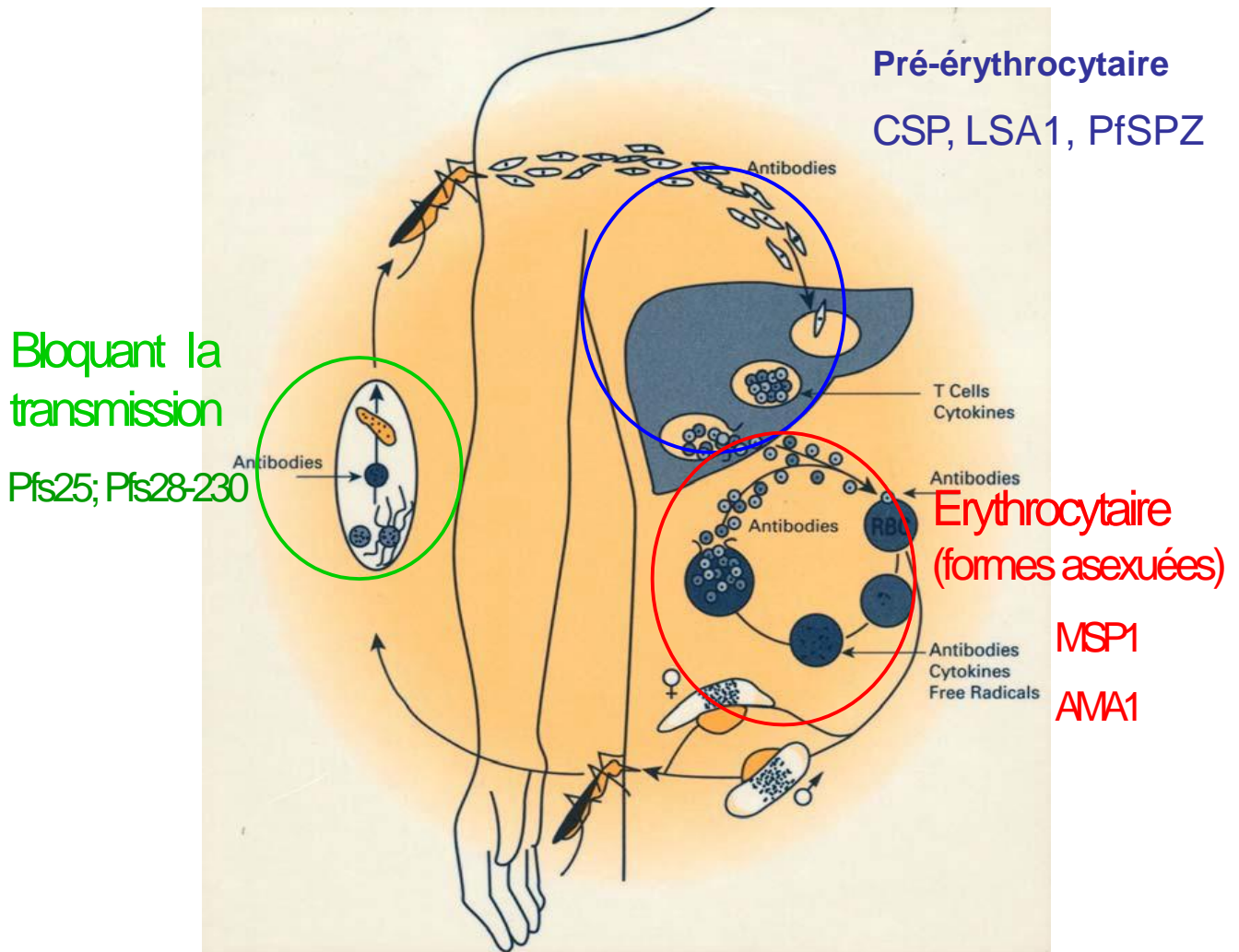
Le point d'impact de ces vaccins se situe au niveau des formes infectantes pour les moustiques, ce qui permet d'interrompre la transmission et la contamination ultérieure d'autres sujets. Les stades sexués (gamètes, gamétocytes, zygotes et ookinète) transmettent l'infection de l'homme au moustique, donc ces types de vaccins pourraient réduire ou interrompre la transmission de la maladie.

Les candidats vaccins les plus étudiés de ce stade ont été principalement les antigènes Pfs28, Pfs25 et Pfs230 [49].

Les anticorps dirigés contre Pfs28 entraînent un blocage de la transmission de *Plasmodium falciparum* et présentent une action synergique lorsqu'ils sont combinés aux anticorps dirigés contre Pfs25. Ces deux antigènes sont très immunogènes et ont une diversité antigénique limitée [49]. Ce type de vaccin ne protège pas la personne vaccinée mais plutôt son entourage. Il y a aussi l'antigène Pfs230 en cours d'essais à Bancoumana et Doneguebougou.

Ces trois types de vaccins sont tous basés sur le principe classique de la vaccination qui consiste à induire l'immunité de l'hôte contre le parasite, de façon à contrôler la densité parasitaire ou à protéger des sujets vaccinés ainsi que la population en générale. Il faut noter la dernière approche de développement de vaccin, le vaccin anti-toxine, appelé aussi vaccin anti-maladie. Cette approche consiste à réduire la morbidité en supprimant l'immunopathologie chez l'hôte.

Ces vaccins agissent sur la neutralisation des substances pathogènes du parasite sans affecter le parasite lui-même [15].



**Figure 9 :** Différents types de vaccins antipaludiques et leurs cibles. (Source : *Nat. Med*2000 page 6).

### III.5.6 Des défenses pour l'hôte : les facteurs génétiques.

Des facteurs génétiques peuvent protéger contre le paludisme. La majeure partie de ceux qui ont été décrits sont associés aux globules rouges, dont voici quelques exemples :

- ✓ La drépanocytose (du grec drepanos "faucille" en regard avec la forme allongée des hématies anormales) aussi appelée hémoglobine S, Sicklémie, ou anémie falciforme: une modification dans la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine entraîne une déformation des globules rouges, ce qui produit des hétérozygotes qui protègent mieux contre le paludisme. Les hématies sont déformées et l'hémoglobine cristallise, ce qui empêche le parasite de rentrer dans le globule rouge. La prévalence de la drépanocytose (HbA/HbS) est élevée dans les populations africaines soumises à une forte pression du paludisme en raison de la résistance qu'elle procure contre les accès graves de la maladie.

- ✓ La thalassémie ou anémie héréditaire : elle est due à une altération de la synthèse d'une des chaînes polypeptidiques ( $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\delta$ ) des hémoglobines normales A, F ou A<sub>2</sub>.
- ✓ Le déficit génétique de G6PD (Glucose-6-phosphate déshydrogénase) qui est une enzyme anti-oxydante protégeant normalement contre les effets du stress oxydatif dans les globules rouges, donne une protection accrue contre le paludisme grave. [33].

### **III.6 LES PARAMETRES HEMATOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES :**

Le sang est composé d'éléments solides : les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes.

Les fonctions du sang, autres que le transport d'oxygène et des cellules de l'immunité, sont assurées par le plasma. Le plasma est constitué d'eau, d'électrolytes, de métabolites, de nutriments, de protéines et d'hormones [50].

#### **III.6.1 Paramètres Hématologiques :**

##### **❖ Globules rouges (hématie, érythrocyte)**

Le globule rouge (hématie, érythrocyte) est une cellule anucléée contenant environ 33% d'hémoglobine ayant, de face, la forme d'un disque arrondi et, de profil, la forme d'une lentille biconcave. Le diamètre moyen du globule rouge humain est de 7,20 $\mu$ m, son épaisseur en périphérie est de 2,4 $\mu$ m, au centre de 1,4 $\mu$ m; sa durée de vie est de 120 jours [51].

Le taux d'hémoglobine (Hb) sanguin correspond à la quantité d'hémoglobine contenue dans un décilitre (dl) de sang.

##### **→ *L'hémoglobine***

Elle varie en fonction du sexe et de l'âge, les valeurs normales à l'international et locales sont dans le tableau ci-dessous:

**Tableau II : Les valeurs normales du taux d'hémoglobine (Hb) sanguin**

Age	Sexe	Valeur en g/dl à l'international	Valeur locale en g/dl
6 mois – 12 ans		11.0 – 15.0	
13 – 17 ans	Masculin	11.7 – 16.6	
	Féminin	11.5 – 15.3	
18 – 60 ans	Masculin	13.1 – 17.3	10,8 – 15,8
	Féminin	11.7 – 16.0	9,1 – 13,8
> 60 ans	Masculin	12.6 – 17.4	
	Féminin	11.7 – 16.1	

→ **La Concentration Corpusculaire (ou globulaire) Moyenne en Hémoglobine (CCMH)**

La concentration corpusculaire (ou globulaire) moyenne en hémoglobine (CCMH) correspond à la quantité d'hémoglobine contenue dans 100 ml de globules rouges. Ce paramètre est obtenu en faisant le rapport entre Hémoglobine/Hématocrite. Il est exprimé en g/dl ou en %.

Les valeurs normales sont :

Enfant  32 – 38 %

Adulte  32 – 37 %

La CCMH définit les concepts fondamentaux de normochromie et d'hypochromie.

- CCMH > 37 : En dehors d'un contexte de microsphérocytose héréditaire, une valeur  $\geq$  à 36 doit faire suspecter un problème analytique.
- CCMH = 32 à 37 : Normochromie.
- CCMH < 32 : Hypochromie

Ce point très important suggère une anomalie portant sur la biosynthèse de l'hémoglobine. Il est souhaitable de vérifier la notion d'hypochromie par l'étude de la morphologie érythrocytaire sur frottis [52].

→ **La teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH)**

Paramètre moins utile, la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH) est calculée par le rapport hémoglobine/nombre de globules rouges contenus dans un dl de sang. Elle est normalement comprise entre 27 et 31 picogramme (pg)/GR.

→ **Les réticulocytes**

❖ **Globules blancs ou leucocytes**

Les leucocytes, ou les globules blancs, sont un groupe de cellules différenciées des cellules souches multipotentes, provenant de la moelle osseuse et présentes dans le sang, la lymphe, les organes lymphoïdes et divers tissus conjonctifs. Ils forment un ensemble hétérogène de cellules

sanguines qui sont des réponses immunitaires de défense de l'organisme contre des substances étrangères ou des agents infectieux (antigènes). Les leucocytes sont des cellules nucléées, qui les différencient des globules rouges (hématies, érythrocytes) et des plaquettes (thrombocytes), qui se différencient également des cellules souches déjà mentionnées et, avec les leucocytes, intègrent les éléments dits figuratifs du sang.

#### ❖ **Plaquettes ou thrombocytes**

Les plaquettes aussi appelées thrombocytes sont des éléments dépourvus de noyau, fabriquées au niveau de la moelle osseuse et qui circulent dans le sang. Elles entrent dans le processus de la coagulation sanguine qui permet d'arrêter une hémorragie. Les plaquettes sont utiles à l'hémostase primaire (clou plaquettaire).

Leur taux habituel varie de 150 000 à 450 000 /mm<sup>3</sup> (150 à 450 x 10<sup>9</sup>/L ou 150 à 450 G/L). Sous la valeur de 150 G/L on utilise le terme de thrombopénie ; au-dessus de la valeur de 450 G/L on parle de thrombocytose (ou d'hyperplaquettose) [51].

#### **Le volume plaquettaire moyen :**

Valeurs de référence : de 7,4 à 10,4 fL.

Cet examen mesure la dimension moyenne des plaquettes.

Une valeur plus élevée montre des plaquettes plus grandes, qui est un facteur de risque de :

- Crise cardiaque,
- AVC (accident vasculaire cérébral).

Une valeur inférieure indique des plaquettes plus petites, c'est-à-dire que la personne risque une hémorragie.

### **III.6.2 Paramètres Biochimiques :**

Les paramètres biochimiques sont des molécules dont le dosage nous renseigne sur le statut d'un organe. Souvent, un paramètre biochimique n'est pas spécifique d'un organe et il faut combiner les dosages de plusieurs paramètres biochimiques pour statuer sur l'état d'un organe.

#### ❖ **Explorations biochimiques dans les affections rénales**

##### • **Au niveau du sang:**

- **L'urée sanguine** : représente la forme d'élimination de l'azote aminé chez l'homme. L'accroissement de son taux dans le plasma est un signe de baisse d'élimination par les reins en déficience fonctionnelle.

Les valeurs normales de l'azotémie chez l'adulte sain sont comprises entre 0,15 et 0,45g/l soit 2,5 - 7,5mmol/l. Cette nouvelle unité internationale qui représente le nombre de molécules d'urée par litre de plasma permet d'éviter des confusions dans les résultats. En effet l'ancienne



unité g/l, exprimait selon les laboratoires tantôt la masse d'urée, tantôt la masse d'azote uréique par litre de plasma.

Le dosage de la créatininémie qui permet de mieux apprécier la fonction rénale, le remplace de plus en plus [53,54].

#### - La créatininémie

La créatinine est le constituant azoté dont le taux est le plus fixe. La créatinine associée à la clairance de la créatinine, constitue l'examen de choix pour l'appréciation de la fonction rénale.

Les valeurs normales sont chez l'adulte: [55,56]

**Tableau III : les valeurs de la créatininémie**

Sexe	Valeur $\mu\text{mol/l}$ à l'internationale	Valeur locale $\mu\text{mol/l}$
Homme	62 – 120	48 – 98
Femme	52 – 100	< 72

#### - La clairance de la créatinine

La clairance de la créatinine notée C, est une épreuve fonctionnelle indiquée dans l'exploration du fonctionnement du glomérule rénal. Elle exprime le volume de plasma débarrassé de toute sa créatinine par minute. On la détermine à partir de la concentration urinaire en créatinine U, de la diurèse V et du taux plasmatique de créatinine P. ( $C = UV/P$ ). Chez le sujet normal, la clairance de la créatinine est de l'ordre de 110 à 150 ml/1, 73 m<sup>2</sup> [55,57]

1,73m<sup>2</sup>(correspond à la surface corporelle d'un adulte).

#### ❖ - Examens biochimiques dans les affections hépatocellulaires

L'exploration biochimique du foie comporte:

##### -les tests de cytolysse s'appuyant sur les dosages

\*des transaminases glutamique-oxalo-acétique (TGO) ou aspartate aminotransférase (ASAT),

\*des transaminases glutamique-pyruvique (TGP) ou alanine aminotransférase (ALAT).

L'aspartate aminotransférase est présente à concentrations voisines dans le foie et le tissu myocardique et dans les muscles squelettiques et les reins ; l'alanine aminotransférase est surtout retrouvée au niveau du tissu hépatique et à des concentrations moindres dans le myocarde, le pancréas, les reins, les muscles squelettiques. Les transaminases sériques sont donc non spécifiques d'une cytolysse hépatique mais néanmoins intéressantes à connaître. Chez l'adulte, on a comme valeurs normales:

TGO:  $N \leq 30 \text{ UI/l}$

TGP:  $N \leq 25 \text{ UI/l}$  (international) [53, 61] et  $N < 41 \text{ UI/L}$  (niveau local).

L'élévation importante des taux des transaminases sériques s'observe surtout dans les hépatites mais également de façon modérée dans les autres affections hépatiques les cirrhoses, les ictères obstructifs. Au cours de l'infarctus du myocarde le taux sérique de l'aspartate aminotransférase augmente de manière isolée.

❖ **Les examens biochimiques courants dans les affections des éléments du sang**

On distingue:

- La bilirubine libre pour l'exploration des hémolyses,
- Le dosage du fer sérique, de la ferritine et de la transferrine pour la classification des anémies et leur exploration.
- Le dosage du fibrinogène et la fibrinémie, importants dans certains états hémorragiques,
- L'électrophorèse de l'hémoglobine, indispensable au diagnostic étiologique de certaines anémies et hémoglobinopathies (drépanocytose),
- Le dosage et l'électrophorèse des protéines plasmatiques [53,57].

## IV. METHODOLOGIE :

### IV.1 Site d'étude :

L'étude a été conduite par le Malaria Research & Training Center (MRTC) de l'Université de Bamako au centre John LaMontagne Malaria Research Center à Bancoumana, un village Malien, et ses villages voisins immédiats. Bancoumana est situé à 60 km au sud-ouest de Bamako et a une population d'environ 10.500 habitants (recensement Mars 2017). Le site est situé dans la zone soudanienne au sud du Mali. Le climat est chaud avec des températures journalières variant entre 19°C et 40°C. Les précipitations annuelles varient entre 600 mm à 1200 mm et surviennent de Juin à Octobre.

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

L'agriculture constitue la principale activité économique des populations. La plaine de Bancoumana est propice aux cultures vivrières et industrielles. Aux abords du village, dans les retenues d'eau (deux digues), la culture du riz (*Oryza sativa L.*, *O. glaberrima S.*) est très développée, ainsi que d'autres produits maraîchers constituent d'importantes ressources de revenu pour la population. La taille des exploitations est très variable et dépend de la capacité de travail potentiel de la famille ainsi que du patrimoine foncier.

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

En dehors de la commercialisation des produits agricoles ; le commerce des produits de consommation courante y est pratiquée.

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

Beaucoup d'essais cliniques aussi bien que des études épidémiologiques et entomologiques ont été conduits à Bancoumana (M. Diallo et al. 2008; Dolo et al. 2003; Sagara et al. 2009). Les sujets adultes en bonne santé sont recrutés dans la communauté environnante, et donc les caractéristiques démographiques de la population d'étude sont représentatives de la communauté. L'équipe du Mali était employée par l'USTTB à travers le programme de

recherche sur le vaccin antipaludique du NIAID/NIH et était basée à Bancoumana durant la durée de l'étude pour fournir les soins et exécuter le protocole.



**Figure 10:** Carte montrant le site d'étude, Bancoumana, Mali (Source : Institut Géographique du Mali (IGM) 1996).

#### **IV.2 Période d'étude**

Notre étude s'est déroulée de Mars 2017 à Mars 2018, les participants ont été enrôlés pour un total de 6 à 12 mois (au moins 6 mois de suivi après la dernière vaccination) dépendant du calendrier de vaccination, de l'assignement au bras et du temps affecté au dépistage.

#### **IV.3 Population d'étude :**

La population d'étude était composée de volontaires hommes et femmes non enceintes en bonne santé résidant à Bancoumana ou villages environnants, âgés de 18 à 50 ans.

#### **IV.4 Type d'étude**

Nous avons effectué une étude prospective descriptive portant sur un essai vaccinal allant de Mars 2017 à Mars 2018.

## **IV.5 Critères d'inclusion et de non inclusion**

### **IV.5.1 Critères d'inclusion**

Etaient inclus dans notre étude :

- ✓ Sujets âgés de 18 à 50 ans de sexe masculin ou féminin (sans grossesse).
- ✓ Disponible pendant la durée de l'étude.
- ✓ Capable de fournir une pièce d'identité à la satisfaction du clinicien de l'étude qui fait le processus d'enrôlement.
- ✓ Bon état général sans antécédents médicaux et chirurgicaux significatifs.
- ✓ Accepter que les échantillons de sang prélevés soient gardés pour des futures recherches.
- ✓ Résidant connu de Bancoumana ou environnant.
- ✓ Donner le consentement individuel et éclairé.

### **IV.5.2 Critères de non inclusion**

- ✓ Grossesse confirmée chez une femme par un test d'urines ou de sérum ( $\beta$ -hCG).
- ✓ Allaitement en cours.
- ✓ Le taux d'hémoglobine, des globules blancs et des plaquettes au-delà et au-dessous de la norme.
- ✓ Valeur de l'alanine Aminotransférase (ALAT) ou de la créatinémie au-dessus de la limite supérieure.
- ✓ Un test positif au virus de l'immunodéficience humaine (VIH), au virus de l'hépatite C (VHC), ou au virus de l'hépatite B (VHB).
- ✓ Antécédents d'allergie à un des composants des candidats vaccin.
- ✓ Antécédents de réaction sévère aux piqûres de moustiques.
- ✓ Administration antérieure de vaccin antipaludique expérimentale dans les cinq dernières années.

## **IV.6 Déroulement et procédures de l'étude**

La permission communautaire a été obtenue auprès des notables des villages et des autres membres de la communauté à travers l'explication du protocole. La discussion sur l'étude a été faite au cours d'une rencontre communautaire, invitant les chefs de ménages et de familles.

### **IV.6.1 Consentement**

Avant l'administration du consentement individuel l'équipe a pris soin d'examiner le contenu du formulaire de consentement de l'étude qui est traduit oralement en langue locale. Les volontaires ont été encouragés à poser des questions ensuite un questionnaire leur a été administré pour évaluer la compréhension du consentement. Le test de compréhension

comportait vingt questions et il fallait seize bonnes réponses ou plus pour valider le test. Cela aidait à s'assurer que le volontaire avait entièrement compris avant de signer le formulaire de consentement. Le volontaire non lettré apposait son empreinte digitale à la place de la signature ; de plus, un témoin indépendant signait le formulaire du consentement pour attester que le volontaire a compris le contenu et a consenti volontairement.

#### **IV.6.2 Le dépistage**

Après la signature des documents de consentements, les volontaires ont été invités pour les examens de dépistage. Au cours du dépistage les volontaires ont été interrogés sur les antécédents médicaux puis ils ont subi un examen physique complet, l'Electrocardiogramme (ECG) et un prélèvement de sang pour l'hémogramme, la créatinémie, le dosage de l'ALAT, le test HIV (avec pré et post counseling), VHC, VHB.

En cas de maladie découverte au cours du dépistage, le sujet est traité ou référé dans les services spécialisés au besoin.

#### **IV.7 Techniques de Laboratoire**

Le laboratoire clinique a effectué les tests suivants:

1. Goutte Epaisse (GE)
2. Numération formule sanguine complète (NFS)

Les paramètres suivants de la NFS ont été évalués pour la tolérance durant l'étude : Globules blancs, nombre absolu de neutrophiles (ANC)/ nombre absolu de lymphocytes (ALC), l'hémoglobine et les plaquettes,

3. Créatinine sérique (Cr)
4. Alanine aminotransférase (ALAT)

##### **IV.7.1 Diagnostic du Paludisme**

###### **✓ Gouttes Epaises**

Les gouttes épaisses et les frottis sanguins colorés au Giemsa ont été examinés au laboratoire de biologie Clinique du Malaria Research et Training Center (MRTC) conformément au SOP en vigueur (cf. annexe)

###### **✓ Tests de Diagnostic rapide**

Pour les visites imprévues et les diagnostics cliniques, les tests de diagnostic rapides ont été utilisés pour la mise en évidence d'un ou plusieurs antigènes de *Plasmodium* mais ces tests rapides ne peuvent être utilisés à la place de la microscopie pour déterminer si le sujet était éligible pour gorger directement les *Anophèles*.

#### **IV.7.2 Technique de détermination des paramètres hématologiques :**

Nous avons utilisé l'automate Beeckman Coulter AC•T 5diff CP (voir les détails en annexes)

#### **IV.7.3 Technique de détermination des paramètres biochimiques :**

Nous avons utilisé l'automate Pentra C200 (voir les détails en annexes)

#### **IV.7.4 Technique de détermination des variants d'hémoglobine avec le D-10 :**

##### **✓ Principe de la procédure du D-10**

Le D-10 Dual Program repose sur le principe de la séparation des analyses par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) par échange d'ions. Les échantillons sont automatiquement dilués dans le système D-10 puis injectés dans la cartouche analytique.

Le système D-10 envoie un gradient programmé de tampon de force ionique croissante (il existe 2 solutions de réactif de force ionique différentes, l'une hyper concentrée en ion et l'autre peu concentrée en ion). La machine mélange de façon automatique au fil du temps ces solutions pour obtenir une solution finale de concentration croissante dans la cartouche ; les molécules d'hémoglobine sont alors séparées en fonction de leur interaction ionique avec le matériel contenu dans la cartouche. Les molécules d'hémoglobine séparées traversent ensuite la cellule à circulation du photomètre filtre où sont mesurés les changements d'absorbance à 415 nm. Le logiciel D-10 intègre les données brutes recueillies lors de chaque analyse. Un étalonnage à deux niveaux est employé pour déterminer les concentrations des différents types d'Hb recherchés. Un compte-rendu d'analyse et un chromatogramme sont générés pour chaque échantillon. La surface de l'hémoglobine glyquée (A1c) est calculée à l'aide d'un algorithme gaussien.

Exponentiellement modifié EM qui permet d'exclure la surface des pics dus à l'A1c labile et à l'hémoglobine carbamylée de la surface du pic A1c.

##### **✓ Prélèvement et manipulation des échantillons**

##### **✓ Type d'échantillon**

On utilise le sang total.

##### **✓ Précautions relatives au prélèvement des échantillons**

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

Les échantillons de sang total doivent être recueillis dans un tube sous vide contenant de l'EDTA.

##### **✓ Conservation des échantillons**

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

#### ✓ Préparation des échantillons

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

S'assurer que les codes-barres sur les échantillons sont tournés vers l'arrière de l'appareil.

Utiliser des adaptateurs spéciaux pour les tubes de 12, 13 et 14 mm de diamètre. Retirer tous les adaptateurs pour les tubes de 16 mm de diamètre. Les tubes dont la hauteur est comprise entre 75 mm et 100 mm peuvent être utilisés. Si l'échantillon se trouve dans un tube de taille ou de type anormal ou si le tube contient moins de 2,0 mL d'échantillon, une pré dilution est nécessaire. Pour pré diluer, pipeter 1,5 mL de solution de lavage/dilution dans un micro-tube de 1,5 mL étiqueté puis ajouter 5 µL de l'échantillon de sang total. Boucher le tube et bien mélanger. Utiliser un adaptateur pour les micro-tubes de 1,5 mL.

#### **IV.8 Considération Ethique :**

L'étude a été approuvée par les comités d'éthiques de la FMPOS et du NIAID/NIH. Aussi, tous les amendements subséquents au protocole ont été soumis à ces deux comités d'éthiques et une approbation a été obtenue à chaque fois avant la mise en œuvre des changements apportés.

La participation à l'étude était volontaire et, chaque participant avait la possibilité de retirer son consentement à tout moment durant la conduite de l'étude.

La confidentialité des données a été maintenue conformément aux exigences réglementaires. Seul le personnel autorisé avait accès aux données de l'étude et, il n'y avait qu'un numéro d'étude sur le dossier médical de chaque participant.

#### **IV.9 Collecte, Traitement et Analyses des données :**

Les données étaient recueillies sur des formulaires de report de cas (FREC) puis transmises dans une base de données électronique appelée DataFax. Les dossiers et les échantillons de produit biologique des volontaires ne portaient pas leur nom. Ces données ont fait l'objet d'un contrôle de qualité. Un numéro d'étude avait été attribué à tous les volontaires. Les données ont été saisies sur le logiciel Microsoft Excel2013 et analysées avec les logiciels SPSS 20.0 pour les analyses quantitatives et EpiInfo7 pour les analyses qualitatives. Le test du  $\chi^2$  a été utilisé



pour comparer les différentes variables catégorielles. Et le t-test de Student a été utilisé pour la comparaison des moyennes.

Le seuil de signification statistique a été fixé à  $p < 0,05$ .

## V. RESULTATS:

### V.1 RESULTATS SOCIO-DEMOGRAPHIQUES :

Caractéristiques socio-démographiques de la population d'étude

**Tableau IV : Répartition de la population d'étude selon le sexe**

Sexe	Effectif	Pourcentage
Masculin	74	57,8
Féminin	54	42,2
<b>Total</b>	<b>128</b>	<b>100</b>

Le sexe masculin était le plus représenté dans la population d'étude (57,8%) avec un sexe ratio de 1,37.

**Tableau V : Fréquence des variants d'hémoglobine dans la population d'étude**

Variants d'Hb	Effectif	Pourcentage
AA	103	80,5
AC	9	7
AS	15	11,7
SC	1	0,8
<b>Total</b>	<b>128</b>	<b>100</b>

La prévalence globale des hémoglobines anormales dans notre population d'étude était de 19,5%. Le trait drépanocytaire (HbAS, 11,7%) était le plus représenté.

**Tableau VI : Fréquence des variants d'hémoglobine selon le sexe**

Sexe	Variants d'hémoglobine (%)				Total
	AA	AC	AS	SC	
Masculin	56 (54)	7 (78)	10 (67)	1 (100)	74
Féminin	47 (46)	2 (22)	5 (33)	0 (0)	54
<b>Total</b>	<b>103 (100)</b>	<b>9 (100)</b>	<b>15 (100)</b>	<b>1 (100)</b>	<b>128</b>

Le trait drépanocytaire était beaucoup plus élevé chez le sujet masculin environ 78% AC et 67% AS que chez le sujet féminin respectivement 22% et 33% ( $p < 0,001$ )

## V.2 RESULTATS DE LA PARASITEMIE :

**Tableau VII : Fréquence des espèces plasmodiales selon les variants d'hémoglobines durant la période de transmission 2017 (JUL, OCT et DEC)**

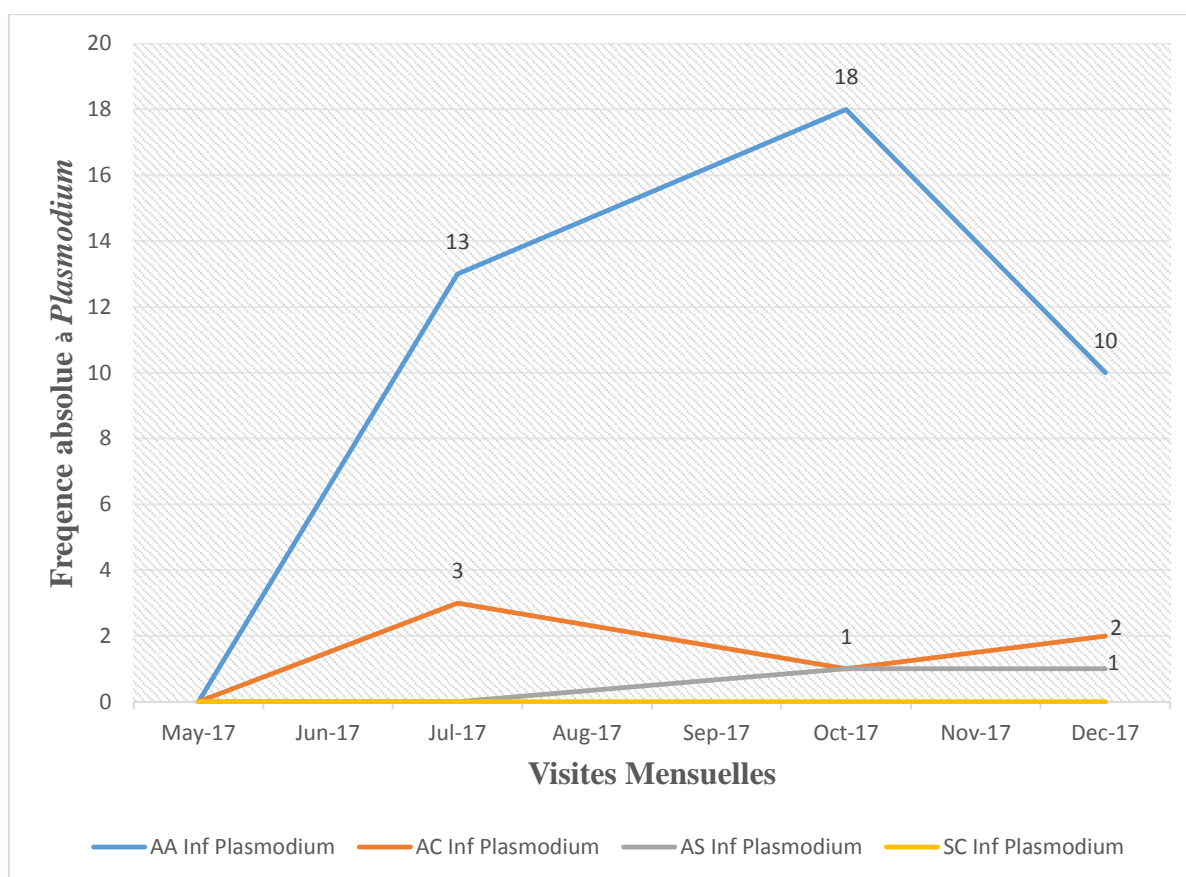
Variants d'hémoglobine	Espèces	Effectifs			Pourcentage
		JUL	OCT	DEC	
AA	<b>Pf</b>	13	18	10	<b>93,2</b>
	<b>Gf</b>	4	5	4	
	<b>Pm</b>	1	1	0	<b>4,5</b>
	<b>Po</b>	1	0	0	<b>2,3</b>
	<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>19</b>	<b>10</b>	<b>100,0</b>
AC	<b>Pf</b>	3	1	2	<b>100,0</b>
	<b>Gf</b>	0	1	0	
AS	<b>Pf</b>	0	1	1	<b>100,0</b>
	<b>Gf</b>	0	0	1	

On constate la présence de *P. falciparum* chez les porteurs de tous les variants d'hémoglobine, *P. malariae* et *P. ovale* sont absents chez les volontaires qui ont le trait drépanocytaires.

**Tableau VIII : Taux moyen de la parasitémie à *Plasmodium falciparum* selon les variants d'hémoglobine à différentes visites**

VARIANTS D'HEMOGLOBINE	JUIL-17	OCT-17	DEC-17
<b>AA</b>	150,8	484,4	456
<b>AC</b>	93,2	40	120
<b>AS</b>	-	40	40
<b>SC</b>	-	-	-

Le taux moyen de la parasitémie à *Plasmodium falciparum* était toujours élevé chez les porteurs d'hémoglobine normale (HbAA 484,4 parasites/ $\mu$ l de sang) comparés aux porteurs d'hémoglobine anormale (HbAC 120 parasites /  $\mu$ l de sang ou HbAS 40 parasite /  $\mu$ l de sang) au cours de l'étude. Comparés aux porteurs d'HbAC, les porteurs du trait drépanocytaire HbAS avaient un taux moyen de la parasitémie faible au cours de notre étude.



**Figure 11:** Courbe de survenue de l'infection à *Plasmodium* selon les variants de l'hémoglobine

On constate que le variant d'hémoglobine AA est plus susceptible aux infections palustre par rapport aux variants d'hémoglobine AC et AS dans notre étude ( $p < 0,001$  ; AA vs AC, AS en OCT 2017).

### V.3 RESULTATS DES PARAMETRES HEMATOLOGIQUES :

**Tableau VIX :** Taux moyen des paramètres Hématologiques selon les variants d'hémoglobine.

Variants d'Hb	WBC ± ET	HGB ± ET	PLT ± ET	ANC ± ET	ALC ± ET
AA (n=183)	5,0879 ± 1,1372	12,8295 ± 1,5046	239,13 ± 72,374	2,0705 ± 0,6903	2,3181 ± 0,6219
AS (n=26)	5,0538 ± 1,3822	13,0077 ± 1,9068	244,81 ± 57,101	2,2635 ± 0,9417	2,1111 ± 0,5279
AC (n=18)	5,6500 ± 1,3840	13,2667 ± 1,1747	246,39 ± 53,158	2,2439 ± 0,9702	2,7578 ± 0,6427

Nous n'avons pas observé une différence statistiquement significative entre les paramètres hématologiques en fonction des variants d'hémoglobine ( $p>0,05$ ).

#### V.4 RESULTATS DES PARAMETRES BIOCHIMIQUES :

**Tableau X : Taux moyen des paramètres biochimiques selon les variants d'hémoglobine**

<b>Variants d'Hb</b>	<b>Creat <math>\pm</math> ET</b>	<b>ALT <math>\pm</math> ET</b>
<b>AA (n=183)</b>	83,6334 $\pm$ 14,0487	17,4962 $\pm$ 8,0641
<b>AC (n=18)</b>	84,6622 $\pm$ 13,3791	17,3611 $\pm$ 9,3546
<b>AS (n=26)</b>	84,8131 $\pm$ 11,3677	15,8808 $\pm$ 5,596

Dans notre étude, nous n'avons pas observés une différence statistiquement significative entre les paramètres biochimiques en fonction des variants d'hémoglobine ( $p>0,05$ ).

## **VI. COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS :**

### **Sur le plan méthodologique**

Le but de notre étude était d'évaluer la fréquence des variants d'hémoglobine et son impact sur la parasitémie à *Plasmodium*, les paramètres hématologiques et biochimiques des participants à l'essai vaccinal antipaludique (Pfs25-230/AS01) à Bancoumana de Mars 2017 au Mars 2018. Nous avons déterminé les paramètres sociodémographiques, la prévalence des variants d'hémoglobine, indiqué la moyenne de la parasitémie à *Plasmodium* (par goutte épaisse), les paramètres hématologiques et biochimiques (par les automates AcT Diff 5. et Pentra C 200) chez l'ensemble des volontaires. La goutte épaisse, les paramètres hématologiques et biochimiques ont été traités sur place et le typage d'hémoglobine a été effectué à Bamako.

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

### **Sur le plan des résultats**

#### **Paramètres sociodémographiques**

Sur le plan sociodémographique nous avons constaté que dans notre population d'étude les hommes étaient majoritaires par rapport aux femmes avec un sexe ratio de 1,37. La prévalence de trait drépanocytaire était beaucoup plus élevé chez les hommes environ 9,5% AC et 13,5% AS que chez le sujet féminin respectivement 3,7% et 9,3%.

#### **Distribution des variants d'hémoglobine dans notre population d'étude**

Dans notre étude, nous avons trouvé 11,7% de sujets HbAS et 7% de sujets HbAC (Tableau II). Dans la même zone, Kamate en 2012 et Doumbia en 2010 avaient trouvé des proportions similaires respectivement (14,4% d'HbAS et 6,6% d'HbAC) et (13,80% d'HbAS et 5,03% d'HbAC) [62]. En 1992, Baby avait trouvé 14,75% d'HbAC et 3,05% d'HbAS dans la population des Dogons de Bandiagara qui sont supposés être originaires du Mandé [63]. Diallo et coll. en 1994 avaient trouvé chez les dogons au Mali 15,8% d'HbAC et une faible fréquence de 3,05% d'HbAS [64]. Ces différences de proportions avec notre étude s'expliquent probablement par le fait que notre population d'étude était majoritairement constituée de Malinké [35].

Dans cette population, l'HbC est associé à une réduction significative du risque de neuropaludisme [65]. Le même constat a été fait au Burkina Faso [66] et au Ghana [67]. La

différence environnementale et la pression exercée par les maladies infectieuses semblent jouer un rôle dans la sélection des variants génétiques conférant une résistance à ces maladies infectieuses. Plusieurs études ont démontré que différents polymorphismes de la bêta-globine sont retrouvés chez différentes populations [35].

### **Relation entre les variants d'hémoglobine et la parasitémie à *Plasmodium falciparum***

Au cours de notre étude le nombre maximum d'infection palustre a été observé chez les volontaires du type d'HbAA par rapport aux autres types (HbAC et HbAS). Ces résultats nous démontrent que l'HbAC et l'HbAS protègent contre l'infection palustre et influent sur la présentation clinique de la maladie. Les premières observations entre le trait drépanocytaire et le paludisme provenaient de la Rhodésie du Nord (actuelle Zambie) où Beet notait que les parasites du paludisme étaient moins fréquents dans le sang des sujets ayant le trait drépanocytaire [68]. Allison attirait l'attention sur cette association en concluant que les personnes ayant le trait drépanocytaire développaient un paludisme moins fréquent et moins sévère que ceux n'ayant pas ce trait [69]. Allison observa le premier dès 1949 qu'il y'avait une fréquence élevée du trait drépanocytaire (au moins 20%) dans les populations vivant près des régions côtières kényanes et autour du lac Victoria à l'opposé d'une faible fréquence de l'hémoglobine S sur les hautes terres où le paludisme était inexistant.

Comparé aux résultats de Gonçalves et al, en 2017 donnent des indications sur la manière dont ces facteurs génétiques protecteurs peuvent affecter les infections naturelles et pourraient avoir des implications pratiques pour les programmes de contrôle et d'élimination du paludisme dans les zones où ces mutations sont courantes. Bien qu'il soit possible que les mécanismes de protection procurés par ces variants ciblent des événements pathogènes propres aux cas cliniques graves, la preuve épidémiologique selon laquelle ces variants influent également sur le risque de paludisme clinique non sévère suggère que l'hétérozygotie pour l'hémoglobine C ou S influence les processus pathogènes communs aux patients, toutes les infections à *P. falciparum*. Les travaux expérimentaux indiquent également que ces mutations affectent les parasites du paludisme de différentes manières. Cependant, nous ne comprenons toujours pas l'importance de ces différents mécanismes dans les infections naturelles et la différence entre la dynamique parasitaire intra-hôte chez les AA et les hétérozygotes AS ou AC, notamment en termes de durée de la circulation du parasite et de production des stades de transmission [70].

### **Relation entre les variants d'hémoglobine et le taux moyen des paramètres hématologiques**

Les valeurs moyennes des paramètres hématologiques (tableau VI) chez tous les types d'hémoglobine sont dans la norme de référence locale selon notre protocole d'étude. Nous n'avons pas trouvé dans notre revue de la littérature d'autres études évaluant la relation entre les variants de l'hémoglobine et le taux moyen des paramètres hématologiques.

### **Relation entre les variants d'hémoglobine et le taux moyen des paramètres biochimiques**

Dans notre étude, la créatininémie avait une valeur moyenne d'environ 84  $\mu\text{mol/l}$  (tableau VII) avec des valeurs normales s'étendant de 48 à 98  $\mu\text{mol/l}$ . Ces valeurs sont proches de celles proposées par Popper H. et coll. (76  $\mu\text{mol/l}$ ), et de celles rapportées par d'autres auteurs [71].

Ainsi l'alanine aminotransférase (ALT) a une valeur moyenne d'environ 17UI/L dans notre population d'étude (tableau VII) avec des valeurs normales < 41UI/L.

L'alanine aminotransférase est surtout retrouvée au niveau du tissu hépatique et à des concentrations moindres dans le myocarde, le pancréas, les reins, les muscles squelettiques. Les transaminases sériques sont donc non spécifiques d'une cytolyse hépatique mais néanmoins intéressantes à connaître [53, 61].

Cependant nous n'avons pas constaté l'influence du type d'hémoglobine sur nos valeurs de la créatinémie (Créat) et l'alanine aminotransférase (ALT) dans notre population d'étude.

### **Notre étude présentes quelques limites :**

- Nous n'avons pas inclus les volontaires ayant des valeurs anormales des paramètres hématologiques et biochimiques. Cela rend difficile l'interprétation de la relation entre les variants d'hémoglobine et des paramètres biochimiques et hématologiques.
- Nous avons inclus uniquement des volontaires adultes, excluant les enfants. Ceci pourrait expliquer l'absence des drépanocytaires confirmés et homozygotes SS dans notre échantillon ; ces cas étant associés à une forte mortalité à un jeune âge.
- La taille d'échantillon (n=128) est faible aux regards de la fréquence des variants d'hémoglobine dans la population ne général. Cela a probablement donné un manque de puissance à notre étude.



## VII. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

### CONCLUSION

Au terme de ce travail nous pouvons conclure que :

Le type d'hémoglobine normale HbAA était plus susceptible à l'infection palustre, les types d'hémoglobine anormale (HbAC, HbAS) étaient aussi susceptibles de l'infection à *Plasmodium falciparum* mais à un niveau moindre par rapport à HbAA.

Les types d'hémoglobine n'avaient pas d'impact significatif sur les paramètres hématologiques et biochimiques étudiés. Toutefois ce résultat peut traduire le manque de puissance de notre étude.

## **RECOMMANDATIONS**

Au terme de notre étude nous reformulons les recommandations suivantes :

### **Aux autorités :**

De collaborer avec le MRTC qui est sur place afin de sensibiliser la population à faire le dépistage de ces dites hémoglobinopathies et leurs surveillances ;

Encourager la population à participer aux essais cliniques ;

De renforcer les coopérations entre l'université et les bailleurs afin de multiplier les recherches ;

Créer un cadre permettant un transfert de compétence et de technologie ;

### **Aux personnels chercheurs :**

De mener des campagnes de sensibilisation dans le but de faire comprendre à la population l'importance de la lutte contre le paludisme ;

Encourager des études similaires sur l'impact des types d'hémoglobine dans les autres sites d'essai cliniques du MRTC et avec des tailles d'échantillons plus grandes

### **A la population :**

De se faire dépister pour minimiser le risque de propagation de cette maladie génétique ;

De participer massivement à ces études de recherche afin qu'ensemble puisse progresser dans la recherche et aller vers l'éradication du paludisme.

## REFERENCES

1. Mlle Imane A. hémoglobines humaines : moyennes de diagnostic biologique [Thèse]. [Rabat]: Faculté de Médecine et de Pharmacie –rabat; 2012.
2. Valérie G. Mise en place de l'électrophorèse capillaire MINICAP® (Sebia) pour le diagnostic des hémoglobinopathies au CHU de Nancy [Mémoire du diplôme d'études spécialisées de biologie médicale]. [Nancy]; 2014.
3. Mr Sadio K. Impact de la supplémentation martiale chez des enfants d'âge scolaire anémiques et porteurs d'hémoglobinopathies s & c au Mali. [Thèse de Médecine]. [Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie du Mali]: Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako; 2006.
4. Modiano D, Luoni G, Sirima BS, Simporé J, Verra F, Konaté A, et al. Haemoglobin C protects against clinical Plasmodium falciparum malaria. *Nature*. 15 nov 2001;414(6861):305- 8.
5. Mukisi Mukaza M. Contribution à l'étude de l'ostéonécrose drépanocytaire de la tête fémorale de l'adulte Epidémiologie, diagnostic et traitement [Thèse de Doctorat en Sciences]. [Bruxelle]: Médicales Faculté de Médecine, ULB; 2010.
6. Nagara M, Alba-Sauviat C, Simeon D, Gaudeau-Toussaint M-F, Fontvielle F, Faucher G. L'hémoglobine C homozygote : à propos d'un cas de découverte fortuite. *Immuno-Anal Biol Spéc*. août 2009;24(4):210- 6.
7. Ou CN, Rognerud CL. Diagnosis of hemoglobinopathies: electrophoresis vs. HPLC. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. nov 2001;313(1- 2):187- 94.
8. Labie D, Elion J. Bases moléculaires et physiopathologiques des maladies de l'hémoglobine. *EMC - Hématologie*. déc 2005;2(4):220- 39.
9. Bourée P, Ensaf A. La drépanocytose : une hémoglobinopathie tropicale qui devient cosmopolite. *Option/Bio*. nov 2012;23(481):15- 7.
10. Jeanne L. Place de l'électrophorèse capillaire dans le diagnostic et le suivi des hémoglobinopathies. *Option/Bio*. 1 avr 2010;21(434):17- 20.
11. Wiwanitkit V. Hemoglobin E disorder: Newborn screening program. *Indian J Hum Genet*. 2013;19(3):279- 81.
12. PELTIER J.Y., SAYADA C., GIROT R. Les alphas thalassémies. *Ann Bio Clin*. 1994;52:321- 31.
13. Pierre Aubry, Bernard-Alex Gaüzère. Paludisme Actualités 2017. Cours présenté à; 2017; Medecine Tropicale.
14. Niangaly A, Karthigayan Gunalan null, Amed Ouattara null, Coulibaly D, Sá JM, Adams M, et al. Plasmodium vivax Infections over 3 Years in Duffy Blood Group Negative Malians in Bandiagara, Mali. *Am J Trop Med Hyg*. sept 2017;97(3):744- 52.
15. Mlle Merepen dite Agnès G. Validation d'une technique Elisa pour l'évaluation de l'immunogénicité en phase ib du candidat vaccin ama1-c1/alhydrogel contre le plasmodium falciparum au Mali. [Thèse de Pharmacie]. [Essai Vaccinal]: Université du Mali; 2006.

16. Essai de Phase 1 avec Escalade de Dose, en Double Aveugle, Randomisé, Contrôlé de la Tolérance et de l'Immunogénicité des Vaccins Pfs25M-EPA/AS01 et Pfs230D1M-EPA/AS01, Vaccins Bloquant la Transmission du Plasmodium falciparum, à Dose Complète et Fractionnaire chez les adultes au Mali.
17. BERNARD J., LEVY J.P., VARET B., CLAUREL J.P., RAIN J.D., SULTANT Y. Abrégés d'hématologie [Internet]. 9<sup>e</sup> édition. Paris: Masson; 1998 [cité 6 juill 2018]. Disponible sur: <https://www.abebooks.fr/9782225835674/H%C3%A9matologie-9e-%C3%A9dition-Bernard-L%C3%A9vy-2225835675/plp>
18. Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ. Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. 2nd edition. New York: Cambridge University Press; 2009. 846 p.
19. Pouiré Y. Contribution A L'étude des Paramètres Hématologiques Chez Les Femmes Enceintes Atteintes d'une Alpha Thalassémie Au Centre Médical Saint Camille d'Ouagadougou [Mémoire]. [Biotechnologie Microbienne et Cellulaire]; 2009.
20. ORSINA A. Les hémoglobinoses: introduction. Ann Pédiatrie. 1985;32 (9):743.
21. Godart C., Riou J. Place de l'HPLC dans le diagnostic des hémoglobinopathies. BIO-RAD. 2007;
22. Bardakdjian-Michau J. Le dépistage néonatal de la drépanocytose en France. Arch Pédiatrie. juin 2008;15(5):738- 40.
23. Lionnet F, Arlet J-B, Bartolucci P, Habibi A, Ribeil J-A, Stankovic K. Recommandations pratiques de prise en charge de la drépanocytose de l'adulte. Rev Médecine Interne. sept 2009;30:S162- 223.
24. Arnal C, Girot R. Drépanocytose chez l'adulte. EMC – Hématologie. 2004;1- 15.
25. Piel FB, Howes RE, Patil AP, Nyangiri OA, Gething PW, Bhatt S, et al. The distribution of haemoglobin C and its prevalence in newborns in Africa. Sci Rep. 2013;3:1671.
26. El Maataoui A, Ouzzif Z. L'hémoglobine C/OArabe : histoire d'une famille. Pathol Biol. oct 2012;60(5):320- 1.
27. Charache S, Conley CL, Waugh DF, Ugoretz RJ, Spurrell JR. Pathogenesis of hemolytic anemia in homozygous hemoglobin C disease. J Clin Invest. nov 1967;46(11):1795- 811.
28. Godeau B, Galactéros F. Principales hémoglobinopathies. EMC – AKOS Traité Médecine. 2003;1- 6.
29. Moiz B, Hashmi MR, Nasir A, Rashid A, Moatter T. Hemoglobin E syndromes in Pakistani population. BMC Blood Disord. 25 mars 2012;12:3.
30. Gulbis B, Cotton F, Vertongen F. Hémoglobines anormales rares. EMC - Hématologie. 1 nov 2004;1(4):106- 14.

31. Aguilar-Martinez P, Badens C, Bonello-Palot N, Cadet E, Couque N, Ducrocq R, Elion J, Francina A, Joly P, Pissard S, Rochette J. Arbres décisionnels pour le diagnostic et la caractérisation moléculaire des hémoglobinopathies. *Ann Biol Clin Paris*. 2010;68:455–464.
32. Montalembert M de. Syndromes thalassémiques. EMC – Hématologie. 2002;1- 8.
33. Wéry M. Les plasmodiums parasites de l’homme : paludisme ou malaria, In *Protozoologie médicale*. Ed.De Boeck. Belgique: De Boeck Université; 1995.
34. Josserand Debacker M, Fisch A. Paludisme: historique, mythes, croyances et idées reçues. 2000.
35. Mr François KAMATE. Impact des polymorphismes de l’hémoglobine et du globule rouge sur la fréquence du Paludisme dans la commune rurale de Bancoumana (Mali) [Thèse de Pharmacie]. [Faculté de Médecine, de Pharmacie et d’Odontostomatologie du Mali]: Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako; 2012.
36. WHO | World malaria report 2018 [Internet]. WHO. [cité 5 mars 2019]. Disponible sur: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/en/>
37. Allasseini BALAM. Epidémiologie du paludisme chez les scolaires de Donegoubougou durant l’année scolaire 2007-2008 [Thèse de médecine]. USTTB; 2010.
38. DOUMBO O. Epidémiologie du paludisme au Mali, étude de la chloroquino-résistance, essai de stratégie de contrôle basé sur l’utilisation de rideaux imprégnés de perméthrine associé au traitement systématique des accès fébriles [Thèse de Doctorat des sciences biologiques (Parasitologie, pathologie, Ecologie)]. Montpellier; 1992.
39. KOITA O. Contribution à l’étude épidémiologique du paludisme le long de la route transsaharienne au Mali Août/sept1988 [Thèse de Pharmacie,]. Bamako; 1988.
40. Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. The global distribution of clinical episodes of Plasmodium falciparum malaria. *Nature*. 10 mars 2005;434(7030):214- 7.
41. Elodie-Anne STAUDT. Un Vaccin contre le Paludisme : obstacles, espoirs et avancées [Thèse de Pharmacie]. UL; 2009.
42. Ripert C. Paludisme, In *Epidémiologie des maladies parasitaires* [Internet]. Eds Tec & Doc Lavoisier. Londres; 1996 [cité 6 juill 2018]. Disponible sur: <https://www.decite.fr/livres/epidemiologie-des-maladies-parasitaires-9782743000769.html>
43. Lopera-Mesa, T.M., et al.,. Impact of red blood cell variants on childhood malaria in Mali: a prospective cohort study. *Lancet Haematol*. 2(4):140- 9.
44. M. Séidina Aboubacar Samba DIAKITE. Polymorphismes érythrocytaires et protections contre le paludisme à Plasmodium falciparum: Exploration de mécanismes innés [Thèse de doctorat de Sciences]. 2015.
45. May, J., et al.,. Hemoglobin variants and disease manifestations in severe falciparum malaria. *JAMA*. 2007;297(20):2220- 6.
46. HOFFMAN S. L., ISENBARGER D., LONG G. W., SEDEGAH M., SZARFMAN A., WATERS L., HOLLINGDALE M. R., VAN DER MEIDE P. H., FINBLOOM D. S.,

- BALLOU W. R. Sporozoite vaccine induces genetically restricted T cell elimination of malaria from hepatocytes. juin 1989;2(244 (4908)):1078- 81.
47. MALIK A., EGAN J. E., HOUGHTEN RA, SADOFF J. C., HOFFMAN S. L. Human cytotoxic T lymphocytes against the Plasmodium falciparum circumsporozoite protein. Proc Natl Acad Sci U A. 15 avr 1991;88(8):3300- 4.
48. LALVANI A., MORIS P., VOSS G., PATHAN A. A., KESTER K. E., BROOKES R., et al. Potent induction of focused Th1-type cellular and humoral immune responses by RTS,S/SBAS2, a recombinant Plasmodium falciparum malaria vaccine. J Infect Dis. 1999;180:1656-64.
49. DUFFY P. E., KASLOW D. C. A novel malaria protein, Pfs28, and Pfs25 are genetically linked and synergistic as falciparum malaria transmission-blocking vaccines. Infect Immun. 65(3):1109-1113.
50. Capucine PAROT. Bilans héματο-biochimiques Chez le cheval d'endurance de haut niveau : Intérêt pronostic et proposition de valeurs de référence [Thèse de Médecine Vétérinaire]. 2011.
51. Michel Pavic, Patrick Gérome. Hematologie. Cours Medecine Interne présenté à; 2013; Université Médicale Virtuelle Francophone.
52. G. JANSSENS. Répertoire d'Analyses de Biologie Clinique. 2015.
53. Borel J., Caron J., Chanard J., Gougeon 1., Leutenegger M., Maquart F.X., Potron G., Randoux A. et Zeitoun P. Comment prescrire et interpréter un examen de biochimie. 2ème édition. Paris: Maloine; 1984. 15- 36 p.
54. Boulanger P., Polonovski M., Tayeau F., Mandel P., Biserte G. Biochimie médicale. Fascicule III. Sang, humeur, tissus, organes. Biochimie physiologique et sémiologique. 8e édition. Paris: Masson; 1971. 740 p.
55. Charrel M. Sémiologie biochimique. Marketing. 1991;160.
56. Popper H., Mandel E., Mayer H. Creatinine detezmination in blood. Biochem. 1937;291:354- 67.
57. Bernard S. Biochimie clinique: instruments et techniques de laboratoires ; diagnostics médico-chirurgicaux. 2ème éd. Paris: Maloine; 1999. 369 p.
58. Arnaud M., Bucenard J., Tixier M., Bertin P., Trèves R. Métabolisme des purines. Endocrinol -Nutr. 1992;10-379A-10:14.
59. Haeckel R.J. The detennination ofuric acid concentration. J Clin Chem. 1976;14:101- 8.
60. Blacque Belaire A., Depossey B.M., Fourestier M. Dictionnaire des constantes biologiques et physiques. Applications cliniques et explorations paracliniques. 5ème édition. Paris: Maloine; 1980.
61. Mazières B. Physiopathologie de l'hyperuricémie. Rev Prat. 33:2231- 41.

62. DOUMBIA M. Prévalence des polymorphismes du paludisme et du connus comme protecteurs contre le paludisme dans la commune rurale de Bancoumana (MALI) [Thèse de Pharmacie]. [Bamako]: Faculté de Médecine et de Pharmacie du Mali; 2010.
63. Baby M. Approche pluridisciplinaire des hémoglobinopathies chez les dogons de l'arrondissement de Sangha (MALI) [Thèse de Pharmacie]. [Bamako]: Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie, Mali; 1992.
64. Diallo, D., et al. Haemoglobinopathies C and S in the Dogons. Nouvelle revue française d'hématologie. 1994;35(6):551- 4.
65. KEITA B. Etude prospective des indicateurs du paludisme de 2008 à 2011 dans les villages de Kéniéroba, Fourda et Bozokin dans la commune rurale de Bancoumana, Mali: Influence des polymorphismes du globule rouge. [Thèse de Médecine]. [Bamako]: Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie, Bamako, Mali; 2016.
66. Modiano D, Luoni G, Sirima BS, Simporé J, Verra F, Konaté A, et al. Haemoglobin C protects against clinical Plasmodium falciparum malaria. Nature [Internet]. nov 2001 [cité 19 nov 2018];414(6861):305- 8. Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/35104556>
67. Mockenhaupt, F.P., et al. Hemoglobin C and resistance to severe malaria in Ghanaian children. J Infect Dis. 2004;190(5):1006- 9.
68. Beet, E.A. The genetics of the sickle-cell trait in a Bantu tribe. Ann Eugen. 1949;14(4):279- 84.
69. Allison, A.C. Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. Br Med J. 1954;1(4857):290- 4.
70. Gonçalves BP, Sagara I, Coulibaly M, Wu Y, Assadou MH, Guindo A, et al. Hemoglobin variants shape the distribution of malaria parasites in human populations and their transmission potential. Sci Rep [Internet]. 27 oct 2017 [cité 12 avr 2019];7. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5660173/>
71. OUEDRAOGO MT. Etude comparative chez la femme enceinte et la femme non enceinte au Centre Hospitalier National Yalgado Ouédraogo (C.H.N.Y.O) et au Centre Médical Saint Camille de Ouagadougou. [Thèse de Pharmacie]. [Unité de formation et de Recherche des Sciences de la Santé (UFR/SDS)]: UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU; 2001.

## Fiche signalétique

**Nom:** TRAORE

**Section :** Pharmacie

**Prénom:** Modibo

**Secteurs d'intérêt :** Parasitologie,

**E-mail :** [traoremodibo41@gmail.com](mailto:traoremodibo41@gmail.com)

Hématologie, Biochimie et Santé publique

**Nationalité:** malienne

**Date de soutenance:** 28 / 05 / 2019

**Ville de soutenance:** Bamako

**Lieu de dépôt :** Bibliothèque de la Faculté de Médecine et d'Odonto-Stomatologie et de la Faculté de Pharmacie, Bamako, Mali.

**Titre:** Fréquence des variants d'hémoglobine et son impact sur la parasitémie à *Plasmodium*, les paramètres hématologiques et biochimiques chez les volontaires ayant participé aux études de vaccin contre le paludisme Pfs25M-Pfs230D1MEPA/AS01 à Bancoumana, Mali.

### RESUME

Au cours de cette étude, notre objectif était d'évaluer la fréquence des variants d'hémoglobine et leur impact sur la parasitémie à *Plasmodium*, les paramètres hématologiques et biochimiques chez les volontaires ayant participé aux études de vaccin (Pfs25M-EPA/AS01 et Pfs230D1MEPA/AS01) contre le paludisme à Bancoumana, Mali.

Nous avons testé deux candidats vaccins antipaludiques en administration seul ou en combinaison, Pfs25M et Pfs230D1M dans un essai clinique randomisé, contrôlé et en double aveugle chez 128 volontaires, âgés de 18 à 50 ans à Bancoumana, de Mars 2017 à Mars 2018.. Le prélèvement de sang a été effectué chez tous les volontaires après leur passage au poste clinique. Le prélèvement et les analyses des échantillons ont été réalisés selon les bonnes pratiques de laboratoire.

A l'issue de notre étude il ressort que :

Le type d'hémoglobine AA était plus susceptible aux infections palustre par rapport à ce qui porte le trait drépanocytaire (AC, AS).

Le taux moyen de la parasitémie à *Plasmodium falciparum* était élevé chez les porteurs d'hémoglobine normale (HbAA 12,11parasites/200 leucocytes) comparés aux porteurs d'hémoglobine anormale (HbAC 3 parasites/200 leucocytes ou HbAS 1 parasite/200 leucocytes) au cours de l'étude. Comparés aux porteurs d'HbAC, les porteurs du trait drépanocytaire (HbAS) avaient un taux moyen de la parasitémie faible.

Nous n'avons pas observé d'impact significatif du type d'hémoglobine sur les paramètres hématologiques et biochimiques étudiés.

**Mot clé :** Variants d'Hémoglobine, Parasitémie, *Plasmodium falciparum*, Paramètres Hématologiques et Biochimiques.



## Summary Data Sheet

**Name:** TRAORE

**Section:** Pharmacy

**First name:** Modibo

**Sectors of interest:** Parasitology, Hematology, Biochemistry and Public Health

**E-mail:** traoremobibo41@gmail.com

**Nationality:** Malian

**City of defense:** Bamako

**Defense date:** 28/05/2019

**Place of deposit:** Library of the Faculty of Medicine and Odonto-Stomatology and the Faculty of Pharmacy, Bamako, Mali.

**Title:** Frequency of Hemoglobin Variants and its Impact on *Plasmodium* Parasitaemia, Hematological and Biochemical Parameters in Volunteers Participating in Malaria Vaccine Studies Pfs25M-Pfs230D1MEPA / AS01 in Bancoumana, Mali.

### Summary

In this study, our goal was to evaluate the frequency of hemoglobin variants and their impact on *Plasmodium* parasitaemia, hematologic and biochemical parameters in volunteers who participated in vaccine studies (Pfs25M-EPA / AS01 and Pfs230D1MEPA / AS01) against malaria in Bancoumana, Mali.

We tested two malaria vaccine candidates either alone or in combination, Pfs25M and Pfs230D1M in a randomized, controlled, double-blind clinical trial in 128 volunteers, aged 18-50 years in Bancoumana, from March 2017 to March 2018. blood samples were taken from all volunteers after their passage at the clinic. Sample collection and analyzes were performed according to good laboratory practice.

At the end of our study it appears that:

The type of hemoglobin AA was more susceptible to malaria infections compared to that carrying the sickle cell trait (AC, AS).

The mean rate of *Plasmodium falciparum* parasite density was elevated in normal hemoglobin carriers (HbAA 12,11parasites / 200 leukocytes) compared to abnormal hemoglobin carriers (HbAC 3 parasites / 200 leukocytes or HbAS 1 parasite / 200 leukocytes) at baseline. Compared to HbAC carriers, sickle cell trait carriers (HbAS) had a low mean parasite density.

We did not observe a significant impact of the type of hemoglobin on the hematological and biochemical parameters studied.

**Keyword:** Variations of Hemoglobin, *Plasmodium falciparum*, Parasite density, Hematologic and Biochemical Parameters.

## ANNEXES

### 1. Procédures standard opératoires (SOP) de la goutte épaisse

#### ❖ Principe :

C'est une technique de concentration permettant un repérage rapide des parasites dans le sang.

#### ❖ Matériels:

- Des gants de protection de bonne qualité
- Lames nettoyées et emballées (en quantité supérieure aux besoins)
- Des lancettes stériles, de l'éthanol à 70 %
- Du coton hydrophile
- Un collecteur d'aiguilles
- Une boîte ou un plateau pour le séchage des lames à l'horizontale en les protégeant des mouches et de la poussière;
- Des formulaires ou un registre;
- Un stylo à bille pour les formulaires ou registres;
- Un crayon pour écrire sur la lame et un petit taille-crayon

#### ❖ Mode opératoire

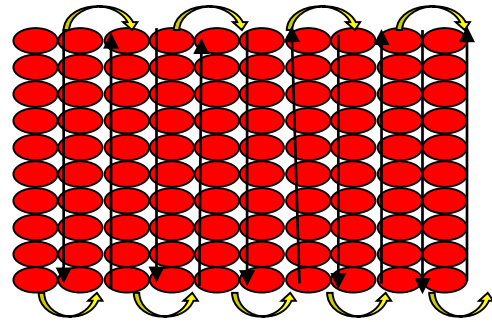
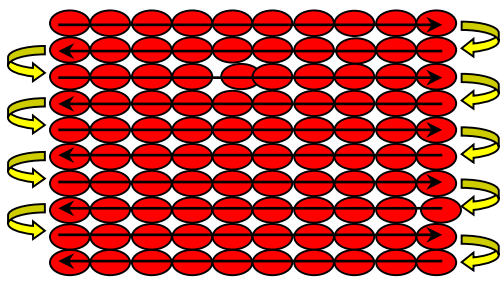
Prélever une grosse goutte de sang (environ 5-10 $\mu$ l) en le déposant directement à l'extrémité d'une lame (l'autre extrémité étant généralement réservée au frottis). A l'aide du coin d'une deuxième lame, étaler la goutte sur 1 cm de diamètre en tournant pendant quelques secondes. Laisser sécher avec soin, ne jamais fixer (cela altère la coloration).

#### ❖ Coloration

Il y a deux méthodes de coloration avec le Giemsa: la méthode rapide (colorant à 10 % durant 15 à 20 min) et la méthode lente (colorant à 3 % pendant 45 min). On emploie la méthode lente pour colorer un plus grand nombre de lames, comme c'est le cas dans les enquêtes transversales ou épidémiologiques et pour les travaux de recherche sur le terrain. Méthode rapide (10 %) C'est la méthode la plus courante pour colorer simultanément de 1 à 15 lames. En cas d'urgence c'est la méthode rapide qui est utilisée.

#### ❖ Lecture et quantification

Une goutte d'huile à immersion est placée sur la GE. Les parasites sont recherchés en utilisant l'objectif à immersion (x100) du microscope. Pour le comptage des parasites, la lame est examinée de gauche à droite ou de haut en bas comme indiqué ci-dessous afin d'identifier les parties de la GE où la répartition des leucocytes est distribuée de façon homogène.



Sens de lecture d'une lame en horizontal (1)

Sens de lecture d'une lame en vertical (2)

**Figure 12:** Technique de lecture d'une lame

Les formes asexuées (trophozoïtes) et les formes sexuées (gamétocytes) de chaque espèce plasmodiale observée sont comptées en notant simultanément les leucocytes. Le comptage se faisait sur 200 leucocytes. Une lame n'est déclarée négative qu'après lecture d'au moins 100 champs de la GE sans détecter une forme plasmodiale. La densité parasitaire par  $\mu\text{L}$  de sang est calculée en divisant le nombre de parasites comptés, par le nombre de leucocytes comptés (200 ou plus) multiplié par 8000.

❖ **Avantages et inconvénients**

- **Avantages:** La GE est sensible et donne une concentration parasitaire d'environ 20 fois plus que celle d'un frottis et peut détecter des parasites au taux extrêmement faible (5 parasites/ $\mu\text{l}$  de sang) soit une parasitémie de 0.0001%
- **Inconvénients:** lente et diagnostic d'espèce difficile.

**2. Protocol mode opératoire du frottis mince (FM)**

❖ **Principe :**

Le frottis minces est utilisé pour l'examen morphologique plus détaillée et pour déterminer les espèces de parasites. Etalement de sang sur une lame porte objet, prélevé à partir de prélèvement de sang capillaire ou de sang veineux.

❖ **Matériels:**

- Lancette stérile à usage unique
- Sous paillasse
- Coton alcoolisé
- Gant à usage unique
- Lame porte objet dégraissée
- Sac poubelle
- Etiquettes ou crayon

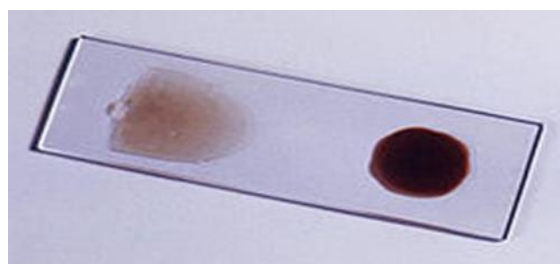
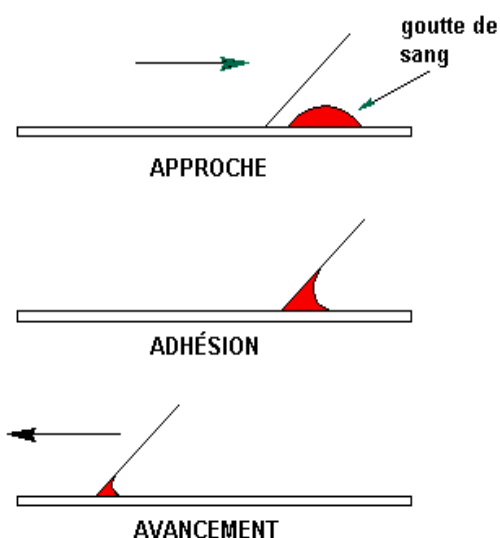
### ❖ Mode Opérateur:

#### ➤ Prélèvement

- Piqûre au niveau du 3<sup>ème</sup> ou 4<sup>ème</sup> doigt de la main
- Chez les nourrissons de moins de 6 mois, la piqûre se fait au niveau du talon ou du gros orteil.
- Nettoyer l'endroit choisi avec l'alcool
- Piquer d'un coup sec et rapide
- Essuyer la première goutte de sang avec un tampon de coton sec
- Presser le doigt piqué pour faire sortir une goutte de sang.
- Confectionner les frottis sanguins, sur une surface dure et plane
- Déposer 2,5-5µl de sang sur la lame.

#### ➤ Confection frottis mince (FM)

- Glisser le bord du frottoir jusqu'à ce qu'elle touche la goutte de sang (laisser fuser)
- Etaler d'un coup sec et régulier en respectant un angle de 45°, tout le sang doit être étalé avant d'atteindre l'autre extrémité de la lame.
- La queue du FM à couche monocellulaire: régulière, non striée.



**Figure 13** : schémas de confection d'un frotti

#### ➤ Fixation et Séchage des frottis sanguins

- Après séchage, fixer les frottis minces au méthanol
- Plonger le frottis mince au méthanol pendant 3 à 5 secondes
- Laisser sécher les frottis sur une surface plane

#### ➤ Coloration:

- Recouvrir le frottis de colorant à 10% pendant 10-15 min: coloration rapide.

- 3% pendant 30 min: coloration lente
- Rincer sous un filet d'eau distillée ou du robinet dans l'évier
- Laisser sécher le frottis à l'air libre au moins pendant 1h au minimum ou utiliser un séchoir.
- Le pH du colorant doit être légèrement alcalin/ (7.2- 7.4). Une coloration acide pourrait empêcher la mise en évidence des parasites.

➤ **Lecture:**

- Placer une goutte d'huile d'immersion sur le frottis mince (Vers la queue) puis lire avec l'objectif ×100. Sélectionner une zone dans laquelle les globules rouges ne se chevauchent pas.
- Examiner la queue ou les bords du frottis et identifier les espèces de parasites en notant les caractéristiques suivantes :

- La forme du trophozoïte
- Le nombre du trophozoïte dans le globule rouge
- La taille du globule rouge infecté
- Le nombre de mérozoïte par schizonte
- La forme du gamétocyte
- Et autres inclusions dans les globules rouges infecté.

- Compter tous les globules rouges puis les globules rouges infectés dans au moins cinq champs. Calculer le pourcentage de globules rouges infectés.

-Une fois le comptage terminé, on calcule le nombre relatif de parasites par rapport au nombre de leucocytes et l'on exprime le résultat en « parasites par microlitre de sang», à partir d'une simple formule de mathématique :

$$\text{Nombre de parasites} \times 8000 / \text{Nombre de leucocytes} = \text{parasites par microlitre}$$

**Avantages**

- Technique rapide (diagnostic d'urgence)
- Diagnostic d'espèce

**Inconvénients**

- Peu sensible (problème pour les parasitémies faibles Seuil).

**3. Modes opératoires des automates :**

➤ **Analyses biochimiques:**

L'ALAT et la créatinine sérique ont été dosées sur le Pentra C200.

❖ **Matériels et réactifs:**

- L'appareil Horiba ABX Pentra C200
- L'imprimante
- Le plateau permettant de porter les différentes cassettes

- Les cassettes de réactifs de créatinine et d'ALAT
- Les cuvettes
- Le contrôle de qualité interne (normal et pathologique)
- Le calibrant
- Les échantillons (sérum)
- Gants et blouses
- Pipettes et embouts

- **Calibration et contrôle de qualité:**

La calibration et le contrôle de qualité quotidiens sont impératifs avant l'analyse des échantillons pour vérifier la performance de l'appareil.

- **Reconstitution du calibrant et des contrôles:**

- ❖ **Multical:**

Reconstituer le contenu du flacon de lyophilisat avec 3ml d'eau distillée, on laisse le flacon à la température ambiante pendant une demi-heure. Agiter avec douceur sans secouement pour éviter la formation de mousse. Retirer le bouchon du flacon, utiliser une pipette pour aliquoter un volume de 350 µl dans les tubes biocups jaunes.

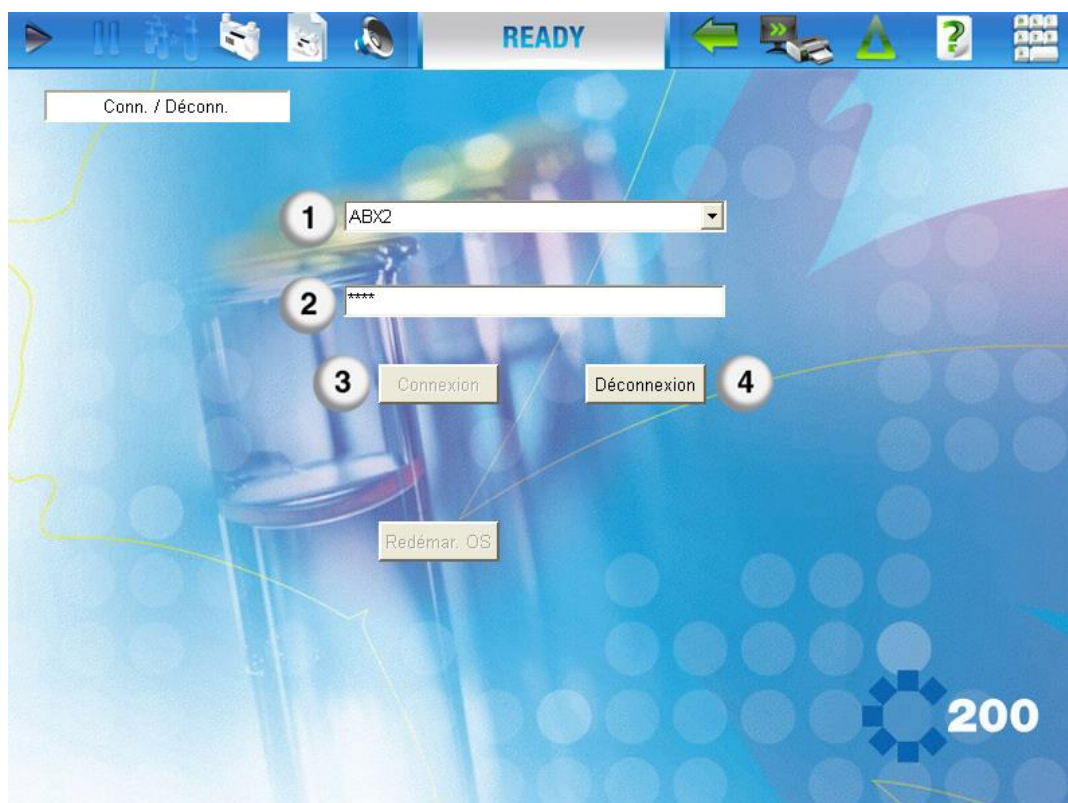
- ❖ **Contrôle:**

Reconstituer de la même manière que la multical cette fois-ci avec 5 ml d'eau distillée pour chaque flacon de lyophilisat (normal et pathologique). Aliquoter les contrôles à 350 µl dans les tubes biocups verts pour le contrôle normal et dans les tubes biocups bleus pour le contrôle pathologique. Après les aliquots qui ne doivent pas être utilisés dans l'immédiat sont congelés.

- **Démarrage de l'appareil:**

Il faut d'abord mettre l'imprimante en marche en appuyant sur le bouton power. Ensuite appuyer sur le bouton marche/arrêt de l'appareil ABX Pentra C200 situé sur la façade droite

- Attendre que l'écran s'allume et soit prêt à être utilisé
- Se connecter en utilisant ABX2 et le mot de passe
- Appuyer sur ok



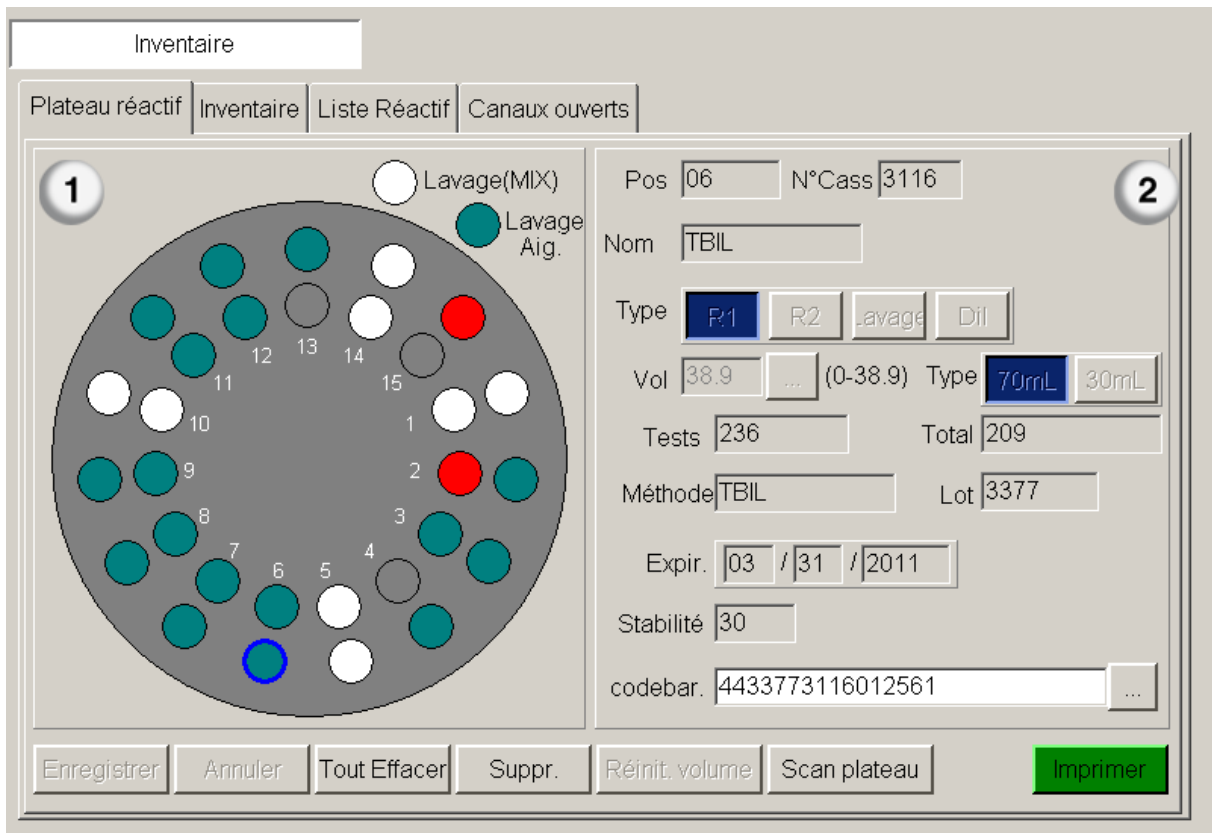
**Figure 14:** Ecran de l'appareil ABX Pentra C200 après la connexion

- Ensuite appuyer sur le bouton retour pour accéder à l'écran principal



**Figure15:** Ecran principal de l'appareil ABX Pentra C200

Après tous ceux-ci il faut procéder à la vérification des cuvettes, des cuvettes usagées, de la clé USB et la connexion de l'imprimante à l'appareil. Il faut également faire l'inventaire des réactifs, scanner les réactifs, la calibration et le contrôle de qualité vont suivre.



**Figure 16 :** Ecran de l'inventaire des réactifs

- **Calibration:**

Sélectionner une position vide dans la liste de travail.

- Sélectionner Multi-Standard (exemple) dans la liste déroulante Type.
- Sélectionner la catégorie d'échantillons (Commun) dans la liste déroulante Échantillon : Commun (exemple).
- Sélectionner MCAL (exemple) dans la liste déroulante MS.
- Sélectionner Complet pour une calibration complète ou le numéro du point de calibration pour une calibration à un point dans la liste déroulante N°.
- Sélectionner les tests à calibrer.
- Appuyer sur Enregistrer.

Un ID Ech automatique (950000XX) est attribué aux calibrant. L'appareil attribue automatiquement les positions adéquates pour des multipoints selon la calibration enregistrée pour chaque test.



- **Contrôle:**

- ❖ Sélectionner une position vide dans la liste de travail.
- ❖ Sélectionner Contrôle à partir de la liste déroulante Type.
- ❖ Sélectionner le contrôle approprié à partir de la liste déroulante Contrôle.
- ❖ Sélectionner les tests.
- ❖ Appuyer sur Enregistrer.

Un ID Ech automatique (970000XX) est attribué aux contrôles.

- Ouvrir le couvercle principal.
- Appuyer sur le bouton >> en dessous de la liste de travail.
- Charger le calibrant et les contrôles selon la liste de travail.
- Enlever le couvercle de l'Unité du Conteneur d'Échantillons et de Réactifs (SRCU).
- Charger les godets d'échantillon avec l'adaptateur sur le plateau d'échantillons.
- Après avoir vérifié toutes les conditions, appuyer sur le bouton démarrer pendant 2 secondes puis sur Ok si un message d'alarmes ne s'affiche pas.
- À la fin de l'analyse les résultats sont automatiquement imprimés.

- **Analyse des échantillons:**

Après un bon résultat de calibration et de contrôle qui certifie le bon fonctionnement de l'appareil on peut procéder à l'analyse des échantillons.

- **Centrifugation des échantillons:**

Les tubes vacutainer SST contenant le sang étaient centrifugés à 2300 tours par minutes pendant 15 minutes.

- **Principe de l'analyse:**

Quand un rayon lumineux traverse une solution, son intensité est réduite. La réduction en intensité lumineuse est liée à la longueur d'onde, la longueur du trajet et les caractéristiques de la solution à cette longueur d'onde (concentration de l'échantillon et absorption molaire).

L'absorbance à une longueur d'onde spécifique ( $A_\lambda$ ) d'une solution peut être déduite de la mesure de l'intensité de la lumière (I):

$$A_\lambda = -\log(I / I_0)$$

Dans le Pentra C200,  $I_0$  est l'intensité lumineuse à travers l'air et est mesuré sans cuvette avant chaque chargement de cuvette. L'absorbance est proportionnelle à la concentration:

$$A_\lambda = \epsilon \lambda \cdot l \cdot c$$

Où  $\epsilon$  est l'absorption molaire,  $l$  la longueur du trajet et  $c$  la concentration. Afin d'éviter les effets de certains défauts de cuvette, de variations d'intensité de la lampe et d'interférences d'échantillon, une seconde longueur d'onde peut être utilisée comme référence :

$$A_{Mes} = A_{\lambda 1} - A_{\lambda 2}$$

Le mode opératoire est le même aussi bien pour les contrôles que pour les échantillons.

➤ **L'hémogramme :**

Il a été réalisé avec les automates Becton Dickinson Coulter AC•T 5diff. Le système Coulter compte et mesure avec précision la taille des cellules sanguines. Le principe repose sur la détection de la charge électrique spécifique à chaque type de cellules. Les cellules sont mises en suspensions dans un conducteur fluide. A leur passage à travers un orifice, elles provoquent des vibrations mesurables. Le nombre de vibration indique le nombre de particules, chaque particule est identifiée par son amplitude de vibration, proportionnelle au volume de la particule. Le logiciel utilisé par le système Coulter AC•T 5diff compte non seulement les cellules sanguines mais aussi, donne un aperçu de la formule globulaire et des indices de distributions.

#### MATERIEL ET REACTIFS

- **Matériels :**

Blouses

Gants

Becton Dickinson Coulter AC•T 5diff CP

Imprimante

Compresse

Papier hygiénique

Homogénéisateur bidirectionnel

Baguettes

portoir

- **Les réactifs:**

AC•T 5diff Diluent,

AC•T 5diff Fix,

AC•T 5diff WBC Lyse,

AC•T 5diff Hgb Lyse,

AC•T 5diff Rinse et

Sang de contrôle.

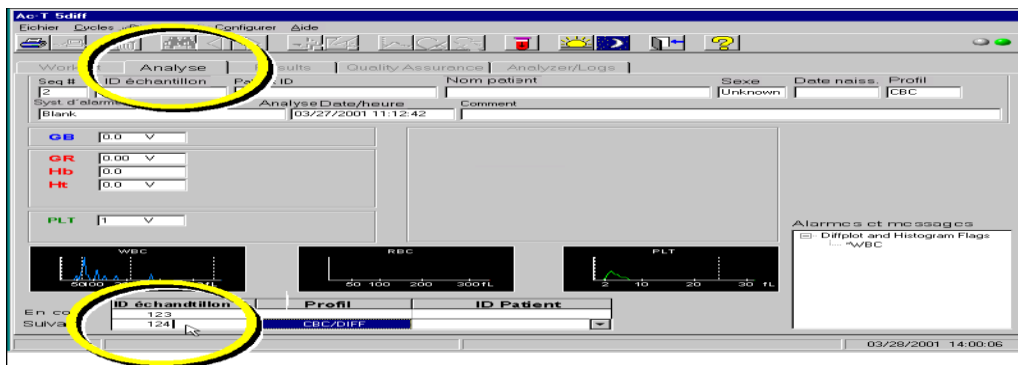
❖ **Contrôle de Qualité (CQ)**

Pour le premier usage d'un nouveau lot de contrôle, on utilise les instructions sur l'insert sheet du contrôle pour l'enregistrement des valeurs du contrôle.

a) Entrez l'identification du contrôle dans le champ ID échantillon Entrez manuellement le numéro de lot réservé au contrôle dans le champ ID échantillon de l'écran Analyse :

- sur l'onglet **Analyse**.
- Entrez le numéro de lot réservé au contrôle dans le champ ID échantillon suivant.

Ouvrez le fichier de contrôle approprié :



**Figure 17:** fenêtre d'enregistrement de contrôle

- sur l'onglet **Assurance QUALITE**
- Vérifiez les informations du fichier de contrôle. Faites défiler les analyses de contrôle si nécessaire afin d'afficher toutes les données.
- Si vous désirez consulter les graphes de Levey-Jennings, sélectionnez l'onglet approprié (faites défiler l'écran vers la droite si nécessaire) et double-cliquez sur le graphe pour l'agrandir.

**NB :** Les contrôles ne doivent pas rester plus de 30mn à la température ambiante, un temps de 15mn suffi pour qu'ils prennent la température du labo.

b) Homogénéisez par retournement au moins 8 fois de haut vers le bas et l'inverse pour chaque contrôle.

c) Inspectez le contenu du tube pour vous assurer que toutes les cellules sont uniformément distribuées et qu'il n'y a aucun signe de détérioration.

d) Veillez à ce que le tube soit dans la position de perçage (12 heures) dans le support de tubes.

Si non, faites tourner le support de manière à amener le tube dans cette position



**Figure 18:** Illustration de la position du tube sur porte échantillon

e) Fermez la porte du support de tubes. Les voyants rouge et vert clignotent :

Quand le voyant rouge reste allumé, le système est occupé à analyser l'échantillon. Quand le voyant vert reste allumé, l'instrument est prêt pour l'analyse suivante.

f) Examinez les résultats des contrôles pour vérifier qu'ils sont dans les plages acceptables avant d'analyser les échantillons. Si ce n'est pas le cas, retirez les résultats incorrects du fichier de contrôle et analysez le à nouveau

Si les résultats sont toujours en dehors des plages acceptables, Nettoyez le système (reportez-vous à la section *Système diluteur*) et répétez l'analyse du contrôle.

Si les résultats sont toujours en dehors des plages acceptables informez le responsable du labo. Les résultats du fichier de contrôle sont imprimés et garder dans le binder de l'appareil Analyses des Echantillons :

- **Identification des échantillons**

Lors de la collecte chaque échantillon est identifié par le numéro d'étude du volontaire, heure de prélèvement, le sexe et l'initial du préleveur.

L'analyse se porte sur un prélèvement veineux ou capillaire collecté dans un tube EDTA contenant comme anticoagulant entre 30min et 2 heures. les échantillons sont gardé entre 2 - 4 °C après 24h. tout échantillon au delà de 24heures n'est plus traitable.

L'ACT5Diff aspire 30 µl de sang entier en mode NUM et 53 µl de sang entier en mode NUM/DIFF.

L'instrument peut traiter jusqu'à 60 échantillons par heure en mode NUM ou NUM/DIFF dans les conditions normales.

- **Enregistrement dans l'appareil**

Le système peut enregistrer jusqu'à 10 000 fichiers

L'Instrument est configuré sur le mode de numérotation automatique des identifications, il attribue automatiquement un numéro d'identification d'échantillon (de 1 à 999999) et incrémente cette valeur avant chaque analyse.

- **l'analyse des échantillons :**


**1-Enregistrement des coordonnées des échantillons**

a. Appuyer sur l'onglet Résultats.

b. Vérifiez que l'archive courante est ouverte (arrière-plan blanc sur la liste de travail et la liste des résultats<sup>7</sup>). Si une ancienne archive est ouverte (arrière-plan vert), Appuyer sur Fichier Fermer archive.

c. Avec un nouveau protocole on crée une nouvelle archive.

**2-Appuyer sur l'onglet Liste de travail.**

**3-Appuyer sur ** pour ouvrir la fenêtre Ajouter/Modifier la liste de travail pour des informations sur la manière de changer le numéro de départ, reportez-vous à la section Changer le numéro de début de la numérotation automatique des ID des échantillons.



**4-Vérifiez que le numéro d'identification d'échantillon est correct :** Mettez le champ ID échantillon en surbrillance.

- Tapez le numéro d'identification d'échantillon désiré.



- Appuyez sur ENTER une fois le numéro entré.

- Vérifiez que le numéro d'identification d'échantillon est correct.

**5-Sélectionnez le profil NUM/DIFF :**


Appuyer sur , Sélectionnez NUM/DIFF puis Appuyez sur  (Tab) pour faire passer le curseur dans le champ Système d'alarmes

**6-Sélectionnez si nécessaire un autre Système d'alarmes :**

Appuyer sur  puis sur le système d'alarmes désiré. Ensuite Appuyez sur  (Tab) pour faire passer le curseur dans le champ Date et heure de prélèvement.

Le système d'alarme utilisé est la plage standard sauf en cas d'une autre exigence protocolaire.


**7-Entrez la date et l'heure auxquels l'échantillon a été prélevé puis Appuyez sur  (Tab)** pour faire passer le curseur dans le champ Commentaires.

**8-Entrez vos commentaires et appuyez sur  (Tab)** pour passer au champ ID patient.



**9-Entrez l'identification du volontaire**

NB : A ne pas confondre les deux paramètres ID :

-ID de l'échantillon constitue les échantillons du jour 1 à .....X/jour ne change pas jusqu' à fin de mois

-ID patient est propre au volontaire donc le numéro d'étude du volontaire Entrez manuellement l'identification du volontaire puis Appuyez sur  (Tab) pour passer au nom du volontaire.


**10-**Entrez le nom du patient (30 caractères alphanumériques et espaces au maximum)


**12-**Appuyez sur   (Tab) pour passer au champ Sexe du volontaire

**13-**Sélectionnez le sexe du volontaire

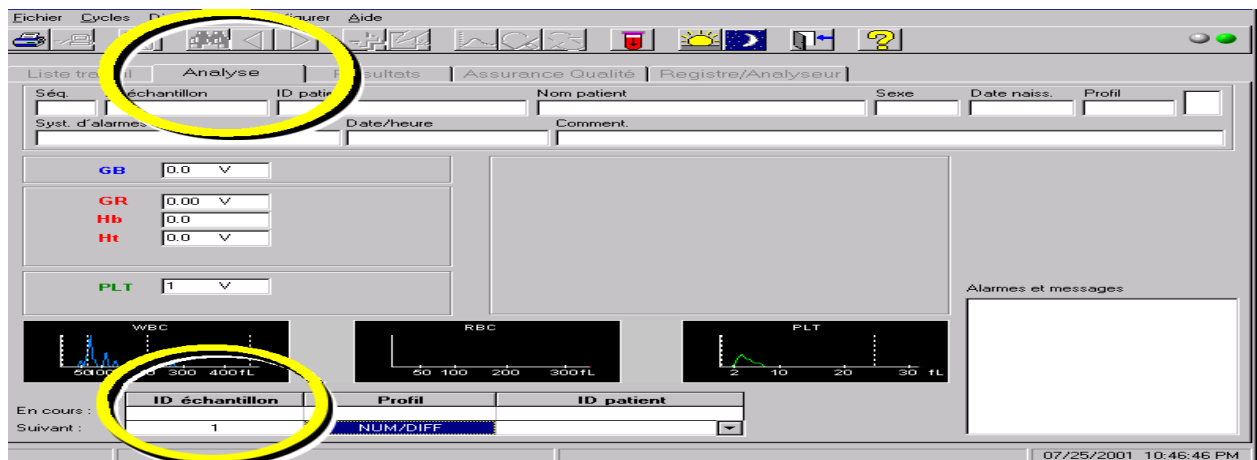
**15-**Entrez origine de l'échantillon(le site d'études)

**16-**Entrez l'origine du volontaire N/A.

**17-**Appuyer sur  pour enregistrer les informations et effacer la boîte pour pouvoir y ajouter des entrées supplémentaires.

**18-**Lorsque la dernière entrée a été ajoutée, appuyer sur  pour enregistrer et quitter l'écran.

**19- Appuyer** sur l'onglet Analyse. L'identification échantillon pour l'échantillon suivant à analyser apparaît dans le champ ID échantillon Suivant.



**Figure 19:** fenêtre d'analyse des échantillons

**20-** Homogénéisez avec soin la totalité de l'échantillon en respectant les 15mn sur agitateur ou tapote si micro tube, tout en s'assurant que l'échantillon est bien mélangé.

**21-**Vérifiez que l'identification échantillon du champ ID échantillon suivant correspond à l'échantillon à analyser.

**22-**Insérez le tube dans la position correcte du support de tubes (à 12h).

**23-**Fermez la porte du support de tubes pour commencer l'analyse.

**24-**Retirez le tube lorsque la porte du support de tubes s'ouvre automatiquement (après le Prélèvement). Le voyant rouge est toujours allumé, ce qui signifie que l'échantillon est toujours en cours d'analyse.

**25-**Attendez que le voyant vert s'allume, ce qui indique que le système est prêt pour l'analyse suivante. Les informations concernant l'échantillon suivant à analyser s'affichent dans le champ ID échantillon Suivant de l'écran Analyse.

**26-**Vérifiez que les résultats de l'échantillon en cours sont affichés dans la fenêtre Analyse. Examinez les résultats ceux anormaux seront analysés deux fois de suite pour confirmation, les actions correctives seront prises et documentées.

**27-**Vérifiez le numéro d'identification et les résultats de l'échantillon avant de faire le compte-rendu des résultats.

**28-**Appuyer sur  pour imprimer les résultats.

**29-**Vérifiez que le numéro d'identification de l'échantillon figurant dans le champ d'identification de l'échantillon suivant est correct.

**30-**Répétez les étapes 21 à 29 jusqu'à ce que tous les échantillons soient analysés.

#### ❖ EXAMEN DES RÉSULTATS

Tous les résultats doivent être examinés paramètre par paramètre avant de les rendre ou de les archiver.

Surtout faire le frottis mince pour le manuel count lorsque l'appareil donne une interprétation impossible.

#### ❖ LIMITES DE LA PROCEDURE

##### Les exigences opératoires:

- Température de la salle, comprise entre 18 et 30°C
- Taux d'humidité de la salle, comprise entre 30 et 85% (sans condensation)
- Voltage compris entre 220 et 240 V

##### Les exigences de l'échantillon:

- Sang total sur anticoagulant: EDTA,
- Le résultat optimum est obtenu entre 30mn et 2 heures.
- Garder les prélèvements à la température ambiante en cas de nécessité vérifier la numération des plaquettes.
- Garder les prélèvements à 4 °C au réfrigérateur **après** analyse pour d'éventuels cas de besoin.

#### ❖ Supports

- Feuille de paillasse: AcT Corrective Action Log Sheet
- Les supports d'impression des résultats
- Fiche de report des résultats critique

## SERMENT DE GALIEN

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

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

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

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

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

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

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

Je le jure!